

Krzysztof Siałek

WPLYW KWASU DWUHOMOGAMMALINOLENOWEGO /DHLA/ NA
CZYNNÓŚĆ ZLEPNĄ PŁYTEK KRWI I ZACHOWANIE SIĘ
NADTLENKÓW LIPIDÓW W SUROWICY KRWI U CHORYCH
NA MIAŻDŻYCĘ TĘTNIC

Klinika Alergii i Immunologii
IMW Akademii Medycznej w Krakowie

Kierownik Kliniki i promotor pracy:
Prof. dr hab. med. Andrzej Szczeklik

Bibl. Medyczna CM UJ



1816095561

Kraków - 1982

S P I S T R E Ś C I
=====

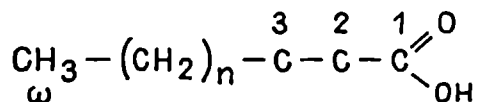
I. Wprowadzenie	str.	3
1. Wielonienasycone kwasy tłuszczowe	str.	3
2. Kwas arachidonowy, tromboksan i prostacyklina	str.	7
3. Płytki krwi i ich agregacja	str.	9
4. Upośledzenie biosyntezy prostacykliny	str.	11
5. Zastosowanie lecznicze prostacykliny i próby farmakologicznej ingerencji w metabolizm kwasu arachidonowego	str.	12
6. Kwas eikozapentaenowy i dwuhomogamma- linolenowy	str.	13
II. Założenia i cel pracy	str.	15
III. Chorzy i metody badania	str.	17
1. Charakterystyka badanych chorych	str.	17
2. Sposób przeprowadzania badań	str.	18
3. Oznaczenia laboratoryjne	str.	18
IV. Wyniki badań	str.	23
V. Omówienie wyników	str.	27
VI. Wniosek	str.	37
VII. Streszczenie	str.	38
VIII. Tabele	str.	41
IX. Piśmiennictwo	str.	46

I. W P R O W A D Z E N I E

1. Wielonienasycone kwasy tłuszczowe

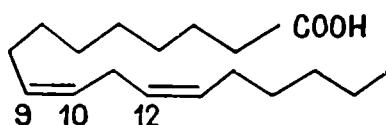
Wielonienasycone kwasy tłuszczowe od kilkunastu lat znajdują się w centrum zainteresowania medycyny. Stanowią one bowiem nie tylko materiał energetyczny i budulcowy, lecz są także substancjami macierzystymi dla syntezy wielu związków o silnej aktywności biologicznej, na przykład prostaglandyn czy leukotrienów. U człowieka i ssaków występują cztery rodziny kwasów wielonienasyconych / 62 /. Różnią się one między sobą liczbą atomów węgla i ilością podwójnych wiązań. Nazwy tych grup wywodzą się od ich głównych prekursorów, to jest: kwasu palmitylowego, olejowego, linolowego i linolenowego. Wszystkie pozostałe wielonienasycone kwasy tłuszczowe, znajduwane u człowieka, powstają w reakcjach odwodorowania lub wydłużenia łańcucha ww. kwasów.

Kwas linolowy /18:2 ω 6/ i linolenowy /18:3 ω 3/ nie są syntetyzowane w organizmie człowieka, lecz dostarczane są z pożywieniem. Dlatego określa się je mianem niezbędnych kwasów tłuszczowych / EFA - Essential Fatty Acids /. Kwasy tłuszczowe serii ω 6 / rys. nr 4 /, w tym kwas linolowy / rys. nr 2 / i jego pochodny kwas dwuhomogammalinolenowy / rys. nr 3 / i arachidonowy / rys. nr 5 / występują przede wszystkim w tłuszczach roślinnych. Na przykład oleje słonecznikowy i kukurydziany czy sojowy zawierają wśród innych kwasów ponad 50% kwasu linolowego /11/. Natomiast seria ω 3 / rys. nr 4 / wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, na przykład kwas linolenowy i eikoza -



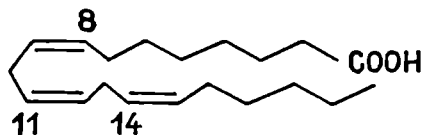
Rys. nr 1: Ogólny schemat kwasu tłuszczowego

/ Numeracja atomów węgla w cząsteczce kwasu tłuszczowego określana jest począwszy od węgla grupy karboksylowej COOH. Pozycję podwójnego wiązania oznacza symbol Δ oraz liczba określająca kolejność atomu węgla, przy którym wiązanie to występuje. Cyfra umieszczona przy literze ω np. ω 3 lub ω 6 wskazuje ile atomów węgla dzieli ostatnie wiązanie nienasycone od końcowej grupy metylenowej CH₂. /



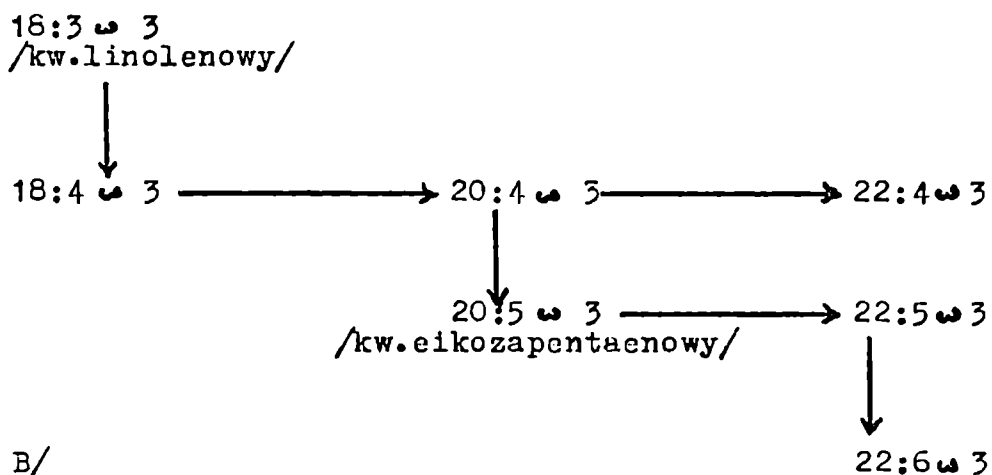
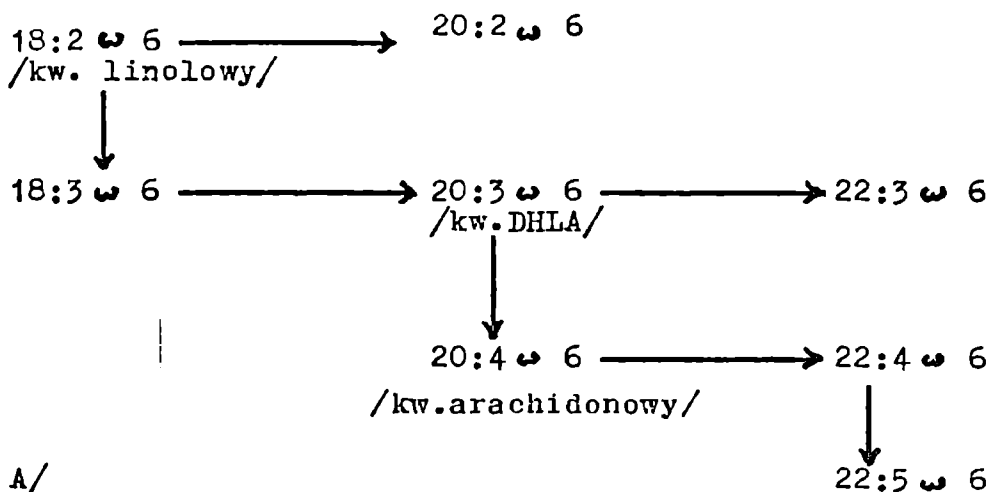
Rys. nr 2: Kwas linolowy 18:2 ω 6

/ kw. Δ -9,12 oktaukadienowy /

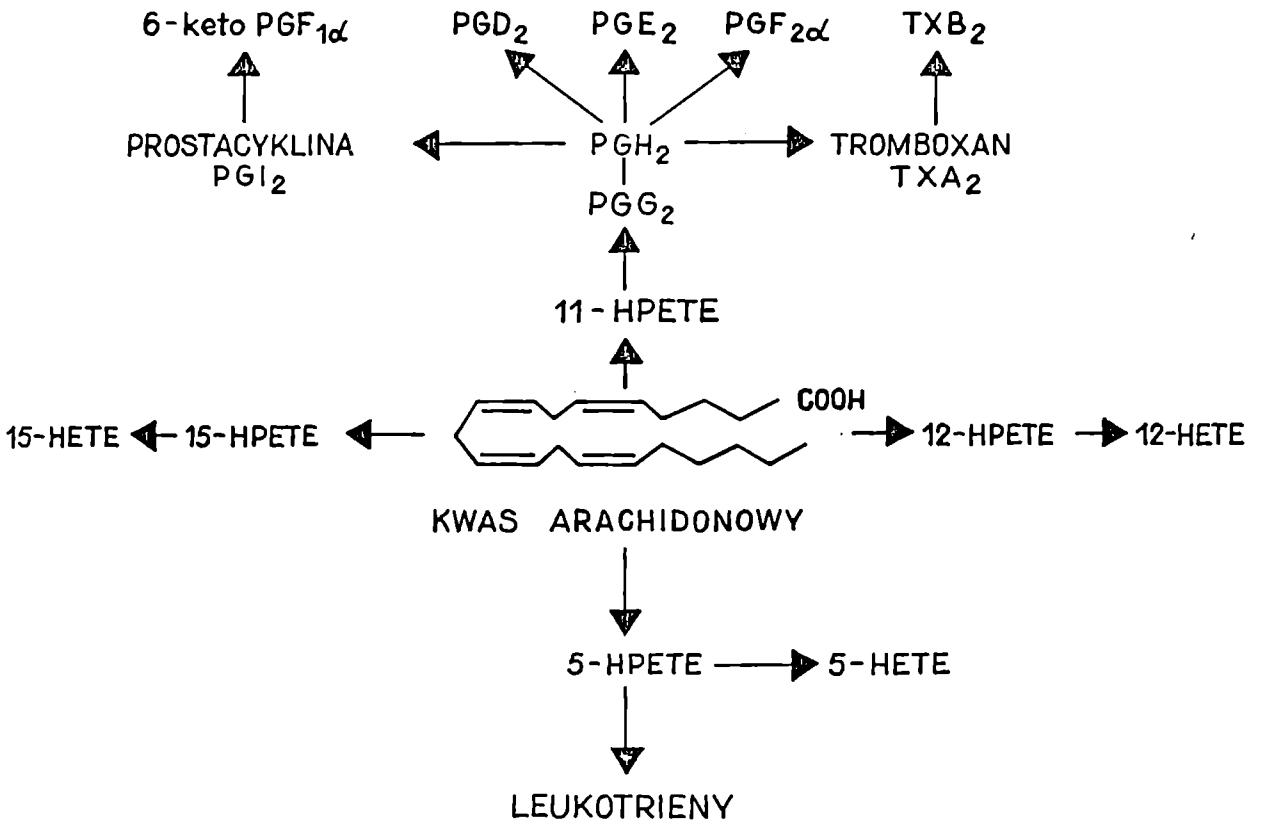


Rys. nr 3: Kwas dwuhomogammalinolenowy - 20:3 ω 6

/ kw. Δ -8,11,14 eikozatrienowy /



Rys. nr 4: Przemiany nienasyconych kwasów tłuszczowych serii ω 6 wywodzących się od kwasu linolowego /A/ oraz serii ω 3 wywodzących się od kwasu linolenowego /B/.



rys. nr 5: Przemiany kwasu arachidonowego

pentaenowy znajdują się w glonach morskich i fitoplanktonie, będących pożywieniem skorupiaków, ryb morskich czy fok / 11 /. Uważa się, że niezbędne kwasy tłuszczowe powinny stanowić około 1 % dobowego zapotrzebowania kalorycznego człowieka / 62 /.

Wielonienasycone kwasy tłuszczowe wchodzi przede wszystkim w skład fosfolipidów błon komórkowych, stanowiąc o ich prawidłowej budowie i funkcji. W ustroju ssaków kwasy te są również produktami wyjściowymi do syntezy eikozanoidów, tzn. prostaglandyn i leukotrienów.

2. Kwas arachidonowy, tromboksan i prostacyklina

Głównym źródłem do syntezy eikozanoidów jest kwas arachidonowy /20:4 ω 6/. Łącznie ze swoim trienowym analogiem - kwasem dwuhomogammalinolenowym /20:3 ω 6/ - stanowi on najważniejszy zwierzęcy produkt elongacji i desaturacji roślinnego kwasu linolowego. Kwas arachidonowy obecny jest w błonie każdej komórki, skąd uwalniany jest pod wpływem swoistej fosfolipazy A₂. Następnie pod wpływem cyklooksygenazy przekształcany jest on do nietrwałych cyklicznych nadtlenków prostaglandynowych PGG₂ i PGH₂, z których powstają prostaglandyny oraz tromboksan i prostacyklina / rys. nr 5 /. W płytkach, tkance płucnej czy w leukocytach wolny kwas arachidonowy stanowi również substrat dla biosyntezy tzw. liniowych nadtlenków, głównie kwasu 12-hydroperoksyarachidonowego /12-HPETE/ i odpowiedniego hydroksykwasu /12-HETE/ o właściwościach chemotaktycznych w stosunku do leukocytów oraz kwasu 5-hydroperoksyarachidonowego /5-HPETE/. Na tej ostatniej drodze syntetyzowane

są leukotrieny A, B, C, D i E, z których LTC₄, LTD₄ i LTE₄ odpowiadają wolnodziałającej substancji anafilaktycznej / SRS-A, Slow Reacting Substance of Anaphylaxis // 77,94/.

W układzie krążenia najważniejszymi produktami enzymatycznych przemian kwasu arachidonowego są: w płytkach krwi - tromboksan, a w ścianie naczyniowej - prostacyklina. Tromboksan / TXA₂ / odkryty przez Samuelsona w 1975 roku jest substancją silnie agregującą płytki krwi i kurczącą tętnice / 81 /. Jego okres półtrwania wynosi ok. 30 sek. w temperaturze 37°C. Powstaje on głównie w płytkach krwi, a także w płucach i w śledzionie. TXA₂ obniża poziom cAMP w płytkach, stymuluje mobilizację Ca⁺⁺ i w ten sposób powoduje agregację płytek krwi / 74, 81 /. Tromboksan ulega samoistnemu rozkładowi do trwałego, nieaktywnego związku TXE₂. Antagonistą tromboksanu jest odkryta przez Gryglewskiego i wsp. prostacyklina / PGI₂ /, która syntetyzowana jest w śródbłonku naczyń / 35, 38, 40 /. U ludzi prostacyklina rozszerza naczynia krwionośne, działając głównie na mięśniówkę gładką tętniczek oraz hamuje agregację płytek krwi i rozprasza krążące zlepy płytkowe / 28, 78, 137/. Pozostaje ona w krążeniu stosunkowo krótko, spontanicznie bowiem rozpada się do nieaktywnej 6-keto PGF_{1α}. Okres połowicznego rozpadu PGI₂ przy 37°C wynosi około 3 min. Według Mc Giffa i wsp. w wątrobie 6-keto PGF_{1α} może być enzymatycznie przekształcona do biologicznie aktywnej 6-keto PGE₁, która miałaby spełniać niektóre funkcje prostacykliny / 70, 132, 133 /.

Prostacyklina, będąc fizjologicznym antagonistą trom-

boksanu utrzymuje hemostazę w układzie krążenia. Osłania ona śródbłonek naczyniowy przed "lądowaniem" na nim płytek krwi i uwalnianiem tromboksanu. Działanie prostacykliny łączymy z aktywacją cykazy adenyłowej i zwiększeniem puli wewnątrzkomórkowego cAMP, co powoduje zahamowanie agregacji płytek poprzez blokadę uwalniania jonów Ca^{++} / 4 /.

Natomiast, powstające również z kwasu arachidonowego, klasyczne prostaglandyny na przykład PGE_2 i $PGF_2\alpha$ pełnią w układzie krążenia drugorzędną rolę. Rozkurczowe działanie PGE_2 , skurczowe działanie $PGF_2\alpha$ na naczynia oraz antyagregacyjne działanie PGD_2 są bowiem raczej wynikiem ich farmakologicznego wpływu na układ krążenia w przeciwieństwie do fizjologicznego działania prostacykliny.

3. Płytki krwi i ich agregacja

Głównym obiektem działania prostacykliny i tromboksanu jest płytka krwi. Ten bezjądrzasty fragment cytoplazmy megakariocyta pełni ważną rolę w hamowaniu krwawienia z uszkodzonego naczynia / 55 /. Jest to działanie wielokierunkowe, polegające na: wytworzeniu pierwotnego zakrzepu na drodze adhezji i agregacji, aktywacji osoczowego układu krzepnięcia, a wreszcie - zapoczątkowanie odnowy i naprawy zranionego naczynia, przez uwolnienie czynnika mitogennego, który pobudza migrację i wzrost elementów komórkowych. Płytką zawiera mitochondria, mikrofilamenty z kurczliwej trombocysteiny, pęcherzyki lizosomalne oraz dwa typy ziarnistości. W ziarnistościach al-

fa gromadzony jest czynnik płytkowy 4 /PF₄/, betatromboglobulina, fibrynogen, czynnik mitogeny Rossa. Natomiast ciała gęste /"dense bodies"/ bogate są w ADP, ATP, serotoninę i Ca⁺⁺. Zawartość ciałek gęstych jest szybko uwalniana przez ADP i adrenalinę. Enzymy lizosomalne są natomiast łatwiej uwalniane podczas kontaktu płytki z kolagenem lub trombiną. Zawartość ziarnistości alfa przenika do otoczenia równocześnie ze składnikami ciałek gęstych czy lizosomalnych lub niekiedy niezależnie od nich. Różne substancje wywołują reakcję uwalniania ziarnistości i agregację płytek krwi. Kontakt płytki z włóknem kolagenowym lub mikroelementami odsłoniętymi przy uszkodzeniu śródbłonna prowadzi do zmian błonowych, adhezji i aktywności płytki. Kurcząca się trombocysteina powoduje zmianę kształtu trombocyta z dyskowatego na kulisty, następnie pojawiają się pseudopodia. Zawartość ziarnistości zostaje wydalona na zewnątrz płytki, co stanowi bodziec do agregacji.

Agregacja może być wywołana przez ADP, trombinę, kompleks antygeny z przeciwciałem, adrenalinę. W początkowej fazie agregacja jest jeszcze odwracalna, jeśli jednak bodziec, który wywołał pierwotną agregację płytek jest dostatecznie silny, uwolniony zostaje endogenny ADP i TXA₂, agregacja przechodzi w fazę drugą - nieodwracalną. Płytki zlewają się ze sobą, zacierają się granice między nimi. Płytki odgrywają również istotną rolę w osoczowej fazie krzepnięcia, uwalniając podczas agregacji płytkowy czynnik 3 / 8 /.

W czasie wydzielania ziarnistości alfa z płytek uwalniane są ich swoiste białka. Przykładem jest czynnik płyt-

kowy 4 /PF₄/, który unieczynnia przypuszczalnie heparynę i chroni uruchomioną kaskadę krzepnięcia przed zahamowaniem. Beta-tromboglobulina natomiast wiąże się do swoistego receptora śródbłonkowego i jak się wydaje wywiera hamujące działanie na generację w nim prostacykliny /79/. Biażko mitogenne, zwane również czynnikiem Rossa, pobudza wzrost zarówno miocytów warstwy środkowej tętnic, jak i fibroblastów tkanki łącznej i ułatwia ich wędrówkę do wewnętrznej błony naczyniowej / 41,93 /. Może to mieć znaczenie nie tylko w procesie naprawy uszkodzonego fragmentu ściany naczyniowej, ale i w rozwoju blaszki miażdżycowej / 41 /. Substancje hamujące reakcję uwalniania z płytek zawartości ich ziarnistości, w tym prawdopodobnie również prostacyklina, zapobiegałyby rozwojowi miażdżycy.

4. Upośledzenie biosyntezy prostacykliny

Pomiędzy płytką krwi a ścianą tętnicy istnieje równowaga uwarunkowana ilością produkowanej prostacykliny i tromboksanu. Prostacyklina ochrania śródbłonek tętnic przed przyleganiem i agregacją płytek krwi i uwolnieniem tromboksanu. Wysunięto przypuszczenie /R. Gryglewski, A. Szczeklik - 1978 /, że miażdżyca zaczyna się wówczas, gdy ustaje lub jest zmniejszona produkcja PGI₂ /39/. Prace Sinzinger dowodzą, że w ścianie tętnic chorych z rozwinętą miażdżycą ilość PGI₂ jest zmniejszona / 21, 108 /.

Silnymi inhibitorami syntetazy prostacykliny są liniowe nadtlenki, powstające bądź spontanicznie, bądź na drodze enzymatycznej przez utlenienie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Peroksydację lipidów zapoczątkowuje:

promieniowanie jonizujące, toksyczny czterochlorek węgla, wysokie stężenie tlenu; zachodzi ona również podczas starzenia się komórek. Powstające tzw. wolne rodniki $/OH, O_2^-, O_2 /$ są bardzo reaktywnymi ugrupowaniami chemicznymi, które ułatwiają utlenienie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych do hydro- i nadtlenków. Te z kolei są związkami nietrwałymi i spontanicznie ulegają rozkładowi do mono- i dwualdehydów. Spośród nich malonylodwualdehyd $/MDA/$ uważany jest za najważniejszy metabolit tego destrukcyjnego procesu. W surowicy krwi najwyższą skłonność do peroksydacji i tworzenia nadtlenków lipidów wykazuje frakcja lipoproteinów niskiej gęstości $/LDL /$. Ona też najsilniej hamuje biosyntezę prostacykliny $/118 /$.

5. Zastosowanie lecznicze prostacykliny i próby farmakologicznej ingerencji w metabolizm kwasu arachidonowego

Odkrycie prostacykliny i poznanie jej właściwości pozwoliło w krótkim czasie na jej syntezę w laboratorium. Szybko też wprowadzono ją do terapii. Uzyskano pozytywne efekty stosując prostacyklinę w leczeniu miażdżycy kończyn dolnych $/117, 46 /$, w leczeniu objawów spoczynkowej dławicy piersiowej $/119, 120, 121 /$ i w zakrzepicy żyły śródkowej siatkówki $/139 /$. Istnieją również próby zastosowania jej celem zapobieżenia wykrzepiania się w drenach w krążeniu pozaustrojowym $/31, 46, 134 /$. Prowadzone są także badania dotyczące wpływu leczniczego związków zmieniających — cych metabolizm endogennego kwasu arachidonowego $/np. aspiryna, indometacyna czy sulfinpyrazon// 2, 36, 37 /$. Kilku-letnie próby wykazały skuteczność $/50\% /$ stosowania sulfinpyrazonu jako ochrony przed wystąpieniem powtórnego zawału

serca / ART - Anturan Reinfarction Trial / / 123 /. Intensywnie poszukiwane są również syntetyczne inhibitory syntetazy tromboksanu.

6. Kwas eikozapentaenowy i kwas dwuhomogammalinolenowy

Na metabolizm wielonienasyconych kwasów tłuszczowych można wpływać przy pomocy leków lub diety. O stosunkach bowiem ilościowych między produktami przemian kwasów nienasyconych decyduje samo stężenie tych kwasów w organizmie.

W ostatnich latach wysunięto przypuszczenie, że rzadkie występowanie zawałów serca u Eskimosów, żyjących w północno-zachodniej Grenlandii, zależy od wysokiego poziomu kwasu eikozapentaenowego /20:5 ω 3/ i niskiego poziomu kwasu arachidonowego w fosfolipidach ich osocza i tkanek /22, 23, 24, 49 /. Kwas eikozapentaenowy /EPA/ jest głównym składnikiem tranu i mięsa ryb, którymi żywią się grenlandzcy Eskimosi. Natomiast w pożywieniu ich praktycznie nie występuje kwas linolowy czy arachidonowy / 22, 26 /. EPA powstaje drogą desaturacji i elongacji łańcucha kwasu linolenowego / 48 /. Ludzki organizm posiada małą zdolność takich przemian. Człowiek może ten kwas przyswajać głównie z pożywieniem / 11, 25, 27 /. EPA zawarty w tłuszczu ryb morskich zastępuje endogenny kwas arachidonowy w płytkach, gdzie powstaje nieaktywny tromboksan A_3 zamiast toksycznego tromboksanu A_2 . W ścianie naczyń natomiast syntetyzowana jest z kwasu EPA prostacyklina I_3 o podobnych właściwościach do PGI_2 / 82, 86 /. Uważa się również, że EPA może współzawodniczyć z TXA_2 i PGH_2 o proagregacyjne receptory na błonie komórkowej płytki / 41 /. Zwiększone spożycie kwasu EPA wiedzie do jego wzrostu w fosfolipidach płytko-

wych i osoczu ludzkim przy równoczesnym spadku stężenia kwasu arachidonowego. Prowadzi to do zmniejszenia zdolności płytek do agregacji / 10,34,96,104,124 /, zmniejszenia lepkości krwi / 59 /, wydłużenia czasu krwawienia / 104,124 / i obniżenia generacji tromboksanu A_2 / 104/. U szczurów, otrzymujących pożywienie wzbogacone kwasem linolenowym i jego pochodnymi, zauważono redukcję płytkowego tromboksanu A_2 , naczyniowej prostacykliny I_2 oraz samego kwasu arachidonowego w osoczu / 50,52 /. Zjawiska te może tłumaczyć kompetetywne hamowanie utleniania kwasu arachidonowego do tromboksanu A_2 przez kwas eikozapentaenowy / 16, 17, 55 /.

Kwas dwuhomogammalinolenowy /20:3 ω 6/ podobnie jak kwas arachidonowy powstaje z kwasu linolowego. Jest on prekursorem prostaglandyn serii pierwszej, z których PGE_1 silnie hamuje agregację płytek krwi i rozszerza naczynia krwionośne / 76 /. Prostaglandyna E_1 działa poprzez cAMP podobnie jak prostacyklina / 4 /. Obie te substancje prawdopodobnie rywalizują o zajęcie tego samego receptora na błonie płytki / 98, 103, 128 /. PGE_1 wykazuje zaledwie około 5% antyagregacyjnej aktywności prostacykliny / 76 /. W płytkach krwi z dostarczonego kwasu dwuhomogammalinolenowego /DGLA/ pod wpływem cyklooksygenazy powstaje cykliczny nadtlenuk PGH_1 , który następnie nie przemienia się - jak można by się spodziewać - w tromboksan A_2 , lecz w nieaktywny biologicznie kwas 12-hydroperoksyheptadekadienowy /12-HHD//82/. Reakcję tę katalizuje syntetaza tromboksanu.

II. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

=====

W ostatnich latach odkryto przemiany kwasu arachidonowego i poznano właściwości biologiczne jego metabolitów. Duże zainteresowanie wzbudziły możliwości farmakologicznej lub dietetycznej ingerencji w przemiany tego kwasu. Zmierzają one do takiego sterowania przebiegiem reakcji chemicznych, aby zwiększyć stężenie korzystnych w danym schorzeniu metabolitów kwasu arachidonowego, kosztem metabolitów niekorzystnych. W badaniach dietetycznych dużą uwagę poświęcono ostatnio kwasowi eikozapentaenowemu / 22,23,24,25,26,27,104,124 /. Kwas dwuhomogam—malinolenowy / DHLA / wydaje się w tym względzie co najmniej tak samo interesujący. Metabolitami jego są bowiem prostaglandyny serii pierwszej, spośród których prostaglandyna E_1 silnie hamuje zlepianie się płytek krwi. Sam DHLA nie powoduje - zdaniem wielu autorów - agregacji płytek / 56, 106 /. W przeciwieństwie do kwasu arachidonowego miałby bowiem nie powstawać z niego w płytkach krwi tromboksan, lecz nieaktywna substancja: kwas 12—hydroksoheptadekadienowy / 82, 130 /. Tak więc teoretycznie wzbogacenie pożywienia w DHLA winno być w miażdżycy zjawiskiem korzystnym. Płytki krwi, którym przypisuje się tak ważną rolę w powstawaniu miażdżycy tętnic wytwarzałyby więcej antyagregacyjnej prostaglandyny E_1 oraz mniej proagregacyjnego tromboksanu.

Celem pracy jest odpowiedź na pytanie: czy DHLA dodany do pożywienia zmniejsza czynność zlepną płytek, a jeśli tak, to czy zjawisko to wiąże się z upośledzeniem

produkcji tromboksanu A_2 ?

Ponadto badania winny udzielić odpowiedzi na pytanie: czy i jak zmienia się pod wpływem DELA peroksydacja lipoproteidów surowicy krwi, które regulują syntezę prostacykliny przez ścianę tętnicy ?

III. CHORZY I METODY BADANIA

=====

1. Charakterystyka badanych chorych

Badania przeprowadzono u 33 mężczyzn w wieku od 37 do 70 lat / średnia wieku 55,5 lat /, którzy z powodu miażdżycy zarostowej tętnic kończyn dolnych leczeni byli w Klinice Alergii i Immunologii oraz w Oddziale Farmakologii Klinicznej Akademii Medycznej w Krakowie. Rozpoznanie ustalono w oparciu o typowy wywiad, badanie fizyczne i oscylometrię oraz potwierdzono przy pomocy arteriografii miednicowo-kończynowej /wykonano ją u 16 chorych /, bądź pletyzmografii okluzyjnej / u 17 osób / /tabela nr 1/. Ponadto u 11 chorych stwierdzono chorobę wieńcową / pięciu przebyło zawał serca /, u 7 chorobę nadciśnieniową, u 5 cukrzycę, a u 2 chorobę wrzodową. U wszystkich pacjentów dominowały objawy chromania przestankowego. Ich czas trwania wynosił od pół roku do dwunastu lat / średnio - 5 lat /. Dwie osoby skarżyły się ponadto na spoczynkowe bóle nóg, a u jednej obecne było niedokrwienne owrzodzenie stopy. Wszystkie 33 osoby leczone były dotychczas środkami farmakologicznymi. Chirurgicznie leczonych było wcześniej 6 osób, którym wykonano sympatektomię, endarterektomię lub amputację kończyny. Siedmiu chorych otrzymało przed ponad rokiem wlewy dotętnicze prostacykliny.

Wszyscy chorzy przez cały okres badań przebywali na normalnej szpitalnej diecie oraz nie otrzymywali żadnych dodatkowych leków, które wpływałyby na czynność zlepną płytek krwi.

2. Sposób przeprowadzania badań

Badania przeprowadzono przestrzegając warunków podwójnie ślepej próby. Przez cztery tygodnie 23 osoby otrzymywały DHLA, a 10 osób placebo. Kapsułki produkcji Roche / Anglia / zawierały 250 mg czystego kwasu DHLA. Placebo stanowiły identycznie wyglądające kapsułki produkcji tej samej firmy farmaceutycznej. W obu rodzajach kapsułek znajdowały się również: 0,01 % BHA /hydroksybutyloanisol/ i 0,01 % BHT /hydroksybutylotoluen/ - syntetyczne związki o właściwościach antyoksydacyjnych. Badani przyjmowali cztery razy dziennie jedną kapsułkę DHLA lub placebo. Podawany kwas tłuszczowy był dobrze tolerowany i nie powodował żadnych objawów ubocznych.

Krew do badań pobierano od chorych będących na czczo w dzień przed rozpoczęciem obserwacji, w 28 dniu, a w niektórych oznaczonych parametrach w 14 dniu podawania DHLA /tabela nr 2 /.

3. Oznaczenia laboratoryjne

U wszystkich chorych wykonano następujące badania:

- A/ próg agregacji płytek krwi na ADP i kolagen,
- B/ liczba krążących agregatów płytkowych,
- C/ produkcja tromboksanu A_2 przez osocze bogatopłytkowe pod wpływem stymulacji kolagenem,
- D/ stężenie nadtlenków lipidów w lipoproteidach surowicy krwi /LDL i VLDL /,
- E/ oznaczenie hamowania produkcji prostacykliny przez ścianę aorty szczura pod wpływem otrzymanej frakcji lipoproteidów / LDL i VLDL /,

F/ stężenie cholesterolu w surowicy krwi oraz we frakcji LDL i VLDL,

G/ oznaczenie poziomu kwasu dwuhomogammalinolenowego i arachidonowego w błonie komórkowej erytrocytów,

H/ stężenie trójglicerydów, glukozy, mocznika, kreatyniny, bilirubiny, kinazy kreatynowej i fosfatazy alkalicznej w ramach wykonywanych badań klinicznych.

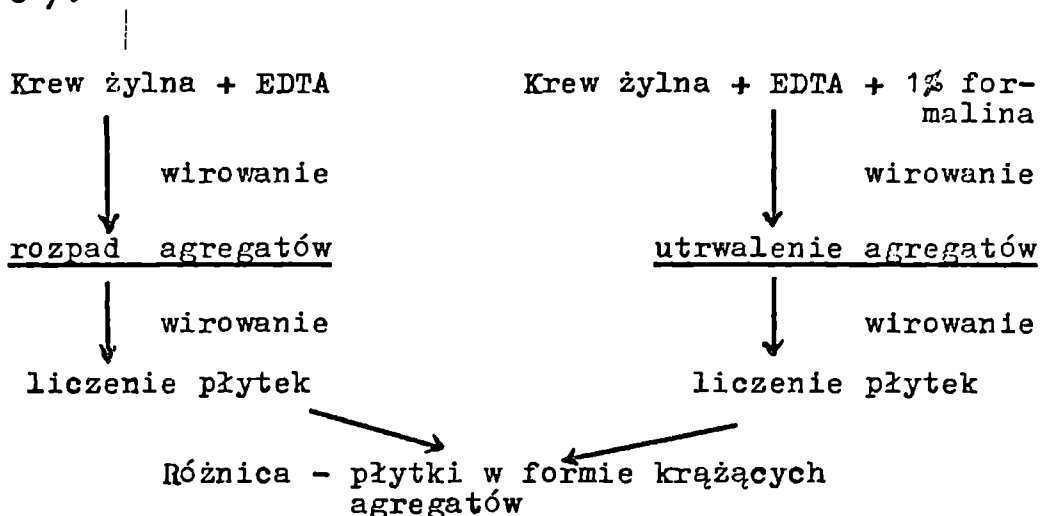
Ad A/

Pobraną krew żylną z 3,8% cytrynianem sodu wirowano przez 10 minut przy 200 g uzyskując osocze bogatopłytkowe /PRP - platelet rich plasma/. Natomiast osocze ubogopłytkowe /PPP - platelet poor plasma/ uzyskiwano wirując kilka mililitrów krwi przez 20 minut przy 2000 g. Ilość płytek w PRP sprowadzono do stałej wartości 2×10^8 komórek w mm^3 . Badania przeprowadzono według metody Borna / 7 / przy użyciu agregometru model 330, Chrono-Log CO. /USA/. Agregację 0,5 ml PRP przy stałej temperaturze 37°C wywoływano stosując 0,2 - 10 μM ADP /SIGMA - USA /i 0,2 - 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kolagenu / Horm - RFN /. Próg agregacji dla ADP określano jako najniższe stężenie użytego ADP wywołujące dwufazową nieodwracalną agregację. Natomiast dla kolagenu progiem agregacji było najniższe stężenie kolagenu powodujące nieodwracalną agregację w ciągu 4 minut.

Ad B/

Liczbę krążących agregatów płytkowych w oparciu o metodę Wu i Hoak'a oznaczano jako różnicę w liczbie płytek krwi zawartych w dwóch roztworach krwi żyłnej z E D T A / 29, 135 /. W jednym z roztworów agregaty płytkowe ule-

gały utrwaleniu pod wpływem dodawanej 1% formaliny / rys. nr 6 /.



Rys. nr 6. Schemat badania liczby krążących agregatów

Ad C/

Biologiczna metoda badania generacji tromboksanu A_2 w osoczu bogatopłytkowym przy stałej ilości płytek 2×10^8 w mm^3 polega na mierzeniu kurczenia się mięszu płuca świnki morskiej pod wpływem dodawanego kolagenu w stężeniach: 2, 30 i 50 $\mu g/ml$ / 40,111 /. Fragment tkanki płuca przepłukiwany był stale natlenionym /95% O_2 i 5% CO_2 / buforem Krebsa z szybkością 2,5 ml/min w stałej temperaturze $37^\circ C$. Reakcję rejestrowano przy pomocy izotonicznych przekaźników typu Harvard połączonych z sześciokanałowym poligrafem typu Watanabe. Wynik porównywano ze skurczem tkanki płuca spowodowanym przez 11,9-epoksymetano-analogiem PGH_2 /EMA// 65 /. Generację tromboksanu określano w nanogramach ekwiwalentów EMA na 1 ml dla każdego stężenia kolagenu.

Ad D/

Badanie przeprowadzono z użyciem kwasu tiobarbiturowego, który daje reakcję barwną z malonylodwualdehydem/MDA/, głównym metabolitem nadtlenków lipidów / 95 /. Frakcję lipoproteidów zawierającą LDL i VLDL uzyskano metodą strąceniową przy użyciu heparyny i $MnCl_2$ / 12 /. Stężenie MDA w nM/ml rejestrowano spektrofotometrem typu Pyeunicam 1700 B przy długości fali 532 nm. Otrzymane stężenie MDA przeliczano na 5 mg białka zawartego we frakcji lipoproteidów.

Ad E/

W tej biologicznej metodzie określano hamowanie generacji prostacykliny w ścianie aorty szczura przez inkubowanie jej z frakcją lipoproteidów lub roztworem 0,15 M $NaCl_2$ przez 2 godz. przy 4°C. Przemyte fragmenty ściany aorty szczura umieszczano następnie w 0,005 M buforze Tris o pH-8,2 przez 3 min. przy 37°C. Generację prostacykliny zawartą w roztworze oznaczano w porównaniu do znanej syntetycznej prostacykliny /Upjohn Co.Kalamazoo,USA/ na podstawie hamowania przez nie agregacji króliczego PRP /76/. Wyniki przedstawiono w procentach hamowania biosyntezy prostacykliny.

Ad F/

Stężenie cholesterolu w surowicy i w frakcjach lipoproteidów / LDL i VLDL / oznaczano według reakcji Liebermana-Burcharda / 6 /.

Ad G/

Analizę składu kwasów tłuszczowych w błonie komórkowej erytrocytów wraz z poziomem kwasu dwunomogamma-linolenowego i arachidonowego przeprowadziła firma Roche / Anglia / według metod poprzednio opisanych / 56, 115 /.

Ad H/

Stężenie trójglicerydów, glukozy, kreatyniny, bilirubiny, fosfatazy alkalicznej, kinazy kreatynowej, mocznika w surowicy krwi; wykonano w Zakładzie Chemii Klinicznej Akademii Medycznej w Krakowie stosując rutynowe metody oznaczeń.

Badania progów agregacji, generacji tromboksanów, stężenia MDA we frakcjach lipoproteidów oraz hamowania produkcji prostacykliny wykonane zostały przez Panią mgr Annę Żmudę w Zakładzie Farmakologii Akademii Medycznej w Krakowie / kierowanym przez prof. dr Ryszarda Gryglewskiego /.

Ocenę statystyczną wyników przeprowadzono przy pomocy testu "t" - Studenta, uznając znamienność różnic przy $p < 0,05$.

IV. W Y N I K I

=====

Próg agregacji płytek na ADP znamiennie obniżył się w grupie badanej / $p=0,007$ / po czterotygodniowym podawaniu kwasu dwuhomogammalinolenowego /DHLA/, czego nie zauważono w grupie otrzymującej placebo. Szczególnie wrażliwe na ADP stały się płytki krwi chorych, u których stężenie cholesterolu we krwi przed podawaniem DHLA było $\geq 6,5$ mmol/l / $p=0,004$, tabela nr 3/. Również próg agregacji płytek na kolagen obniżył się znamiennie w grupie badanej już po dwóch tygodniach podawania DHLA / $p=0,001$ /. U chorych z hypercholesterolemią / cholesterol $\geq 6,5$ mmol/l / wystąpił statystycznie znamienne spadek progu agregacji na kolagen po dwóch tygodniach / $p=0,003$ / oraz po czterech tygodniach leczenia DHLA / $p=0,01$ /. Podobnie u chorych z grupy badanej z prawidłowym poziomem cholesterolu / cholesterol $< 6,5$ mmol/l / płytki krwi wykazywały większą wrażliwość na kolagen po dwóch tygodniach podawania DHLA / $p=0,02$ //tabela nr 4 /. W grupie kontrolnej nie zauważono takich znamienności. Próg wrażliwości na kolagen obniżył się znamiennie w grupie chorych z hypercholesterolemią w porównaniu do grupy kontrolnej / $p=0,04$ /.

DHLA obniża zatem próg agregacji płytek krwi na ADP i kolagen. Pod jego wpływem płytki krwi stają się bardziej skłonne do agregacji, zwłaszcza u chorych z hypercholesterolemią.

W przeprowadzonych badaniach nie zauważono zmian w liczbie krążących agregatów płytek krwi pod wpływem stosowania DHLA / $p>0,3$ /.

Produkcja tromboksanu A_2 przez płytki krwi, oznaczona metodą biologiczną po czterotygodniowym okresie podawania DHLA nie uległa zmianie / tabela nr 5 /. We wcześniejszych, nie publikowanych dotąd badaniach przeprowadzonych w Klinice oznaczano generację tromboksanu u 13 chorych, którzy otrzymywali DHLA przez dwa tygodnie; stwierdzono wyraźny spadek jego produkcji na przykład przy stężeniu kolagenu 2 ng/ml $p=0,002$. A zatem produkcja tromboksanu spada po dwóch tygodniach podawania DHLA, a następnie po czterech tygodniach powraca do wartości wyjściowych.

W grupie badanej wystąpił wyraźny wzrost poziomu DHLA w błonie komórkowej erytrocytów po dwutygodniowym / $p=0,0015$ / i po czterotygodniowym okresie / $p=0,0008$ / podawania tego kwasu. Około dwukrotnie zwiększyła się ilość DHLA w erytrocytach w grupie badanej w porównaniu do grupy chorych otrzymujących placebo / $p=0,0003$ /. Zmianom tym towarzyszył wzrost stosunku kwasu DHLA do kwasu arachidonowego w błonie komórkowej erytrocytów / z 2/10 do 4/10, tabela nr 10 /, gdyż ilość kwasu arachidonowego nie zmieniła się pod wpływem podawanego DHLA.

Stężenie malonylodwualdehydu / MDA /, w otrzymanej przez strącenie frakcji lipoproteidów zawierających LDL i VLDL, oznaczono przy stałym poziomie białka / 5mg/w tej frakcji. W grupie chorych z hypercholesterolemią zaobserwowano znamienny spadek MDA w czwartym tygodniu podawania DHLA / $p=0,017$, tabela nr 6 /.

W grupie badanej zauważono w czwartym tygodniu stosowania DHLA znamienny spadek poziomu cholesterolu we krwi

/p-0,02/. W całej badanej grupie liczącej 23 osoby w oparciu o wyjściowe wartości cholesterolu we krwi / przed podawaniem DHLA / wyróżniono dwie podgrupy chorych. Pierwsza zawierała 10 osób, których poziom cholesterolu we krwi był równy lub większy niż 6,5 mmol/l. W drugiej podgrupie, liczącej 13 osób, znaleźli się chorzy z cholesterolom mniejszym niż 6,5 mmol/l. Zauważono, że wyraźna redukcja cholesterolu po stosowaniu DHLA wystąpiła tylko u chorych z hypercholesterolemią / p-0,002, tabela nr 8 /. Oznaczano również poziom cholesterolu w otrzymanej frakcji lipoproteidów / LDL i VLDL /, który nieco się obniżył w grupie badanej, przyjmującej DHLA. I tak cholesterol z wartości 3,31 mmol/l spadł do 2,58 mmol/l po dwóch tygodniach oraz do 2,8 mmol/l po czterech tygodniach podawania tego kwasu. Nie są to zmiany statystycznie znamienne.

W grupie otrzymującej DHLA stwierdzono zmniejszenie hamowania biosyntezy prostacykliny w ścianie aorty szczura przez lipoproteidy LDL i VLDL. Spadek ten był znamieny w trzecim i czwartym tygodniu podawania DHLA, zarówno u chorych z normocholesterolemią /p-0,026/, jak i hypercholesterolemią /p-0,007, tabela nr 7/.

Zmniejszenie hamowania produkcji prostacykliny przez lipoproteidy / LDL i VLDL / koreluje ze spadkiem w nich stężenia MDA. Współczynnik korelacji r wynosi 0,59 przy prawdopodobieństwie p-0,01. Bardzo wyraźna korelacja występuje w grupie chorych z hypercholesterolemią / r-0,92, p-0,001 /.

W grupie badanej wystąpił również znamieny spadek poziomu glukozy we krwi po czterech tygodniach podawania DHLA / tabela nr 9 /. Pozostałe oceniane parametry wykonane w ramach badań rutynowych, to znaczy: poziom trójglicerydów, kreatyniny, kwasu moczowego, bilirubiny, fosfatazy alkalicznej i kinazy kreatynowej w surowicy krwi u badanych osób nie uległy wyraźnym zmianom pod wpływem stosowania DHLA.

V. O M Ó W I E N I E W Y N I K Ó W
=====

Wielonienasycone kwasy tłuszczowe wprowadzone zostały do prewencji miażdżycy już w latach pięćdziesiątych, gdy zauważono, że obniżają one poziom cholesterolu we krwi / 54, 57, 58 /. Ahrens głosił nawet, że redukcja całkowitego cholesterolu jest proporcjonalna do ilości podwójnych wiązań w kwasach tłuszczowych dostarczanych z pożywieniem / 1 /. W dwóch programach prewencji choroby wieńcowej / Dayton-Los Angeles; Helsinki-Mental Hosp. / zastosowanie diet bardzo bogatych w wielonienasycone kwasy tłuszczowe spowodowało - w warunkach szpitalnych - obniżenie poziomu cholesterolu we krwi o 10-15 % i zmniejszenie częstości występowania chorób układu krążenia, zwłaszcza zawału serca o pomyślnym przebiegu /"non-fatal myocardial infarction"/ / 19, 63, 75, 87, 127 /.

Wielonienasycone kwasy tłuszczowe w odróżnieniu od kwasów nasyconych nie wykazują niekorzystnego działania na płytkę krwi i ścianę naczyń. Nasycone kwasy tłuszczowe zwiększają bowiem reaktywność płytek i powodują ich stałą aktywację w krążeniu u zdrowych ludzi / 84 /. Kwas palmitynowy w przeciwieństwie do kwasu linolowego po dotętnicznym podaniu uszkadza również komórki śródbłonna, fibroblasty i leukocyty / 33, 45 /. Dieta bogata w kwasy nasycone prowadzi do miażdżycy nie tylko indukując hypercholesterolemię lecz również uszkadzając ścianę tętnicy / 15, 48 /.

Głównym niezbędnym, nienasyconym kwasem tłuszczowym w naszej diecie jest kwas linolowy, zawarty przede wszystkim

kim w tłuszczach roślinnych /138/. Dieta obfitująca w kwas linolowy zmniejsza skłonność płytek krwi do agregacji u ludzi / 30, 47, 126, 136 / i u zwierząt / 47, 68, 71 / oraz obniża u tych ostatnich formację tromboksanów / 68 /. Zwiększenie kwasu linolowego w diecie redukuje nadciśnienie u zwierząt / 122, 125 / i u ludzi / 14, 53 /, co związane jest najprawdopodobniej z regulacyjnym wpływem prostaglandyn na ciśnienie krwi / 131 /. Zauważono również, że wzrost spożycia tego kwasu powoduje u szczurów zwiększenie przepływu krwi w naczyniach wieńcowych oraz wzrost kurczliwości mięśnia sercowego / 20 /, podczas gdy w ścianie aorty powstaje więcej prostacykliny / 88 /. Beitz w oparciu o przeprowadzone badania na szczurach uważa, że wzrost endogennego poziomu kwasu linolowego w estrach cholesterolu serca powoduje stymulację endogennej prostacykliny, która ma ochraniać serce przed rozwojem choroby niedokrwiennej / 3 /.

Jak wiadomo kwas linolowy jest wspólnym prekursorem kwasu dwuhomogammalinolowego / DHLA / i arachidonowego. Kwas arachidonowy dodany do zawiesiny ludzkich płytek wzbudza ich agregację / 60, 105 /. W przeciwieństwie do niego DHLA "in vitro" zmniejsza, a nawet hamuje agregację płytek wywołaną przez ADP / 60 /. Działanie pro-agregacyjne kwasu arachidonowego tłumaczy się powstaniem z niego TXA_2 , zaś anty-agregacyjne działanie DHLA ma zależeć od generacji PGE_1 / 9, 56, 60, 129 /. Lagarde uważa, że w środowisku płytek krwi i komórek endotelium DHLA wykazuje silniejsze właściwości anty-agregacyjne niż kwas eikozapentaenowy / 61 /.

Z DHLA powstaje w płytkach krwi nieaktywny biologicznie hydroksykwas / kwas 12-hydroksyheptadekadienowy/ zamiast spodziewanego tromboksanu A₁ / 82 /. Według Needlemana zastąpienie w przemianach płytkowych kwasu arachidonowego przez DHLA mogłoby być zjawiskiem korzystnym/82/. DHLA mógłby bowiem pełnić rolę "fałszywego klucza" dla syntezy tromboksanu z kwasu arachidonowego / 82 /.

Po doustnym podaniu DHLA szczurom i królikom jest on szybko wbudowywany do tkankowych lipidów /18/. U szczurów najwięcej DHLA gromadzi się w rdzeniu nerki / 18 /, a u świnek morskich w wątrobie / 115 /. Kwas ten podany szczurom i psom powoduje zahamowanie agregacji ich płytek / 130 /.

We krwi ludzkiej DHLA pojawia się w cztery godziny po doustnym podaniu, jako ester trójglicerydów, a po 24 godzinach gromadzi się w fosfolipidach, głównie w fosfatydylocholinie / 115 /. Po długotrwałym stosowaniu znajduje się on we wszystkich rodzajach lipidów błon komórkowych / 115 /. Wyniki przedstawione w tej pracy wskazują, że już po dwutygodniowym okresie podawania tego kwasu zawartość jego w błonie komórkowej erytrocytów wzrasta dwukrotnie i utrzymuje się w 28 dniu jego stosowania. Niektórzy badacze uważają, że spożywanie DHLA zmniejsza agregację ludzkich płytek wywołaną na przykład przez ADP / 56, 106 /. Kernoff i wsp. podawał różne dawki DHLA lub jego etylowego estru ośmiu zdrowym ochotnikom oraz badał wpływ pojedynczej dawki i stałego przyjmowania tego kwasu przez okres od pięciu do dziesięciu dni / 56 /.

Agregacja płytek krwi na ADP najbardziej zahamowana była w trzeciej dobie podawania tego kwasu, natomiast w następnych dniach transmisja światła w osoczu bogatopłytkowym wzrastała / 56 /. W pierwszych godzinach po podaniu DHLA obniżała się również aktywność osocza neutralizująca heparynę, czyli tak zwany czynnik płytkowy 4/56/. O'Brien również podawał DHLA kilku ochotnikom, lecz nie potwierdził obserwacji Kernoffa i wsp. / 85 /. Nie publikowano natomiast do tej pory wyników długotrwałej - kilkutygodniowej - suplementacji u ludzi kwasu dwuhomogammalinolowego.

Wyniki przedstawione w tej pracy wskazują, że czterotygodniowe podawanie DHLA obniża znamienne próg agregacji płytek na ADP. Również próg agregacji płytek na kolagen obniżył się w grupie badanej już po dwóch tygodniach podawania DHLA. Płytki krwi pod wpływem DHLA stają się bardziej reaktywne, łatwiej ulegają agregacji, choć produkcja tromboksanu A_2 nie uległa w nich zmianie po 28 dniach spożywania tego kwasu. We wcześniejszych, nie publikowanych dotąd badaniach zauważyliśmy statystycznie znamienne spadki produkcji tromboksanu A_2 po dwutygodniowym okresie podawania DHLA chorym na miażdżycę tętnic / $p < 0,002$ /.

Stała dawka DHLA / 1 g / może prowadzić -po dłuższym okresie stosowania - do adaptacji ustroju i ponownie większego wykorzystania naturalnego kwasu arachidowego. Przypomina to zjawisko opisane podczas podawania prostacykliny chorym na miażdżycę zarostową kończyn dol-

nych. Dłużej trwający wlew prostacykliny osłabia jej efekt antyagregacyjny co Sinzinger wiąże z pojawieniem się większej liczby płytek krwi, bardziej skłonnych do agregacji, tzw. "rebound phenomen" / 109 /. Kwas arachidonowy, główny wielonienasycony kwas tłuszczowy zawarty w fosfolipidach ludzkich płytek, jest naturalnym występującym w ustroju prekursorem prostaglandyn E_2 , D_2 , prostacykliny czy tromboksanu. W tkankach ssaków DHLA stanowi tylko małą część zapasów niezbędnych kwasów tłuszczowych / 18, 66 /. Badania przeprowadzone "in vitro" wskazują, że DHLA konkuruje z kwasem arachidonowym o zajęcie cyklooksygenazy w płytkach krwi / 112, 113 / oraz w komórkach śródbłonna / 102 /. Wydaje się jednak, że cyklooksygenaza ma większe powinowactwo do kwasu arachidonowego. Ludzkie płytki krwi nie gromadzą kwasu arachidonowego w następstwie podawania DHLA / 56, 82, 115 /. Niektóre gatunki zwierząt, na przykład szczury, posiadają w wątrobie bardzo aktywny system enzymatyczny/delta-5-desaturazę /, która umożliwia syntezę kwasu arachidonowego z DHLA / 115 /. Małą aktywność tego enzymu stwierdzono u świnek morskich, królików i u ludzi / 5, 18, 88 /. Wyniki przedstawione w tej pracy potwierdzają również te obserwacje. Stosowany doustnie DHLA nie spowodował wzrostu poziomu kwasu arachidonowego w błonie komórkowej erytrocytów.

Gdy płytki krwi inkubuje się z DHLA i inhibitorem syntetazy tromboksanu, to powstaje w nich drogą nieenzymatycznych przemian prostaglandyna E_1 / 82, 89 /. Generacja kwasu 12-hydroksoheptadekainowego jest wówczas obniżona

i gromadzony wewnętrzny nadtlenuk - PGH_1 ulega nieenzymatycznej przemianie do PGE_1 i PGD_1 / 82 /. Prostaglandyna E_1 pięć razy silniej niż PGH_1 i ponad trzydzieści razy silniej niż PGD_1 hamuje agregację ludzkich płytek / 82 /. Podobnie jak prostacyklina wywiera ona swoje działanie aktywując cyklazę adenylową i zwiększając wewnątrzkomórkowy cAMP / 4, 69 /. Natomiast dodanie DHLA do roztworu płytek nie powoduje wzrostu cAMP / 82 /. Synteza PGE_1 z DHLA w płytkach krwi ma mniejsze znaczenie niż produkcja głównego metabolitu, czyli kwasu hydroksoheptadekadienowego / 82 /. Kwas dwuhomogammalinolenowy nie może być również substratem do produkcji przez ścianę naczyniową prostacykliny, gdyż w PGH_1 brak jest delta 5-nienasyconego wiązania. DHLA dodany do zawiesiny ludzkich komórek śródbłonna powodował zmniejszenie ich hamującego wpływu na agregację płytek / 61, 83 /. Kwas arachidonowy natomiast zwiększał aktywność tych komórek, co objawiało się zahamowaniem agregacji płytek krwi / 83 /. Komórki śródbłonna naczyniowego z dodanego do roztworu kwasu arachidonowego produkują więcej prostacykliny / 72, 110 /. Hamujący wpływ DHLA na produkcję prostacykliny przez śródbłonek naczyniowy nie równoważy powstająca drogą nieenzymatyczną prostaglandyna E_1 w płytkach. Wykazuje ona co prawda również właściwości antyagregacyjne, lecz w stosunku do prostacykliny jest pod tym względem ok. 20 do 30 razy słabsza / 76/. Prostaglandyna E_1 i prostacyklina prawdopodobnie współzawodniczą o zajęcie tego samego receptora płytkowego / 98, 103, 128 /. PGE_1 osłabia może nawet fizjologiczne działanie endogennej prostacykliny, która ochrania ścianę na-

czynia przed przyleganiem, a następnie agregacją płytek krwi na jej powierzchni / 35, 39 /.

W publikowanych do tej pory wynikach badań zwraca się uwagę na obecność hyperreaktywnych płytek krwi w hyperlipoproteinemiach / 67, 91, 92 /. U chorych z rodzinną hypercholesterolemią typu II a wcześniej rozwija się miażdżyca i powikłania zakrzepowe. Płytki tych chorych żywiej reagują na ADP, adrenalinę i kolagen / 13 /. Wydalanie płytkowych nukleotydów i serotoniny jest też zwiększone / 13 /. Wzrost aktywności płytek krwi w hypercholesterolemii II a relatywnie wzrasta do ilości wolnego cholesterolu związanego do fosfolipidów i białek / 101 /. Ludzkie płytki "in vitro" wzbogacone w cholesterol przez inkubację z liposomami łatwiej ulegają agregacji / 100 /. Pod wpływem trombiny płytki krwi zawieszane w środowisku bogatym w cholesterol uwalniają więcej kwasu arachidonowego z fosfolipidów niż płytki z ubogiej w cholesterol zawiesiny / 116 /. Inne jeszcze obserwacje sugerują związek między osoczymym poziomem lipidów a czasem przeżycia płytek krwi u ludzi z chorobą wieńcową. Skrócenie tego czasu związane jest ze wzrostem poziomu cholesterolu we krwi / 114 /. Wyniki przedstawione w tej pracy wskazują, że pod wpływem DHLA najbardziej wrażliwe na stosowane czynniki agregacyjne stały się płytki krwi chorych z hypercholesterolemią. Nadwrażliwość płytek krwi u chorych z hypercholesterolemią ujawniła się dopiero w czasie stosowania DHLA, gdyż przed podawaniem tego kwasu tłuszczowego progi agregacyjne płytek u chorych z prawidłowym i podwyższonym poziomem chole-

sterolu nie różniły się między sobą. Wydaje się więc, że DHLA jak gdyby odsłonił u chorych z hypercholesterolemią większą skłonność ich płytek do agregacji. Podwyższony poziom cholesterolu w surowicy krwi nie tłumaczy pojawienia się bardziej wrażliwych na ADP i kolagen płytek krwi. Po zakończonym bowiem podawaniu DHLA najbardziej znamienne obniżył się on właśnie u chorych z hypercholesterolemią. Być może DHLA nasila zaburzoną w miażdżycy równowagę między płytką a ścianą naczynia, co ujawniać się może w zmienionej reaktywności płytek krwi. Warto tu wspomnieć o pojedynczych obserwacjach Sim'a i Mc Craw wskazujących, że stosowanie "in vitro" i "in vivo" dużych dawek DHLA może odsłonić agregacyjne właściwości tego kwasu / 107 /.

Wpływ DHLA i jego metabolitów na zachowanie się ludzkich płytek krwi oceniać należy raczej jako działa — nie farmakologiczne w przeciwieństwie do fizjologicznego działania pochodnych kwasu arachidonowego - prostacykliny i tromboksanu. Wzbogacenie tym kwasem diety, jak się wydaje, nie jest celowe i okazać się może nawet szkodliwe dla ustroju. Potwierdzeniem tych przypuszczeń mogą być wcześniejsze doniesienia mówiące, że miażdżyca wiąże się u człowieka z obniżeniem w osoczu stosunku kwasu arachidonowego do kwasu dwuhomogammalinolenowego / 43 /.

Zwiększenie ilości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w diecie niesie ze sobą potencjalne niebezpieczeństwo wzrostu w ustroju nadtlenków lipidów, które powstają w procesie autooksydacji z tych kwasów / 32, 39 /.

Uważa się, że nadtlutki lipidów odgrywają ważną rolę w rozwoju miażdżycy w ścianie naczyń. W naszym organizmie tworzą się one prawdopodobnie w wyniku zakłócenia metabolizmu lipidów, co przypuszcza się związane jest ściśle z działaniem znanych już, tak zwanych czynników ryzyka miażdżycy/42, 64/. U pacjentów z hyperlipidemią znacznie wzrasta zawartość nadtlutków, które znajdują się głównie w LDL i VLDL / 118 /. Frakcja lipoproteidów o niskiej gęstości w porównaniu do innych wyizolowanych frakcji posiada największą zdolność do utleniania i proporcjonalnie najsilniej hamuje syntezę prostacykliny w skrawkach aorty szczura /118/. Ostatnio coraz częściej posądzają się również nadtlutki o działanie karcinogenne / 99 /. Stosowanie antyoksydantów, takich jak na przykład witamina E czy hydroksybutylotoluen / BHT/, ochraniać ma ustrój przed nadmierną peroksydacją lipidów i ich toksycznymi produktami / 51, 80, 97, 99 /.

Wyniki badań przedstawione w niniejszej pracy wskazują, że po czterotygodniowym okresie stosowania DHLA nastąpił spadek ilości MDA w frakcji LDL i VLDL u chorych z hypercholesterolemią, u których najbardziej znamienne obniżył się również poziom cholesterolu w surowicy krwi. W podawanych kapsułkach, oprócz samego DHLA, obecny był również hydroksybutyloanisol / BHA / i hydroksybutylotoluen / BHT /, które przeciwdziałały nadmiernemu utlenieniu DHLA. Spadek ilości MDA w LDL i VLDL znamienne korelował ze zmniejszonym hamowaniem produkcji prostacykliny przez uzyskaną frakcję lipoproteidów w trzecim i czwartym tygodniu podawania DHLA.

Dyskusja nad stosowaniem w prewencji miażdżycy wielonienasyconych kwasów tłuszczowych toczy się już od wielu lat. Badania epidemiologiczne ugruntowały przekonanie o potrzebie zwiększenia ilości tych kwasów w naszym pożywieniu. Takie postępowanie prewencyjne spotkało się z ogromnym aplauzem i dopiero od niedawna zaczynają się szerzyć wątpliwości, co do jego słuszności i skuteczności / 73 /. Coraz częściej zwraca się też uwagę na zachowanie się w ustroju poszczególnych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych dostarczonych z pożywieniem. Z różnych kwasów powstają bowiem w ustroju różne metabolity nieraz o potężnym wpływie na układ krążenia. Sterowanie tymi przemianami przez odpowiednie suplementacje dietetyczne jest koncepcją bardzo atrakcyjną. Wybitni znawcy zagadnienia / Needleman / uważają, za najbardziej obiecujące w tym względzie i potencjalnie najbardziej korzystne w miażdżycy - dwa kwasy, a mianowicie: eikozapentaenowy i dwuhomogammalinolenowy. O pierwszym istnieje już dość spore, pozytywne i szybko rosnące piśmiennictwo. Drugi - nie był dotąd przedmiotem dokładniejszych badań klinicznych, ze względu na niedostępność czystego preparatu. Badania przedstawione w niniejszej pracy dają wyniki inne od oczekiwanych. Czynność zlepna płytek krwi nie tylko, że nie uległa osłabieniu, lecz wręcz przeciwnie - spotęgowała się. Doświadczenie kliniczne nie potwierdziło więc logicznych przesłanek dla stosowania kwasu dwuhomogammalinolowego w miażdżycy.

VI. W N I O S E K

=====

U chorych na miażdżycę tętnic wzbogacanie diety kwasem dwuhomogammalinolenowym nie wydaje się celowe. Kwas ten obniża wprawdzie podwyższony poziom cholesterolu we krwi, lecz równocześnie zwiększa zlepność płytek krwi, czyniąc je bardziej podatnymi na działanie agregacyjne ADP i kolagenu.

VII. S T R E S Z C Z E N I E

Wielonienasycone kwasy tłuszczowe od kilkunastu lat znajdują się w centrum zainteresowania medycyny. Wprowadzono je do prewencji miażdżycy, gdy zauważono, że obniżają one poziom cholesterolu we krwi. Jak się okazało, kwasy te nie tylko stanowią materiał budulcowy i energetyczny, lecz są również substancjami macierzystymi dla syntezy eikozanoidów, to znaczy prostaglandyn i leukotrienów - związków o silnej aktywności biologicznej. W ostatnich latach odkryto przemiany najważniejszego wielonienasyconego kwasu tłuszczowego - kwasu arachidonowego i poznano właściwości biologiczne jego metabolitów. Głównymi produktami przemian kwasu arachidonowego w układzie krążenia, to: tromboksan, powstający w płytkach krwi, który powoduje silny skurcz naczyń i agregację płytek oraz prostacyklina wywodząca się ze śródbłonna naczyniowego o odmiennych właściwościach. Prostacyklina bowiem ochrania śródbłonek przed przyleganiem i agregacją płytek i uwalnianiem tromboksanu. Po odkryciu prostacykliny dość szybko wprowadzono ją do terapii, uzyskując w niektórych schorzeniach pozytywne efekty. Duże zainteresowanie wzbudziły ostatnio próby farmakologicznej i dietetycznej ingerencji w przemiany samego kwasu arachidonowego. W wielu ośrodkach przeprowadzono tego typu badania z użyciem kwasu eikozapentaenowego, uzyskując korzystne efekty. Kwas dwuhomogammalinolenowy wydaje się w tym względzie co najmniej tak samo interesujący. Metabolitami tego kwasu są bowiem prostaglandyny serii pierwszej, spośród których

PGE_1 silnie hamuje zlepianie się płytek krwi, rozszerza naczynia krwionośne, podczas gdy sam kwas DHLA nie powoduje agregacji płytek. W przeciwieństwie do kwasu arachidonowego nie powstaje z DHLA w płytkach tromboksan, lecz nieaktywna substancja 12-H₂D /kwas 12-hydroperoksyheptadekadienowy/. Według Needlemana zastąpienie w przemianach płytkowych kwasu arachidonowego przez DHLA mogłoby być zjawiskiem korzystnym. DHLA mógłby bowiem pełnić rolę "fałszywego klucza" dla syntezy tromboksanu z kwasu arachidonowego.

Celem pracy była odpowiedź na pytania: czy DHLA dodany do pożywienia zmniejsza czynność zlepną płytek krwi i czy jest to związane z upośledzeniem produkcji tromboksanu A_2 oraz jak zmienia się peroksydacja lipoproteidów surowicy krwi, które regulują syntezę prostacykliny przez ścianę tętnicy.

Badania przeprowadzono, przestrzegając warunków podwójnie ślepej próby, u 33 mężczyzn z rozpoznaną miażdżycą zarostową tętnic kończyn dolnych. DHLA podawano przez cztery tygodnie w dawce 1 g na dobę. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że DHLA był szybko wbudowywany do błon komórkowych. Płytki krwi pod wpływem DHLA stały się bardziej reaktywne, łatwiej ulegały agregacji pod wpływem ADP i kolagenu, a produkcja tromboksanu A_2 nie uległa zmianie. Znamienne obniżył się natomiast poziom cholesterolu we krwi, szczególnie u chorych z hypercholesterolemią, u których obniżył się również poziom MDA / malonylodwualdehydu /. Spadek ilości

MDA w LDL i VLDL znamienne korelował ze zmniejszonym hamowaniem produkcji prostacykliny przez uzyskaną frakcję lipoproteidów.)

Badania przedstawione w niniejszej pracy dają wyniki inne od oczekiwanych, czynność zlepna płytek krwi nie tylko że nie uległa osłabieniu, lecz wręcz przeciwnie - spotęgowała się. Badania kliniczne nie potwierdziły więc logicznych przesłanek o korzystnym stosowaniu DHLA w miażdżycy.

VIII. T A B E L E

TABELA NR 1

LOKALIZACJA ZMIAN MIAŻDŻYCOWYCH U BADANYCH CHORYCH
NA PODSTAWIE WYNIKÓW ARTERIOGRAFII MIEDNICOWO-KOŃCZYNOWEJ

Lokalizacja zmian	Ilość osób
1. Odcinek proksymalny /aorta, tt. biodrowe/	7
2. Odcinek środkowy /tt. udowe, podkolanowe/	5
3. Odcinek dystalny /poniżej tt. podkolanowych/	6
4. Odcinek proksymalny i środkowy	4
5. Odcinek środkowy i dystalny	8
6. Odcinek proksymalny, środkowy i dystalny	3

TABELA NR 2

ZESTAWIENIE WYKONANYCH OZNACZEŃ LABORATORYJNYCH

Rodzaj badań laboratoryjnych	Czas wykonania oznaczeń		
	I	II	III
A. Próg agregacji płytek krwi na ADP i kolagen	X	X	X
B. Liczba krążących agregatów płytkowych	X	X	X
C. Generacja tromboksanu A ₂ w PRP	X		X
D. Stężenie MDA we frakcji lipoproteidów /LDL i VLDL/	X	X	X
E. Hamowanie produkcji PGI ₂ przez LDL i VLDL	X	X	X
F. Stężenie cholesterolu w surowicy i w LDL i VLDL	X		X
G. Poziomemia i kwasu arachidonowego w erytrocytach	X	X	X
H. Rutynowe badania kliniczne	X		X

X - pobieranie próbki krwi do badań,

I - przed rozpoczęciem badań,

II - w 14 dniu badania,

III - w 28 dniu badania

TABELA NR 3

PROG AGREGACJI PŁYTEK NA ADP W μ M

	I		II		III	
	M	SE	M	SE	M	SE
DHLA	1,5	0,2	1,3	0,2	1,2 ^a	0,2
placebo	1,7	0,3	1,3	0,2	1,5	0,2

a/ p-0,007

DHLA/cholesterol $\geq 6,5$	1,5	0,2	1,3 ^b	0,2	1,0 ^c	0,2
DHLA/cholesterol $< 6,5$	1,5	0,4	1,4	0,4	1,3	0,3

b/ p-0,03

c/ p-0,004

- I - przed rozpoczęciem badania,
 II - w 14 dniu badania,
 III - w 28 dniu badania.

M - średnia,

SE - błąd średniej,

p - prawdopodobieństwo.

TABELA NR 4

PRÓB AGREGACJI PŁYTEK KRWI NA KOLAGEN W $\mu\text{g/ml}$

	I		II		III	
	M	SE	M	SE	M	SE
DHLA	1,0	0,1	0,6 ^a	0,1	0,8	0,1
placebo	0,7	0,2	0,6	0,1	0,8	0,1
a/ p-0,001						
DHLA/cholesterol $\geq 6,5$	0,9	0,1	0,4 ^b	0,1	0,5 ^c	0,1
DHLA/cholesterol $< 6,5$	1,0	0,2	0,7 ^d	0,1	1,0	0,2

b/ p-0,003

c/ p-0,01

d/ p-0,02

opis symboli - jak w tabeli nr 3

TABELA NR 5

GENERACJA TROMBOKSANU A₂ W ng Eq EMA/ml PRP

Stężenie kolagenu w $\mu\text{g/ml}$ PRP		I		III	
		M	SE	M	SE
2	DHLA	77,1	12,0	70,6	11,1
30		346,1	56,5	312,9	49,0
50		469,9	102,0	421,7	79,1
2	placebo	98,6	32,0	60,3	11,9
30		262,2	48,7	307,3	74,5
50		412,1	82,1	360,2	116,9

I - przed rozpoczęciem badań,

III - w 28 dniu badań

M - średnia

SE- błąd średniej

TABELA NR 6

STĘŻENIE MDA W FRAKCJI LIPOPROTEIDÓW LDL I VLDL
W nM/5 mg BIAŁKA

	I		II		III	
	M	SE	M	SE	M	SE
DHLA	49,4	5,7	53,3	9,8	47,1	6,8
placebo	41,8	6,0	44,8	5,6	48,2	6,5
DHLA/cholesterol ≥ 6,5	54,0	6,1	56,0	13,5	38,0 ^a	2,3
DHLA/cholesterol < 6,5	45,4	9,3	49,1	16,0	55,0	12,2

a/ p-0,017

TABELA NR 7

PROCENT HAMOWANIA PROSTACYKLINY PRZEZ FRAKCJE
LIPOPROTEIDÓW /LDL i VLDL/ W %

	I		II		III	
	M	SE	M	SE	M	SE
DHLA	50,3	3,3	48,0	6,4	41,0 ^a	4,0
placebo	59,7	8,4	49,4	6,1	43,3	4,8
DHLA/cholesterol ≥ 6,5	48,4	6,1	54,7	5,5	37,6 ^b	4,2
DHLA/cholesterol < 6,5	51,9	3,5	38,0	13,2	44,0	6,6

b/ p-0,007 między drugim i czwartym tygodniem

TABELA NR 8

STĘŻENIE CHOLESTEROLU W SUROWICY KRWI W mmol/l

	I		III	
	M	SE	M	SE
DHLA	6,6	0,4	6,2 ^a	0,4
placebo	6,6	0,5	6,1	0,3
DHLA/cholesterol ≥ 6,5	7,9	0,8	6,8 ^b	0,7
DHLA/cholesterol < 6,5	5,6	0,2	5,8	0,3

b/ p-0,002

I - przed badaniem

III - w 28 dniu badań

TABELA NR 9

STĘŻENIE GLUKOZY W SUROWICY W mmol/l

	I		III	
	M	SE	M	SE
DHLA	6,4	0,2	6,0 ^a	0,2
placebo	7,0	0,6	6,5	0,3

a/ p-0,035

TABELA NR 10

POZIOM KWASU DUDHOMOGAMMALINOLENOWEGO / DHLA /
I ARACHIDONOWEGO / AA / W BŁONIE KOMÓRKOWEJ
ERYTROCYTÓW W % ORAZ STOSUNEK DHLA / AA

Grupa kontrolna / chorzy przyjmujący placebo /						
	DHLA		AA		DHLA/AA	
	M	SD	M	SD	M	SD
I	1,1	0,3	5,8	2,4	0,22	0,05
II	1,0	0,2	5,4	1,4	0,19	0,01
III	1,4	0,8	6,0	1,5	0,23	0,1

Grupa badana / chorzy przyjmujący DHLA /						
	DHLA		AA		DHLA/AA	
	M	SD	M	SD	M	SD
I	1,3	0,6	6,6	1,5	0,2	0,1
II	2,6 ^a	0,6	6,9	2,4	0,4	0,1
III	2,6 ^b	0,7	7,0	2,1	0,4	0,1

a/ p-0,0015

b/ p-0,0008

I - przed badaniem
II - w 14 dniu badań
III - w 28 dniu badań

M- średnia
SD- odchylenie
standardowe
p-prawdopodobieństwo

IX. P I Ś M I E N N I C T W O
=====

1. Ahrens E.: Nutritional factors and serum lipid levels. Amer. J. Med., 1957, 23, 928.
2. Aspirin Myocardial Infarction Study Research Group: A randomized controlled trial of aspirin in person recovered from myocardial infarction. J A M A, 1980, 243, 661.
3. Beitz J., Hoffmann P., Forster W.: Cholesterol esters of rat hearts of linoleic acid fed rats stimulates prostaglandin I₂ synthetase activity. Prostagl. and Med., 1980, 6, 17.
4. Bestl C.: Prostacyclin increases cyclic AMP levels and adenylate cyclase in platelets. Nature, 1977, 267, 850.
5. Bills T., Smith J., Silver M.: Selective release of arachidonic acid from the phospholipids of human platelets in response to thrombin. J. Clin. Invest., 1977, 60, 1.
6. Błaszczyszyn M.: Dokładne i proste oznaczanie cholesterolu całkowitego w surowicy. Wiad.Lek., 1970, 23, 1413.
7. Born G.: Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. Nature, 1962, 194, 1135.
8. Born G.: Haemodynamic and biochemical interactions in intravascular platelet aggregation. Blood cells and vessel walls: functionale interactions. Ciba Foundation Symposium 71. Excerpta Medica 1980, 61. North Holland.
9. Bosser M.: Prostaglandin E₁ and platelets. Biomedicine, 1973, 18, 95.

10. Brox J., Killie J., Gunnes S. et al.: The effect of cod liver and corn oil on platelets and vessel wall in man. *Thromb. and Haemost.* 1981, 3, 604.
11. Budowski P.: Nutritional effects of ω 3-polyunsaturated fatty acid. *Israel J. Med. Sci.* 1981, 17, 223.
12. Burstein M., Scholnick H., Morfin R.: Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions. *J. of Lip. Research*, 1970, 11, 583.
13. Carvalko C., Colman R., Lees R.: Platelet function in hyperlipoproteinemia. *N. Engl. J. Med.*, 1974 290, 434.
14. Comberg H., Heydaen S., Hames C. et al.: Hypotensive effect of dietary prostaglandin precursor in hypertensive man. *Prostaglandins*, 1978, 15, 193
15. Constantinides P., Kiser M.: Arterial effects of palmitic, linoleic and acetoacetic acid. *Atherosclerosis*, 1981, 38, 309.
16. Culp B., Titus B., Lands W.: Inhibition of prostaglandin biosynthesis by eicosapentaenoic acid. *Prostagl. and Med.*, 1979, 3, 269.
17. Culp B., Lands W., Lueckeri B.: The effect of dietary supplementation of fish oil on experimental myocardial infarction. *Prostaglandins*, 1980, 6, 1021.
18. Danon A., Heimberg M., Oats J.: Enrichment of tissue lipids with fatty acids that are prostaglandin precursors. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1975, 388, 318.

19. Dayton S., Pearce M. et al.: A controlled chemical trial of diet high in unsaturated fat in preventing complications of atherosclerosis. *Circulation*, 1967, 39-40 / suppl /, 1.
20. De Deckers E., Ten Hoor F.: Effects of dietary fats on coronary flow rate and the left ventricular function of the isolated rat heart. *Nutr. Metab.*, 1979, 23, 88.
21. Dembińska A., Gryglewska T., Żmuda A., Gryglewski R.: The generation of prostacyclin by arteries and by the coronary vascular bed is reduced in experimental atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis*, 1977, 14, 1025.
22. Deyrberg J., Bang H., Hjerne N.: Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland eskimos. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1975, 28, 958.
23. Deyrberg J., Bang H., Stoffersen E. et al.: Eicosapentaenic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis. *Lancet*, 1978, 2, 117.
24. Deyrberg J., Bang H.: Haemostatic function and platelet polyunsaturated fatty acids in Eskimos. *Lancet*, 1979, 2, 433.
25. Deyrberg J., Bang H., Aagaard O.: ω -linolenic acid and eicosapentaenoic acid. *Lancet*, 1980, 1, 199.
26. Deyrberg J.: Platelet-vessel wall interaction: influence of diet. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 1981, 294, 373
27. Deyrberg J.: Dietary manipulation of prostaglandin synthesis beneficial or detrimental. *Card. Phar. of the Prostagl.* ed by A. Herman, P. Vanhoutte, H. Denolin and A. Goossens. Raven Press, New York, 1982.

28. Feldman R.: Prostacyklina - naczyniowy hormon antyagregacyjny regulujący hemostazę.
Pol. Arch. Med. Wewn., 1980, 1, 57.
29. Gaertner H.: Krzepnięcie krwi i diagnostyka jej zaburzeń. P. Z. W. L., Warszawa, 1971, 122.
30. Gerrard J., White J., Krivit W.: Labile aggregation stimulating substance free fatty acids and platelet aggregation. L.Lab.Clin.Med., 1976, 87, 73.
31. Gimson A., Langley P., Hughes R. et al.: Prostacyclin to prevent platelet activation during charcoal haemoperfusion in fulminant hepatic failure. Lancet, 1980, 1, 173.
32. Glavind J.: On the existence of lipid peroxides in animal tissues. Br. J. Nutr., 1972, 27, 87.
33. Gordon G.: Saturated free fatty acid toxicity. Part 2. Exp. Med. Path., 1977, 27, 262.
34. Goodnight S., Harris W., Connor W.: The effects of dietary fatty acids on platelet composition and function in man: a prospective controlled study. Blood, 1981, 5, 880.
35. Gryglewski R., Bunting S., Moncada S. et al.: Arterial walls are protected against deposition of platelet thrombi by a substance /prostaglandin X/ which they make from prostaglandin endoperoxides. Prostaglandins, 1976, 12, 685.
36. Gryglewski R.: Prostaglandin and thromboxan biosynthesis inhibitors. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 1977, 297, 585.
37. Gryglewski R.: Znaczenie kaskady kwasu arachidonowego dla kardiologii. Kard. Pol., 1978, 21, 481.

38. Gryglewski R., Korbut R., Ocetkiewicz A. et al.: Lungs as a generator of prostacyclin - hypothesis on physiological significance. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 1978, 304, 45.
39. Gryglewski R., Szczeklik A.: Inhibition of prostacyclin formation by lipid peroxides in the arterial wall: hypothetical step in development of atherosclerosis. Mater. Med. Pol. 1978, 21, 489
40. Gryglewski R.: Bioassay of prostacyclin and thromboxan A_2 . INSERM, 1979, 91, 99.
41. Gryglewski R., Salmon J., Ubatuba F. et al.: Effects of all cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenic acid and PGH_3 on platelet aggregation. Prostaglandins, 1979, 18, 453.
42. Gryglewski R.: Prostacyklina a miażdżyca. W. PAN - Ossolineum, Warszawa, 1981.
43. Hagenfeldt L., Paasikivi J., Sjoren A.: Plasma levels of free polyunsaturated fatty acid in patients with ischaemic heart disease. Metabolism, 1973, 22, 1349.
44. Harher L., Ross R., Glomset J.: Atherosclerosis endothelial injury and platelet mediated intimal smooth cell proliferation. Platelets: A multidisciplinary approach, 1978, 89.
45. Hawley H., Gordon G.: The effects of long chain free fatty acids on human neutrophil function and structure. Lab. Invest., 1976, 34, 216.
46. Higgs E., Moncada S., Vane J.: The biological importance and therapeutic potential of prostacyclin. Prostaglandins, Platelets, Lipids ed by H. Cons, E. De Felice, P. Kuo, 1981, 1. Symposie Specjalost Inc, Miami, Florida.

47. Hornstra G., Lewis B., Chait A. et al.: Influence of dietary fat on platelet function in man. *Lancet*, 1973, 1, 1155.
48. Hornstra G., Vendelmans A.: Introduction of experimental arterial occlusive thrombi in rats. *Atherosclerosis*, 1973, 17, 369.
49. Hornstra G., Haddeman E., Ten Hoor E.: Fish oils, prostaglandins and arterial thrombosis. *Lancet*, 1979, 2, 1080.
50. Hornstra G., Hazehof E., Haddeman E. et al.: Fish oil feeding lowers thromboxane and prostacyclin production by rat platelet and aorta does not result in the formation of prostaglandin I₃. *Prostaglandins*, 1981, 5, 727.
51. Horwitt M.: Therapeutic uses vitamin E in medicine. *Nutrition Rev.*, 1980, 3, 105.
52. Hwang D., Carrol A.: Decreased formation of prostaglandins derived from arachidonic acid by dietary linolenate in rats. *Am. J. of Clin. Nutr.*, 1980, 33, 590.
53. Iacono J., Marshall M., Dougherty R. et al.: Reduction in blood pressure associated with high polyunsaturated fat reduces cholesterol in man. *Prev. Med.*, 1975, 4, 426.
54. Jackson R., Taunton C., Morrisett J. et al.: The role of dietary polyunsaturated fat in lowering blood cholesterol in man. *Circulation Res.*, 1978, 42, 447.
55. Jorgensen K., Deyrberg J.: Platelet and atherosclerosis. *Danish Med. Biull.*, 1980, 6, 253

56. Kernoff P., Willis A., Stone K. et al.: Antithrombotic potential of dihomogammalinolenic acid in man. Br. Med. J., 1977, 2, 1441.
57. Keys A.: Human atherosclerosis and the diet. Circulation, 1952, 5, 115.
58. Kinsell L., Patridge J. et al.: Dietary modification of serum cholesterol and phospholipid levels. L. Clin. Endocrinol. Met., 1952, 12, 909.
59. Kobayashi S., Hirei A., Tecano T.: Reduction in blood viscosity by eicosapentaenoic acid. Lancet 1981, 2, 197.
60. Lagarde M., Charib A., Dechavance M.: Different utilization of arachidonic and dihomogammalinolenic acids by human platelet prostaglandin synthetase. Biochemie, 1977, 59, 935.
61. Lagarde M., Burtin M., Dechavanne M. et al.: Dihomogammalinolenic acid is more anti-aggregatory than eicosapentaenoic in a platelet endothelial cell mixture. Prostagl. and Med. 1980, 4, 177.
62. Lehringer A.: Biochemia. P.W.R.i L.Warszawa, 1979, 183.
63. Leren P.: The Oslo diet - heart study. Circulation, 1970, 42, 935.
64. Logan R., Riemerna R., Thomson M. et al.: Risk factors for ischaemic heart disease in normal man aged 40. Edinburgh-Stockholm study. Lancet, 1978, 1, 945.
65. Malmsten C.: Some biological effects of prostaglandin endoperoxides analogs. Life Sci. 1976, 18, 169

66. Marcus A., Ullman H., Safier L.: Lipids composition of subcellular particles of human blood platelets. *J. Lipid Res.*, 1969, 10, 108.
67. Marcus A.: The role of lipids in platelet function — with particular reference to the arachidonic acid pathway. *J. Lipid Res.*, 1978, 19, 793
68. Mathias M., Fine K., Lipiński B. et al.: Dietary linoleate effect upon prostaglandin and thromboxane synthesis. *Prostaglandins*, 1978, 15, 706
69. Mc Donald J.: Regulation of cAMP levels and aggregation in human platelets by PGE₁. *J. Lab. Clin. Med.*, 1973, 81, 818.
70. Mc Giff J.: Prostaglandins, prostacyclin and thromboxanes. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1981, 21, 479.
71. Mc Gregor L., Morazain R., Renaud S.: Effect of dietary linoleic acid on platelet function in the rat. *Thromb. Res.*, 1980, 20, 499.
72. Mc Intyre D., Pearson J., Gordon J.: Localisation and stimulation of prostacyclin production in vascular cells. *Nature*, 1978, 27, 549.
73. Mc Michael J.: Fats and atheroma: an inquest. *Br. Med. J.*, 1979, 1, 173.
74. Miller O., Johnson R., Gorman R.: Inhibition of PGE₁ — stimulates cAMP accumulation in human platelets by thromboxane A₂. *Prostaglandins*, 1977, 13, 599.
75. Miettinen M., Turpeinen C. et al.: Effects of cholesterol — lowering diet on mortality from coronary heart — disease and other causes. *Lancet*, 1972, 2, 835.

76. Moncada S., Gryglewski R., Bunting S. et al.: A lipid peroxides inhibits the enzyme in blood vessel microsomes that generates from prostaglandin which prevents platelet aggregation. *Prostaglandins*, 1976, 5, 715.
77. Moncada S., Vane J.: Arachidonic acid metabolites and the interactions between platelets and blood-vessel walls. *N.Engl.J.of Med.*, 1979, 20, 1142
78. Moncada S., Vane J.: Prostacyclin: its biosynthesis, actions and clinical potential. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 1981, 294, 305
79. Musiał J.: Swoiste białka płytek krwi w miażdżycy tętnic i chorobie wieńcowej. *Kard.Pol.* 1980, 8, 707.
80. Nafsted J.: Endothelial damage and platelet thrombosis associated with PUFA - rich, vitamin E deficient diet fed to pig. *Thromb. Res.*, 1974, 5, 251.
81. Needleman P., Hinkes M., Raz A.: Thromboxanes: selective biosynthesis and distinct biological properties. *Science*, 1976, 193, 163.
82. Needleman P., Whitaker M., Wyche A. et al.: Manipulation of platelet aggregation by prostaglandins and their fatty acid precursors: pharmacological basis for a therapeutic approach. *Prostaglandins*, 1980, 1, 165.
83. Nordoy A., Svensson B., Hoak J.: The effects of albumin bound fatty acids on the platelet inhibitory function of human endothelial cells. *Eur. J. of Clin. Invest.*, 1979, 9, 5.

84. O'Brien J., Etherington M., Jamieson S. et al.: Effect of a diet of polyunsaturated fats in some platelet function tests. *Lancet*, 1976, 2, 995
85. O'Brien J.: Lipids, platelets and atherosclerosis. *Lancet*, 1980, 2, 981.
86. Oelz O., Seyberth H., Knapp H. et al.: Effects of feeding ethyl, dihomogammalinolenate on prostaglandin biosynthesis and platelet aggregation in the rabbit. *Bioch. Bioph. Acta*, 1976, 431, 268.
87. Oliver M.: Diet and coronary heart disease. *Med. Biull.*, 1981, 1, 49.
88. Quadt J., Ten Hoor F.: Prostacyclin synthesis of the isolated perfused aorta is stimulated by pulsations, inhibited by aspirin and nicotine and can be modulated by the type of dietary fat. *Proc. 20-th Dutch. Fed. Meet. Groningen*, 1979.
89. Raz A., Aharony D., Kenig-Wakshal R.: Biosynthesis of thromboxane B₂ and 12-L-hydroxy 5,8,10-heptadecatrienoic acid in human platelets. *Eur. J. Biochem.*, 1978, 86, 447.
90. Reigald D., Needelman P.: Eicosapentaenoic acid and the triene prostaglandins: pharmacology and therapeutic potential. *TIPS*, 1980, 359, 361
91. Renaud S., Dunsont E., Godsey F. et al.: Platelet function in relation to dietary fats in farmers from two regions of France. *Thromb. Haemost.*, 1978, 40, 518.

92. Renaud S., Morazini R., Godsey F. et al.: Platelet functions in relation to diet and serum lipids in British farmers.
Br. Heart J., 1981, 46, 562.
93. Ross R.: Atherosclerosis: a problem of the biology of arterial wall cells and their interactions with blood components.
Atherosclerosis, 1981, 1, 293.
94. Samuelsson B., Borgeat P. et al.: Introduction of nomenclature leukotriens.
Prostaglandins, 1979, 17, 785.
95. Satoh K.: Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by new colorimetric method. Clin. Chim. Acta, 1978, 90, 37.
96. Saynor R., Verel D.: Effect of marine oil high in eicosapentaenoic acid on blood lipids and coagulation. Metab. and Nutr., 1980, 8, 378.
97. Scott M.: Advance in our understanding of vitamin E.
Fed. Proc., 1980, 10, 2736.
98. Shafer A., Cooper B., O'Hara D.: Identification of platelet receptor prostaglandin I₂ and D₂.
J. Biol. Chem., 1979, 254, 2914.
99. Shamberger R., Andreone T., Willis C.: Antioxidants and cancer IV initiating activity of malonaldehyde as a carcinogen.
J. Natl. Cancer Inst., 1974, 53, 1771.
100. Shattil S., Anaya R., Bennett J. et al.: Platelet hypersensitivity induced by cholesterol incorporation. J. Clin. Inv., 1975, 55, 636.

101. Shattil S., Bennett J., Colman R. et al.: Abnormalities of cholesterol phospholipid composition in patient and low-density lipoproteins of human hyperbetalipoproteinemia. *J. Lab. Clin. Med.*, 1977, 89, 341.
102. Shen T.: Prostaglandin synthetase inhibitor. Prostaglandin and Thromboxane ed by F. Bert, B. Samuelsson, G. Velo, 1976, 111. Plenum Press, New York.
103. Siegl A., Smith J., Silver M. et al.: Selective binding site for ^3H -prostacyclin on platelets. *J. Clin. Invest.*, 1979, 63, 215.
104. Siess W., Scherer B., Bohlrig B.: Platelet - membrane fatty acid platelet aggregation and thromboxane formation during mackerel diet. *Lancet*, 1980, 1, 441.
105. Silver M., Smith J., Ingeman C.: Arachidonic acid-induced human platelet aggregation and prostaglandin formation. *Prostaglandins*, 1973, 4, 863.
106. Sim A., Mc Craw A.: The activity of ω -lin denate and dihomogammalinolenate methyl esters in vitro and in vivo on blood platelet function in non-human primates and in man. *Thromb. Res.*, 1977, 10, 385.
107. Sim A., Mc Craw A.: Dihomogammalinolenic acid and thrombosis. *Br. Med. J.*, 1978, 1, 236.
108. Sinzinger H., Feigl W., Silberbauer K.: Prostacyclin generation by human atherosclerotic arteries. *Lancet*, 1980, 2, 469.

109. Sinzinger H., Silberbauer K., Horsch A. et al.: Decreased sensitivity of human platelets to PGI_2 during long-term intraarterial prostacyclin infusion in patients with peripheral vascular disease- a rebound phenomenon ?
Prostaglandins, 1981, 21, 49.
110. Spector A., Kaduce T., Hoak J. et al.: Utilisation of arachidonic and linoleic acid by cultured human endothelial cells. J.Clin.Invest., 1981, 68, 1003.
111. Spławiniński J., Wojtaszek B., Marcinkiewicz E.: Bioassay of thromboxane A_2 with the help of guinea pig lung strip. Abstr. of the Third Internat. Symp. on Prostaglandins and Thromboxanes, Halle/Salle, 1980, 102.
112. Srivastawa K.: Metabolism of arachidonic acid by platelets: utilisation of arachidonic acid by human platelets in presence of linoleic and dihomogammalinoleic acid.
Zeitsch. fur Ernährung, 1978, 17, 248.
113. Srivastawa K.: Effect of some saturated and unsaturated fatty acid on in vitro platelet utilisation of arachidonic acid. Prostagl. and Med. 1979, 3, 377.
114. Steele P., Rainwater J.: Effects of dietary and pharmacologic alteration of serum lipids on platelet survival time. Circulation, 1978, 58, 365
115. Stone K., Willis A., Hart M.: The metabolism of dihomogammalinolenic acid in man. Lipids, 1979, 2, 174.
116. Stuart M., Gerrard J., White J.: Effect of cholesterol on production of thromboxane B_2 in vitro.
N. Engl. J. of Med., 1980, 302, 6.

117. Szczeklik A., Nizankowski R. et al.: Successful therapy of advanced arteriosclerosis obliterans with prostacyclin. *Lancet*, 1979, 1, 1111
118. Szczeklik A., Gryglewski R.: Low density lipoprotein /LDL/ are carriers for lipid peroxides and inhibit prostacyclin biosynthesis in arteries. *Artery*, 1980, 7/6/, 488.
119. Szczeklik A., Szczeklik J., Nizankowski R. et al.: Prostacyclin for acute coronary insufficiency. *Artery*, 1980, 8 /1/, 7.
120. Szczeklik A., Szczeklik J., Nizankowski R.: Prostacyclin, nitroglycerin and effort angina. *Lancet*, 1981, 1, 1006.
121. Szczeklik A.: Cardiovascular actions of prostacyclin in man. *Prostaglandins, Platelets, Lipids : New developments in atherosclerosis* ed by H. Conn, E. De Felice, P. Kuo, 1981, 119, Miami: Symp. Spec. Inc.
122. Ten Hoor F., Van de Graff H.: The influence of a linoleic acid rich diet and of acetyl salicylic acid on NaCl-induced hypertension, Na⁺ and H₂O balance and urinary prostaglandin excretion in rats. *Acta Biol. Med. Germ.*, 1978, 37, 875.
123. The Anturane Reinfarction Trial Research Group: Sulfapyridazine in the prevention of sudden death after myocardial infarction. *N. Engl. J. of Med.*, 1980, 302, 250.
124. Thorngren M., Gustafson A.: Effects of 11-week increase in dietary eicosapentaenoic acid on bleeding time, lipids and platelet aggregation. *Lancet*, 1981, 2, 1190.

125. Triebe G., Block H., Forster W.: Uber das Blutdruckverhalten hochsalzbelaster Ratten bei unterscheidlichem linolauredehalt das Futters. Acta Biol.Med.Germ., 1976, 35,1223.
126. Turek J., Houstsmuller V.,Lussenburg R. et al.: Effect of low cholesterol, linoleic acid enriched diet on thrombotic tendency and plasma lipoproteins in patients with angina pectori. Artery, 1980, 8 /2/, 134.
127. Turpeinen O.: Effect of cholesterol-lowering diet on mortality from coronary heart disease and other cause. Circulation, 1979, 59, 1.
128. Whittle B., Moncada S., Vane J.: Comparison of the effects of prostacyclin, prostaglandin E₁ and D₂ on platelet aggregation in different species. Prostaglandins,1978,3, 373.
129. Willis A., Vane J., Kuhn D.: An endoperoxide aggregator /Lass/ formed in platelets in response to thrombotic stimuli: purification, identification and unique biological significance. Prostaglandins, 1974, 8,451.
130. Willis A., Comai K., Kuhn D. et al.: Dihomogammalinolenate supresses platelet aggregation when administrated in vitro or in vivo. Prostaglandins, 1974, 8, 509.
131. Wolfe L.: Eicosanoids: prostaglandins, thromboxanes, leukotreines and other derivatives of carbon-20 unsaturated fatty acid. J. of Neuroch., 1982, 1, 1.
132. Wong P., Malik K., Sun F. et al.: Hepatic metabolism of prostacyclin in rabbit formation of a potent inhibitor of platelet aggregation Washington Proc.Fourth Intern.Conf.on Prostagl., 1979, 127.

133. Wong P., Lee W., Quilley C. et al.: Metabolism of prostacyclin: formation of an active metabolite in the liver. *Fed.Proc.*, 1981, 40, 2001.
134. Woods H., Ash G., Weston M. et al.: Prostacyclin can replace heparin in haemodialysis in dog. *Lancet*, 1978, 2, 1075.
135. Wu K., Hoak J.: A new method for the quantitative detection of platelet aggregates in arterial insufficiency. *Lancet*, 1974, 2, 923.
136. Vallee E., Gougat J., Ageron M.: Inhibition of platelet phospholipase A₂ as a mechanism for the anti-aggregating effect of linoleic acid. *Agents and Actions*, 1980, 10, 57.
137. Vane J., Moncada S.: Prostacyclin. *Excerpta Med.*, 1980 190, 79.
138. Vergroessen A.: Physiological effects of dietary linoleic acid. *Nutr. Rev.*, 1977, 35, 1.
139. Żygulska-Mach H., Kostka-Trąbka E., Niton A., Gryglewski R.: Prostacyclin in central retinal vein occlusion. *Lancet*, 1980, 2, 1075.

WYKAZ UŻYTYCH SKRÓTÓW

-
- DHHA -- kwas dwuhomogammalinolenowy
 - EPA -- kwas eikezapentaenowy
 - MDA -- malonylodwualdehyd
 - HPETE -- kwas hydroperoksyarachidienowy
 - HETE -- kwas hydroksyarachidienowy
 - PG -- prostaglandyny np. E₁, E₂, D₂
 - PGI₂ -- prostacyklina
 - TX -- tromboksany np. A₂, B₂
 - LT -- leukotrieny np. A, B, C
 - HHD -- kwas 12-hydroperoksyheptadekadienowy
 - PRP -- osocze bogatoplytkowe
 - PPP -- osocze ubogoplytkowe
 - EDTA -- kwas etylenodwusminocztereoctowy
 - EMA -- 11,9-epoksymetanoanalog PGH₂