

Uniwersytet Jagielloński

Collegium Medicum

Wydział Lekarski

Barbara Sokołowska

**Wpływ hamowania biosyntezy leukotrienów na
czynność elektryczną serca w stabilnej chorobie
wieńcowej**

Praca doktorska

Promotor: Prof. dr hab. Andrzej Szczeklik

II Katedra Chorób Wewnętrznych CM UJ w Krakowie

Kierownik Katedry: Prof. dr hab. Jacek Musiał

Kraków 2010

*Składam serdeczne podziękowania Promotorowi,
Panu Profesorowi Andrzejowi Szczeklikiowi
za kierowanie badaniami, nieocenioną pomoc
i życzliwość w trakcie powstawania tej pracy.*

*Serdecznie dziękuję także Panu Profesorowi Jackowi Musiałowi,
Panu Profesorowi Markowi Sanakowi,
koleżankom i kolegom z II Katedry Chorób Wewnętrznych
za umożliwienie badań i pomoc w realizacji pracy.*

WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW

5-HETE – kwas 5-hydroksyeikozatetraenowy
5-HPETE – kwas 5-hydroperoksyekozatetraenowy
5-LO – 5-lipoksygenaza
5-S, 12-S-diHETE – kwas 5S, 12S-dwuhydroksyeikozatetraenowy
ALT – aminotransferaza alaninowa
APTT – (Activated Partial Thromboplastin Time) – (czas częściowej tromboplastyny po aktywacji), czas kaolinowo-kefalinowy
AST – aminotransferaza asparaginianowa
ATP – adenzynotrójfosforan
blok AV – blok przedsionkowo-komorowy
BLT₁ – receptor dla LTB₄ typu 1
BLT₂ – receptor dla LTB₄ typu 2
CA – koronarografia
CABG – (Coronary Artery Bypass Graft) – pomostowanie aortalno-wieńcowe
cAMP – cykliczny adenzynomonofosforan
ChNS – choroba niedokrwienna serca
CRP – białko C-reaktywne
CysLT₁ – receptor cysteinylowy typu 1
CysLT₂ – receptor cysteinylowy typu 2
CysLT₃ – receptor cysteinylowy typu 3
CysLTs – leukotrieny cysteinylowe
EKG – elektrokardiogram
ELISA – (enzyme-linked immunosorbent assay) - test immunoenzymatyczny
FLAP – (5-lipoxygenase activating protein) – białko aktywujące 5-lipoksygenazę
FW – frakcja wyrzutowa lewej komory serca
GPR17 – (G-protein coupled receptor 17) – związany z białkiem G receptor 17
h – godzina
HF – (high frequency) – pasmo w widmie zmienności rytmu serca o wysokiej częstotliwości (0,15-0,4 Hz).
HR – (heart rate) – częstotliwość rytmu (zatokowego lub komór – w przypadku migotania przedsionków) serca (dla całej doby lub poszczególnych godzin)
HR max. – maksymalna częstotliwość rytmu (zatokowego lub komór serca - w przypadku migotania przedsionków) serca (dla całej doby lub poszczególnych godzin)
HR min. – minimalna częstotliwość rytmu (zatokowego lub komór serca - w przypadku migotania przedsionków) serca (dla całej doby lub poszczególnych godzin)
HR śr. – średnia częstotliwość rytmu (zatokowego lub komór serca - w przypadku migotania przedsionków) serca (dla całej doby lub poszczególnych godzin)
HRV – (heart rate variability) – zmienność rytmu (zatokowego) serca (dla całej doby lub poszczególnych godzin)
ICAM-1 – (Intercellular Adhesion Molecule-1) – cząsteczka adhezji międzykomórkowej-1
IgG – immunoglobulina G
INR – (International Normalised Ratio) – współczynnik protrombinowy
LC/MS – spektrometria mas z wykorzystaniem wysokosprawnego chromatografu cieczonego
LDL-C – (Low Density Lipoproteins - cholesterol) – cholesterol frakcji lipoprotein o małej gęstości
LF – (low frequency) – pasmo w widmie zmienności rytmu serca o niskiej częstotliwości (0,04 – 0,15 Hz)
LK – lewa komora serca

LP – lewy przedsionek serca
LTA₄ – leukotrien A₄
LTA₄H – hydrolaza leukotrienu A₄
LTB₄ – leukotrien B₄
LTC₄ – leukotrien C₄
LTC₄S – syntaza leukotrienu C₄
LTD₄ – leukotrien D₄
LTE₄ – leukotrien E₄
LTE₄-AChE – kompleks LTE₄-acetylocholinesteraza
LTs – leukotrieny
NN – (normal – normal) – odstęp NN, gdzie „N” oznacza pobudzenie „prawidłowe” (normal), czyli zatokowe (odstęp pomiędzy kolejnymi pobudzeniami zatokowymi)
PBS – (phosphate buffered saline) - roztwór soli fizjologicznej buforowany fosforanami o pH=7,2
PCI – (Percutaneous coronary interventions) - przeszłone interwencje wewnątrzwłóciowe
PGD₂ – prostaglandyna D₂
PGE₂ – prostaglandyna E₂
PGF_{2α} – prostaglandyna F_{2α}
PGH₂ – prostaglandyna H₂
PGI₂ – prostacyklina
pNN₅₀ – (percentage of NN intervals) – odsetek odstępów NN różniących się od sąsiednich o ponad 50 ms względem liczby wszystkich odstępów NN w badanym okresie
POChP – przewlekła obturacyjna choroba płuc
PQ – odstęp PQ
QCA – cyfrowa angiografia ilościowa
QTc – skorygowany odstęp QT
R – randomizacja
rMSSD – (root mean square of successive differences) – pierwiastek kwadratowy średniej z sumy kwadratów różnic pomiędzy kolejnymi odstępami NN w badanym okresie (w ms)
SD – odchylenie standardowe
SDANN – (standard deviation of averaged NN intervals) – odchylenie standardowe średnich wartości odstępów NN, mierzonych w kolejnych krótkich przedziałach (5-minutowych) dłuższego okresu (całej doby lub poszczególnych godzin - oznaczane w ms)
SDNN – (standard deviation of NN) – odchylenie standardowe czasów trwania wszystkich odstępów NN w badanym okresie (w ciągu doby lub poszczególnych godzin – oznaczane w ms)
SDNNI – (SDNN index) – wskaźnik SDNN; średnia z odchyłeń standardowych kolejnych odstępów NN z kolejnych 5-minutowych okresów badania, oznaczany w ms (w ciągu doby lub poszczególnych godzin)
SEM – standardowy błąd średniej
ST – odcinek ST
SVE – pobudzenie dodatkowe pochodzenia nadkomorowego
TXA₂ – tromboksan A₂
TSH – hormon tyreotropowy
ULF – (ultra low frequency) – pasmo w widmie zmienności rytmu serca o najniższej częstotliwości (< 0,0033 Hz)
uLTE₄ – stężenie LTE₄ w moczu
VE – pobudzenie dodatkowe pochodzenia komorowego
VLF – (very low frequency) – pasmo w widmie zmienności rytmu serca o bardzo niskiej częstotliwości (0,0033-0,04 Hz)
Węzeł SA – węzeł zatokowo-przedsionkowy

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	7
1.1 Synteza leukotrienów	8
1.2 Receptory dla leukotrienów	11
1.3 Działanie leukotrienów	12
1.4 Leki przeciwleukotrienowe	13
1.5 Leukotrieny w chorobie niedokrwiennej serca	16
2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY	19
3. BADANI	20
4. METODY	26
4.1 Koronarografia	26
4.2 24-godzinne monitorowanie elektrokardiogramu metodą Holtera	27
4.3 Echokardiografia przekłatkowa	29
4.4 Oznaczanie stężenia LTE ₄ w moczu w I i II części badania	29
4.5 Oznaczenia laboratoryjne	32
4.6 Analiza statystyczna	33
5. WYNIKI BADAŃ I CZĘŚCI KLINICZNEJ	34
5.1 Porównanie grupy otrzymującej inhibitor 5 – lipoksygenazy (zileuton) z grupą otrzymującą placebo	34
5.2 Porównanie danych angiograficznych w badanych grupach	36
5.3 Stężenie LTE ₄ w moczu przed i po zabiegu koronarografii z ew. angioplastyką	37
5.4 Średnia częstotliwość rytmu zatokowego serca przed i po zabiegu	40
5.5 Zmienność rytmu serca przed i po zabiegu	41
5.6 Czas trwania odstępów PQ, QTc i zespołów QRS przed i po zabiegu	44
6. WYNIKI BADAŃ II CZĘŚCI KLINICZNEJ	46
6.1 Charakterystyka kliniczna badanej grupy	46
6.2 Stężenie LTE ₄ w moczu u chorych z utrwalonym migotaniem przedsionków w pierwszym i drugim dniu badania	48
6.3 Wpływ zileutonu na czynność elektryczną serca u chorych z utrwalonym migotaniem przedsionków	50

7. DYSKUSJA	53
8. WNIOSKI	64
9. STRESZCZENIE	65
10. WYKAZ TABEL	72
11. WYKAZ RYCIN	73
12. PIŚMIENNICTWO	74

1. WSTĘP

Leukotrieny (LTs) należą do grupy biologicznie czynnych pochodnych kwasu arachidonowego, powstających na szlaku 5-lipoksygenazy (5-LO) (1, 2). Są one powszechnie uznawane za silne mediatory prozapalne, o dobrze udokumentowanej roli w patofizjologii astmy oskrzelowej, alergicznego nieżytu nosa, łuszczycy, reumatoidalnego zapalenia stawów i nieswoistych zapaleń jelit (2-5). Ich znaczenie w chorobach układu krążenia o etiologii zapalnej, zwłaszcza w chorobie wieńcowej, skupia uwagę wielu środowisk naukowych i jest aktualnie obiektem intensywnych badań (6-8).

Leukotrieny uczestniczą w powstawaniu, progresji, a także destabilizacji blaszek miażdżycowych (8). W ścianach miażdżycowo zmienionych tętnic obecne są wszystkie niezbędne do syntezy leukotrienów białka i enzymy oraz ich receptory (8), a poziom 5-lipoksygenazy koreluje z zawansowaniem miażdżycy (9). Wysoką ekspresję receptorów dla leukotrienów (głównie receptorów CysLT₂) stwierdzono u zwierząt doświadczalnych, również we włóknach Purkiniego układu przewodzącego serca oraz na kardiomiocytach (10).

Funkcja i znaczenie receptorów dla leukotrienów cysteinylowych w układzie przewodzącym serca nie były dotąd badane. W kontekście prozapalnego działania leukotrienów oraz żywo dyskutowanych teorii zapalnych leżących u podłoża choroby wieńcowej, a nawet migotania przedsionków, rodzi się podstawowe pytanie - czy farmakologiczne hamowanie biosyntezy leukotrienów może wywierać wpływ na czynność elektryczną serca w tych schorzeniach.

1.1 Synteza leukotrienów

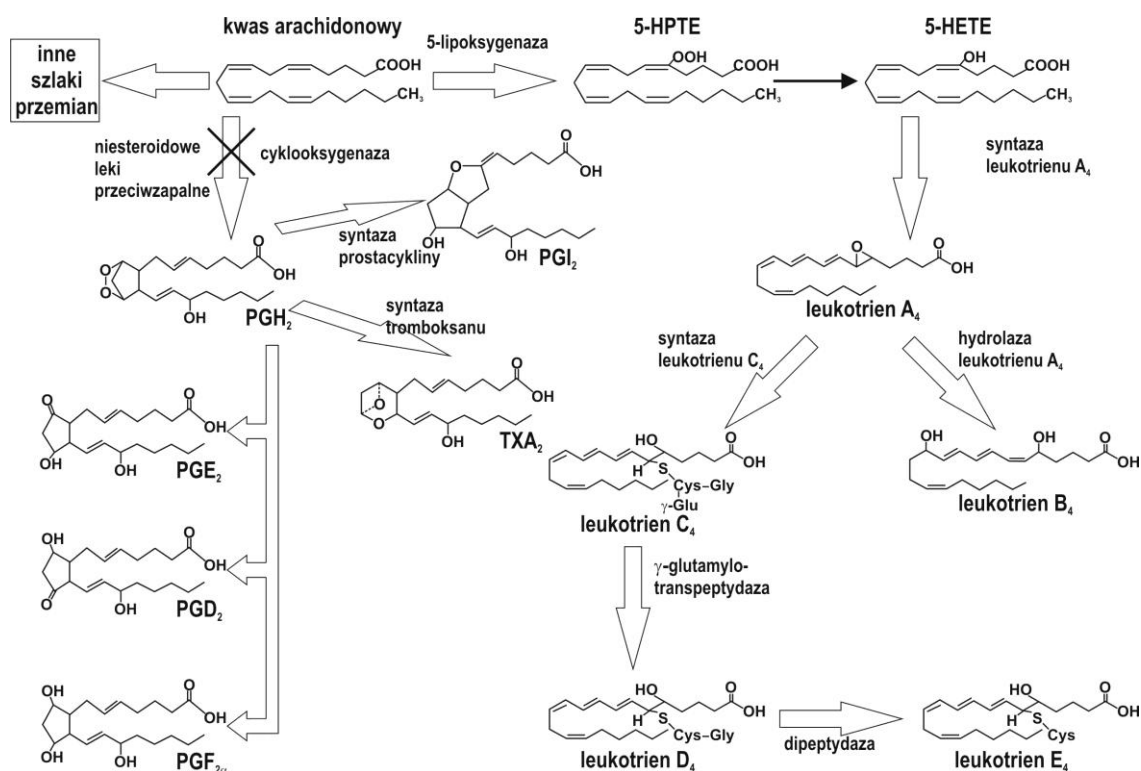
Leukotrieny są pochodnymi 20-węglowego wielonienasyconego kwasu tłuszczowego – kwasu arachidonowego (2, 11). Ich nazwa wywodzi się od komórek, z których zostały one po raz pierwszy wyizolowane, tj. leukocytów oraz obecności trzech sprzężonych wiązań podwójnych w łańcuchu węglowym. Nazwę tę zaproponował Bengt Samuelsson, który też określił ich strukturę chemiczną i zasadnicze szlaki przemian, a badania te uwieńczone zostały Nagrodą Nobla w 1982r. (12).

W przeciwieństwie do prostaglandyn, powstających z kwasu arachidonowego na szlaku cyklooksygenazy, synteza leukotrienów przebiega na szlaku 5-lipoksygenazy (ryc. 1).

Leukotrieny nie podlegają magazynowaniu w ziarnistościach wewnątrzkomórkowych, lecz za każdym razem, w chwili aktywacji komórki, syntetyzowane są *de novo* z fosfolipidów błonowych (13). Pod wpływem wielu czynników, m.in. reakcji antygen-przeciwciała, stymulacji fizycznej (zimno, miejscowe zmiany składu i stężeń jonów) czy bodźca zapalnego, dochodzi do mobilizacji wapnia wewnątrzkomórkowego oraz wnikania do cytozolu jonów wapniowych z przestrzeni zewnątrzkomórkowej (14, 15). W efekcie, aktywacji ulega fosfolipaza A₂, która przy udziale jonów wapnia i ATP hydrolizuje fosfolipidy do glicerolu i kwasu arachidonowego (16). Właściwa synteza leukotrienów rozpoczyna się dopiero w chwili oksygenacji kwasu arachidonowego, katalizowanej przez cytozolową 5-lipoksygenazę (12). Kwas arachidonowy musi być jednak uprzednio związany z dodatkowym białkiem błonowym, tzw. białkiem aktywującym 5-lipoksygenazę (FLAP – 5-lipoxygenase activating protein). Z kwasu arachidonowego, za pośrednictwem kompleksu 5-lipoksygenazy i białka FLAP, powstaje kwas 5-hydroperoksyheksatetraenowy (5-HPETE), a następnie leukotrien A₄ (LTA₄). Dalsza przemiana LTA₄ może przebiegać dwukierunkowo, doprowadzając, przy udziale hydrolazy A₄, do powstania leukotrienu B₄

(LTB₄) lub dzięki reakcji przyłączenia do LTA₄ cząsteczki glutationu – leukotrienu C₄ (LTC₄). LTC₄ drogą transportu czynnego przedostaje się do środowiska zewnątrzkomórkowego, gdzie za pośrednictwem gamma-glutamilo-transpeptydazy odszczepieniu ulega reszta glutaminowa i utworzony zostaje leukotrien D₄ (LTD₄). Z kolei, z leukotrienu D₄ (LTD₄), po odłączeniu cząsteczki glicyny, powstaje leukotrien E₄ (LTE₄) (2). Jest on wydalany z żółcią lub przez nerki, w niezmienionej formie lub jako N-acetylo– LTE₄ (17).

Leukotrieny LTC₄, LTD₄ i LTE₄ łącznie nazywane są leukotrienami cysteinyłowymi (CysLTs), z powodu obecności w ich cząsteczkach cysteiny, zaś liczba 4 oznacza całkowitą ilość podwójnych wiązań w łańcuchu węglowym (12).



Rycina 1. Drogi przemian kwasu arachidonowego na szlaku cyklooksygenazy i 5-lipoksygenazy.

PGH₂ – prostaglandyna H₂, PGE₂ – prostaglandyna E₂, PGD₂ – prostaglandyna D₂, PGF_{2α} – prostaglandyna F_{2α}, PGI₂ – prostacyklina, TXA₂ – tromboksan A₂, 5-HPETE – kwas 5-hydroperoksyseikozatetraenowy, 5-HETE – kwas 5-hidroksyseikozatetraenowy.

Zdolność do wytwarzania leukotrienów uwarunkowana jest obecnością w komórkach enzymów uczestniczących w ich syntezie (18). Występowanie 5-lipoksygenazy (5-LO) i białka FLAP ogranicza się do komórek pochodzących ze szpiku kostnego, które stanowią tzw. pierwotne źródło leukotrienów (18). Zmienna ekspresja szlaku enzymatycznego w poszczególnych typach komórek, powoduje, iż różnią się one rodzajem i ilością produkowanych leukotrienów. I tak - LTB₄ syntetyzowany jest głównie przez neutrofile, w mniejszym stopniu przez monocyty i makrofagi. Natomiast za syntezę LTC₄ odpowiedzialne są przede wszystkim mastocyty i eozynofile, a ich dodatkowe źródło stanowią bazofile, monocyty i makrofagi (18, 19).

Znanym zjawiskiem jest także uwalnianie LTA₄ przez komórki posiadające 5-LO i możliwość jego dalszego metabolizowania do LTB₄ i LTC₄ przez inne komórki, które samodzielnie nie są w stanie syntetyzować leukotrienów. W ten sposób m. in. LTB₄ powstaje w erytrocytach i limfocytach T (20), a LTC₄ w komórkach śródbłonna (21, 22), płytkach krwi (23) i komórkach mięśni gładkich (24). Mechanizm ten, określany „syntezą przezkomórkową” został opisany po raz pierwszy w 1982r. przez Marcusa i wsp. na przykładzie interakcji między neutrofilami i płytkami krwi (25). Stanowi on dodatkowe i istotne źródło leukotrienów w zapalnie zmienionych tkankach (26, 27).

Jak dotąd nie udało się opracować wiarygodnej metody oznaczania stężenia leukotrienów w surowicy krwi, głównie z powodu bardzo szybkiego metabolizmu kolejnych produktów 5-lipoksygenazy, jak również możliwości ich uwalniania z leukocytów podczas samego pobierania i obróbki materiału (28). Wiadomo natomiast, iż LTE₄ jest najbardziej stabilnym produktem przemian leukotrienów cysteinylowych (29). Jego stężenie w moczu świadczy o aktywacji szlaku 5-lipoksygenazy *in vivo* (30). Oznaczanie stężenia LTE₄ w moczu stało się powszechnie uznaną metodą oceny generacji leukotrienów w ustroju (31).

1.2 Receptory dla leukotrienów

Receptory leukotrienowe należą do grupy tzw. receptorów z siedmioma domenami przezbłonowymi, sprzężonych z białkami G (32-35). Przyłączenie się LTs do swoistego receptora powoduje zmianę jego konformacji, a następnie pobudzenie białka G i zmiany stężeń wewnątrzkomórkowego wapnia oraz cAMP. Zapoczątkowuje to aktywację kolejnych enzymów kaskady kinaz i ostatecznie odpowiednią zmianę aktywności komórki (36).

LTB₄ działają poprzez dwa typy receptorów: receptory BLT₁ o wysokim stopniu powinowactwa dla LTB₄, ale znajdujące się jedynie na komórkach zapalnych, oraz poprzez receptory BLT₂ o niskim stopniu powinowactwa dla substratu, za to szeroko reprezentowane w tkankach (13, 37, 38). Dla leukotrienów cysteinylowych (LTC₄, LTD₄, LTE₄) dobrze scharakteryzowane zostały dwa typy receptorów: CysLT₁ i CysLT₂ (10, 36, 39). Ich dystrybucję tkankową oraz ekspresję przedstawiono w tabeli 1 (40). Receptory CysLT₁ znajdują się głównie na komórkach mięśni gładkich oskrzeli, makrofagach śródmiąższowych płuc i komórkach śledziony, podczas gdy receptory CysLT₂ szczególnie wysoką ekspresję wykazują w sercu, nadnerczach i centralnym systemie nerwowym (40). W sercu receptory CysLT₂ obecne są na komórkach mięśni gładkich i śródbłonna tętnic wieńcowych oraz, w zaskakująco dużych ilościach, na kardiomiocytach (głównie prawego przedsionka, lewej komory i koniuszka serca) i komórkach włókien Purkiniego układu przewodzącego serca (10). Funkcja i znaczenie receptorów cysteinylowych w komórkach układu przewodzącego serca nie zostały do tej pory ustalone.

Wyniki badań nad funkcją receptorów cysteinylowych wskazują na istnienie, z bardzo dużym prawdopodobieństwem, dodatkowo heterodimeru CysLT₁-CysLT₂ lub jeszcze jednego, trzeciego typu receptora (CysLT₃). Potencjalnym kandydatem na CysLT₃ wydaje się być sprzężony z białkiem G receptor 17 (GPR17) (41).

Tabela 1. Dystrybucja i ekspresja receptorów cysteinylowych CysLT₁ i CysLT₂ w tkankach.

TKANKA	STOPIEŃ EKSPRESJI	
	CysLT ₁	CysLT ₂
Płuca		
mięśniówka gładka oskrzeli	++	+
makrofagi śródmiąższowe	++	++
Leukocyty krwi obwodowej		
eozynofile	++	++
monocyty/makrofagi	+	+
neutrofile	+/-	+
limfocyty B	+	?
limfocyty T	+/-	+
komórki prekursorowe CD 34+	+	?
Mastocyty	+	?
Śledziona	++	++
Serce i tętnice wieńcowe		++
Mózg		++
Nadnercza	?	++

CysLT₁ – receptor cysteinylowy typu 1, CysLT₂ – receptor cysteinylowy typu 2, (++) wysoka ekspresja, (+) niska ekspresja, (+/-) ekspresja kwestionowana, (?) jeszcze nie zbadano.

1.3 Działanie leukotrienów

Profil działania LTB₄ jest całkowicie odmienny od leukotrienów cysteinylowych (CysLTs). LTB₄ działa przede wszystkim silnie chemotaktycznie na neutrofile, eozynofile i monocyty (42). Stymuluje on uwalnianie enzymów lizosomalnych i reaktywnych form tlenu przez neutrofile, zwiększa przepuszczalność naczyń oraz wzmacnia adhezję krążących neutrofilów do ścian naczyń - poprzez wzrost ekspresji cząstek adhezyjnych ICAM-1 na komórkach śródbłonna i Mac-1 na powierzchni neutrofilów (43, 44). Dodatkowo, pobudza wytwarzanie prozapalnych

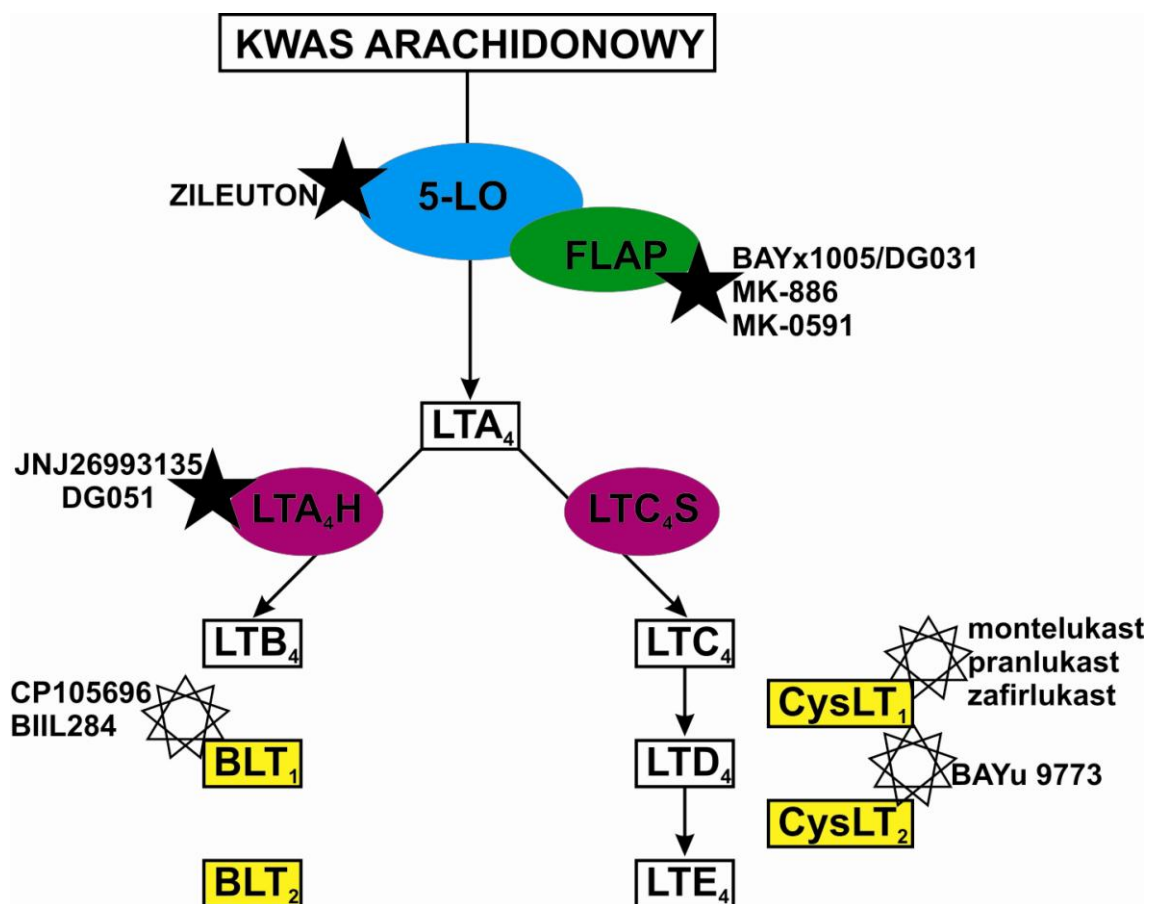
cytokin przez leukocyty, prowadząc do wzmocnienia i przedłużenia reakcji zapalnej (43).

Leukotrieny cysteinyłowe, działając poprzez receptory CysLT₁, powodują: skurcz mięśni gładkich oskrzeli, zwiększenie produkcji śluzu i upośledzenie klirensu śluzowo-rzęskowego, wzrost przepuszczalności naczyń z obrzękiem błony śluzowej; uczestniczą one też w niekorzystnym zjawisku remodelingu oskrzeli u chorych na astmę oskrzelową (45-48). Działając na receptory CysLT₂ w sercu, wykazują ujemny efekt inotropowy, silnie kurczą zmienione miażdżycowo tętnice wieńcowe (49), zwiększają przepuszczalność naczyń (39, 50), uczestniczą w ich remodelingu oraz powstawaniu zakrzepów (51, 52).

1.4 Leki przeciwleukotrienowe

Leki przeciwleukotrienowe (włączając tu również związki eksperymentalne, nie wprowadzone dotąd do kliniki) można podzielić ze względu na sposób ich działania na pięć podstawowych grup: inhibitory 5-lipoksygenazy, inhibitory białka FLAP, inhibitory hydrolazy leukotrienu A₄, antagoniści receptorów cysteinyłowych oraz antagoniści receptorów dla LTB₄ (ryc. 2) (7, 53, 54).

Związkami, które znalazły już zastosowanie kliniczne są: inhibitor 5-LO – zileuton oraz antagoniści receptorów CysLT₁ (np. montelukast, zafirlukast). Stosuje się je w przewlekłym leczeniu astmy oskrzelowej i zaliczane są one do grupy leków kontrolujących przebieg choroby (55-58). Zalety tych preparatów to bezpieczny profil działania, dobra tolerancja przez chorych i rzadkie działania niepożądane (54, 59).



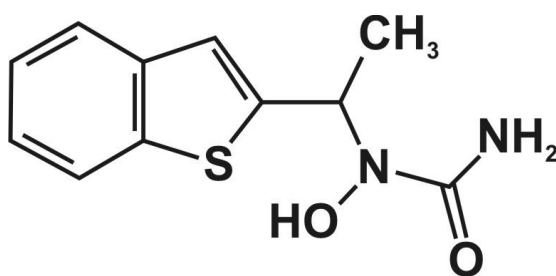
Rycina 2. Schemat syntezy leukotrienów z uwzględnieniem miejsc działania wybranych leków i eksperymentalnych preparatów przeciwleukotrienowych.

5-LO – 5-lipoksygenaza, FLAP – białko aktywujące 5-lipoksygenazę, LTA₄H – hydrolaza leukotrienu A₄, LTC₄S – syntaza leukotrienu C₄, BLT₁ – receptor dla LTB₄ typu 1, BLT₂ – receptor dla LTB₄ typu 2, CysLT₁ – receptor cysteinyłowy typu 1, CysLT₂ – receptor cysteinyłowy typu 2, LTA₄ – leukotrien A₄, LTB₄ – leukotrien B₄, LTC₄ – leukotrien C₄, LTD₄ – leukotrien D₄, LTE₄ – leukotrien E₄, ★ – inhibitory szlaku syntezy LTs, ☆ – inhibitory receptorów LTs.

Inhibitory 5-LO i białka FLAP działają na tym samym poziomie szlaku syntezy LTs (hamują oba ramiona syntezy LTs, a więc produkcję LTB₄ i CysLTs) i powodują podobny efekt kliniczny. Wśród inhibitorów CysLTs wyróżniamy blokery receptora CysLT₁ oraz mieszanych antagonistów CysLT₁/CysLT₂ (BAYu9773). Niestety, nie uzyskano dotąd selektywnego

inhibitora CysLT₂, co stanowi podstawowe ograniczenie badań nad jego funkcją (ryc. 2).

W niniejszej pracy do hamowania biosyntezy leukotrienów użyto lek – zileuton – inhibitor 5-lipoksygenazy (Zyflo, A-64077, Abbot, USA) (60, 61). Preparat ten został zatwierdzony przez FDA i dopuszczony do sprzedaży na rynku amerykańskim w 1997 roku, gdzie do dzisiaj jest stosowany jako lek w długotrwałej kontroli i zapobieganiu objawów lekkiej astmy przewlekłej (62 - 68). Chemicznie zileuton jest pochodną hydroksymocznika (N-([1-(1-benzotieno-2-yl)etylo]-N-hydroksymocznik) o wzorze sumarycznym C₁₁H₁₂N₂O₂S i masie cząsteczkowej 236,29 (ryc. 3) (61, 69). Jest mieszaniną racemiczną (50:50) R (+) i S (-) enancjomerów, z których oba są farmakologicznie czynnymi *in vivo* i *in vitro* inhibitorami 5-lipoksygenazy (69).



Rycina 3. Wzór strukturalny zileutonu – inhibitora 5-lipoksygenazy (Zyflo).

Zileuton dobrze (w ok. 94,5%) wchłania się z przewodu pokarmowego i szybko, bo już po ok. 1,7 godziny ($T_{\max}$ ok. 1,7 h) od czasu spożycia tabletki, osiąga swoje maksymalne stężenie we krwi ($C_{\max}$ ok. 4.98 µg/mL). W osoczu w 93% wiąże się z białkami, głównie albuminami, a jego średni okres półtrwania wynosi 2,5 godziny. Eliminacja zileutonu z organizmu polega na jego metabolizowaniu w wątrobie przy udziale cytochromu P450. Zileuton, w standardowej dawce 2400 mg/dobę, zmniejsza endogenną produkcję leukotrienów średnio o ok. 26 do 86% (70).

Wykorzystany przez nas w badaniu preparat (Zyflo), ze względu na wspomniany wyżej krótki czas działania, podawany był, zgodnie z zaleceniami producenta, w 4 podzielonych dawkach (tj. po 600 mg) na 24 godziny. W USA od 2008 roku dostępna jest dodatkowo postać leku o przedłużonym uwalnianiu (Zyflo CR); co pozwala na dawkowanie leku dwa razy na dobę po 1200 mg (2 tabletki) (69, 71).

Na ogół lek jest dobrze tolerowany. Wśród obserwowanych działań ubocznych, do istotnych klinicznie należy przejściowy wzrost aktywności enzymów wątrobowych, po co najmniej kilku tygodniowym okresie stosowania (69). Zyflo jest lekiem niedostępnym w Polsce.

1.5 Leukotrieny w chorobie niedokrwiennej serca

Leukotrien B_4 (LTB_4) oraz leukotrieny cysteinyłowe biorą udział w powstawaniu, progresji oraz destabilizacji blaszek miażdżycowych (8, 72-74). Uczestniczą one w rekrutacji monocytów, komórek piankowatych, hiperplazji intymy, napływie leukocytów do ścian tętnic oraz niekorzystnym zjawisku remodelingu naczyń (51, 52, 75, 76). W ścianach miażdżycowo zmienionych tętnic obecne są wszystkie niezbędne do syntezy leukotrienów białka i enzymy (FLAP – białko aktywujące 5-lipoksygenazę, 5-lipoksygenaza, hydrolaza leukotrienu A_4 , syntaza leukotrienu C_4) oraz ich receptory ($CysLT_1$, $CysLT_2$, BLT_1 , BLT_2) (8), a poziom 5-lipoksygenazy koreluje z zaawansowaniem i niestabilnością blaszek miażdżycowych (9, 77-79). Leukotrieny cysteinyłowe (LTC_4 , LTD_4) silnie kurczą naczynia wieńcowe, prowadzą do spadku przepływu wieńcowego i obniżenia kurczliwości mięśnia sercowego. Skurcz naczyń jest znacznie bardziej wyrażony w segmentach tętnic wieńcowych wyraźnie zmienionych przez proces miażdżycowy (49). W trakcie ostrego niedokrwienia mięśnia sercowego obserwowano zwiększenie generacji leukotrienów, zarówno u zwierząt doświadczalnych, jak i u pacjentów

z chorobą niedokrwienną serca (80-82). U chorych na zawał serca i na niestabilną dusznicę bolesną, leczonych farmakologicznie, również stwierdzano podwyższone wartości leukotrienu E_4 w moczu (80). W badaniach przeprowadzonych w II Katedrze Chorób Wewnętrznych CM UJ wykazano, że także w trakcie niedokrwienia wywołanego zamknięciem tętnicy wieńcowej przez cewnik balonowy dochodzi do zwiększonego uwalniania LTE_4 w moczu (83). Ponadto zauważono, iż u chorych z podwyższonymi stężeniami tego leukotrienu w moczu przed zabiegiem, częściej dochodziło do niekorzystnych zdarzeń sercowych (zawał, wstrząs, konieczność ponownej rewaskularyzacji) w trakcie dalszej hospitalizacji (83). Podwyższone stężenia LTE_4 w moczu stwierdzano również u chorych po zabiegach pomostowania aortalno-wieńcowego (CABG) (84).

Zauważono, iż pewne warianty genetyczne białka aktywującego 5-lipoksygenazę są związane z częstszym występowaniem restenozy w stentach po zabiegach angioplastyki w obrębie tętnic wieńcowych (85, 86). Wykazano także związek występowania udaru mózgu i zawału serca w populacji Europy, Japonii i Ameryki z określonymi allelami genów dla FLAP oraz hydrolazy LTA_4 , warunkującymi zwiększoną produkcję LTB_4 (87-89). W 4-tygodniowym pilotażowym badaniu pacjentów po zawale serca z potwierdzoną obecnością jednego z w/w wariantów genów, leczonych inhibitorem białka aktywującego lipoksygenazę (FLAP) (DG031), uzyskano znaczącą redukcję stężenia białka C reaktywnego (CRP), amyloidu A, mieloperoksydazy i rozpuszczalnej formy ICAM-1 (90). U 28 osób (6%), biorących udział w badaniu Los Angeles Atherosclerosis Study, będących nosicielami dwóch zmutowanych alleli w obrębie regionu promotorowego genu 5-lipoksygenazy, stwierdzono istotne pogrubienie kompleksu intima-media w tętnicach szyjnych oraz dwukrotnie wyższe stężenia białka C-reaktywnego w porównaniu z nosicielami allelu prawidłowego (91, 92). U kobiet polimorfizm genetyczny regionu promotorowego syntazy LTC_4 , polegający na zamianie adenozyiny na cytozynę, opisany po raz pierwszy przez Marka Sanaka i wsp. (93), związany był z większym odsetkiem zwapnień w tętnicach wieńcowych oraz wyższym wskaźnikiem intima-media w tętnicach szyjnych (94). Blokowanie syntezy LTs preparatami MK-886

oraz BAYx1005 (inhibitory FLAP) hamowało proces powstawania blaszek miażdżycowych u myszy pozbawionych genów dla apolipoproteiny E oraz receptora dla LDL (95, 96). Również zastosowanie inhibitora rec. CysLT₁ – montelukastu – w tym samym modelu zwierzęcym powodowało podobny, choć słabiej wyrażony efekt kliniczny (97). Prowadzone były także badania kliniczne (II i III fazy) z obiecującymi wstępnymi wynikami, dotyczące preparatu DG031 (veliflapon, BAYx1005 – jeden z inhibitorów FLAP) i DG051 (inhibitor hydrolazy A₄) nad możliwością ich zastosowania w chorobie wieńcowej w prewencji wtórnej zawału serca i udaru mózgu (2, 54, 90). Przypuszcza się, iż leki przeciwleukotrienowe znajdą zastosowanie w terapii schorzeń układu krążenia (7, 98-100). Przestankami tego przypuszczenia są: niepodważalna rola LTs w etiopatogenezie miażdżycy oraz długa tradycja bezpiecznego stosowania tych preparatów w terapii astmy oskrzelowej.

2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

Leukotrieny są silnymi mediatorami prozapalnymi, powstającymi z kwasu arachidonowego, na szlaku 5-lipoksygenazy. W ścianach miażdżycowo zmienionych tętnic obecne są wszystkie niezbędne do ich syntezy enzymy oraz ich receptory, a podczas koronarografii i plastyki naczyń wieńcowych dochodzi do zwiększonej generacji leukotrienów.

Dla receptorów CysLT₂ szczególnie wysoką ekspresję stwierdzono na komórkach włókien Purkiniego układu przewodzącego serca, kardiomiocytach zwłaszcza prawego przedsionka i lewej komory, w mięśniówce gładkiej naczyń wieńcowych oraz na komórkach śródbłonna. Funkcja i znaczenie receptorów dla leukotrienów cysteinylowych w układzie przewodzącym serca nie były dotąd badane. W modelach zwierzęcych wykazano, iż inhibitory 5-LO redukują śmiertelność, ograniczają strefę zawału, zmniejszają wyrzut enzymów sercowych i występowanie groźnych arytmii komorowych, ale związanych z ostrym niedokrwieniem i zjawiskiem reperfuzji (101). W kontekście prozapalnego działania leukotrienów oraz żywo dyskutowanych teorii zapalnych leżących u podłoża choroby wieńcowej czy migotania przedsionków, rodzi się podstawowe pytanie - czy farmakologiczne hamowanie biosyntezy leukotrienów może wywierać wpływ na czynność elektryczną serca u tych chorych. Odpowiedź byłaby o tyle interesująca, że dysponujemy lekami przeciwleukotrienowymi, które od lat z powodzeniem stosowane są w terapii astmy oskrzelowej, a które w przyszłości być może znajdą zastosowanie również w leczeniu schorzeń układu krążenia.

Celem badania była:

Ocena wpływu farmakologicznego hamowania 5-lipoksygenazy na generację leukotrienów i czynność elektryczną serca:

- a) u chorych na stabilną chorobą niedokrwinną serca
poddawanych koronarografii z ewentualną przezskórną
angioplastyką tętnic wieńcowych
- b) u chorych z utrwalonym migotaniem przedsionków

3. BADANI

Badanie przeprowadzono w dwóch częściach. W pierwszej, wzięli udział chorzy na stabilną chorobę wieńcową, z zatokowym rytmem w zapisie EKG.

W drugiej części, chorzy z utrwalonym migotaniem przedsionków. Wszyscy pacjenci wyrazili świadomą zgodę na udział w badaniu. Protokół badania uzyskał aprobatę Komisji Bioetycznej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Część I badania:

Do badania włączono 103 chorych (36 kobiet i 67 mężczyzn) w wieku od 30 do 75 lat z udokumentowaną stabilną chorobą niedokrwienną serca. Pacjentów rekrutowano spośród osób przyjmowanych do Oddziału Interny i Chorób Serca II Katedry Chorób Wewnętrznych CMUJ w celu wykonania planowego zabiegu koronarografii z ew. angioplastyką i implantacją stentu. Rozpoznanie choroby wieńcowej ustalane było na podstawie typowego wywiadu, dodatniego wyniku testu wysiłkowego i/lub wcześniej stwierdzonych angiograficznych cech miażdżycy naczyń wieńcowych.

Stabilną chorobę wieńcową zdefiniowano w oparciu o wytyczne European Society of Cardiology z 2006 roku (102).

Kryteria włączenia do badania:

- Chorzy z rozpoznaną chorobą niedokrwienną serca kierowani do planowej diagnostyki koronarograficznej
- Wiek od 30-75 lat
- Rytm zatokowy w zapisie elektrokardiogramu
- Brak przeciwwskazań do leczenia inwazyjnego
- Pisemna zgoda pacjenta na udział w badaniu

Kryteria wykluczające z udziału w badaniu:

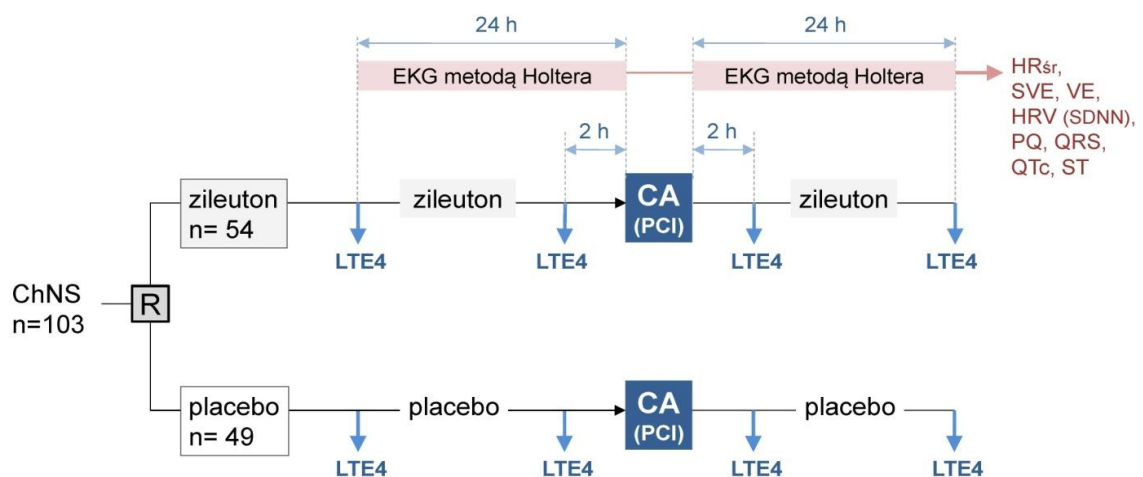
- Zawał serca w okresie ostatnich 3 miesięcy bądź niestabilna dusznica bolesna
- Wszczepiony rozrusznik serca
- Zaburzenia rytmu serca o typie migotania/trzepotania przedsionków lub częstoskurczu przedsionkowego z blokiem AV
- Astma oskrzelowa
- Zaostrzenie POChP
- Objawy ostrej infekcji
- Przewlekła choroba nerek (stadium 3)
- Niewydolność wątroby
- Niewydolność serca (FW < 50%)
- Inne schorzenia o ciężkim przebiegu
- Brak zgody na badanie

Schemat I części badania (Ryc. 4):

1. Czas badania dla każdego chorego wynosił ok. 48 godzin.
2. W dniu przyjęcia do szpitala, po uzyskaniu świadomej, pisemnej zgody u wszystkich pacjentów spełniających kryteria włączenia do badania, przeprowadzono pełne badanie lekarskie obejmujące wywiad, badanie fizykalne oraz echokardiograficzne serca. Następnie wykonywano spoczynkowy 12 – odprowadzeniowy zapis EKG oraz pobierano próbki krwi w celu wykonania badań laboratoryjnych (morfologia krwi, elektrolity, stężenie glukozy, mocznika i kreatyniny, aktywność AST i ALT, stężenie bilirubiny, pełny lipidogram, CRP metodą o wysokiej czułości oraz poziom troponiny I).
3. Chorych następnie randomizowano do grupy badanej, otrzymującej inhibitor 5-lipoksygenazy (Zileuton) (n=54) w dawce 4 x 600mg/dobę lub do grupy kontrolnej, otrzymującej placebo (n=49). Lek Zyflo (zileuton) zakupiono w firmie Cornerstone Therapeutics Inc., Cary NC, USA. Ponieważ czas badania wynosił ok. 48 godzin, chorzy łącznie otrzymywali 10 dawek zileutonu lub

placebo, w tym 5 przed i 5 po zabiegu. Bezpośrednio po przyjęciu piątej dawki leku vs placebo chorych kierowano do Pracowni Angiografii w celu wykonania koronarografii z ew. angioplastyką.

4. U pacjentów kwalifikujących się do leczenia przezskórnego, bezzwłocznie po koronarografii, wykonywano zabieg angioplastyki wieńcowej z implantacją stentu.
5. Próbkę moczu w celu oznaczenia LTE_4 pobierano dwukrotnie w pierwszej dobie hospitalizacji (24 godziny oraz 2 godziny przed zabiegiem) i dwukrotnie w drugiej dobie (dwie godziny oraz 24 godziny po zabiegu).
6. Przed i po zabiegu u wszystkich chorych prowadzono 24-godzinne monitorowanie EKG metodą Holtera.
7. W 12 godzinie po zabiegu pobierano próbkę krwi w celu oznaczenia poziomu troponiny I.
8. W trakcie hospitalizacji chorzy otrzymywali standardowe leczenie obejmujące: aspirynę, tiklopidynę lub kłopidogrel, beta-bloker, inhibitor konwertazy angiotensyny i statynę. Preparaty oraz dawki leków pozostawały niezmienione przez cały okres prowadzenia badania (patrz tabela 3).



Rycina 4. Schemat I części badania.

CA (PCI) – koronarografia z ew. przezskórną angioplastyką tętnic wieńcowych, R – randomizacja, LTE_4 – leukotrien E_4 , EKG metodą Holtera – 24-godzinne monitorowanie EKG metodą Holtera, HR sr. – średnia częstotliwość rytmu zatokowego serca dla całej doby, SVE – dobową ilość pobudzeń dodatkowych pochodzenia nadkomorowego, VE – dobową ilość pobudzeń dodatkowych pochodzenia komorowego, HRV (SDNN) – zmienność rytmu (zatokowego) serca, PQ – odstęp PQ [ms], QRS – czas trwania zespołu QRS [ms], QTc – czas trwania skorygowanego odstępu QT [ms], ST – odcinek ST.

Część II badania:

Do II części badania włączono 49 chorych (14 kobiet i 35 mężczyzn) w wieku od 35 do 80 lat z udokumentowanym utrwalonym migotaniem przedsionków hospitalizowanych w Oddziale Interny i Chorób Serca II Katedry Chorób Wewnętrznych CMUJ.

Utrwalone migotanie przedsionków zdefiniowano w oparciu o wspólne wytyczne American College of Cardiology (ACC), American Heart Association (AHA) oraz European Society of Cardiology (ESC) dotyczące postępowania w tej arytmii z 2006 roku (103).

Kryteria włączenia do badania:

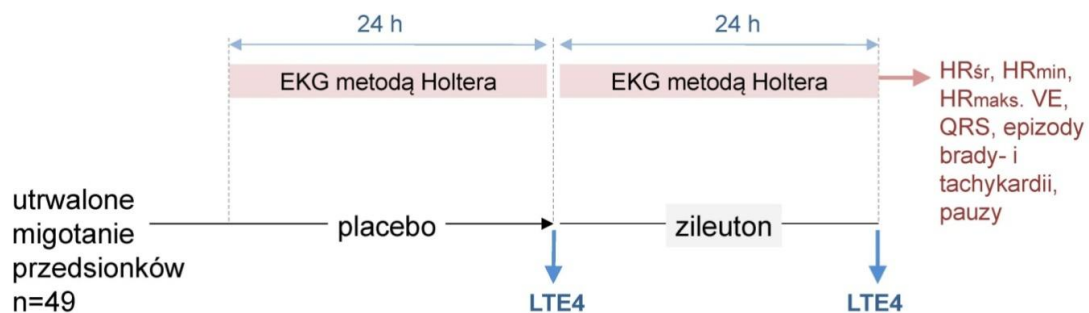
- Chorzy z rozpoznanym utrwalonym migotaniem przedsionków (trwającym > 12 miesięcy)
- Wiek od 35-80 lat
- Migotanie przedsionków w zapisie elektrokardiogramu
- Pisemna zgoda pacjenta na udział w badaniu

Kryteria wykluczające z badania:

- Niewydolność serca w okresie dekompensacji
- Zawał serca w okresie ostatnich 3 miesięcy, bądź niestabilna dusznica bolesna
- Obecność skrzepliny w jamach serca
- Wszczepiony rozrusznik serca
- Astma oskrzelowa
- POChP
- Objawy ostrej infekcji
- Przewlekła choroba nerek (stadium 3)
- Niewydolność wątroby
- Inne schorzenia o ciężkim przebiegu
- Nadczynność tarczycy
- Brak zgody na badanie

Schemat II części badania (Ryc. 5):

1. Czas badania dla każdego chorego wynosił ok. 48 godzin.
2. W dniu przyjęcia do szpitala, po uzyskaniu świadomej, pisemnej zgody u wszystkich chorych spełniających kryteria włączenia do badania, przeprowadzono pełne badanie lekarskie obejmujące wywiad, badanie fizykalne oraz echokardiograficzne serca. Następnie wykonywano spoczynkowy 12 – odprowadzeniowy zapis EKG oraz pobierano próbki krwi w celu wykonania badań laboratoryjnych obejmujących morfologię, INR, APTT, d-dimery, fibrynogen, stężenie glukozy, mocznika, kreatyniny, sodu, potasu, enzymy wątrobowe, poziom troponiny I oraz stężenie białka CRP i TSH.
3. Wszyscy chorzy otrzymywali zawsze w pierwszej dobie pobytu placebo (1 tbl. co 6 godzin), a w drugiej dobie zileuton w dawce 4 x 600 mg.
4. Próbki moczu w celu oznaczenia LTE_4 pobierano dwukrotnie w trakcie pobytu (pierwszego i drugiego dnia hospitalizacji – zawsze o tej samej godzinie).
5. U wszystkich pacjentów prowadzono dwukrotnie 24-godzinne monitorowanie holterowskie EKG (w pierwszej i drugiej dobie hospitalizacji).
6. W trakcie hospitalizacji chorzy otrzymywali dotychczasowe standardowe leczenie (104, 105). Preparaty oraz dawki leków pozostawały niezmiennie przez cały okres prowadzenia badania.



Rycina 5. Schemat II części badania.

LTE₄ – leukotrien E₄, EKG metodą Holtera – 24-godzinne monitorowanie EKG metodą Holtera, HR śr. – średnia częstotliwość rytmu komór serca dla całej doby, HR max. – maksymalna częstotliwość rytmu komór serca dla całej doby, HR min. – minimalna częstotliwość rytmu komór serca dla całej doby, VE – dobowa ilość pobudzeń dodatkowych pochodzenia komorowego, QRS – czas trwania zespołu QRS [ms], QTc – czas trwania skorygowanego odstępu QT [ms].

4. METODY

4.1 Koronarografia

W pierwszej części badania wszyscy chorzy poddawani byli zabiegowi koronarografii w Pracowni Angiografii II Katedry Chorób Wewnętrznych CM UJ. Zabiegi były przeprowadzane zawsze w drugim dniu hospitalizacji o podobnej porze dnia (między godziną 12:00 a 16:00). Koronarografię wykonywano techniką Seldingera, standardowo z nakłucia prawej tętnicy udowej, z zastosowaniem znieczulenia miejscowego. Podczas zabiegu stosowano koszulki tętnicze oraz cewniki diagnostyczne i prowadzące 6F. Wszystkim chorym podawano jeden rodzaj kontrastu, tj. niskoosmolarny i niskojonowy kontrast Ultravist 370. Bezpośrednio po koronarografii wyniki poddawano analizie angiograficznej, na podstawie której chorych kwalifikowano do leczenia przezskórnego. U wszystkich chorych zakwalifikowanych do w/w leczenia, wykonywano jednocześnie angioplastykę wieńcową z implantacją stentu. Rodzaj stentu, jego średnica i długość były dobierane na podstawie wyników pomiarów QCA - cyfrowej angiografii ilościowej (angiograf Integris HM – 3000, oprogramowanie komputerowe ACA DCI, Philips). Po predylatacji cewnikiem balonowym stenty implantowano ciśnieniem nominalnym i doprężano ciśnieniem od 2–6 atmosfer powyżej ciśnienia nominalnego. Po zabiegu wykonywano ponowną angiografię w celu dokumentacji uzyskanego wyniku. Całość badań angiograficznych była archiwizowana na dyskach CD.

4.2 24-godzinne monitorowanie elektrokardiogramu metodą Holtera

W obu częściach klinicznych badania, u wszystkich chorych, dwukrotnie prowadzono 24-godzinne monitorowanie i zapis elektrokardiogramu (EKG) metodą Holtera, przy użyciu 3-kanalowego zestawu rejestrującego (Aspel, HolCARD 24 W, Poland). Każdorazowo, po zakończeniu badania dane zapisane na przenośnej karcie pamięci zestawu rejestrującego wczytywano do pamięci komputera stacjonarnego, a następnie poddawano automatycznej analizie przy użyciu oprogramowania dostarczonego przez producenta rejestratora EKG. Każdy uzyskany automatycznie wynik podlegał edycji i weryfikacji jego poprawności przez lekarza oraz ostatecznie reanalizie. W przypadku stwierdzenia złej jakości technicznej zapisu EKG lub zapisu krótszego niż 22 godziny, chorzy byli wyłączani z badania. Warunki zapisu i aktywność fizyczna pacjentów były podobne w trakcie obu 24-godzinnych holterowskich zapisów EKG.

Przy ocenie parametrów holterowskich posługiwano się ustalonymi przez producenta sprzętu definicjami dla rytmu dominującego i zaburzeń rytmu serca. Oceniano: średnią (HR *śr.*), maksymalną (HR *max.*) i minimalną (HR *min.*) częstotliwość rytmu serca, dobową liczbę dodatkowych pobudzeń pochodzenia komorowego (VE) i nadkomorowego (SVE) (współczynnik przedwcześnieści wynosił 25%), dobową liczbę epizodów tachykardii (minimalna częstotliwość rytmu na początku epizodu >125/min, a maksymalna na końcu 100/min), bradykardii (maksymalna częstotliwość rytmu na początku epizodu <45/min, a minimalna na końcu >55/min) i pauz (brak zespołów QRS w okresie dłuższym niż 2380 ms po zespole komorowym, 1800 ms po zespole nadkomorowym, 2000 ms po zespole dominującym), obniżenia i uniesienia odcinków ST (odcinki ST uśredniano z 32 sekund rytmu podstawowego, graniczna wartość uniesienia i obniżenia ST w 60 ms za punktem J wynosiła 1 mm, minimalny czas trwania epizodów zmian ST

wynosił 60 sekund) oraz czas trwania odstępów QTc i dyspersję QT w wybranych przedziałach czasu.

Dodatkowo, w pierwszej części badania, oceniano dobową zmienność rytmu serca (HRV) wykorzystując parametry analizy czasowej (badanie czasu trwania kolejnych odstępów NN, czyli odstępów między pobudzeniami zatokowymi oraz różnic między nimi) i częstotliwościowej (badanie widma cyklicznie występujących zmian czasu trwania kolejnych odstępów NN) w wybranych przedziałach czasu. Spośród parametrów analizy czasowej oceniano SDNN (standard deviation of NN – odchylenie standardowe czasów trwania wszystkich odstępów NN w badanym okresie czasu, oznaczane w ms) z całości zapisu z pierwszego i drugiego dnia badania oraz z okresu jednej godziny bezpośrednio przed i pierwszej godziny po zabiegu koronarografii z ew. angioplastyką. Dodatkowo z okresu jednej godziny przed i pierwszej godziny po zabiegu oceniano: SDANN (standard deviation of averaged NN intervals – odchylenie standardowe średnich wartości odstępów NN, mierzonych w kolejnych krótkich przedziałach (5-minutowych) dłuższego okresu – w tym przypadku jednej godziny - oznaczane w ms), SDNNI (SDNN index – wskaźnik SDNN; średnia z odchyłeń standardowych kolejnych odstępów NN z kolejnych 5-minutowych okresów badania, oznaczany w ms, z danego przedziału czasu) oraz pNN₅₀ (percentage of NN intervals – odsetek odstępów NN różniących się od sąsiednich o ponad 50 ms względem liczby wszystkich odstępów NN w badanym okresie). Z tego samego okresu czasu wykonano analizę częstotliwościową HRV, którą przeprowadzono metodą tzw. szybkiej transformacji Fouriera (fast Fourier transformation). Wyniki tej analizy obejmowały dane dotyczące czterech pasm w widmie zmienności rytmu serca (ULF - ultra low frequency - pasmo w widmie zmienności rytmu serca o najniższej częstotliwości, tj. <0,0033 Hz, VLF - very low frequency - pasmo w widmie zmienności rytmu serca o bardzo niskiej częstotliwości tj. 0,0033-0,04 Hz, LF - low frequency - pasmo w widmie zmienności rytmu serca o niskiej częstotliwości tj. 0,04-0,15 Hz, HF - high frequency - pasmo w widmie zmienności rytmu serca o wysokiej częstotliwości tj. 0,15-0,4 Hz) oraz stosunku LF/HF. Dodatkowo w obu częściach klinicznych badania

mierzono czas trwania zespołów QRS, a w pierwszej części badania także czas trwania odstępów PQ, w pierwszej i ostatniej godzinie każdego 24-godzinnego zapisu EKG.

4.3 Echokardiografia przekłatkowa

W obu częściach badania wykonywano przekłatkowe badanie ultrasonograficzne serca (aparat Vivid 7, firmy GE, głowica 3,5 MHz). W trakcie badania wykorzystywano klasyczne techniki obrazowania, tj.: jednowymiarową (TM), dwuwymiarową (2D) i dopplerowską. Wszystkie pomiary dokonywane były w czterech podstawowych projekcjach przekroju serca (przymostkowej, koniuszkowej, podmostkowej i nadmostkowej). Wykonywano pomiary wielkości jam serca, oceniano kurczliwość globalną i odcinkową, funkcję skurczową i rozkurczową lewej komory serca oraz oceniano morfologię i funkcję aparatu zastawkowego. Pole powierzchni lewego przedsionka mierzono w projekcji koniuszkowej czterojamowej (norma wielkości 18-20 cm²). Frakcję wyrzutową lewej komory wyliczano wg metody Simpsona (metody dysków). U wszystkich chorych USG serca wykonywała ta sama osoba.

4.4 Oznaczanie stężenia LTE₄ w moczu w I i II części badania

Stężenia LTE₄ w moczu oznaczane były w laboratorium II Katedry Chorób Wewnętrznych dwoma metodami tj. LC/MS i ELISA.

W pierwszej części klinicznej badania posłużono się metodą LC/MS, czyli spektrometrii mas z wykorzystaniem wysokosprawnego chromatografu cieczowego. W tym celu użyto spektrometr masowy LCQ Advantage (Thermo Finnigan) ze źródłem jonów typu electrospray

i pułapką jonową jako analizatorem oraz wysokosprawny chromatograf cieczowy z odwróconym układem faz –z pompą LC Pump Surveyor (Thermo Finnigan) i kolumną Zorbax Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies, USA).

Pobrane od chorych próbki moczu przechowywano w temperaturze -80°C do czasu wykonywania oznaczeń. Bezpośrednio po rozmrożeniu, w celu usunięcia strąków moczanowych, próbki poddawano wirowaniu (4000 obrotów/ minutę, przez 10 min). Odwirowany mocz w objętości 25 ml mieszano z 25 ml roztworu soli fizjologicznej buforowanego fosforanami (PBS - phosphate buffered saline) o pH=7,2 (naważka PBS, EuroImmun). Tak przygotowaną mieszaninę moczu i PBS umieszczano w stożkodennych probówkach polipropylenowych o pojemności 50 ml (Falcon lub Saerstedt) i dodawano standard wewnętrzny w ilości 2500 pg d_3 -[20,20,20]-LTE₄ (Biomol) oraz 150 µL zawiesiny mikrocząsteczek sefarozy opłaszczonych mysimi przeciwciałami monoklonalnymi (Cysteinyl-Leukotriene Affinity Sorbent, Cayman Chemical). Całość reakcji immunoadsorpcyjnej pozostawiano na 20 minut w temperaturze 37°C, następnie przez kolejne 40 minut mieszano mieszadłem rolkowym, a po tym czasie – w celu sedymentacji cząstek adsorpcyjnych – wirowano przez 5 minut (500 g). Nadsącz zlewano, a osad adsorbenta przenoszono do probówek polipropylenowych o pojemności 2,5 ml. Materiał płukano roztworem PBS i ponownie wirowano przez 5 minut (500 g) w celu sedymentacji adsorbentu. Po przemyciu, immunosorbent zawieszano w schłodzonym do - 15°C metanolu czystości HPLC (J. T. Baker). Całość mieszano przez 5 minut przy użyciu mieszadła wirowego i ponownie odwirowano (10 minut, 4500 obrotów/ minutę). Nadsącz metanolu, który wypłukiwał z immunosorbentu związane z przeciwciałem leukotrieny, zbierano do probówek typu Eppendorfa. Płukanie schłodzonym metanolem powtarzano jeszcze dwukrotnie. Metanol, zebrany po elucji leukotrienu, odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem (CentriVap, Labanco) do objętości 40-50 µl. Przed ostateczną analizą w układzie LC/MS próbki wirowano, aby uniknąć wprowadzenia do pętli strzykowej ewentualnych pozostałości sefarozy. Rejestrację widm masowych wykonywano w trybie monitorowania pojedynczego jonu SIM (Single Ion

Monitoring) w zakresie $m/z = 439,0 - 444,0$. Zakres taki obejmował zarówno analit jak i wzorzec wewnętrzny: dla LTE_4 $m/z = 440,1 - 440,4$; dla d_3-LTE_4 $m/z = 443,1 - 443,4$. Analizę widm masowych przeprowadzano programem Xcalibur 1.1 (Thermo Finnigan). Zawartość LTE_4 wyznaczano porównując intensywności integralne pików chromatograficznych dla wzorca i analitu. Uzyskaną wartość dzielono przez objętość moczu, z której ekstrahowano analit oraz stężenie kreatyniny w moczu. Stężenie kreatyniny w analizowanych próbkach moczu badano aparatem VITROS 250 (Johnson & Johnson, USA). Wyniki oznaczenia $uLTE_4$ wyrażano w postaci stężenia leukotrienu E_4 w pg na miligram kreatyniny [$pg/mg_{kreatyniny}$].

W drugiej części klinicznej badania, stężenia leukotrienu E_4 w poszczególnych próbkach moczu oznaczano metodą immunoenzymatyczną przy użyciu komercyjnych zestawów EIA (Cayman Chemical's, USA). Na wynik tego oznaczenia wpływają nie tylko LTE_4 , ale także – choć w znacznie mniejszym stopniu - LTC_4 , LTD_4 oraz kilka metabolitów leukotrienów cysteinylowych. Praktycznie, w moczu obecny jest głównie LTE_4 . Z tego względu w niniejszej pracy dla uproszczenia używano określenia LTE_4 .

Zebrany mocz pacjentów rozporcjowywano do probówek typu Eppendorfa i mrożono w temperaturze $-80^{\circ}C$ do czasu dalszych oznaczeń. Tuż przed badaniem poziomów LTE_4 w moczu, próbki rozmrażano i wirowano z prędkością 4000 obrotów/min w temp. $4^{\circ}C$. Dodatkowo z tych samych próbek moczu oznaczano poziomy kreatyniny w analizatorze Vitros 350 (Johnson & Johnson, USA). Mocz przed nałożeniem na płytkę do ELISA, rozcieńczano czterokrotnie, co uwzględniano w późniejszych obliczeniach. Wszystkie czynności związane z nastawianiem płytki były wykonywane zgodnie z zamieszczoną w zestawie instrukcją obsługi. Stężenie LTE_4 badano w następujący sposób: do płytek z zestawu dodawano królicze poliklonalne przeciwciała przeciwko LTE_4 , określoną ilość kompleksu LTE_4 -acetylocholinesteraza (LTE_4 -AChE) oraz badaną próbkę moczu (lub standard). LTE_4 znajdujące się w badanej próbce konkurowały z kompleksami LTE_4 -AChE o wiązanie z przeciwciałami poliklonalnymi. Przeciwciała poliklonalne związane z LTE_4

lub kompleksami LTE₄-AChE wiązały się z płytką poprzez mysie przeciwciała (przeciwno króliczym IgG), którymi była ona opłaszczona. Po 18 godzinach inkubacji w temperaturze pokojowej, niezwiązane z płytką reagenty wypłukiwano. Następnie do tak przygotowanej płytki dodawano substrat dla acetylocholinesterazy. W wyniku reakcji enzymatycznej powstawał związek silnie pochłaniający światło o długości fali 412 nm. Odczyt absorbancji badanych próbek na płytce przeprowadzano w czytniku kolorymetrycznym ELx 800 (BIO-TEK Instruments, USA). Stopień absorpcji światła był odwrotnie proporcjonalny do stężenia LTE₄ w badanej próbce, które to wyrażano w pg/mg _{kreatyniny}.

Z uwagi na użycie w pierwszej i drugiej części klinicznej badania różnych technik oznaczania uLTE₄, wyników nie można ze sobą bezpośrednio porównywać. Wyniki oznaczeń uLTE₄ metodą ELISA są zwykle wyższe od tych uzyskiwanych metodą LC/MS. ELISA daje wiarygodne wyniki głównie dla zawartości uLTE₄ przekraczających 150 pg/ml (106). Dla niższych wartości bardziej wiarygodna i precyzyjna jest metoda spektrometrii masowej. Metoda LC/MS jest wysoce swoista dla LTE₄, podczas gdy ELISA, szeroko stosowana w badaniach klinicznych, poza LTE₄ wykrywa także niektóre inne metabolity 5-lipoksygenazy.

4.5 Oznaczenia laboratoryjne

Krew pobierano za pomocą zestawu z systemem próżniowym firmy Becton-Dickinson do probówek z wersenianem potasu, cytrynianem sodu oraz bez antykoagulantu. Następnie próbki cytrynianowe i „na skrzep” wirowano z prędkością 3500 obrotów/min przez 10 min w temperaturze 4°C i wykorzystywano do dalszych oznaczeń.

Z próbek z wersenianem potasu oznaczano morfologię krwi pełnej przy użyciu automatycznego analizatora hematologicznego Sysmex K-1000 (ICN, Japonia). W surowicy krwi oznaczano poziomy elektrolitów, stężenie glukozy, mocznika i kreatyniny, aktywność AST i ALT, stężenie bilirubiny oraz lipidogram przy użyciu analizatora Vitros 350 (Johnson & Johnson,

USA). Dodatkowo w surowicy pacjentów oznaczano poziomy CPR metodą nefelometryczną o wysokiej czułości (Dade Behring, Niemcy) oraz poziomy troponiny I w analizatorze MiniVIDAS (BioMerieux, Francja). Fibrynogen oznaczano w osoczu pacjentów przy użyciu aparatu CA-500 (Sysmex, Japonia).

4.6 Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programu STATISTICA wersja 8 (StatSoft Inc, Tulusa, OK., USA). W charakterystyce wyjściowej grup zastosowano test χ^2 (zmienne katégoryczne) lub test t-studenta dla zmiennych niezwiązanych (zmienne ciągłe). W pierwszej fazie analiz dane testowano pod względem zgodności z rozkładem normalnym (test Kolmogorova-Smirnova). Stężenia LTE_4 w moczu, ze względu na brak normalności rozkładu w obrębie badanych grup, logarytmowano przed wykonywaniem dalszych obliczeń. Serie danych spełniające kryterium rozkładu normalnego analizowano testem t-studenta lub w modelu ANOVA (wariant z powtarzanymi pomiarami). Dane nie spełniające kryterium rozkładu normalnego porównywano testami nieparametrycznymi (test U Manna-Whitneya w I części badania lub test Wilcoxona w II części badania). Dane o rozkładzie normalnym przedstawiono w tekście i tabelach jako średnie $\pm\text{SD}$ (odchylenie standardowe), a na wykresach kolumnowych lub punktowych jako średnie $\pm\text{SEM}$ (błąd standardowy). Serie danych z rozkładem różnym od normalnego przedstawiano w tekście i na wykresach jako mediany i przedział międzykwartylowy [25-75% w nawiasie kwadratowym]. Do oceny stopnia korelacji zmiennych o rozkładzie normalnym i $n \geq 30$ zastosowano model regresji liniowej. W pozostałych przypadkach zastosowano wariant nieparametryczny (korelacja rang Spermmana). Za poziom istotności statystycznej przyjęto $p < 0,05$.

5. WYNIKI BADAŃ I CZĘŚCI KLINICZNEJ

Wpływ farmakologicznego hamowania 5-lipoksygenazy na generację leukotrienów i czynność elektryczną serca u chorych na stabilną chorobą niedokrwienną serca poddawanych koronarografii z ewentualną przezskórną angioplastyką tętnic wieńcowych

5.1 Porównanie grupy otrzymującej inhibitor 5 – lipoksygenazy (zileuton) z grupą otrzymującą placebo

W badaniu wzięło udział 103 chorych na stabilną chorobą wieńcową, zrekrutowanych spośród 348 chorych kolejno przyjętych do Oddziału Interny i Chorób Serca II Katedry Chorób Wewnętrznych CMUJ między listopadem 2006 a grudniem 2007 roku, w celu wykonania planowej koronarografii z ew. angioplastyką i implantacją stentu. W wyniku przeprowadzonej randomizacji 54 osoby zostały przydzielone do grupy otrzymującej przez czas trwania badania (ok. 48 godzin) lek (zileuton), a 49 osób do grupy otrzymującej placebo.

Porównywane grupy nie różniły się istotnie pod względem cech demograficznych, występowania czynników ryzyka choroby niedokrwiennej serca ani wyników biochemicznych krwi (LDL-cholesterol, CRP). W obu grupach nie było chorych z niewydolnością nerek ani laboratoryjnymi cechami uszkodzenia wątroby (tabela 2).

Tabela 2. Charakterystyka kliniczna chorych.

Parametry kliniczne i laboratoryjne	Zileuton (n=54)	Placebo (n=49)	P
Wiek (lata $\pm$ SD)	60 $\pm$ 7,4	59,1 $\pm$ 7,9	NS
Płeć: kobiety (%)/mężczyźni (%)	20 (37%)/34 (63%)	16(32,7%)/33(67,3%)	NS
Nadciśnienie tętnicze	52 (96,3%)	42 (85,7%)	NS
Hipercholesterolemia	47 (87%)	44 (89,8%)	NS
Przebyty zawał serca	12 (22,2%)	12 (24,5%)	NS
Przebyty udar mózgu	2 (3%)	2 (4%)	NS
Miażdżyca tętnic kończyn dolnych	5 (9,3%)	3 (6,1%)	NS
Cukrzyca	11 (20,4 %)	9 (18,4%)	NS
Niewydolność nerek	0 (0%)	0 (0%)	NS
Niewydolność wątroby	0 (0%)	0 (0%)	NS
Palenie papierosów	35 (64,8%)	31 (63,3%)	NS
Frakcja wyrzutowa LK serca	56 $\pm$ 5	57 $\pm$ 4	NS
CRP [mg/l]	1,32	1,9	NS
LDL –C [mmol/l] ($\pm$ SD)	2,64 $\pm$ 0,8	2,74 $\pm$ 1,08	NS

Wyniki przedstawiono jako liczebności (%), średnie ($\pm$ SD), mediany (w przypadku CRP). LK – lewa komora serca; CRP – białko C-reaktywne, LDL-C – cholesterol frakcji lipoprotein o małej gęstości.

Chorzy nie różnili się istotnie pod względem przyjmowanych leków. Wszyscy stosowali podwójną terapię przeciwpłytkową (aspirynę z kłopidogrelem lub tiklopidyną) oraz prawie wszyscy otrzymywali inhibitory konwertazy angiotensyny, betablokery i statyny (tabela 3). Średnia oszacowana dobową dawkę betablokerów w przeliczeniu na dawkę propranololu (pod względem siły działania beta-adrenolitycznego) wynosiła ok. 120 mg (107- 109).

Tabela 3. Porównanie grupy chorych otrzymujących zileuton z grupą otrzymującą placebo pod względem przyjmowanych leków w chwili włączenia do badania.

Grupy leków		Zileuton (n=54)	Placebo (n=49)	p
Aspiryna	n (%)	54 (100)	49 (100)	NS
Klopidogrel lub tiklopidyna	n (%)	54 (100)	49 (100)	NS
Inhibitory konwertazy angiotensyny	n (%)	53 (98)	49 (100)	NS
Betablokery	n (%)	52 (96,3)	48 (98)	NS
Antagoniści kanałów wapniowych	n (%)	10 (18,5)	7 (14,3)	NS
Nitraty	n (%)	13 (24,1)	12 (24,5)	NS
Statyny	n (%)	54 (100)	48 (98)	NS

Wyniki przedstawiono jako liczebności (%).

5.2 Porównanie danych angiograficznych w badanych grupach

Chorzy z obu grup nie różnili się istotnie pod względem wyników badań angiograficznych oraz objętości użytego podczas badania kontrastu. W grupie otrzymującej zileuton u 16 chorych wykonano zabieg angioplastyki z implantacją stentu, w grupie otrzymującej placebo u 11 chorych. W obu grupach po 38 pacjentów poddanych było jedynie koronarografii bez dodatkowej interwencji wewnątrznaczyniowej. Wśród osób trzymujących placebo stwierdzono wyższy, choć nieistotny statystycznie, odsetek chorych z bardziej zaawansowanymi zmianami miażdżycowymi (zwężenia w trzech tętnicach nasierdżiowych),

kwalifikowanych następnie do operacji pomostowania aortalno-wieńcowego (tabela 4).

Nie odnotowano żadnych poważnych powikłań związanych z podwaniem leku (zileuton) ani z samym zabiegiem koronarografii wśród wszystkich chorych, podczas trwania hospitalizacji.

Tabela 4. Porównanie danych angiograficznych i objętości podanego podczas zabiegu kontrastu w grupach chorych otrzymujących zileuton lub placebo.

Charakterystyka angiograficzna		Zileuton (n=54)	Placebo (n=49)	P
Bez istotnych zwężeń w tętnicach nasierdziowych	n (%)	29 (53,7 %)	22 (44,9 %)	NS
Choroba 1- naczyniowa	n (%)	16 (29,6 %)	10 (20,4 %)	NS
Choroba 2 – naczyniowa	n (%)	5 (9,3 %)	6 (12,25 %)	NS
Choroba 3 – naczyniowa	n (%)	4 (7,4 %)	11 (22,45 %)	NS
Zabieg angioplastyki z implantacją stentu	n (%)	16 (29,6 %)	11 (22,4 %)	NS
Objętość kontrastu	[ml]	153,14	165,9	NS

Wyniki przedstawiono jako wartości bezwzględne z odsetkami, w przypadku objętości użytego kontrastu jako wartości średnie. Jako istotne zwężenia tętnic nasierdziowych traktowano zmniejszenie średnicy światła naczynia o >70%.

5.3 Stężenie LTE₄ w moczu przed i po zabiegu koronarografii z ew. angioplastyką

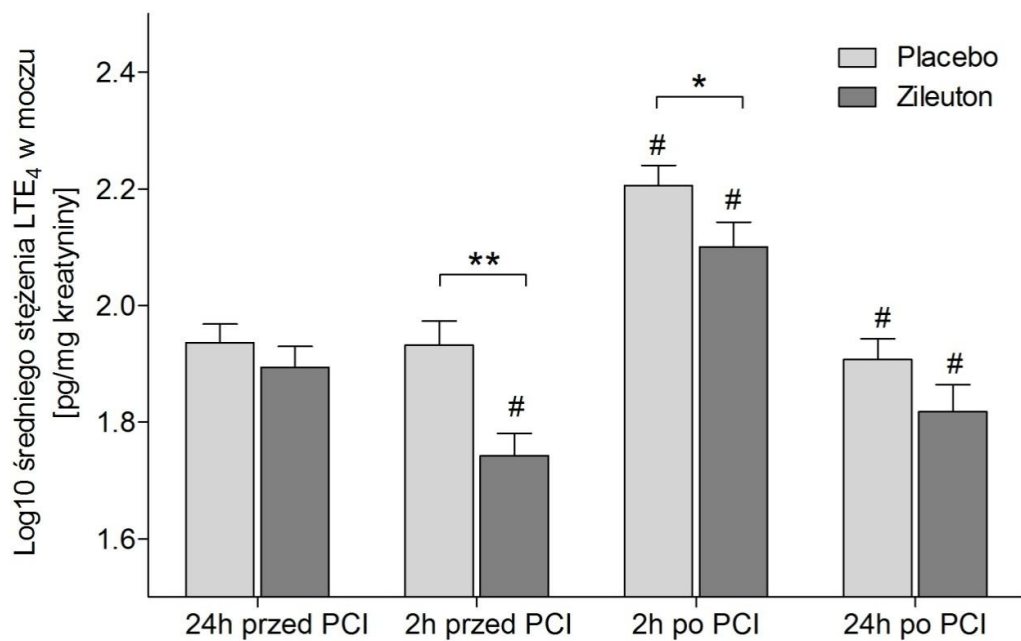
W obu grupach wyjściowe stężenia LTE₄ w moczu były podobne. Wśród chorych otrzymujących zileuton obserwowano na 2 godziny przed zabiegiem obniżenie średniego stężenia LTE₄ w moczu o 26,02%

($p < 0,0001$), podczas gdy w grupie otrzymującej placebo synteza LTE_4 przed zabiegiem pozostawała na niezmiennym poziomie. Koronarografia z ew. angioplastyką powodowały zwiększenie średniego wydalania LTE_4 z moczem o ok. 200 % (w stosunku do wartości wyjściowych) w obu grupach. Podawanie zileutonu jak również sam rodzaj zabiegu nie miały wpływu na powyższe zjawisko, choć w grupie otrzymującej placebo obserwowano wyraźniejszy wzrost wydalania LTE_4 ($p < 0,05$) (Rycina 6). Nie stwierdzono korelacji między wzrostem stężenia LTE_4 w moczu a stopniem zaawansowania miażdżycy w tętnicach nasierdżiowych jak również objętością użytego podczas badania kontrastu, czy stężeniem CRP lub LDL-C. Podwyższone wartości LTE_4 powracały do wartości wyjściowych w ciągu kolejnych 24 godzin po zabiegu (tabela 5).

Tabela 5. Wpływ zabiegu koronarografii z ew. angioplastyką i implantacją stentu oraz podawania zileutonu na stężenie LTE_4 w moczu.

	Zileuton (n=54)	Placebo (n=49)
24 godziny przed zabiegiem	86,46 [26,17 – 187,58]	91,29 [30,35 – 162,63]
2 godziny przed zabiegiem	51,96 [19,59 – 154,38]# **	90,81 [24,94 – 247,93]
2 godziny po zabiegu	131,47 [29,22 – 375,92]# *	161,84 [60,0 – 330,49]#
24 godziny po zabiegu	75,83 [17,35 – 239,94]#	85,57 [26,18 – 167,39]#

*Stężenie LTE_4 w moczu wyrażono w pg/mg kreatyniny oraz przedstawiono jako mediany [5-95 percentyl]. Zmiany stężenia LTE_4 w czasie i wpływ zabiegu koronarografii; # $p < 0,0001$ w porównaniu do stężenia LTE_4 w poprzedniej próbce moczu. Efekt podawania zileutonu, * $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$ w porównaniu z placebo, w danym punkcie czasowym. Do analizy użyto testu ANOVA dla układów z powtarzanymi pomiarami na danych zlogarytmowanych, które następnie poddano analizie post hoc z użyciem testu Newmana-Keulusa. Za poziom istotności przyjęto $p < 0,05$.*



Rycina 6. Wykres przedstawia zlogarytmowane wartości średnich stężeń LTE_4 w moczu przed i po zabiegu koronarografii z ew. angioplastyką i implantacją stentu w grupach chorych otrzymujących placebo lub zileuton. Zmiany stężenia LTE_4 w czasie i wpływ zabiegu koronarografii.

$p < 0,0001$ w porównaniu do stężenia LTE_4 w poprzedniej próbce moczu. Efekt podawania zileutonu, * $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$ w porównaniu z placebo, w danym punkcie czasowym.

5.4 Średnia częstotliwość rytmu zatokowego serca przed i po zabiegu

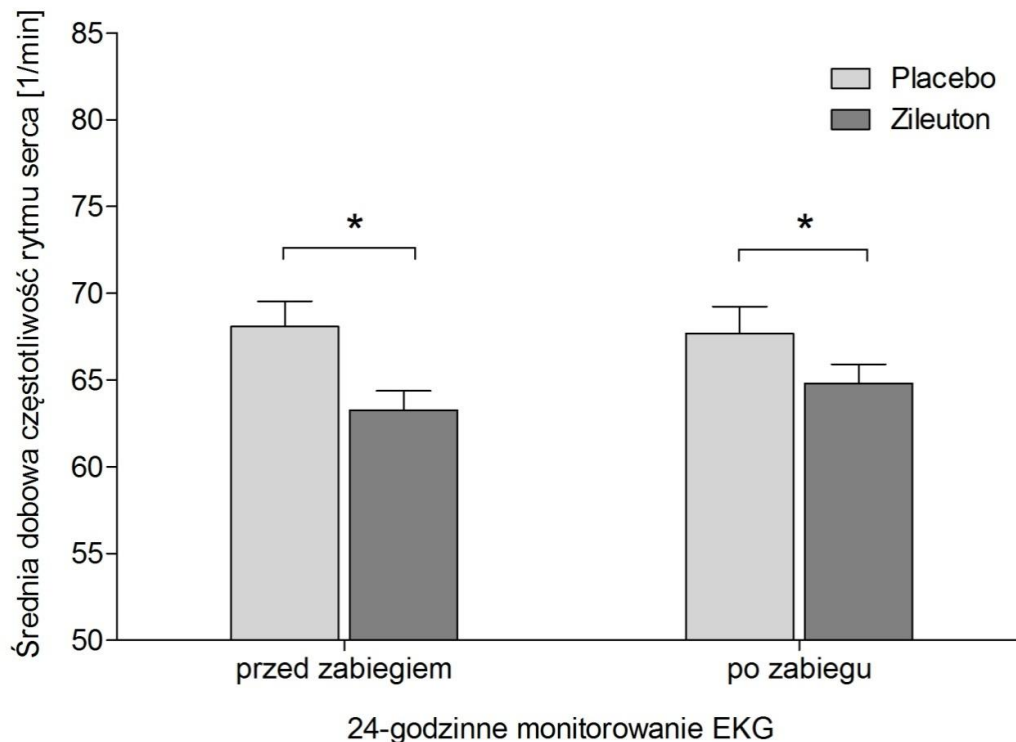
Zarówno sam zabieg koronarografii jak i hamowanie 5-lipoksygenazy wywierały wpływ na częstotliwość rytmu serca. W grupie otrzymującej zileuton średnia dobową częstotliwość rytmu serca, mierzona za pomocą 24-godzinnego monitorowania EKG metodą Holtera, była o ok. 7,1% niższa przed zabiegiem i o ok. 4,3% niższa po zabiegu w porównaniu z grupą otrzymującą placebo (ANOVA, $p=0,027$; tabela 6, rycina 7). Ten sam efekt obserwowano porównując średnią częstotliwość rytmu serca z krótszego okresu tj. jednej godziny bezpośrednio przed i tuż po zabiegu ($p=0,017$).

Sama procedura koronarografii z ew. angioplastyką i implantacją stentu także powodowała zwolnienie rytmu serca, lecz w tym przypadku wyniki były nieistotne statystycznie ($p=0,056$).

Tabela 6. Średnia częstotliwość rytmu zatokowego serca przed i po zabiegu.

Średnia częstość rytmu serca [1/min]±SD	Z okresu 24 godzin przed zabiegiem	Z okresu 24 godzin po zabiegu	Z okresu 1 godziny tuż przed zabiegiem	Z okresu 1 godziny bezpośrednio po zabiegu
Placebo (n=49)	68,08±10,13	67,67±10,91	71,16±14,81	69,12±12,56
Zileuton (n=54)	63,26±8,11*	64,79±8,24*	65,91±9,25*	64,42±7,52**

*Porównanie średniej dobowej częstotliwości rytmu zatokowego serca (przed i po zabiegu) oraz średniej częstotliwości rytmu serca z okresu jednej godziny bezpośrednio przed i po zabiegu w porównaniu grupy otrzymującej placebo z grupą otrzymującą zileuton. Do analizy użyto testu ANOVA dla układów z powtarzanymi pomiarami, które następnie poddano analizie post hoc z użyciem testu Newmana-Keulusa. Za poziom istotności statystycznej przyjęto $p<0.05$. ** - $p<0,01$, * - $p<0,05$.*



Rycina 7. Wykres przedstawia wartości średnich dobowych częstotliwości rytmu zatokowego serca przed i po zabiegu koronarografii z ew. angioplastyką i implantacją stentu w grupach chorych otrzymujących placebo lub zileuton.

* - $p < 0,05$.

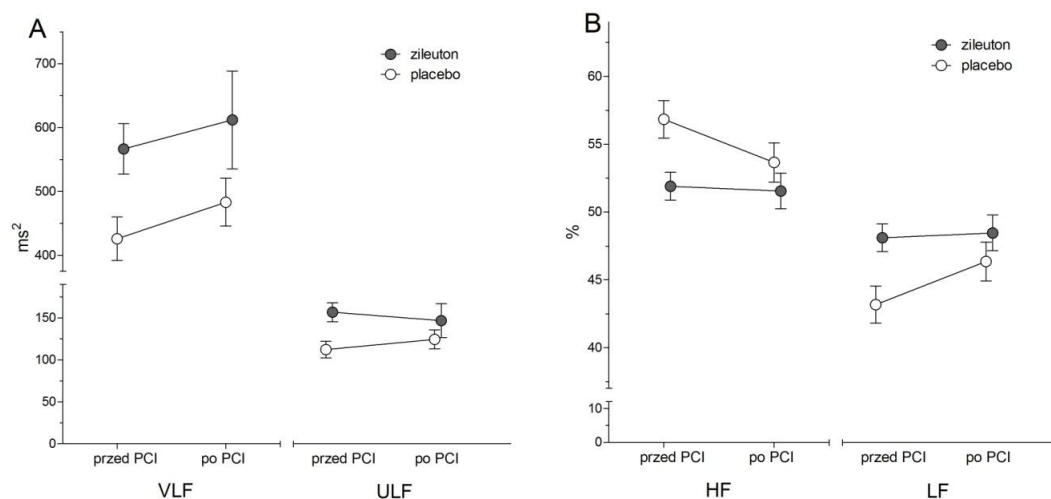
5.5 Zmienność rytmu serca przed i po zabiegu

Procedura koronarografii z ew. interwencją wewnątrznaczyniową wywierała niekorzystny wpływ na dobową zmienność rytmu serca (HRV – heart rate variability) przedstawianą jako SDNN (standard deviation of NN – odchylenie standardowe czasów trwania wszystkich odstępów NN w ciągu doby, oznaczane w ms) powodując jej zmniejszenie w obu badanych grupach (ze $123,23 \pm 33,9$ do $115,78 \pm 37,3$ ms, ANOVA, $p = 0,02$). W grupie otrzymującej zileuton obserwowano jednak nieco wyższe, choć nieistotnie statystycznie, wartości SDNN średnio o 11,2 % przed i 9 % po zabiegu ($p = 0,075$).

Badając poszczególne parametry analizy czasowej HRV z krótszych przedziałów czasu (tj. ostatniej godziny przed i pierwszej godziny po zabiegu) wykazano iż, zmniejszenie wartości w trakcie badania dotyczyło głównie SDNN (standard deviation of NN) i SDANN (standard deviation of averaged NN intervals), zaś SDNNI (SDNN index) i pNN₅₀ (percentage of NN intervals) pozostawały bez zmian. Po zastosowaniu tzw. analizy *post hoc*, najwyższe SDANN stwierdzono w grupie otrzymującej zileuton w okresie przed koronarografią ($64,0 \pm 21,6$ ms, $p=0,026$); po zabiegu parametr ten ulegał obniżeniu do wartości obserwowanych u chorych otrzymujących placebo ($\sim 50 \pm 24$ ms). Poddając ocenie parametry analizy częstotliwościowej zmienności rytmu serca z tego samego okresu czasu, zauważono, iż zileuton oddziaływał głównie na dwa z czterech pasm widma HRV tj. na pasmo o bardzo niskiej (VLF - very low frequency) i najniższej (ULF - ultra low frequency) częstotliwości. Moc widma zmienności odstępów NN w zakresie VLF była wyższa w grupie otrzymującej zileuton średnio o 33,2 % przed i o 26,7 % po zabiegu ($p=0,016$) i analogicznie moc widma w zakresie ULF była odpowiednio o 39,2 % i 17,7 % wyższa niż w grupie otrzymującej placebo ($p=0,035$) (rycina 8).

Koronarografia powodowała zmniejszenie względnej mocy widma zmienności odstępów NN w zakresie HF (HF – high frequency) (wyrażonej w procentach) w grupie otrzymującej placebo z $56,8\% \pm 10,1$ przed zabiegiem do $53,7\% \pm 9,6$ po zabiegu ($p=0,026$). Zjawiska tego nie obserwowano w grupie otrzymującej zileuton, w której względna moc widma HF pozostawała na niezmiennym poziomie w trakcie badania (odpowiednio $51,8\% \pm 7,4$ i $51,5\% \pm 9,3$). Odwrotną zależność, obserwowano w przypadku względnej mocy widma zmienności odstępów NN w zakresie LF (LF – low frequency), a mianowicie jej wzrost w grupie otrzymującej placebo z $43,2\% \pm 9,6$ przed koronarografią do $46,3\% \pm 10,1$ po zabiegu (ANOVA, $p=0,019$), podczas gdy w grupie otrzymującej zileuton parametr ten nie ulegał zmianie ($48,1\% \pm 8,5$ przed i $48,5\% \pm 9,8$ po zabiegu). Po wyliczeniu stosunku LF/HF parametr ten po zabiegu wzrósł w grupie otrzymującej placebo o ok. 12 %, zaś w grupie chorych otrzymujących zileuton spadł o 3,4 % ($p=0,024$). Te same zmiany wskaźnika LF/HF

obserwowano w grupie chorych poddawanych angioplastyce z implantacją stentu jak i w grupie osób poddawanych jedynie samej koronarografii (rycina 8).



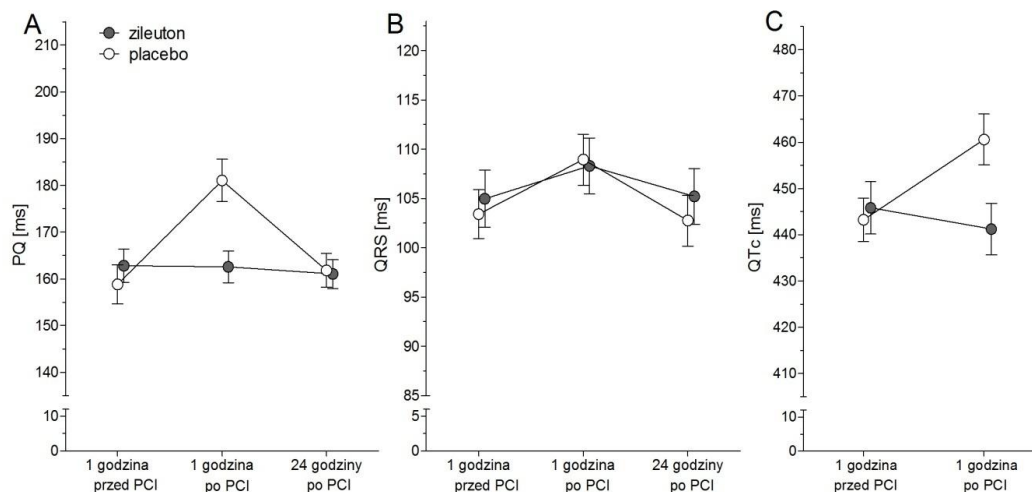
Rycina 8. Wykresy przedstawiają parametry analizy częstotliwościowej zmienności rytmu serca z okresu jednej godziny bezpośrednio przed i jednej godziny tuż po koronarografii z ew. angioplastyką w grupach chorych otrzymujących placebo lub zileuton. Wykres A przedstawia zmiany mocy widma zmienności odstępów NN w zakresie VLF i ULF wyrażone w [ms²]. Wykres B przedstawia zmiany względnych mocy widm wyrażonych w procentach (%) w zakresie HF i LF (względna moc widma HF=HF/LF+HFx100%, względna moc widma LF=LF/LF+HFx100%).

5.6 Czas trwania odstępów PQ, QTc i zespołów QRS przed i po zabiegu

Zarówno zabieg koronarografii, jak i hamowanie syntezy leukotrienów wpływały na czas trwania odstępu PQ w zapisie EKG. W grupie otrzymującej placebo odstępy PQ w pierwszej i 24 godzinie przed zabiegiem były podobne (odpowiednio $157,1 \pm 26,6$ i $158,8 \pm 29,3$ ms), ulegając przejściowemu wydłużeniu w pierwszej godzinie po zabiegu o ok. 15,2% ($181,0 \pm 31,7$ ms), aby następnie powrócić do wartości wyjściowych w 24-tej godzinie po zabiegu ($161,8 \pm 25,7$ ms). Przejściowego wydłużenia odstępów PQ nie obserwowano w grupie otrzymującej zileuton, w której chronologicznie ułożone wyniki czasu trwania PQ wynosiły $164,4 \pm 24,5$, $162,8 \pm 25,3$, $162,5 \pm 23,6$, $161,0 \pm 22,3$ ms (rycina 9). Analiza wariancji wskazuje na wysoce istotny statystycznie efekt zabiegu koronarografii ($p < 0,001$) jak również na interakcję z zileutonem ($p < 0,001$) w omawianym wyżej zjawisku.

Umiarkowane wydłużenie czasu trwania zespołu QRS obserwowano u wszystkich chorych w pierwszej godzinie po zabiegu ($p < 0,01$), niezależnie od podawania zileutonu (rycina 9).

Czas trwania średniego QTc z całej doby w obu grupach nie różnił się w pierwszym i drugim dniu badania. Mierząc czas trwania QTc z okresu jednej godziny przed i jednej godziny po zabiegu koronarografii obserwowano jego wydłużenie w grupie otrzymującej placebo o ok. 5,6% (z $434,9 \pm 42,4$ do $459,1 \pm 41,2$ ms) ($p < 0,001$), podczas gdy parametr ten nie zmieniał się w tym czasie w grupie otrzymującej zileuton ($445,8 \pm 36,2$ przed i $441,2 \pm 49,9$ ms po zabiegu) (rycina 9). A zatem, podawanie zileutonu wykazywało tendencję ochronną przed wydłużeniem QTc powodowanym samym zabiegiem ($p = 0,07$). Ani procedura koronarografii, ani podawanie zileutonu nie wpływało na dyspersję odstępu QT.



Rycina 9. Wykresy przedstawiają czasy trwania odstępów PQ, QTc i zespołów QRS w pierwszej godzinie bezpośrednio przed, pierwszej godzinie tuż po i w 24-tej godzinie po zabiegu koronarografii z ew. angioplastyką. Wykres A: czasy trwania odstępów PQ [ms]. Wykres B: czasy trwania zespołów QRS [ms]. Wykres C: czasy trwania QTc.

Zabieg koronarografii istotnie statystycznie zwiększał liczbę pobudzeń dodatkowych pochodzenia komorowego ($p < 0,01$), pozostając bez wpływu na liczbę pobudzeń dodatkowych pochodzenia nadkomorowego w obu badanych grupach.

Nie obserwowano istotnego statystycznie wpływu zileutonu na liczbę pobudzeń dodatkowych pochodzenia nadkomorowego, komorowego czy na czas trwania epizodów obniżenia lub uniesienia odcinków ST.

6. WYNIKI BADAŃ II CZĘŚCI KLINICZNEJ

Wpływ farmakologicznego hamowania 5-lipoksygenazy na generację leukotrienów i czynność elektryczną serca u chorych z utrwalonym migotaniem przedsionków

6.1 Charakterystyka kliniczna badanej grupy

W badaniu wzięło udział 49 osób (14 kobiet i 35 mężczyzn) w średnim wieku $67,4 \pm 9,8$ lat, z utrwalonym migotaniem przedsionków. U większości chorych stwierdzono nadciśnienie tętnicze i hipercholesterolemię. 5 z 7 pacjentów z przebyłym w przeszłości udarem mózgu było dodatkowo po zawale serca, bądź miało rozpoznaną miażdżycę tętnic kończyn dolnych. Wszystkie osoby z miażdżycą tętnic kończyn dolnych były nałogowymi palaczami tytoniu. Wśród osób z cukrzycą 28 % chorych przebyło w przeszłości zawał serca; w grupie chorych bez cukrzycy 17 %. W obu w/w grupach równie często stwierdzano przebyty udar mózgu (po 14 %); w grupie osób bez cukrzycy częściej stwierdzano miażdżycę tętnic kończyn dolnych (20 % vs 7 %). Wśród badanych nie było chorych z istotną niewydolnością nerek ani laboratoryjnymi cechami uszkodzenia wątroby. Średnia frakcja wyrzutowa lewej komory serca mierzona podczas przekłatkowego badania echokardiograficznego wynosiła $49,3 \% \pm 12,9$; u wszystkich chorych stwierdzono powiększony lewy przedsionek serca (tabela 7).

Tabela 7. Charakterystyka kliniczna badanej grupy.

Parametry kliniczne, echokardiograficzne i laboratoryjne (n=49)	
Wiek (lata $\pm$ SD)	67,4 $\pm$ 9,8
Płeć: kobiety (%)/mężczyźni (%)	14 (28,6 %)/35 (71,4 %)
Nadciśnienie tętnicze	34 (69,4 %)
Hipercholesterolemia	43 (87,7 %)
Przebyty zawał serca	10 (20,4 %)
Przebyty udar mózgu	7 (14,3 %)
Miażdżyca tętnic kończyn dolnych	8 (16,3 %)
Cukrzyca	14 (28,6 %)
Niewydolność nerek	0 (0 %)
Niewydolność wątroby	0 (0 %)
Palenie papierosów	19 (38,7 %)
LDL –C [mmol/l] ($\pm$ SD)	2,72 $\pm$ 0,9
CRP [mg/l]	3,41
Fibrynogen [g/l]	3,9 $\pm$ 1,3
Fracja wyrzutowa LK (%)	49,3 $\pm$ 12,9
Powierzchnia LP [cm ²]	29,45 $\pm$ 5,94

Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SD, mediany (w przypadku CRP), ew. liczebności (%). LK – lewa komora serca, LP – lewy przedsionek serca.

Wszyscy chorzy w trakcie badania kontynuowali leczenie przeciwkrzepliwe (heparyną drobnocząsteczkową podawaną podskórnie lub doustnymi antykoagulantami). Większość chorych, spośród leków zwalniających rytm serca, stosowała betabloker (79,6 %), blisko połowa chorych glikozydy naparstnicy i ok. 16 % blokery kanału wapniowego.

Amiodaron zażywały 3 osoby (tabela 8). Średnia oszacowana dobową dawką betablokerów w przeliczeniu na dawkę propranololu (pod względem siły działania beta-adrenolitycznego) wynosiła ok. 100 mg (107-109).

Tabela 8. Charakterystyka grupy badanej pod względem przyjmowanych leków w chwili włączenia do badania.

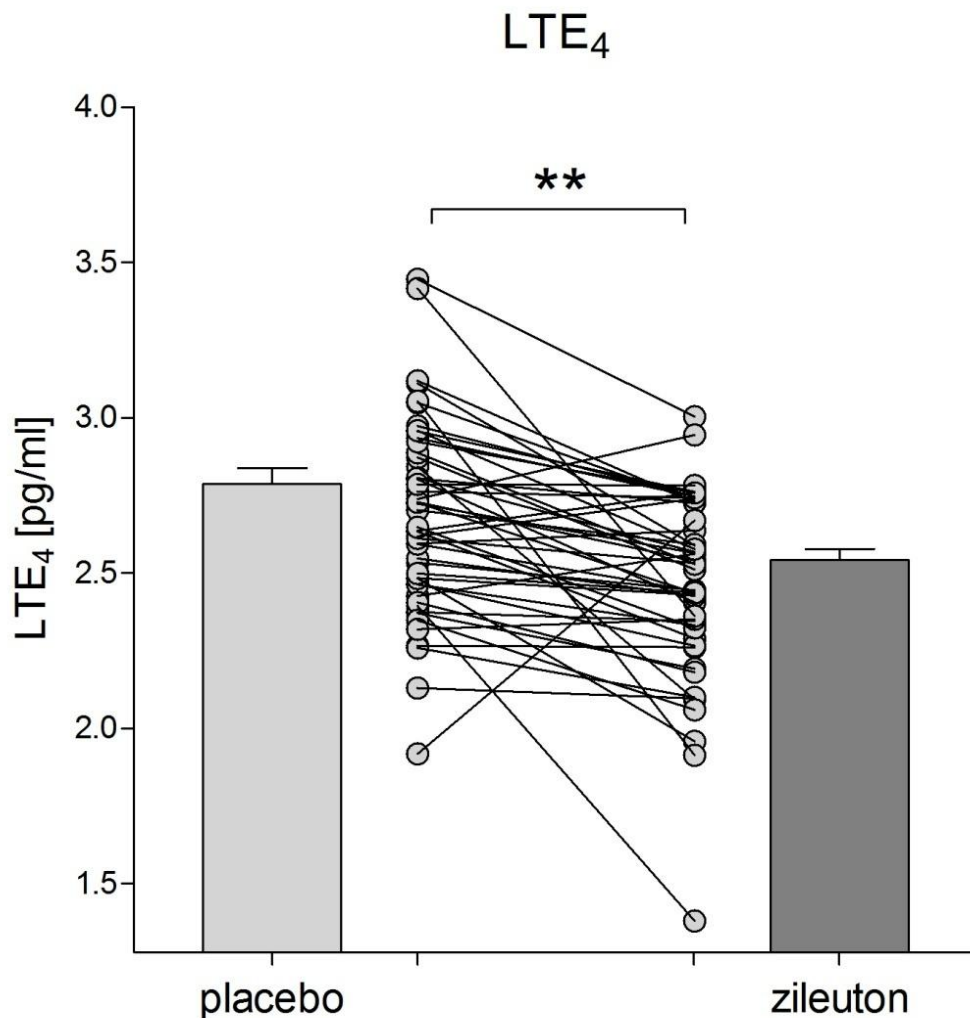
Grupy leków		Chorzy z utrwalonym migotaniem przedsionków (n=49)
Betablokery	n (%)	39 (79,6 %)
Blokery kanałów wapniowych	n (%)	8 (16,3 %)
Glikozydy naparstnicy	n (%)	23 (46,9 %)
Amiodaron	n (%)	3 (6,1 %)
Inne leki antyarytmiczne	n (%)	0 (0 %)

Wyniki przedstawiono jako wartości bezwzględne z odsetkami.

6.2 Stężenie LTE₄ w moczu u chorych z utrwalonym migotaniem przedsionków w pierwszym i drugim dniu badania

U chorych w drugim dniu badania (w trakcie podawania zileutonu) obserwowano niższe średnio o 43 % stężenia LTE₄ w moczu (rycina 10). Zmniejszenie wydalania LTE₄ z moczem było wysoce istotne statystycznie (445 pg/mg kreatyniny [291,5 – 759,0] vs 325 pg/mg kreatyniny [203 – 533,5]) (p<0,0001). Wyjściowe stężenia LTE₄ jak również

ich procentowy spadek w moczu nie korelowały ze stężeniami CRP, fibrynogenu ani LDL-C w osoczu jak również frakcją wyrzutową lewej komory serca czy powierzchnią lewego przedsionka. Wartości te nie zależały także od wieku ani płci badanych osób. W trakcie badania nie odnotowano u chorych poważnych działań niepożądanych związanych z podawaniem zileutonu.

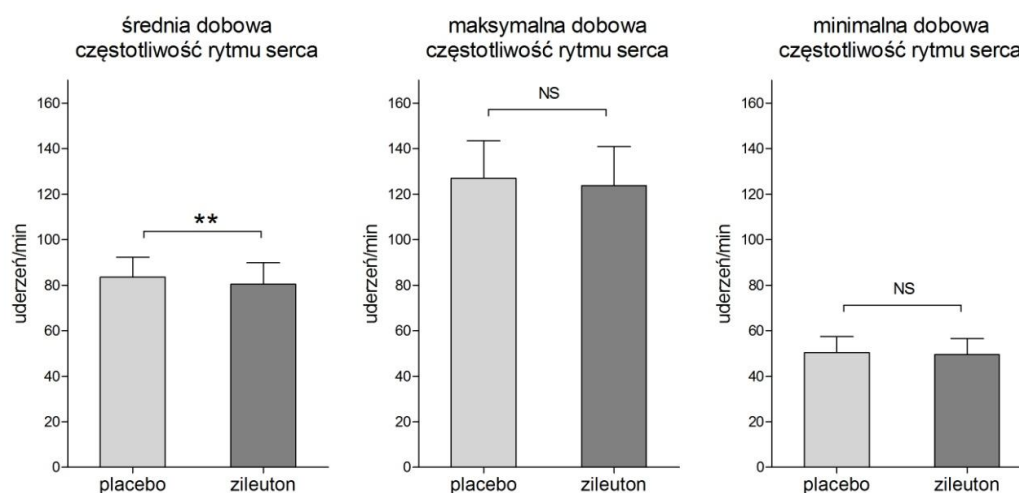


Rycina 10. Wykres przedstawia zlogarytmowane wartości średnich stężeń LTE₄ w moczu w pierwszym i drugim dniu badania. W pierwszym dniu chorzy otrzymywali placebo, w drugim dniu zileuton.

** oznacza $p < 0.0001$.

6.3 Wpływ zileutonu na czynność elektryczną serca u chorych z utrwalonym migotaniem przedsionków

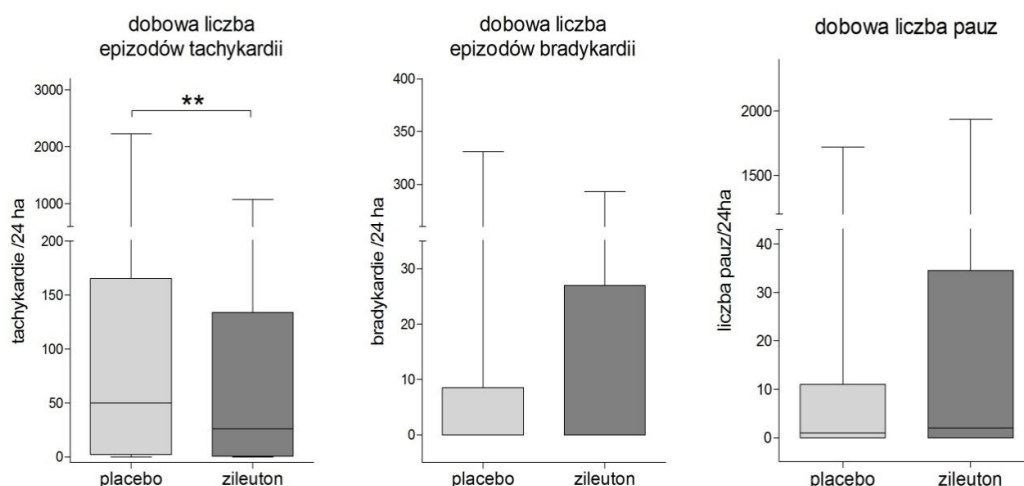
U chorych w drugim dniu badania (w trakcie podawania zileutonu) obserwowano niższą średnią dobową częstotliwość rytmu komór serca, mierzoną podczas 24-godzinnego monitorowania EKG metodą Holtera, średnio o ok. 3,18 uderzeń/minutę (83,59 vs 80,41 uderzeń/minutę) ($p < 0,0001$). Podobny efekt obserwowano w odniesieniu do maksymalnej (127,02 vs 123,82 uderzeń/minutę) i minimalnej (50,41 vs 49,65 uderzeń/minutę) dobowej częstotliwości rytmu komór serca, choć wyniki te nie były istotne statystycznie (rycina 11). Dziesięciu spośród 49 chorych, którzy zostali włączeni do badania, nie zażywało betablokerów. Po dokonaniu odpowiedniej analizy statystycznej, w tak wyodrębnionej grupie, pomimo jej niewielkiej liczebności, również obserwowano wysoce istotne statystycznie ($p = 0,021$) zwolnienie średniej częstotliwości rytmu komór o ok. 3,4 uderzenia/minutę, a także maksymalnej i minimalnej.



Rycina 11. Wykresy przedstawiają wartości średnich, maksymalnych i minimalnych dobowych częstotliwości rytmu komór serca w pierwszym i drugim dniu badania. W pierwszym dniu chorzy otrzymywali placebo, w drugim dniu zileuton.

** oznacza $p < 0,0001$.

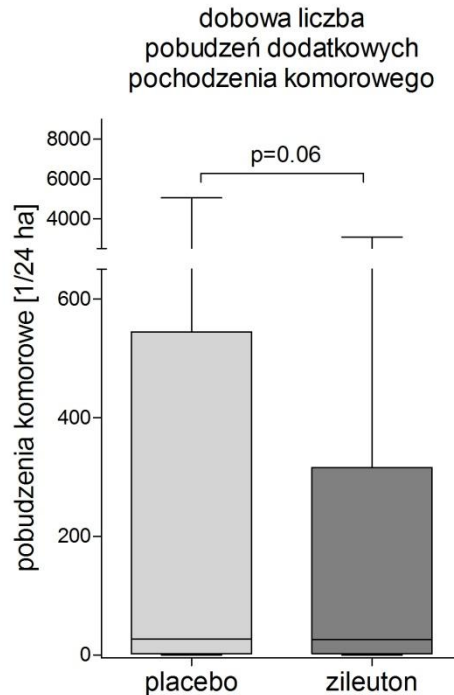
W drugim dniu badania stwierdzono mniej - średnio o 31,24 % - epizodów tachykardii (194,6 vs 133,8 epizodów tachykardii/24 h) ($p<0,01$) oraz skłonność do większej ilości epizodów bradykardii (28,4 vs 33,02 epizodów bradykardii/24 h) i pauz (65,36 vs 88,81 epizodów pauz/24 h) ($p=NS$) (rycina 12).



Rycina 12. Wykresy przedstawiają dobowe liczby epizodów tachykardii, bradykardii i pauz (trwających powyżej 2 sekundy) w pierwszym i drugim dniu badania. W pierwszym dniu chorzy otrzymywali placebo, w drugim dniu zileuton.

**** oznacza $p<0.001$.**

Ponadto, w dniu podawania zileutonu obserwowano mniej (średnio o 22 %) pobudzeń dodatkowych pochodzenia komorowego. Wynik ten nie był jednak znamieny statystycznie ($p=0,06$) (rycina 13).



Rycina 13. Wykres przedstawia dobowe liczby pobudzeń dodatkowych pochodzenia komorowego w pierwszym i drugim dniu badania. W pierwszym dniu chorzy otrzymywali placebo, w drugim dniu zileuton.

Nie obserwowano wpływu zileutonu na czas trwania zespołów QRS, skorygowanego odstępu QT, dyspersję QT ani obniżenia czy uniesienia odcinków ST.

Powyższe wyniki elektrokardiograficzne, uzyskane w trakcie 24-godzinnej monitorowania EKG metodą Holtera, nie korelowały z wyjściowymi stężeniami LTE_4 w moczu, ani różnicą poziomów LTE_4 w moczu między pierwszym a drugim dniem obserwacji. Nie zależały także od wyjściowego stężenia CRP, fibrynogenu ani parametrów echokardiograficznych, współistniejących schorzeń czy płci chorych.

7. DYSKUSJA

Dysponujemy obecnie dość obszerną literaturą, omawiającą udział leukotrienów w etiopatogenezie miażdżycy i ostrych incydentów sercowo-naczyniowych. W ścianach miażdżycowo zmienionych tętnic, na komórkach śródbłonna i kardiomiocytach wykazano obecność wszystkich rodzajów receptorów dla leukotrienów. Podejmowane są pierwsze próby wdrożenia leków przeciwleukotrienowych do terapii choroby wieńcowej w prewencji wtórnej zawału serca, a także w prewencji udaru mózgu (7, 8).

Opisano wysoką ekspresję receptorów CysLT₂ na komórkach włókien Purkiniego układu przewodzącego serca (10). Funkcja i znaczenie tych receptorów w układzie przewodzącym serca, jak również na kardiomiocytach nie były dotąd badane.

Niniejsza praca jest pierwszą próbą oceny wpływu leukotrienów na czynność elektryczną serca człowieka.

Badanie przeprowadzone zostało w dwóch częściach klinicznych. Do pierwszej, wybrano chorych na stabilną chorobę niedokrwienną serca i z rytmem zatokowym w zapisie EKG, poddawanych planowej koronarografii z ewentualną przezskórną angioplastyką tętnic wieńcowych i implantacją stentów; do drugiej części - chorych z utrwalonym migotaniem przedsionków. W obu częściach badania chorym podawano w standardowych dawkach inhibitor 5-lipoksygenazy – zileuton. Wybór leku podyktowany był tym, iż nie istnieje dotąd selektywny inhibitor receptorów CysLT₂ (8), zdecydowano się więc na hamowanie 5-lipoksygenazy, będącej drogą powstawania wszystkich leukotrienów. Przez okres 48 godzin prowadzono monitorowanie EKG metodą Holtera, połączone z równoległą obserwacją stężeń LTE₄ w moczu.

Główne wyniki badania podsumować można następująco: zastosowany lek hamował biosyntezę leukotrienów oraz wywierał korzystny wpływ na czynność elektryczną serca, zwłaszcza poprzez

zwolnienie średniej dobowej częstotliwości rytmu serca, zwiększenie parametrów zmienności rytmu (HRV) i poprawę przewodzenia impulsu elektrycznego przez układ przewodzący serca u chorych poddawanych planowym zabiegom wewnątrznaczyniowym. Nie wpływał natomiast na występowanie arytmii ani na niedokrwienie mięśnia sercowego.

W pierwszej części badania wszyscy chorzy mieli wykonaną planową koronarografię, a 26% z nich dodatkowo, jednocześnie, zabieg angioplastyki z implantacją stentu do tętnicy wieńcowej. Przeprowadzone badanie było zaprojektowane jako randomizowane (chorzy byli losowo przydzielani do grupy otrzymującej zileuton lub placebo) z podwójnie ślełą próbą.

Po raz pierwszy w tej pracy wykazano, że przejściowy wzrost syntezy LTs obserwowany w 2-giej godzinie po zabiegu, dotyczy nie tylko - jak do tej pory sądzono - chorych, u których wykonywana jest koronarografia z angioplastyką (83), ale także chorych, u których wykonywana jest tylko diagnostyczna koronarografia. Po angioplastyce, stwierdzono nieco wyższe, choć nieistotnie statystycznie, wydalanie LTE_4 z moczem, w porównaniu z samą koronarografią (dane nie przedstawione). Aktywacja szlaku 5-lipoksygenazy po interwencji wewnątrznaczyniowej była krótkotrwała (do kilku godzin) i podwyższone stężenia LTE_4 w moczu wracały do wartości zbliżonych do wyjściowych w 24-tej godzinie po zabiegu.

Przedłużoną aktywację szlaku 5-LO, nawet do kilku miesięcy, opisano dotąd jedynie u chorych z ostrymi zespołami wieńcowymi, w tym z niestabilną dławicą piersiową (niezależnie od sposobu leczenia, tj. farmakologicznie czy inwazyjnie); dane w piśmiennictwie wydają się być w tym względzie zgodne (80, 110, 111).

Breziński i wsp., wykazali u chorych na stabilną dławicę piersiową wzrost stężeń LTC_4 i LTD_4 we krwi pobranej z tętnicy wieńcowej dystalnie od miejsca poddanego angioplastyce, bezpośrednio po deflacji balonu (112). Ten przejściowy wzrost syntezy LTs tłumaczony był najczęściej uszkodzeniem ściany naczynia w obrębie zmiany miażdżycowej, powstałym podczas inflacji balonu, pęknięciem blaszki i odsłonięciem rdzenia lipidowego oraz znajdujących się w niej licznych komórek

zapalnych, głównie makrofagów (112). Spanbroek i wsp. wykazali, iż komórki te, a także komórki piankowe i dendrytyczne cechuje wysoka ekspresja 5-LO i to właśnie one mogą odpowiadać za zwiększoną generację LTs po uszkodzeniu blaszki miażdżycowej inflacją cewnika balonowego (9). Breziński i wsp. nie obserwowali podobnego zjawiska, gdy powtórzyli inflację balonu w modelu niepokrytego śródbłonkiem naczynia wykonanego z Gore-texu, perfundowanego pełną krwią. Miało to wskazywać na istotny udział w biosyntezie LTs nie tyle chwilowej okluzji naczynia, co właśnie komórek zapalnych pochodzących ze zmiażdżonej blaszki miażdżycowej. Niemniej jednak, w kolejnym eksperymencie, na tym samym modelu naczynia z Gore-texu wykazano, iż już samo dodanie do krwi pełnej płynącej przez naczynie agonistów aktywujących neutrofile i płytki krwi powodowało wzrost syntezy produktów lipoksygenazy, w tym także 5-S,12-SdiHETE, uważanych za markery tzw. przezkomórkowej syntezy LTs. Wynik ten mógłby wskazywać na istnienie przynajmniej jeszcze jednego, obok komórek blaszki miażdżycowej, dodatkowego źródła LTs podczas angioplastyki. Co więcej, Rosolowsky i wsp., udowodnili, że już samo uszkodzenie śródbłonka naczynia, nie tylko w obrębie segmentu zwężonego przez blaszkę miażdżycową, ale również w obrębie zdrowego segmentu, powoduje uruchomienie interakcji między płytkami krwi, neutrofilami i komórkami śródbłonka i prowadzi do znacznego wzrostu syntezy produktów szlaku LO. W zmienionych miażdżycowo segmentach naczyń obserwowano wyższe stężenia badanych eikozanoidów (113). Wyniki obu cytowanych powyżej prac wydają się nawzajem uzupełniać i mogą stanowić logiczne wytłumaczenie obserwowanej przez nas zwiększonej generacji LTs już w trakcie samej koronarografii. Podczas angiografii tętnic wieńcowych bodźce takie, jak uszkodzenie tętnicy udowej przez jej nakłucie, uszkodzenie śródbłonka przez przemieszczający się w świetle naczynia cewnik, a także samo podanie kontrastu (114, 115) do tętnic wieńcowych mogą aktywować w/w interakcje międzykomórkowe i prowadzić do uruchomienia tzw. przezkomórkowej syntezy LTs (25, 116), stanowiąc istotne źródło LTs podczas interwencji wewnątrznacyniowych.

W większości z cytowanych powyżej prac (80, 83, 110, 111) nie opisano jednak wzrostu syntezy LTs, ani u chorych poddawanych jedynie diagnostycznej koronarografii, ani u chorych poddawanych dodatkowo angioplastyce. Logicznym wytłumaczeniem tego zjawiska, wydaje się fakt, iż w badaniach tych materiały w celu oznaczenia LTs (osocze lub mocz) pobierane były po raz pierwszy dopiero w 24 godzinie po zabiegu, a więc w momencie kiedy chorzy byli już poza szczytem ich uwalniania. W pilotażowym badaniu przeprowadzonym w II Katedrze Chorób Wewnętrznych (83) wykazano, iż w drugiej godzinie po PCI wzrasta wydalanie LTE_4 z moczem, zaś już w czwartej godzinie po zabiegu ulega ono obniżeniu do wartości wyjściowych. W tym badaniu, nie obserwowano jednak istotnego statystycznie wzrostu wydalania LTE_4 u chorych poddawanych samej koronarografii. Wynikało to zapewne z dużo mniejszej liczebności przebadanej grupy chorych (19 osób), a także z użycia mniej czułej metody detekcji LTs w moczu tj. metody ELISA. W niniejszej pracy stężenia LTE_4 oznaczane były wysoce swoistą dla LTE_4 metodą LC/MS (106). Jak wiadomo, chorzy na stabilną chorobę wieńcową charakteryzują się nie podwyższonymi stężeniami LTs w surowicy i w moczu (80, 110) i bardziej wiarygodną metodą oznaczeń w tych przypadkach jest spektrometria mas (106). A zatem, można przyjąć, iż krótkotrwała aktywacja szlaku 5-lipoksygenazy u chorych na stabilną chorobę wieńcową dotyczy zarówno chorych poddawanych diagnostycznej koronarografii jak i koronarografii z angioplastyką tętnic wieńcowych.

Zastosowany w standardowych dobowych dawkach inhibitor 5-lipoksygenazy (zileuton) tylko częściowo blokował biosyntezę leukotrienów. Stopień zahamowania syntezy LTs średnio o 26 % w pierwszej części badania i o ok. 43 % w drugiej części jest zgodny z danymi literaturowymi (117), i wynikami wcześniejszych eksperymentów (66). Kilkunastoprocentowa różnica może wynikać z użycia dwóch różnych metod oznaczeń LTE_4 w moczu, jak i odmiennych grup chorych badanych w obu częściach pracy.

Leczenie zileutonem nie zapobiegało przejściowemu zwiększeniu generacji LTs podczas interwencji wewnątrznaczyniowej; w grupie

otrzymującej placebo obserwowano istotnie wyższy wzrost wydalania LTE_4 z moczem. Zjawisko to można tłumaczyć słabą farmakokinetyką leku z krótkim, bo zaledwie do kilku godzin, czasem jego działania. Lek był dobrze tolerowany przez chorych, nie obserwowano żadnych działań niepożądanych w trakcie badania. Nie wykazano też korelacji między wyjściowym stężeniem LTE_4 w moczu, ani wzrostem jego stężenia po zabiegu, a stopniem zaawansowania miażdżycy w tętnicach nasierdziowych, jak również objętością użytego podczas badania kontrastu, czy stężeniami CRP lub LDL-C. Wyniki te wydają się być zgodne z wcześniejszymi obserwacjami (80, 110).

Drugim i najważniejszym celem niniejszego badania była ocena ew. wpływu leukotrienów na czynność elektryczną serca. Wykazano, iż hamowanie biosyntezy LTs powoduje zwolnienie średniej dobowej częstotliwości rytmu serca (zarówno u chorych z rytmem zatokowym jak i z utrwalonym migotaniem przedsionków), korzystnie wpływa na parametry dobowej zmienności rytmu serca oraz chroni przed przejściowym wydłużeniem odstępów PQ i QTc bezpośrednio po zabiegach interwencji wewnątrz naczyń wieńcowych. Te same zmiany w zapisie EKG obserwowano (w pierwszej części klinicznej badania) zarówno gdy wykonano jedynie diagnostyczną koronarografię jak i wówczas gdy dodatkowo wykonano zabieg angioplastyki z implantacją stentu.

Leukotrienom cysteinylowym przypisuje się rolę w uszkodzeniu mięśnia sercowego w przebiegu niedokrwienia i reperfuzji (82, 118, 119). Na podstawie wyników pojedynczych eksperymentów na modelach zwierzęcych sugerowano, że zmiany niedokrwienne w EKG wywoływane są przez leukotrieny cysteinyłowe, powodujące skurcz naczyń wieńcowych (101). Istnieje zaledwie kilka prac, w których na modelach zwierzęcych, wykazano, że preparaty przeciwleukotrienowe redukują śmiertelność i występowanie groźnych arytmii komorowych, ale związanych z ostrym niedokrwieniem i zjawiskiem reperfuzji mięśnia sercowego (101, 120 - 122). Podobnie, na podstawie wyników kilku eksperymentów na izolowanych sercach zwierzęcych opisano kardioprotekcyjny efekt preparatów przeciwleukotrienowych, przeciwdziałających powstawaniu

arytmii komorowych, inicjowanych toksycznymi dawkami digoksyny (123 -125).

W niniejszej pracy nie obserwowaliśmy u chorych istotnego statystycznie wpływu hamowania syntezy LTs na dobową liczbę pobudzeń dodatkowych pochodzenia komorowego (choć w drugiej części klinicznej badania obserwowano pewien trend w kierunku ich redukcji), ani wpływu na czas trwania obniżenia odcinków ST. Należy jednak zauważyć, że wszystkie cytowane powyżej prace dotyczyły zjawiska arytmii komorowych w przebiegu ostrego niedokrwienia mięśnia sercowego lub jego intoksykacji glikozydami naparstnicy. W niniejszej pracy badano wpływ leukotrienów na czynność elektryczną serca, ale u chorych na stabilną chorobę wieńcową. Można zatem przypuszczać, iż LTs dopiero w szczególnych okolicznościach doświadczalnych mogą potencjalnie nasilać występowanie arytmii komorowych. Należy także pamiętać, iż użyty w badaniu lek (zileuton) nie blokował całkowicie syntezy LTs, lecz jedynie obniżał ich stężenie o ok. 30-40%. Być może zastosowanie mocniejszych preparatów przeciwleukotrienowych, lub selektywnego inhibitora receptorów $cysLT_2$, pozwoliłoby zauważyć ich wyraźniejsze działanie antyarytmiczne, również u chorych na stabilną chorobę wieńcową.

Interesujące wydaje się zwolnienie średniej dobowej częstotliwości rytmu serca w obu częściach badania, związane z farmakologicznym hamowaniem biosyntezy leukotrienów. Powyższe zjawisko nie jest w pełni jasne. Vigorito i wsp. (126) opisywali chwilowe przyspieszenie częstotliwości rytmu serca u 15 zdrowych ochotników po jednorazowym podaniu LTC_4 dożylnie, bądź LTD_4 , bezpośrednio do tętnic wieńcowych. Było to jednak spowodowane wcześniejszym spadkiem ciśnienia tętniczego krwi, z następowym wzrostem w surowicy stężeń epinefryny i norepinefryny, które wracały do wartości wyjściowych w ok. 10-20 minut. Przyspieszenie rytmu serca u tych osób tłumaczyć należy przede wszystkim wtórnym do hipotonii pobudzeniem układu sympatycznego i reakcją serca na aminy katecholowe. Brak obserwacji reakcji serca na dłużej utrzymujące się wyższe stężenia we krwi $cysLTs$ nie pozwala na

podstawie powyższego doświadczenia na przypisanie cysLTs działania chronotropowego dodatniego.

Analizując wyniki niniejszej pracy, należy pamiętać także o możliwości interakcji zileutonu z innymi lekami, zwłaszcza betablokerami. Zileuton zwiększa stężenie we krwi propranololu i nasila jego działanie (71). Ponieważ w pierwszej części badania prawie wszyscy chorzy leczeni byli betablokerami nie można było wykluczyć potencjalnego wpływu wspomnianych interakcji na zwolnienie średniej dobowej częstotliwości rytmu serca. Wyniki drugiej części badania wydają się jednak rozwiewać te wątpliwości, gdyż ten sam efekt kliniczny obserwowano zarówno u chorych zażywających betablokery jak i u chorych nie otrzymujących tych leków. Chorzy nasi (w pierwszej części badania) nie byli leczeni preparatami naparstnicy, o których donoszono, iż mogą wchodzić w interakcje z lekami blokującymi receptory leukotrienowe (123). Fizjologicznie częstotliwość rytmu serca jest wypadkową własnego automatyzmu węzła zatokowo-przedsionkowego (u osób z rytmem zatokowym) oraz wpływu układu autonomicznego na serce, stąd nie sposób ustalić na ile potencjalny dodatni efekt chronotropowy LTs zależny byłby od bezpośredniego ich oddziaływania na węzeł SA, a na ile na autonomiczny układ nerwowy.

Kolejną istotną obserwacją był korzystny wpływ zileutonu na parametry zmienności rytmu serca (HRV) u chorych na stabilną chorobę wieńcową poddawanych przezskórnym interwencjom wewnątrznaczyniowym.

Zmienność rytmu serca jest skutkiem autonomicznej i humoralnej regulacji rytmu w odpowiedzi na bodźce docierające do układu nerwowego ze środowiska (stresy emocjonalne i umysłowe) lub z organizmu. Zależy ona przede wszystkim od napięcia nerwu błędnego, choć nie jest to zależność liniowa. Na widmo zmienności periodycznej w pasmach LF i HF dodatkowo wpływa wrażliwość baroreceptorów w tętnicach szyjnych, a na widmo w paśmie VLF także aktywność układu renina-angiotensyna (127). Przesunięcie modulacji autonomicznej w kierunku przewagi układu przywspółczulnego z jednoczesnym

zwiększeniem HRV, ze względu na potencjalnie korzystne działanie ochronne, jest reakcją bardzo pożądaną (128).

Pomiary HRV od wielu lat wykorzystywane były w ocenie ryzyka nagłego zgonu sercowego u chorych po zawale serca oraz służyły ocenie modulacji współczulno-przywspółczulnej (129-131). Bigger i wsp. zauważyli, iż zwiastunami całkowitej umieralności i zgonów sercowych u chorych w drugim tygodniu po przebytym zawale serca, są zmniejszona całkowita moc widma, jak i moc każdego z czterech pasm. Najsilniejszy związek z umieralnością odnotowano dla mocy w pasmach ULF i VLF. Dodatkowo zauważono, iż moc widma VLF bardziej wiąże się z ryzykiem zgonu związanego z komorowymi zaburzeniami rytmu (130).

W naszej pracy obserwowaliśmy, iż chorzy poddani planowej koronarografii z ew. angioplastyką, którzy otrzymywali zileuton cechowali się większą zmiennością rytmu serca w porównaniu z chorymi otrzymującymi placebo, tak przed jak i po zabiegu. W pierwszej godzinie po interwencji wewnątrznaczyniowej odnotowano zmiany HRV bardziej nasilone w grupie otrzymującej placebo. Najwyraźniejsze zmiany HRV skorelowane były w czasie ze wzrostem syntezy LTs po interwencji wewnątrzwieńcowej, a równocześnie częściowo zapobiegało im podawanie zileutonu.

Wydaje się, iż niepowikłana stabilna choroba wieńcowa nie ma istotnego wpływu na zmienność rytmu serca (132). Natomiast epizodom ostrego niedokrwienia w chorobie wieńcowej, zwykle towarzyszy spadek zmienności rytmu. Ten spadek HRV wyprzedza w czasie (o kilka lub kilkanaście minut) obniżenie odcinka ST w EKG (127). Wielu badaczy podkreślało, iż incydenty niedokrwienne są rzeczywiście poprzedzone stopniowym zmniejszaniem się mocy widma HF w okresie 20 do 2 minut, a następnie mocy widma LF w czasie od 4 do 2 minut przed wystąpieniem niedokrwienia (133-135). Wyniki te sugerują, iż wcześniejszy spadek mocy widma HF w stosunku do epizodu niedokrwienego, a więc zmniejszenie napięcia przywspółczulnego (być może ze współistniejącym wzrostem napięcia współczulnego) jest jednym z elementów zwiastujących niedokrwienie serca u chorych z miażdżycą tętnic wieńcowych (127).

Same zabiegi koronarografii jak i angioplastyki wieńcowej u chorych na stabilną chorobę wieńcową również wpływają na parametry HRV. W trakcie angioplastyki pewne znaczenie może odgrywać przejściowe niedokrwienie podczas inflacji balonu, a także odruch poprzez nerw błędny z rozciągnięcia naczyń wieńcowych przez balon (136). Nie wiadomo, co powoduje tzw. późne i długotrwałe zwiększenie parametrów HRV po PCI; logicznym wydaje się poprawa ukrwienia w obszarze poszerzanej tętnicy i poprawa kurczliwości serca (134, 137). Dotychczasowe doniesienia na temat ewentualnej zależności między lokalizacją zwężenia w tętnicy wieńcowej a wartościami HRV po PCI są rozbieżne (138, 139). Keeley i wsp. nie obserwowali związku między poszerzaną tętnicą, a parametrami HRV. Potwierdzili natomiast, iż nie tylko angioplastyka, ale także sama koronarografia może mieć przejściowy wpływ na HRV. Zauważyli oni, iż w okresie pierwszych 30 minut po zabiegu PCI dochodzi do zmniejszenia HRV zarówno w zakresie parametrów analizy czasowej (SDNN, pNN50, rMSSD) jak i częstotliwościowej (log LF, log HF). Po zabiegu samej koronarografii obserwowano głównie spadek log HF oraz nieistotne statystycznie zmniejszenie pozostałych parametrów HRV (SDNN, pNN50, rMSSD, log LF) (139). Obserwacje te są podobne do wyników naszego badania w grupie chorych otrzymujących placebo, z wyjątkiem odmiennego zachowania się mocy widma LF. Wzrost mocy widma LF po interwencji wewnątrzwieńcowej obserwowano m.in. podczas plastyki prawej tętnicy wieńcowej (138).

W niniejszej pracy farmakologiczne hamowanie biosyntezy leukotrienów częściowo chroniło przed niekorzystnym zmniejszeniem zmienności rytmu serca u chorych poddawanych interwencjom wewnątrzwieńcowym. Być może hamowanie syntezy LTs przez zileuton, zapobiegając skurczowi tętnic wieńcowych, poprawiało ukrwienie serca i jego kurczliwość (49) i tym samym wpływało korzystnie na parametry zmienności rytmu serca. Inną możliwą przyczyną tego zjawiska mógłby być wpływ LTs na układ autonomiczny (spadek napięcia nerwu błędnego i zmniejszenie HRV).

Istotne wydłużenie czasu trwania odstępu PQ, QTc w pierwszej godzinie po zabiegu na tętnicach wieńcowych, obserwowano jedynie

w grupie otrzymującej placebo. Zileuton wydawał się chronić serce przed w/w zmianami. Etiologia zaburzeń przewodnictwa w węźle przedsionkowo-komorowym, poprzez pęczek Hisa, jego odnogi i włókna Purkiniego a także zaburzeń depolaryzacji i repolaryzacji komórek nie są do końca jasne. Wiadomo, iż były one skorelowane w czasie z podaniem kontrastu do naczyń wieńcowych, ale także z obserwowanym wzrostem generacji leukotrienów po interwencjach wewnątrzwieńcowych. Możliwą przyczyną tych zmian może być samo podanie kontrastu i jego toksyczny wpływ m.in. na włókna Purkiniego. Już wcześniej bowiem opisywano pokontrastowe wydłużenie PR, QRS, QTc oraz bradykardię, w stopniu zależnym od rodzaju użytego kontrastu (140 - 146). Niemniej jednak w grupie otrzymującej zileuton nie obserwowaliśmy w/w wpływu kontrastu na układ przewodzący serca. Być może zileuton chronił przed toksycznym uszkodzeniem serca przez kontrast. Ponieważ receptory $cysLT_2$ znajdują się w układzie przewodzącym serca oraz w mniejszych ilościach na kardiomiocytach można przypuszczać, iż zmiany w EKG są po części wynikiem działania samych leukotrienów, lub też, iż LTs potęgują toksyczny wpływ kontrastu na serce, przed czym chroni farmakologiczne blokowanie ich syntezy. Problem wydaje się być jednak jeszcze bardziej złożony. Nie sposób bowiem w tym miejscu zapomnieć także o zmianach czynności układu autonomicznego po interwencjach wewnątrznaczyniowych i ich bezpośredniego oddziaływania na w/w parametry EKG.

Podanie jednoznacznego wytłumaczenia dla powyższych rozważań w chwili obecnej wydaje się trudne. Nasze obserwacje korzystnego wpływu hamowania biosyntezy leukotrienów na czynność elektryczną serca rzucają nowe światło na rolę $cysLTs$ w organizmie. Dobra odpowiedź, przy jedynie częściowym zahamowaniu ich syntezy, sugeruje możliwość uzyskania bardziej spektakularnego efektu przy zastosowaniu bardziej specyficznych leków.

W tym miejscu należy zauważyć, iż niniejsza praca posiada jednak kilka ograniczeń. Podstawowym jest niemożność użycia selektywnego inhibitora receptorów $cysLT_2$, który nie został dotąd zsyntetyzowany. Zileuton działając poprzez hamowanie 5-lipoksygenazy blokuje syntezę

wszystkich rodzajów LTs, stąd brak absolutnej pewności, iż wywołany efekt kliniczny zależy jest od działania poprzez receptory cysLT₂. Ponadto, zileuton jako lek o słabej farmakokinetyce hamuje syntezę LTs jedynie w 30-40%. Nie sposób pominąć także faktu obecności receptorów dla cysLTs w układzie autonomicznym oraz ich przypuszczalnej roli w modulacji współczulno-przywspółczulnej, co dodatkowo utrudnia interpretację uzyskanych wyników. Co więcej, chorzy zażywali wiele leków, również wpływających na rytm serca i jego układ przewodzący, które mogły wchodzić w interakcje z zileutonem. Krótki czas obserwacji (bo jedynie 48 godzin) nie pozwala na ocenę wpływu hamowania syntezy LTs na rokowanie odległe. Nadal brakuje danych na temat rozmieszczenia i roli odkrytego niedawno trzeciego typu receptora dla leukotrienów cysteinylowych (cysLT₃), którego zahamowanie również może wpływać na nasze wyniki. I na koniec, na trudności w interpretacji wyników z holterowskiego zapisu EKG z pierwszej godziny po zabiegu, wpływają niewątpliwie czynniki zakłócające, jak: czynności związane z samą procedurą zabiegu, stres okołozabiegowy, stosowana premedykacja, podawany kontrast oraz osobnicza reakcja na ból. Pomimo w/w ograniczeń wyniki badania wydają nam się być interesujące i zachęcają do kontynuacji i zgłębiania przedstawionych tutaj zagadnień. Do ustalenia pozostaje źródło komórkowe leukotrienów, zaś badania elektrofizjologiczne powinny pomóc w wyjaśnieniu mechanizmu opisanych zjawisk.

8. WNIOSKI

- 1) U chorych na stabilną chorobę wieńcową, poddawanych koronarografii lub koronarografii z angioplastyką i implantacją stentu do tętnicy wieńcowej, dochodzi do krótkotrwałej aktywacji szlaku 5-lipoksygenazy i wzrostu syntezy leukotrienów cysteinylowych.
- 2) Farmakologiczne hamowanie biosyntezy leukotrienów u chorych na stabilną chorobę wieńcową, zastosowane na krótko przed interwencją wieńcową, lub u chorych z utrwalonym migotaniem przedsionków – odśłania swoiste działanie leukotrienów na układ przewodzący serca.
- 3) Farmakologiczne hamowanie 5-lipoksygenazy, pierwszego ogniwa w biosyntezie leukotrienów, powoduje:
 - a) zwolnienie średniej dobowej częstotliwości rytmu serca,
 - b) zwiększenie swoistych parametrów zmienności rytmu serca (HRV),
 - c) poprawę przewodzenia impulsu elektrycznego przez układ przewodzący u chorych poddawanych wewnątrznaczyniowym zabiegom na tętnicach wieńcowych.
- 4) Hamowanie 5-lipoksygenazy nie wpływa natomiast na występowanie arytmii nadkomorowych bądź komorowych, ani na stopień niedokrwienia serca.

9. STRESZCZENIE

Leukotrieny należą do grupy biologicznie czynnych pochodnych kwasu arachidonowego, powstających na szlaku 5-lipoksygenazy. Są silnymi mediatorami prozapalnymi uczestniczącymi w powstawaniu, progresji a także destabilizacji blaszek miażdżycowych. W ścianach miażdżycowo zmienionych tętnic obecne są wszystkie niezbędne do ich syntezy enzymy oraz ich receptory, a podczas angioplastyki naczyń wieńcowych dochodzi do zwiększenia ich generacji. Wykazano wysoką ekspresję receptorów $CysLT_2$ na komórkach włókien Purkiniego układu przewodzącego serca i kardiomiocytach, zwłaszcza prawego przedsionka i lewej komory. Funkcja i znaczenie receptorów dla leukotrienów cysteinylowych w układzie przewodzącym serca nie były dotąd badane. Niniejsza praca jest pierwszą próbą oceny oddziaływania leukotrienów na układ przewodzący serca.

Celem pracy była ocena wpływu farmakologicznego hamowania 5-lipoksygenazy na generację leukotrienów i czynność elektryczną serca u chorych na stabilną chorobą wieńcową poddawanych planowej koronarografii z ewentualną przezskórną angioplastyką tętnic wieńcowych i u chorych z utrwalonym migotaniem przedsionków.

Badanie przeprowadzone zostało w dwóch częściach. W pierwszej części badaniem randomizowanym, z podwójnie ślepą próbą objęto 103 chorych na stabilną chorobą wieńcową i z rytmem zatokowym w zapisie EKG, poddanych planowym interwencjom wewnątrzwieńcowym. 54 osoby losowo wybrane, zostały przydzielone do grupy otrzymującej przez czas trwania badania (ok. 48 godzin) inhibitor 5-lipoksygenazy (zileuton), a 49 osób do grupy otrzymującej placebo. Do drugiej części badania włączono 49 chorych z utrwalonym migotaniem przedsionków; wszyscy ci chorzy w pierwszym dniu badania zawsze otrzymywali placebo, zaś w drugim dniu zileuton.

W obu częściach badania zileuton podawany był w standardowych dobowych dawkach (4x600 mg/dobę). Przez okres 48 godzin prowadzono

monitorowanie EKG metodą Holtera, połączone z równoległym pomiarem stężeń LTE_4 w moczu. W pierwszej części badania stężenie LTE_4 w moczu oznaczano metodą LC/MS (spektrometrii mas z wykorzystaniem wysokosprawnego chromatografu cieczowego) w czterech punktach czasowych tj. w 24 i 2 godzinie przed oraz w 2 i 24 godzinie po interwencji wewnątrzwątrobowej. W drugiej części badania stężenie LTE_4 w moczu oznaczano metodą ELISA tylko dwukrotnie tj. w pierwszym i drugim dniu hospitalizacji – zawsze o tej samej porze.

W pierwszej części badania chorzy mieli wykonaną koronarografię oraz 26% dodatkowo zabieg angioplastyki z implantacją stentu. U wszystkich chorych w 2-giej godzinie po zabiegu obserwowano przejściowe zwiększenie średniego wydalania LTE_4 z moczem o ok. 200%. Aktywacja szlaku 5-LO po interwencji wewnątrznaczyniowej była krótkotrwała i podwyższone stężenia LTE_4 w moczu wracały do wartości zbliżonych do wyjściowych w 24-tej godzinie po zabiegu. Leczenie zileutonem zmniejszało biosyntezę leukotrienów średnio o ok. 26 % w pierwszej części badania i nie zapobiegało zwiększeniu generacji LTs podczas interwencji wewnątrznaczyniowej. W grupie chorych otrzymujących zileuton średnia dobowa częstotliwość rytmu serca była o ok. 7,1% niższa przed zabiegiem i o ok. 4,3% niższa po zabiegu w porównaniu z grupą otrzymującą placebo (ANOVA, $p=0,027$). Ten sam efekt obserwowano porównując średnią częstotliwość rytmu serca z okresu jednej godziny bezpośrednio przed i tuż po zabiegu ($p=0,017$). Procedura koronarografii z ew. PCI powodowała zmniejszenie SDNN (z okresu 24 godzin) w obu badanych grupach (ze $123,23 \pm 33,9$ do $115,78 \pm 37,3$ ms, ANOVA, $p=0,02$). Wyższe parametry analizy czasowej i częstotliwościowej zmienności rytmu serca obserwowano u chorych otrzymujących inhibitor 5-LO, w ostatniej godzinie przed i pierwszej godzinie po zabiegu. Zileuton oddziałował głównie na VLF i ULF. Moc widma HRV w zakresie VLF była wyższa w grupie otrzymującej zileuton średnio o 33,2 % przed i o 26,7 % po zabiegu ($p=0,016$) i analogicznie moc widma w zakresie ULF była odpowiednio o 39,2 % i 17,7 % wyższa niż w grupie otrzymującej placebo ($p=0,035$). W grupie otrzymującej zileuton, w odróżnieniu od grupy otrzymującej placebo, moc widma HF i LF nie

ulegała istotnym zmianom. Przejściowe wydłużenie odstępów PQ (ze 157,1 ms do 181 ms) i QTc (z 434,9 ms do 459,1 ms) obserwowano bezpośrednio po zabiegu tylko w grupie otrzymującej placebo, zaś wydłużenie czasu trwania zespołu QRS obserwowano u wszystkich chorych, niezależnie od podawania zileutonu ($p < 0,01$). Te same zmiany w zapisie EKG obserwowano zarówno u chorych, u których wykonano jedynie diagnostyczną koronarografię jak i u tych, u których dodatkowo wykonano zabieg PCI.

W drugiej części badania podawanie inhibitora 5-LO zmniejszało wydalanie LTE_4 z moczem średnio o ok. 43%. U chorych w trakcie podawania zileutonu, obserwowano niższą średnią dobową częstotliwość rytmu komór serca, średnio o ok. 3,18 uderzeń/minutę (83,59 vs 80,41 uderzeń/minutę) ($p < 0,0001$) oraz średnio o 31,24 % mniej epizodów tachykardii (194,6 vs 133,8 epizodów tachykardii/24 h) ($p < 0,01$). W podgrupie chorych nie otrzymujących betablokerów, również obserwowano istotnie statystycznie ($p = 0,021$) zwolnienie średniej dobowej częstotliwości rytmu komór o ok. 3,4 uderzenia/minutę. W drugim dniu badania obserwowano wolniejszą, choć nieistotnie statystycznie, maksymalną (127,02 vs 123,82 uderzeń/minutę) i minimalną (50,41 vs 49,65 uderzeń/minutę) dobową częstotliwość rytmu komór serca i skłonność do większej ilości epizodów bradykardii (28,4 vs 33,02 epizodów bradykardii/24 h) i pauz (65,36 vs 88,81 epizodów pauz/24 h) ($p = \text{NS}$). Nie obserwowano istotnego statystycznie wpływu hamowania syntezy LTs na dobową liczbę pobudzeń dodatkowych pochodzenia nadkomorowego (w pierwszej części badania), komorowego (choć w drugiej części badania obserwowano pewien trend w kierunku ich redukcji), ani wpływu na czas trwania obniżenia odcinków ST.

Podsumowując, wykazano, iż u chorych na stabilną chorobę wieńcową poddawanych koronarografii lub koronarografii z angioplastyką i implantacją stentu do tętnicy wieńcowej, dochodzi do krótkotrwałej aktywacji szlaku 5-lipoksygenazy i wzrostu syntezy leukotrienów cysteinylowych. Farmakologiczne hamowanie biosyntezy leukotrienów u chorych na stabilną chorobę wieńcową, poddawanych interwencjom wewnątrzwieńcowym, lub u chorych z utrwalonym migotaniem

przedsionków powoduje: zwolnienie średniej dobowej częstotliwości rytmu serca, zwiększenie parametrów zmienności rytmu (u chorych z rytmem zatokowym serca) oraz poprawę przewodzenia impulsu elektrycznego przez układ przewodzący podczas interwencji wewnątrzwieńcowych. Hamowanie 5-lipoksygenazy nie wpływa natomiast na występowanie arytmii, ani na stopień niedokrwienia serca.

SUMMARY

Leukotrienes are a group of biologically active derivatives of arachidonic acid, produced via 5-lipoxygenase pathway. They are potent proinflammatory mediators, which participate in the creation, progression, and destabilization of atheromatous plaques. All the enzymes and receptors essential in their synthesis are present in the walls of atherosclerotic arteries, and during coronary angioplasty their production increases. A high expression of CysLT₂ receptors has been detected in Purkinje fibers of the heart conduction system and in cardiomyocytes, especially in the right atrium and left ventricle. The function and significance of cysteinyl leukotriene receptors of the heart conduction system have not yet been studied. The hereby research is the first attempt to evaluate the action of leukotrienes on the heart conduction system.

The aim of this study was to assess the effect of pharmacological inhibition of 5-lipoxygenase on leukotriene production and the cardiac electrical activity in patients with stable coronary heart disease subject to elective coronary angiography with possible percutaneous angioplasty and in patients with permanent atrial fibrillation.

The study comprised two parts. The first, randomized double-blind trial included 103 patients with stable coronary heart disease and sinus rhythm in ECG, subject to elective intracoronary interventions. 54 randomized patients were assigned to a group which received an inhibitor of 5-lipoxygenase (zileuton) throughout the whole period of the examination (about 48 hours), and 49 patients were assigned to a group with placebo. The second part of the study included 49 patients with permanent atrial fibrillation – all of these patients received placebo on the first day of the study, and zileuton on the second day.

In both trials zileuton was applied in standard daily dosage (4x600 mg/day). ECG Holter recording was performed for the first 48 hours along with consecutive measurements of urine LTE₄ concentrations. In the first trial the urine LTE₄ concentrations were

examined by LC/MS (mass spectrometry using high performance liquid chromatography) at four time points – 24 and 2 hours before and 2 and 24 hours after the intracoronary intervention. In the second trial the urine LTE_4 concentrations were evaluated by ELISA only twice – on the first and second day of hospitalization, always at the same time.

In the first trial the patients underwent coronary angiography and 26% of them required additional angioplasty with stent implantation. In all the patients in the second hour after the procedure there was a transient increase of the urinary excretion of LTE_4 by about 200%. The 5-LO pathway activation after intracoronary intervention was only brief, and the elevated LTE_4 urine concentrations returned close to initial values in the 24th hour after the procedure. In the first trial zileuton treatment decreased the leukotriene biosynthesis by an average of 26% and it did not prevent the intensified generation of LTs during intravascular procedures. The group of patients receiving zileuton had mean values of 24-hour heart rate lower by about 7,1% before the procedure and by about 4,3% following the procedure, compared to the patients receiving placebo (ANOVA, $p=0,027$). The same effect was observed analyzing the mean heart rate about an hour before and immediately following the procedure ($p=0,027$). Cardiac angiography with or without PCI caused a decrease in SDNN (over a 24 hour period) in both groups (from $123,33 \pm 33.9$ to $115,78 \pm 37.3$ ms, ANOVA, $p=0,02$). Higher values in the analyzed time and frequency variability of heart rhythm were observed in patients receiving 5-LO inhibitor in the last hour before and the first hour after the procedure. Zileuton affected mainly the VLF and the ULF. The HRV spectrum power within VLF was higher in the group treated with zileuton by an average of 33,2% before and 26,7% following the procedure ($p=0,016$), and analogically the spectrum power within the ULF was higher by 39,2% and 17,7% respectively, among patients receiving placebo ($p=0,035$). In the group receiving zileuton, as opposed to the placebo group, the HF and LF spectrum power did not alter significantly. Transient prolongation of the PQ interval (from 157,1 to 181 ms) and QTc (from 434,9 ms to 459,1 ms) were observed directly after the procedure only among patients receiving placebo, however in all

patients, regardless of zileuton treatment, QRS time prolongation was noted ($p<0,01$). The same alterations in ECG were observed in patients who underwent only coronary angiography as well as patients who also had PCI.

In the second trial of this study, the administration of 5-LO inhibitor decreased the urine LTE₄ excretion by an average of about 43%. Patients treated with zileuton had a mean 24-hour heart rate lower by about 3,18 beats per minute (83,59 vs. 80,41 beats per minute) ($p<0,0001$) and about 31,24% less episodes of tachycardia (194,6 vs. 133,8 episodes of tachycardia per 24 hours) ($p<0,01$). The subgroup which was not treated with beta-blockers also had statistically significant ($p=0,021$) reduction in the mean 24-hour heart rate by about 3,4 beats per minute. On the second day of the trial there was a slower, however statistically insignificant, maximum (127,02 vs. 123,82 beats per minute) and minimum (50,41 vs. 49,65 beats per minute) 24-hour heart rate and a tendency to more episodes of bradycardia (28,4 vs. 33,02 episodes per 24 hours) and pauses (65,36 vs. 88,81 pauses per 24 hours) ($p=NS$). There were no statistically significant effects of the inhibition of LTs synthesis on the amount of supraventricular extrasystoles (in the first part of the study), ventricular extrasystoles (although in the second part of the study there was a certain tendency to their reduction), nor the impact on the duration of ST depression.

Reassuring, it has been shown that in patients with stable coronary heart disease who have coronary angiography or coronary angiography with angioplasty with stent implantation performed, there is a transient activation of the 5-lipoxygenase pathway and increased synthesis of cysteinyl leukotrienes. Pharmacological inhibition of leukotriene biosynthesis in patients with stable coronary heart disease subject to intracoronary interventions or patients with permanent atrial fibrillation, causes: reduction of the mean 24-hour heart rate, increase in parameters of rhythm variability (in patients with sinus rhythm), and an improvement in the conduction of electrical impulses in the conduction system during intracoronary procedures. Inhibition of 5-lipoxygenase does not affect the incidence of arrhythmia, nor the degree of heart ischaemia.

10. WYKAZ TABEL

Tabela 1. Dystrybucja i ekspresja receptorów cysteinylowych CysLT ₁ i CysLT ₂ w tkankach.	12
Tabela 2. Charakterystyka kliniczna chorych.....	35
Tabela 3. Porównanie grupy chorych otrzymujących zileuton z grupą otrzymującą placebo pod względem przyjmowanych leków w chwili włączenia do badania.	36
Tabela 4. Porównanie danych angiograficznych i objętości podanego podczas zabiegu kontrastu w grupach chorych otrzymujących zileuton lub placebo.	37
Tabela 5. Wpływ zabiegu koronarografii z ew. angioplastyką i implantacją stentu oraz podawania zileutonu na stężenie LTE ₄ w moczu.	38
Tabela 6. Średnia częstotliwość rytmu zatokowego serca przed i po zabiegu.	40
Tabela 7. Charakterystyka kliniczna badanej grupy.	47
Tabela 8. Charakterystyka grupy badanej pod względem przyjmowanych leków w chwili włączenia do badania.	48

11. WYKAZ RYCIN

Rycina 1. Drogi przemian kwasu arachidonowego na szlaku cyklooksygenazy i 5-lipoksygenazy.....	9
Rycina 2. Schemat syntezy leukotrienów z uwzględnieniem miejsc działania wybranych leków i eksperymentalnych preparatów przeciwleukotrienowych.	14
Rycina 3. Wzór strukturalny zileutonu – inhibitora 5-lipoksygenazy (Zyflo).....	15
Rycina 4. Schemat I części badania. ...	22
Rycina 5. Schemat II części badania. .	25
Rycina 6. Wykres przedstawia zlogarytmowane wartości średnich stężeń LTE_4 w moczu przed i po zabiegu koronarografii z ew. angioplastyką i implantacją stentu w grupach chorych otrzymujących placebo lub zileuton. Zmiany stężenia LTE_4 w czasie i wpływ zabiegu koronarografii.	39
Rycina 7. Wykres przedstawia wartości średnich dobowych częstotliwości rytmu zatokowego serca przed i po zabiegu koronarografii z ew. angioplastyką i implantacją stentu w grupach chorych otrzymujących placebo lub zileuton.	41
Rycina 8. Wykresy przedstawiają parametry analizy częstotliwościowej zmienności rytmu serca z okresu jednej godziny bezpośrednio przed i jednej godziny tuż po koronarografii z ew. angioplastyką w grupach chorych otrzymujących placebo lub zileuton..	43
Rycina 9. Wykresy przedstawiają czasy trwania odstępów PQ, QTc i zespołów QRS w pierwszej godzinie bezpośrednio przed, pierwszej godzinie tuż po i w 24-tej godzinie po zabiegu koronarografii z ew. angioplastyką.....	45
Rycina 10. Wykres przedstawia zlogarytmowane wartości średnich stężeń LTE_4 w moczu w pierwszym i drugim dniu badania. W pierwszym dniu chorzy otrzymywali placebo, w drugim dniu zileuton.	49
Rycina 11. Wykresy przedstawiają wartości średnich, maksymalnych i minimalnych dobowych częstotliwości rytmu komór serca w pierwszym i drugim dniu badania. W pierwszym dniu chorzy otrzymywali placebo, w drugim dniu zileuton.	50
Rycina 12. Wykresy przedstawiają dobowe liczby epizodów tachykardii, bradykardii i pauz (trwających powyżej 2 sekundy) w pierwszym i drugim dniu badania. W pierwszym dniu chorzy otrzymywali placebo, w drugim dniu zileuton.....	51
Rycina 13. Wykres przedstawia dobowe liczby pobudzeń dodatkowych pochodzenia komorowego w pierwszym i drugim dniu badania. W pierwszym dniu chorzy otrzymywali placebo, w drugim dniu zileuton.	52

12. PIŚMIENNICTWO

-
- ¹ Samuelsson B. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science*. 1983; 220: 568-575.
- ² Peters-Golden M, Henderson WR Jr. Leukotrienes. *N Engl J Med*. 2007; 357: 1841-54.
- ³ Lewis RA, Austen KF, Soberman RJ. Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway: biochemistry and relation to pathobiology in human disease. *N Engl J Med*. 1990; 323: 645-655.
- ⁴ Fauler J, Neumann C, Tsikas D, Frölich J. Enhanced synthesis of cysteinyl leukotrienes in psoriasis. *J Invest Dermatol*. 1992 Jul; 99(1): 8-11.
- ⁵ De Caterina R, Zampolli A. From asthma to atherosclerosis – 5-lipoxygenase, leukotrienes, and inflammation. *N Engl J Med*. 2004 Jan 1; 350(1): 29-37.
- ⁶ Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005; 352: 1685–1695.
- ⁷ Funk CD. Leukotriene modifiers as potential therapeutics for cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov*. 2005 Aug; 4(8): 664-72.
- ⁸ Bäck M. Leukotriene signaling in atherosclerosis and ischemia. *Cardiovasc. Drugs Ther*. 2009; 23: 41-48.
- ⁹ Spanbroek R, Grabner R, Lotzer K, Hildner M, Urbach A, Ruhling K, Moos MP, Kaiser B, Cohnert TU, Wahlers T, Zieske A, Plenz G, Robenek H, Salbach P, Kuhn H, Radmark O, Samuelsson B, Habenicht AJ. Expanding expression of the 5-lipoxygenase pathway within the arterial wall during human atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 1238-1243.
- ¹⁰ Evans JF. Cysteinyl leukotriene receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2002; 68-69: 587-97.
- ¹¹ Murphy RC, Gijón MA. Biosynthesis and metabolism of leukotrienes. *Biochem J*. 2007 Aug 1; 405(3): 379-95.
- ¹² Samuelsson B. The discovery of the leukotrienes. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Feb; 161: S2-6.
- ¹³ Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*. 2001 Nov 30; 294(5548): 1871-5
- ¹⁴ Borgeat P, Samuelsson B. Arachidonic acid metabolism in polymorphonuclear leukocytes: effects of ionophore A23187. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 2148-2152.

-
- ¹⁵ McDonald PP, McColl SR, Naccache PH, Borgeat P. Studies on the activation of human neutrophil 5-lipoxygenase induced by natural agonists and Ca^{2+} ionophore A23187. *Biochem J* 1991; 280: 379-385.
- ¹⁶ Borgeat P, Samuelsson B. Transformation of arachidonic acid by rabbit polymorphonuclear leukocytes. Formation of a novel dihydroxyeicosatetraenoic acid. *J Biol Chem* 1979; 254: 2643-2646.
- ¹⁷ Maltby NH, Taylor GW, Ritter JM, Moore K, Fuller RW, Dollery CT. Leukotriene C4 elimination and metabolism in man. *J Allergy Clin Immunol*. 1990 Jan; 85(1 Pt 1): 3-9.
- ¹⁸ Reid GK, Kargman S, Vickers PJ, Mancini JA, Léveillé C, Ethier D, Miller DK, Gillard JW, Dixon RA, Evans JF. Correlation between expression of 5-lipoxygenase-activating protein, 5-lipoxygenase, and cellular leukotriene synthesis. *J Biol Chem*. 1990; 265: 19818-23.
- ¹⁹ Hendersson WR Jr. The role of leukotrienes in inflammation. *Ann Intern Med* 1994; 121(9): 684-97.
- ²⁰ McGee JE, Fitzpatrick FA. Erythrocyte-Neutrophil Interactions: Formation of Leukotriene B4 by Transcellular Biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 1349-1353.
- ²¹ Gryglewski RJ. Transcellular biosynthesis of eicosanoids. *Pol J Pharmacol*. 1999; 51(2): 113-117.
- ²² Maclouf J, Murphy RC, Henson P. Transcellular sulfidopeptide leukotrienes biosynthetic capacity of vascular cells. *Blood*. 1989; 74: 703-707.
- ²³ Maclouf JA, Murphy RC. Transcellular metabolism of neutrophil-derived leukotriene A4 by human platelets. A potential cellular source of leukotriene C4. *J Biol Chem*. 1988; 263: 174-181.
- ²⁴ Sala A, Bolla M, Zarini S, Müller-Peddinghaus R, Folco G. Release of leukotriene A4 versus leukotriene B4 from human polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem*. 1996; 271: 17944-17948.
- ²⁵ Marcus AJ, Broekman MJ, Safier LB, Ullman HL, Islam N, Sherhan CN, Rutherford LE, Korchak HM, Weissmann G. Formation of leukotrienes and other hydroxy acids during platelet-neutrophil interactions in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 1982 Nov 16; 109(1): 130-7.
- ²⁶ Feinmark SJ. The role of the endothelial cell in leukotriene biosynthesis. *Am Rev Respir Dis*. 1992; 146: S51-S55.
- ²⁷ Sala A, Aliev GM, Rossoni G, Berti F, Buccellati C, Burnstock G, Folco G, Maclouf J. Morphological and functional changes of coronary vasculature caused by transcellular biosynthesis of sulfidopeptide leukotrienes in isolated heart of rabbit. *Blood*. 1996; 87: 1824-1832.

-
- ²⁸ Heavey DJ, Soberman RJ, Lewis RA, Spur B, Austen KF. Critical considerations in the development of an assay for sulfidopeptide leukotrienes in plasma. *Prostaglandins*. 1987 May; 33(5): 693-708.
- ²⁹ Kumlin M, Dahlen SE. Characteristics of formation and further metabolism of leukotrienes in the chopped human lung. *Biochim Biophys Acta*. 1990; 1044(2): 201-210.
- ³⁰ Kumlin M. Measurements of leukotrienes in humans. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: S102-S106.
- ³¹ Rabinovitch N. Urinary leukotriene E4. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2007 Nov; 27(4): 651-64.
- ³² Yokomizo T, Izumi T, Chang K, Takuwa Y, Shimizu T. A G-protein-coupled receptor for leukotriene B4 that mediates chemotaxis. *Nature*. 1997 Jun 5; 387(6633): 620-4.
- ³³ Bäck M. Functional characteristics of cysteinyl-leukotriene receptor subtypes. *Life Sci*. 2002 Jun 28; 71(6): 611-22.
- ³⁴ Bäck M. Leukotriene receptors: crucial components in vascular inflammation. *Scientific World Journal*. 2007 Sep 1; 7: 1422-39.
- ³⁵ Capra V, Thompson MD, Sala A, Cole DE, Folco G, Rovati GE. Cysteinyl-leukotrienes and their receptors in asthma and other inflammatory diseases: critical update and emerging trends. *Med Res Rev*. 2007 Jul; 27(4): 469-527.
- ³⁶ Rovati GE, Capra V. Cysteinyl-leukotriene receptors and cellular signals. *Scientific World Journal*. 2007 Sep 1; 7: 1375-92.
- ³⁷ Yokomizo T, Kato K, Terawaki K, Izumi T, Shimizu T. A second leukotriene B receptor, BLT2. A New therapeutic target in inflammation and immunological disorders. *J Exp Med*. 2000; 192(3): 421-431.
- ³⁸ Tager AM, Luster AD. BLT1 and BLT2: the leukotriene B(4) receptors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2003 Aug-Sep; 69(2-3): 123-34.
- ³⁹ Kanaoka Y, Boyce JA. Cysteinyl leukotrienes and their receptors: cellular distribution and function in immune and inflammatory responses. *J Immunol* 2004; 173: 1503-10.
- ⁴⁰ Hui Y, Funk CD. Cysteinyl leukotriene receptors. *Biochem Pharmacol*. 2002 Dec 1; 64(11): 1549-57.
- ⁴¹ Ciana P, Fumagalli M, Trincavelli ML, Verderio C, Rosa P, Lecca D, Ferrario S, Parravicini C, Capra V, Gelosa P, Guerrini U, Belcredito S, Cimino M, Sironi L, Tremoli E, Rovati GE, Martini C, Abbracchio MP. The orphan receptor GPR17 identified as a new dual uracil nucleotides/cysteinyl-leukotrienes receptor. *EMBO J*. 2006 Oct 4; 25(19): 4615-27.

-
- ⁴² Ohnishi H, Miyahara N, Gelfand EW. The role of leukotriene B(4) in allergic diseases. *Allergol Int*. 2008 Dec; 57(4): 291-8.
- ⁴³ Crooks SW, Stockley RA. Leukotriene B4. *Int J Biochem Cell Biol*. 1998 Feb; 30(2): 173-8.
- ⁴⁴ Steiner DR, Gonzalez NC, Wood JG. Leukotriene B(4) promotes reactive oxidant generation and leukocyte adherence during acute hypoxia. *J Appl Physiol*. 2001 Sep; 91(3): 1160-7.
- ⁴⁵ Lynch KR, O'Neill GP, Liu Q, Im DS, Sawyer N, Metters KM, Coulombe N, Abramovitz M, Figueroa DJ, Zeng Z, Connolly BM, Bai C, Austin CP, Chateauneuf A, Stocco R, Greig GM, Kargman S, Hooks SB, Hosfield E, Williams DL Jr, Ford-Hutchinson AW, Caskey CT, Evans JF. Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor. *Nature*. 1999 Jun 24; 399(6738): 789-93.
- ⁴⁶ O'Byrne PM. Leukotrienes in the pathogenesis of asthma. *Chest*. 1997 Feb; 111(2 Suppl): 27S-34S.
- ⁴⁷ Peters-Golden M. Expanding roles for leukotrienes in airway inflammation. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2008 Jul; 8(4): 367-73.
- ⁴⁸ Mehrotra AK, Henderson WR Jr. The role of leukotrienes in airway remodeling. *Curr Mol Med*. 2009 Apr; 9(3): 383-91.
- ⁴⁹ Allen S, Dashwood M, Morrison K, Yacoub M. Differential leukotriene constrictor responses in human atherosclerotic coronary arteries. *Circulation* 1998; 97: 2406-13.
- ⁵⁰ Hui Y, Cheng Y, Smalera I, Jian W, Goldhahn L, Fitzgerald GA, Funk CD. Directed vascular expression of human cysteinyl leukotriene 2 receptor modulates endothelial permeability and systemic blood pressure. *Circulation*. 2004 Nov 23; 110(21): 3360-6.
- ⁵¹ Zhao L, Moos MP, Gräbner R, Pédrone F, Fan J, Kaiser B, John N, Schmidt S, Spanbroek R, Lötzer K, Huang L, Cui J, Rader DJ, Evans JF, Habenicht AJ, Funk CD. The 5-lipoxygenase pathway promotes pathogenesis of hyperlipidemia-dependent aortic aneurysm. *Nat Med*. 2004 Sep; 10(9): 966-73.
- ⁵² Uzonyi B, Lötzer K, Jahn S, Kramer C, Hildner M, Bretschneider E, Radke D, Beer M, Vollandt R, Evans JF, Funk CD, Habenicht AJ. Cysteinyl leukotriene 2 receptor and protease-activated receptor 1 activate strongly correlated early genes in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Apr 18; 103(16): 6326-31.
- ⁵³ Leff AR. Antileukotriene Working Group. Discovery of leukotrienes and development of antileukotriene agents. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2001 Jun; 86(6 Suppl 1): 4-8.
- ⁵⁴ Riccioni G, Bucciarelli T, Mancini B, Di Ilio C, D'Orazio N. Antileukotriene drugs: clinical application, effectiveness and safety. *Curr Med Chem*. 2007; 14(18): 1966-77.

-
- ⁵⁵ Zeiger RS, Bird SR, Kaplan MS, Schatz M, Pearlman DS, Orav EJ, Hustad CM, Edelman JM. Short-term and long-term asthma control in patients with mild persistent asthma receiving montelukast or fluticasone: a randomized controlled trial. *Am J Med* 2005; 118: 649-657.
- ⁵⁶ Scow DT, Luttermoser GK, Dickerson KS. Leukotriene inhibitors in the treatment of allergy and asthma. *Am Fam Physician*. 2007 Jan 1; 75(1): 65-70.
- ⁵⁷ American Lung Association Asthma Clinical Research Centers, Peters SP, Anthonisen N, Castro M, Holbrook JT, Irvin CG, Smith LJ, Wise RA. Randomized comparison of strategies for reducing treatment in mild persistent asthma. *N Engl J Med* 2007; 356: 2027-39.
- ⁵⁸ Global strategy for asthma management and prevention. Updated 2008. Global Initiative for Asthma (GINA). <http://www.ginasthma.org> (cyt. 28.01.2008).
- ⁵⁹ García-Marcos L, Schuster A, Pérez-Yarza EG. Benefit-risk assessment of antileukotrienes in the management of asthma. *Drug Saf*. 2003; 26(7): 483-518.
- ⁶⁰ Bell RL, Young PR, Albert D, Lanni C, Summers JB, Brooks DW, Rubin P, Carter GW. The discovery and development of zileuton: an orally active 5-lipoxygenase inhibitor. *Int J Immunopharmacol*. 1992 Apr; 14(3): 505-10.
- ⁶¹ McGill KA, Busse WW. Zileuton. *Lancet*. 1996 Aug 24; 348(9026): 519-24.
- ⁶² Wenzel SE, Kamada AK. Zileuton: the first 5-lipoxygenase inhibitor for the treatment of asthma. *Ann Pharmacother*. 1996 Jul-Aug; 30(7-8): 858-64.
- ⁶³ Israel E, Cohn J, Dubé L, Drazen JM. Effect of treatment with zileuton, a 5-lipoxygenase inhibitor, in patients with asthma. A randomized controlled trial. Zileuton Clinical Trial Group. *JAMA*. 1996 Mar 27; 275(12): 931-6.
- ⁶⁴ Liu MC, Dubé LM, Lancaster J. Acute and chronic effects of a 5-lipoxygenase inhibitor in asthma: a 6-month randomized multicenter trial. Zileuton Study Group. *J. Allergy Clin Immunol*. 1996 Nov; 98(5 Pt 1): 859-871.
- ⁶⁵ DuBuske LM, Grossman J, Dubé LM, Swanson LJ, Lancaster JF. Randomized trial of zileuton in patients with moderate asthma: effect of reduced dosing frequency and amounts on pulmonary function and asthma symptoms. Zileuton Study Group. *Am J Manag Care*. 1997 Apr; 3(4): 633-40.
- ⁶⁶ Dahlén B, Nizankowska E, Szczeklik A, Zetterström O, Bochenek G, Kumlin M, Mastalerz L, Pinis G, Swanson LJ, Boodhoo TI, Wright S, Dubé LM, Dahlén SE. Benefits from adding the 5-lipoxygenase inhibitor zileuton to conventional therapy in aspirin-intolerant asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Apr; 157: 1187-1194.
- ⁶⁷ O'Connor BJ, Löfdahl CG, Balter M, Szczeklik A, Boulet LP, Cairns CB. Zileuton added to low-dose inhaled beclomethasone for the treatment of moderate to severe persistent asthma. *Respir Med* 2007; 101: 1088-96.

-
- ⁶⁸ Berger W, De Chandt MT, Cairns CB. Zileuton: clinical implications of 5-Lipoxygenase inhibition in severe airway disease. *Int J Clin Pract*. 2007 Apr; 61(4): 663-76.
- ⁶⁹ Zflo. Drug description (updated on RxList: 9/10/2009). <http://www.rxlist.com/zyflo-drug.htm>.
- ⁷⁰ Dubé LM, Swanson LJ, Awni W. Zileuton, a leukotriene synthesis inhibitor in the management of chronic asthma. *Clinical pharmacokinetics and safety*. *Clin Rev Allergy Immunol*. 1999 Spring-Summer; 17(1-2): 213-21.
- ⁷¹ Prescribing Information for ZYFLO CR. Lexington, MA: Cornerstone Therapeutics, Inc.; May 2007.
- ⁷² Subbarao K, Jala VR, Mathis S, Suttles J, Zacharias W, Ahamed J, Ali H, Tseng MT, Haribabu B. Role of leukotriene B4 receptors in the development of atherosclerosis: potential mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Feb; 24(2): 369-75.
- ⁷³ Heller EA, Liu E, Tager AM, Sinha S, Roberts JD, Koehn SL, Libby P, Aikawa ER, Chen JQ, Huang P, Freeman MW, Moore KJ, Luster AD, Gerszten RE. Inhibition of atherogenesis in BLT1-deficient mice reveals a role for LTB4 and BLT1 in smooth muscle cell recruitment. *Circulation*. 2005 Jul 26; 112(4): 578-86.
- ⁷⁴ Jawień J. The putative role of leukotrienes in experimental atherogenesis. *Pol Arch Med Wewn*. 2009 Jan-Feb; 119(1-2): 90-3.
- ⁷⁵ Aiello RJ, Bourassa PA, Lindsey S, Weng W, Freeman A, Showell HJ. Leukotriene B4 receptor antagonism reduces monocytic foam cells in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 443-449.
- ⁷⁶ Bäck M, Bu DX, Bränström R, Sheikine Y, Yan ZQ, Hansson GK. Leukotriene B4 signaling through NF-kappaB-dependent BLT1 receptors on vascular smooth muscle cells in atherosclerosis and intimal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Nov 29; 102(48): 17501-6.
- ⁷⁷ Cipollone F, Mezzetti A, Fazia ML, Cuccurullo C, Iezzi A, Uccchino S, Spigonardo F, Bucci M, Cuccurullo F, Prescott SM, Stafforini DM. Association between 5-lipoxygenase expression and plaque instability in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Aug; 25(8): 1665-70.
- ⁷⁸ Qiu H, Gabrielsen A, Agardh HE, Wan M, Wetterholm A, Wong CH, Hedin U, Swedenborg J, Hansson GK, Samuelsson B, Paulsson-Berne G, Haeggström JZ. Expression of 5-lipoxygenase and leukotriene A4 hydrolase in human atherosclerotic lesions correlates with symptoms of plaque instability. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 8161-8166.
- ⁷⁹ Radmark O, Samuelsson B. 5-lipoxygenase: regulation and possible involvement in atherosclerosis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2007;83: 162-174.

-
- ⁸⁰ Carry M, Korley V, Willerson JT, Weigelt L, Ford-Hutchinson AW, Tagari P. Increased urinary leukotriene excretion in patients with cardiac ischaemia. In vivo evidence for 5-lipoxygenase activation. *Circulation* 1992; 85: 230-236.
- ⁸¹ Sampson AP. Leukotrienes in cardiovascular disease. *Clin Exp Allergy Reviews*. 2001; 1: 170-174.
- ⁸² Szczeklik A, Nizankowska E, Mastalerz L, Bochenek G. Myocardial ischemia possibly mediated by cysteinyl leukotrienes. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: 572-73.
- ⁸³ Rzeszutko M, Karczmarek P, Nowakowski T, Szuldrzyński K, Mika P, Dropiński J, Brzostek T, Szczeklik A. Percutaneous coronary intervention is associated with overproduction of cysteinyl leukotrienes. *Eur Heart J* 2006; 27 Abstract Suppl. 227.
- ⁸⁴ Allen SP, Sampson AP, Piper PJ, Chester AH, Ohri SK, Yacoub MH. Enhanced excretion of urinary leukotriene E4 in coronary artery disease and after coronary artery bypass surgery. *Coron Artery Dis* 1993; 4: 899-904.
- ⁸⁵ Shah S, Hauser E, Crosslin D, Wang L, Haynes C, Connelly J, Nelson S, Johnson J, Gadson S, Nelson C. ALOX5AP variants are associated with in-stent restenosis after percutaneous coronary intervention. *Atherosclerosis* 2008, Volume 201 (1): 148-154.
- ⁸⁶ Hlawaty H, Jacob MP, Louedec L, Letourneur D, Brink C, Michel JB, Feldman L, Bäck M. Leukotriene receptor antagonism and the prevention of extracellular matrix degradation during atherosclerosis and in-stent stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 Apr; 29(4): 518-24.
- ⁸⁷ Helgadóttir A, Manolescu A, Thorleifsson G, Gretarsdóttir S, Jonsdóttir H, Thorsteinsdóttir U, Samani NJ, Gudmundsson G, Grant SF, Thorgeirsson G, Sveinbjornsdóttir S, Valdimarsson EM, Matthiasson SE, Johannsson H, Gudmundsdóttir O, Gurney ME, Sainz J, Thorhallsdóttir M, Andresdóttir M, Frigge ML, Topol EJ, Kong A, Gudnason V, Hakonarson H, Gulcher JR, Stefansson K. The gene encoding 5-lipoxygenase activating protein confers risk of myocardial infarction and stroke. *Nat Genet* 2004; 36: 233-239.
- ⁸⁸ Helgadóttir A, Manolescu A, Helgason A, Thorleifsson G, Thorsteinsdóttir U, Gudbjartsson DF, Gretarsdóttir S, Magnusson KP, Gudmundsson G, Hicks A, Jonsson T, Grant SF, Sainz J, O'Brien SJ, Sveinbjornsdóttir S, Valdimarsson EM, Matthiasson SE, Levey AI, Abramson JL, Reilly MP, Vaccarino V, Wolfe ML, Gudnason V, Quyyumi AA, Topol EJ, Rader DJ, Thorgeirsson G, Gulcher JR, Hakonarson H, Kong A, Stefansson K. A variant of gene encoding leukotriene A4 hydrolase confers ethnicity-specific risk of myocardial infarction. *Nat Genet* 2006; 38: 68-74.
- ⁸⁹ Kajimoto K, Shioji K, Ishida C, Iwanaga Y, Kokubo Y, Tomoike H, Miyazaki S, Nonogi H, Goto Y, Iwai N. Validation of the association between the gene encoding 5-lipoxygenase-activating protein and myocardial infarction in a Japanese population. *Circ J* 2005; 69: 1029-1034.

-
- ⁹⁰ Hakonarson H, Thorvaldsson S, Helgadóttir A, Gudbjartsson D, Zink F, Andresdóttir M, Manolescu A, Arnar DO, Andersen K, Sigurdsson A, Thorgeirsson G, Jonsson A, Agnarsson U, Bjornsdóttir H, Gottskalksson G, Einarsson A, Gudmundsdóttir H, Adalsteinsdóttir AE, Gudmundsson K, Kristjansson K, Hardarson T, Kristinsson A, Topol EJ, Gulcher J, Kong A, Gurney M, Thorgeirsson G, Stefansson K. Effects of a 5-lipoxygenase-activating protein inhibitor on biomarkers associated with risk of myocardial infarction: a randomized trial. *JAMA* 2005; 293: 2245-2256.
- ⁹¹ Dwyer JH, Navab M, Dwyer KM, Hassan K, Sun P, Shircore A, Hama-Levy S, Hough G, Wang X, Drake T, Merz CN, Fogelman AM. Oxygenated carotenoid lutein and progression of early atherosclerosis: the Los Angeles Atherosclerosis Study. *Circulation* 2001; 103: 2922-2927.
- ⁹² Dwyer JH, Allayee H, Dwyer KM, Fan J, Wu H, Mar R, Lusis AJ, Mehrabian M. Arachidonate 5-lipoxygenase promoter genotype, dietary arachidonic acid and atherosclerosis. *N Eng J Med* 2004; 350: 29-37.
- ⁹³ Sanak M, Simon HU, Szczeklik A. Leukotriene C4 synthase promoter polymorphism and risk of aspirin-induced asthma. *Lancet* 1997 Nov 29;350(9091):1599-600.
- ⁹⁴ Iovannisci DM, Lammer EJ, Steiner L, Cheng S, Mahoney LT, Davis PH, Lauer RM, Burns TL. Association between a leukotriene C4 synthase gene promoter polymorphism and coronary artery calcium in young women: the Muscatine Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 394-399.
- ⁹⁵ Jawień J, Gajda M, Rudling M, Mateuszuk L, Olszanecki R, Guzik TJ, Cichocki T, Chlopicki S, Korbut R. Inhibition of five lipoxygenase activating protein (FLAP) by MK-886 decreases atherosclerosis in apoE/LDLR-double knockout mice. *Eur J Clin Invest*. 2006; 36: 141-146.
- ⁹⁶ Jawień J, Gajda M, Olszanecki R, Korbut R. BAYx1005 attenuates atherosclerosis in apoE/LDLR – double knockout mice. *J Physiol Pharmacol*. 2007; 58: 583-538.
- ⁹⁷ Jawień J, Gajda M, Wołkow P, Zurańska J, Olszanecki R, Korbut R. The effect of montelukast on atherogenesis in apoE/LDLR – double knockout mice. *J Physiol Pharmacol*. 2008; 59: 633-639.
- ⁹⁸ Capra V, Ambrosio M, Riccioni G, Rovati GE. Cysteinyl-leukotriene receptor antagonists: present situation and future opportunities. *Curr Med Chem*. 2006; 13(26): 3213-26.
- ⁹⁹ Riccioni G, Capra V, D'Orazio N, Bucciarelli T, Bazzano LA. Leukotriene modifiers in the treatment of cardiovascular diseases. *J Leukoc Biol*. 2008 Dec; 84(6): 1374-8.
- ¹⁰⁰ Bäck M. Inhibitors of the 5-lipoxygenase pathway in atherosclerosis. *Curr Pharm Des*. 2009; 15(27): 3116-32.
- ¹⁰¹ Rossoni G, Sala A, Berti F, Testa T, Buccellati C, Molta C, Muller-Peddinghaus R, Maclouf J, Folco GC. Myocardial protection by the leukotriene synthesis inhibitor

BAYx1005: importance of transcellular biosynthesis of cysteinyl-leukotrienes. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 276: 335-341.

¹⁰² Guidelines on the management of stable angina pectoris: executive summary: the Task Force on the Management of Stable Angina Pectoris of the European Society of Cardiology. *European Heart Journal* 2006; 27, 1341–1381.

¹⁰³ ACC/AHA/ESC 2006. Guidelines for the management of patients with atrial fibrillation — executive summary. *Eur Heart J.* 2006; 27: 1979–2030.

¹⁰⁴ Lelakowski J. Pharmacologic treatment of atrial fibrillation. *Pol Merkur Lekarski.* 2008 Oct; 25(148): 303-8.

¹⁰⁵ Rewiuk K, Grodzicki T. Migotanie przedsionków jako problem ludzi starszych. *Kardiologia Pol* 2009; 67 (Supl.4): 149-156.

¹⁰⁶ Sanak M, Bochenek G, Faber J, Plutecka H, Szczeklik A. Elevated urinary leukotriene E(4) excretion in asthma: a comparison of HPLC-mass spectrometry and ELISA. *Allergy.* 2009 Oct 12.

¹⁰⁷ Libby Z, Braunwald B. Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine, 7th Edition. 2005.

¹⁰⁸ Kucha M. Leki beta-adrenolityczne w przewlekłej niewydolności serca. *Via Medica* 2006.

¹⁰⁹ Gieca L. Choroba niedokrwienności serca. PZWL 1996.

¹¹⁰ Rzeszutko M, Tuleja E, Kaczmarek P, Sokołowska B, Nowakowski T, Kowalski R, Mika P, Szułdrzyński K, Dropiński J, Brzostek T, Szczeklik A. Increased urinary leukotriene E4 excretion before PCI is a risk factor of future cardiovascular events during in-hospital observation but not in long-term follow-up. *Kardiologia Polska* 2007; 65: 8 (supl.3) P081.

¹¹¹ Takase B, Kurita A, Maruyama T, Uehata A, Nishioka T, Mizuno K, Nakamura H, Katsura K, Kanda Y. Change of plasma leukotriene C4 during myocardial ischemia in humans. *Clin Cardiol.* 1996 Mar; 19(3): 198-204.

¹¹² Brezinski DA, Nesto RW, Serhan CN. Angioplasty triggers intracoronary leukotrienes and lipoxin A4. Impact of aspirin therapy. *Circulation* 1992; 86: 56-63.

¹¹³ Rosolowsky M, Falck JR, Willerson JT, Campbell WB. Synthesis of lipoxygenase and epoxygenase products of arachidonic acid by normal and stenosed canine coronary arteries. *Circ Res.* 1990 Mar; 66(3): 608-21.

¹¹⁴ Georgakis A, Ener RA, Jin J, Kunapuli S, Fiss D, Leech SH, Wolf NM, Van Decker WA. Risk of thrombogenicity among nonionic radiocontrast agents. *J Invasive Cardiol.* 2008 Jul; 20(7): 349-53.

-
- ¹¹⁵ Albanese JR, Venditto JA, Patel GC, Ambrose JA. Effects of ionic and nonionic contrast media on in vitro and in vivo platelet activation. *Am J Cardiol*. 1995 Nov 15; 76(14): 1059-63.
- ¹¹⁶ Folco G, Murphy RC. Eicosanoid transcellular biosynthesis: from cell-cell interactions to in vivo tissue responses. *Pharmacol Rev* 2006; 58: 375-388.
- ¹¹⁷ Dubé LM, Swanson LJ, Awni W. Zileuton, a leukotriene synthesis inhibitor in the management of chronic asthma. Clinical pharmacokinetics and safety. *Clin Rev Allergy Immunol*. 1999 Spring-Summer; 17(1-2): 213-21.
- ¹¹⁸ Jiang W, Hall SR, Moos MPW, Cao RY, Ishii S, Ogunyankin KO. Endothelial cysteinyl leukotriene 2 receptor expression mediates myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Pathol* 2008; 172: 592-602.
- ¹¹⁹ Hahn RA, MacDonald BR, Simpson PJ, Potts BD, Parli CJ. Antagonism of leukotriene B4 receptors does not limit canine myocardial infarct size. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 253: 58-66.
- ¹²⁰ Cooper DR, Kelliher GJ, Kowey PR. Modulation of arachidonic acid metabolites and vulnerability to ventricular fibrillation during myocardial ischemia in the cat. *Am Heart J*. 1988 Nov; 116(5 Pt 1): 1194-200.
- ¹²¹ Kuzuya T, Hoshida S, Suzuki K, Sasaki T, Kitabatake A, Kamada T, Minamino T, Tada M. Polymorphonuclear leukocyte activity and ventricular arrhythmia in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 1988 Nov 1; 62(13): 868-72.
- ¹²² Chang AC, Dai S, Ogle CW, Tom WM. Role of peptido-leukotrienes in the genesis of early ventricular arrhythmias during acute myocardial ischaemia in rats. *Agents Actions*. 1992 Mar; 35(3-4): 212-9.
- ¹²³ Gök S, Ulker S, Evinç A. Possible contribution of leukotrienes in the arrhythmogenic effects of digoxin on isolated guinea-pig hearts. *Pharmacology*. 1998 Nov; 57(5): 279-84.
- ¹²⁴ Kanzik I, Cakici I, Ersoy S, Ark M, Abacioglu N, Zengil H. Effects of cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors on digoxin-induced arrhythmias and haemodynamics in guinea-pigs. *Pharmacol Res*. 1992 Oct-Nov; 26(3): 305-16.
- ¹²⁵ Gök S, Banoaglu N. Effects of a leukotriene D4 receptor antagonist, L-648,051, and a dual inhibitor lipoxygenase and cyclooxygenase, BW-755C, on digoxin-induced arrhythmias in guinea-pigs. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1993 Jan-Feb; 321: 72-80.
- ¹²⁶ Vigorito C, Giordano A, Cirillo R, Genovese A, Rengo F, Marone G. Metabolic and hemodynamic effects of peptide leukotriene C4 and D4 in man. *Int J Clin Lab Res*. 1997; 27(3): 178-84.

-
- ¹²⁷ Dąbrowska B, Dąbrowski A, Piotrowicz R. Elektrokardiografia holterowska. Wydawnictwo Via Medica. Gdańsk 2004. Wydanie I. str. 178-226.
- ¹²⁸ Dąbrowska B, Dąbrowski A. Podręcznik elektrokardiografii. Wydanie V uaktualnione. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2007. str. 86-88.
- ¹²⁹ Kleiger RE, Miller JP, Bigger JT Jr, Moss AJ. Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 1987 Feb 1; 59(4): 256-62.
- ¹³⁰ Bigger JT Jr, Fleiss JL, Steinman RC, Rolnitzky LM, Kleiger RE, Rottman JN. Frequency domain measures of heart period variability and mortality after myocardial infarction. *Circulation.* 1992 Jan; 85(1): 164-71.
- ¹³¹ Malik M. Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *Eur Heart J* 1996; 17: 354-81.
- ¹³² Huikuri HV, Niemelä MJ, Ojala S, Rantala A, Ikäheimo MJ, Airaksinen KE. Circadian rhythms of frequency domain measures of heart rate variability in healthy subjects and patients with coronary artery disease. Effects of arousal and upright posture. *Circulation.* 1994 Jul; 90(1): 121-6.
- ¹³³ Goseki Y, Matsubara T, Takahashi N, Takeuchi T, Ibukiyama C. Heart rate variability before the occurrence of silent myocardial ischemia during ambulatory monitoring. *Am J Cardiol.* 1994 May 1; 73(12): 845-9.
- ¹³⁴ Bigger JT Jr, Hoover CA, Steinman RC, Rolnitzky LM, Fleiss JL. Autonomic nervous system activity during myocardial ischemia in man estimated by power spectral analysis of heart period variability. The Multicenter Study of Silent Myocardial Ischemia Investigators. *Am J Cardiol.* 1990 Aug 15; 66(4): 497-8.
- ¹³⁵ Kop WJ, Verdino RJ, Gottdiener JS, O'Leary ST, Bairey Merz CN, Krantz DS. Changes in heart rate and heart rate variability before ambulatory ischemic events(1). *J Am Coll Cardiol.* 2001 Sep; 38(3): 742-9.
- ¹³⁶ Manfrini O, Morgagni G, Pizzi C, Fontana F, Bugiardini R. Changes in autonomic nervous system activity: spontaneous versus balloon-induced myocardial ischaemia. *Eur Heart J.* 2004 Sep; 25(17): 1502-8.
- ¹³⁷ Szwoch M, Ambroch-Dorniak K, Sominka D, Dorniak W, Daniłowicz-Szymanowicz L, Krassowski W, Raczak G. Comparison the effects of recanalisation of chronic total occlusion of the right and left coronary arteries on the autonomic nervous system function. *Kardiologia Polska.* 2009 May; 67(5): 467-74.
- ¹³⁸ Janowska-Kulińska A, Torzyńska K, Markiewicz-Grochowalska A, Sowińska A, Majewski M, Jerzykowska O, Pawlak-Buś K, Kramer L, Moczko J, Siminiak T. Changes in

heart rate variability caused by coronary angioplasty depend on the localisation of coronary lesions. *Kardiol Pol.* 2009 Feb; 67(2): 130-8.

¹³⁹ Keeley EC, Lisowsky BS, O'Neill WW, Maddens ME. Influence of Balloon Angioplasty on Heart Rate Variability in Patients with Coronary Artery Disease. *J Interv Cardiol* 1999; 12: 219-224.

¹⁴⁰ Miller D, Lohse J, Wolf G. Slow response induced in canine Purkinje fiber by contrast medium. *Invest Radiol.* 1976 Nov-Dec; 11(6): 577-87.

¹⁴¹ Kern MJ. Selection of radiocontrast media in cardiac catheterization: comparative physiology and clinical effects of nonionic monomeric and ionic dimeric formulations. *Am Heart J.* 1991 Jul; 122(1 Pt 1): 195-201.

¹⁴² Maytin O, Castillo C, Castellanos A Jr. The genesis of QRS changes produced by selective coronary arteriography. *Circulation.* 1970 Feb; 41(2): 247-55.

¹⁴³ Schröder R, Kaltenbach M, Kober G. Coronary arteriography with iotrolan 280, a blood-isotonic, nonionic, dimeric contrast medium: preliminary clinical results. *Fortschr Geb Rontgenstrahlen Nuklearmed Ergänzungsbd.* 1989; 128: 77-80.

¹⁴⁴ Mitsumori M, Hayakawa K, Soga T, Maeda M, Torizuka T, Okuno Y, Misaki T, Dokoh S. Effects of contrast media on the RR and QT interval during coronary arteriography. *Acta Radiol.* 1991 Mar; 32(2): 120-3.

¹⁴⁵ Kyriakidis M, Jackson G, Jewitt D. Contrast media during coronary arteriography: electrocardiographic changes in the presence of normal coronary arteries. *Br J Radiol.* 1978 Oct;51(610): 799-801.

¹⁴⁶ Sullivan ID, Wainwright RJ, Reidy JF, Sowton E. Comparative trial of iohexol 350, a non-ionic contrast medium, with diatrizoate (Urografin 370) in left ventriculography and coronary arteriography. *Br Heart J.* 1984 Jun; 51(6): 643-7.