

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Wydział Lekarski



Katarzyna Sztormowska-Achranowicz

**WPLYW L-ARGININY I NIKOTYNAMIDU
NA UKŁAD SERCOWO-NACZYNIOWY W DOŚWIADCZALNIE
INDUKOWANYM
TĘTNICZYM NADCIŚNIENIU PŁUCNYM**

Rozprawa doktorska

Promotor

Prof. dr hab. med. Ivan Kocić

**Praca wykonana w Katedrze i Zakładzie Farmakologii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego**

**Kierownik Katedry i Zakładu
Prof. dr hab. med. Ivan Kocić**

**Praca naukowo-badawcza finansowana ze środków MNiSW
Nr projektu: 01-0003/08**

GDAŃSK, 2017

Serdecznie dziękuję:

Promotorowi

Panu Profesorowi dr hab. n. med. Ivanowi Kocićowi

*Za wskazanie tematu, cenne wskazówki i uwagi
podczas realizacji pracy*

Panu dr hab. n. med. Zbigniewowi Jankowskiemu
*Kierownikowi Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej
oraz Pracowni Histopatologicznej Medycyny Sądowej
Za współpracę i umożliwienie wykonania oceny
histopatologicznej i morfometrycznej*

Pani dr hab. n. med. Ewie Słomińskiej
*oraz Zespołowi Katedry i Zakładu Biochemii
Za umożliwienie wykonania badań biochemicznych*

Koleżankom i Kolegom z Katedry i Zakładu Farmakologii
*Za cenne rady oraz wspaniałą atmosferę
podczas wykonywania doświadczeń*

Szczególne podziękowania składam

Moim Najbliższym

Za cierpliwość, wyrozumienie i nieustanne wsparcie

SPIS TREŚCI

| | |
|--|------------|
| 1. WSTĘP | 5 |
| 1.1. Tętnicze nadciśnienie płucne | 5 |
| 1.2. Mechanizmy patofizjologiczne, leczenie oraz charakterystyka prawej komory serca w tętnicznym nadciśnieniu płucnym | 11 |
| 1.2.1. Mechanizmy patofizjologiczne | 11 |
| 1.2.2. Leczenie | 20 |
| 1.2.3. Prawa komora serca | 23 |
| 1.3. Charakterystyka wybranych związków | 26 |
| 1.3.1. L-Arginina | 26 |
| 1.3.2. Nikotynamid | 28 |
| 2. CEL PRACY | 31 |
| 3. MATERIAŁ I METODY | 32 |
| 3.1. Materiał | 32 |
| 3.1.1. Zwierzęta doświadczalne | 32 |
| 3.1.2. Diety | 33 |
| 3.1.3. Indukcja tętniczego nadciśnienia płucnego | 33 |
| 3.1.4. Protokół doświadczalny | 34 |
| 3.2. Metody | 35 |
| 3.2.1. Pomiar kurczliwości mięśnia brodawkowatego | 35 |
| 3.2.2. Badanie wpływu aminy sympatomimetycznej na kurczliwość mięśnia brodawkowatego | 36 |
| 3.2.3. Procedura histopatologiczna oraz pomiar morfometryczny tętnic płucnych | 37 |
| 3.2.4. Pomiar masy ciała i serca | 38 |
| 3.2.5. Pomiar stężenia nikotynamidu w osoczu | 39 |
| 3.3. Substancje wykorzystane w doświadczeniu | 40 |
| 3.4. Analiza statystyczna | 40 |
| 4. WYNIKI | 41 |
| 5. DYSKUSJA | 92 |
| 6. WNIOSKI | 107 |
| 7. STRESZCZENIE | 108 |
| 8. SUMMARY | 111 |
| 9. PIŚMIENNICTWO | 114 |
| 10. ZAŁĄCZNIK | 138 |

Wykaz ważniejszych skrótów:

| | |
|----------------------|---|
| PAH | - tętnicze nadciśnienie płucne |
| PH | - nadciśnienie płucne |
| PAPm | - średnie ciśnienie w tętnicy płucnej |
| PVR | - naczyniowy opór płucny |
| PAWP | - ciśnienie zaklinowania w tętnicy płucnej |
| RV | - prawa komora serca |
| RVH | - przerost prawej komory serca |
| RHC | - cewnikowanie prawego serca |
| WHO-FC | - klasa czynnościowa wg Światowej Organizacji Zdrowia |
| ECs | - śródbłonek mięśni gładkich naczyń |
| PASMCs | - mięśnie gładkie naczyń krwionośnych płuc |
| NO | - tlenek azotu |
| AECA | - przeciwciała skierowane przeciwko komórkom śródbłonka |
| ANP | - przedsionkowy peptyd natriuretyczny |
| BNP | - peptyd natriuretyczny typu B; mózgowy peptyd natriuretyczny |
| MAPK | - kinaza białkowa aktywowana mitogenami |
| MLCK | - kinazy łańcucha lekkiego miozyny |
| L-Arg / L-ARG | - L-arginina |
| NCA / NA | - nikotynamid |
| NRC | - <i>National Research Council USA</i> ; Rada Badań Naukowych, Stany Zjednoczone Ameryki |
| MCT | - monokrotalina |
| NOR | - noradrenalina |
| Fc | - siła skurczu |
| (+) dF/dt | - szybkość skurczu |
| (-) dF/dt | - szybkość rozkurczu |
| mN | - jednostka siły (1g = 10mN) |

1. WSTĘP

1.1. Tętnicze nadciśnienie płucne (PAH)

Nadciśnienie płucne (ang. *pulmonary hypertension*, PH), to stan patofizjologiczny oraz hemodynamiczny wpływający na pracę mięśnia sercowego i krążenia płucnego. Jednocześnie to zróżnicowana jednostka chorobowa, która może obejmować stany kliniczne i/lub może stanowić powikłania dotyczące chorób sercowo-naczyniowych i chorób związanych z układem oddechowym [98].

Zgodnie z aktualnymi wytycznymi Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego (ESC) oraz Europejskiego Towarzystwa Oddechowego (ERS) w odniesieniu do diagnostyki i leczenia, nadciśnienie płucne (PH) definiuje się, jako stopniowy, postępujący wzrost średniego ciśnienia w tętnicy płucnej (PAPm) ≥ 25 mmHg w spoczynku lub ≥ 30 mmHg w czasie wysiłku [94] oznaczony metodą cewnikowania tętnicy płucnej. Opublikowane normy wskazują, iż prawidłowy PAPm wynosi 14 ± 3 mmHg w spoczynku oraz 20 mmHg, jako górna granica normy [94, 158].

Z powodu szerokiego spektrum niejednorodności schorzenia na podstawie parametrów klinicznych, hemodynamicznych, patofizjologicznych, histologicznych oraz procedur terapeutycznych opracowano system klasyfikacji stanów chorobowych nadciśnienia płucnego [279]. Od 2015 roku obowiązuje kompleksowa kliniczna klasyfikacja nadciśnienia płucnego, która jest uaktualnioną wersją utworzoną podczas sympozjum z Dana Point w Kalifornii z 2008 roku [281, 338]. Przedstawia pięć głównych grup klinicznych z uwzględnieniem podgrupy związanej z występowaniem przetrwałego PH u noworodków [94, 280]. Grupa 1, obejmuje różne pierwotne stany chorobowe określane mianem tętniczego nadciśnienia płucnego (PAH). Pozostałe grupy zaliczamy do tak zwanego wtórnego nadciśnienia płucnego, jako odpowiedź na: choroby związane z niedrożnością żył wewnątrz płuc (żylne nadciśnienie płucne) lub niewydolnością lewej komory serca współzależnej z między innymi dysfunkcją zastawki mitralnej (Grupa 2; najczęściej występująca około 78% przypadków z całego PH) [316]; w następstwie chorób płuc i / lub hipoksemii (Grupa 3); w konsekwencji mechanizmów związanych z przewlekłą zakrzepowo-zatorową niedrożnością proksymalnych tętnic płucnych (Grupa 4) oraz w przebiegu chorób o niewyjaśnionym i/lub wieloczynnikowym patomechanizmie (np. sarkoidoza, nowotwory) powodującym zmiany w ścianie naczyń płucnych (Grupa 5) [94, 121, 256]. Ponadto występują dodatkowe systemy

klasyfikacyjne wykorzystywane przy diagnostyce nadciśnienia płucnego. Wyróżniamy między innymi: ocenę cech histopatologicznych w obrazie mikroskopowym naczyń płucnych [114, 207, 235, 236], ocenę PH z patofizjologicznego punktu widzenia [238, 308] oraz podział nadciśnienia płucnego według ciśnienia zaklinowania w tętnicy płucnej [97, 103, 316].

Potencjalnie z powodu wieloczynnikowego charakteru schorzenia najbardziej nietypową grupą wśród PH jest stan kliniczny określany, jako tętnicze nadciśnienie płucne (ang. *pulmonary arterial hypertension*, PAH). To grupa rzadkich patologii (4,2% wszystkich przypadków z PH) [95] z przedwłośniczkowym PH, którą definiuje się wartością PAPm ≥ 25 mmHg oraz podwyższonym naczyniowym oporem płucny (PVP > 3 jednostek Wooda) jednocześnie przy prawidłowym ciśnieniu na końcu krążenia płucnego tzw. ciśnienie zaklinowania w tętnicy płucnej (PAWP) ≤ 15 mmHg [193].

Opierając się na wspólnych parametrach patofizjologicznych, histologicznych i terapeutycznych [292] w PAH wyróżnia się postacie: idiopatyczne (IPAH) nazywane samoistnym lub pierwotnym nadciśnieniem płucnym (ang. *primary pulmonary hypertension*, PPH), który stanowi około od 40 do 46% wszystkich przypadków z PAH w tym od 10 do 25% przypadków związanych z dziedziczeniem genu *BMPR2* [98, 179, 281]; „dziedziczne” PAH (ang. *heritable pulmonary arterial hypertension*, HPAH); nadciśnienie tętnicze płucne w wyniku ekspozycji na leki (około 10% przypadków) takie jak: leki hamujące łaknienie oraz stosowane w leczeniu otyłości (aminoreks, fenfluramina, deksfenfluramina), dasatinib, kokaina, chemioterapeutyki, ziele dziurawca, pergol, fenylopropanolamina, selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny, amfetamina, metamfetamina, L-tryptofan oraz toksyny np. toksyczny olej rzepakowy [274] lub PAH w następstwie napromieniowania; związane z przebiegiem wybranych chorób - nabyte, między innymi choroby tkanki łącznej (od 15 do 25% w tym od 7 do 12% związane z twardziną układową) [212] lub zakażenia wirusem HIV (od 0,46 do 4%) [19, 286]; podgrupę 1' tętniczego nadciśnienia płucnego w przebiegu choroby zarostowej żył płucnych i/lub hemangiomatozy naczyń włosowatych płuc (od 0,1 do 0,4%); oraz podgrupę 1'', jako przetrwałe nadciśnienie płucne u noworodków ($< 0,01\%$) [94, 130, 191].

W ciągu ostatnich trzydziestu lat epidemiologia tętniczego nadciśnienia płucnego często ewoluowała i głównie opierała się na rejestrach Narodowego Instytutu Zdrowia (ang. *National Institutes of Health*, NIH) z 1981 roku. Obecnie istnieje sześć głównych międzynarodowych ośrodków rejestrujących występowanie PAH, między innymi

amerykański rejestr REVEAL (ang. *U.S. The Registry to Evaluate Early and Long-Term PAH Disease Management*) [192]. Częstość występowania tętniczego nadciśnienia płucnego to 6,6 do 52 osób/milion danej populacji. Jednak jak wykazał Strange i wsp. występowanie PAH wykazuje zdecydowanie wyższe wartości i może wynosić nawet 151 przypadków/mln [294]. Zachorowalność PAH według różnych rejestrów epidemiologicznych to średnio od 1,1 do 10 przypadków/mln/rok [87, 130, 175, 229]. W Polsce pacjentów z PAH rejestruje się na podstawie ankiet z 23 krajowych ośrodków referencyjnych dla dorosłych i 9 ośrodków pediatrycznych. Obecnie w Polsce liczba pacjentów z PAH wynosi dla dorosłych 753 oraz dla dzieci 113 przypadków. Natomiast częstość występowania oraz zapadalność stwierdzono odpowiednio: u 24,1 osób/ milion oraz u 4,6 przypadków/mln/rok. Śmiertelność wśród pacjentów wynosi 6,3% /rok [161].

Wyżej wymienione rozpiętości między występowaniem PAH w skali globalnej mogą wiązać się między innymi z trudnością diagnozowania symptomów w początkowej fazie choroby (I lub II klasa wg WHO-FC). Rozpoznanie często stawia się po 2,5 roku do około 3 lat od wystąpienia pierwszych objawów, kiedy chory często jest już w III lub IV klasie czynnościowej wg WHO (70-80% przypadków), gdy rokowania są już złe [14, 138]. Podczas badań klinicznych przeprowadzonych przez D'Alonzo i wsp. wykazano, że średni czas przeżycia chorego od chwili rozpoznania, ale bez odpowiedniej terapii celowanej wynosi 2,8 roku [60, 294]. Na podstawie rejestrów NIH dowiedziono, że wśród chorych od momentu zdiagnozowania PAH i podjęcia leczenia konwencjonalnego (doustne antykoagulanty, digoksyna, leki moczopędne, tlen) średni czas przeżycia w 1, 3, 5 oraz 7 roku wynosi 68,2%, 46,9%, 35,6% oraz 32,0% odpowiednio [138, 253]. Dzięki włączeniu swoistej i właściwej farmakoterapii przeżycie w 1, 3, 5 oraz 7 roku dla chorych z PAH ulega poprawie i wynosi odpowiednio 90,5%, 74,5%, 65,5% oraz 58,9% [28, 101, 145].

Rozpoznanie PAH jest procesem skomplikowanym i wieloetapowym. Wymaga zastosowania różnych metod oraz algorytmów diagnostycznych w celu zaklasyfikowania do danej grupy klinicznej oraz oceny zaburzeń na poziomie hemodynamicznym i czynnościowym. Ważnym elementem oceny PAH są symptomy podmiotowe, które charakteryzują się niespecyficznym, indywidualnym i niejednakowym nasileniem objawów takich jak: postępująca duszność i zmniejszona codzienna aktywność fizyczna, powtarzające się oziębienie kończyn, sinica warg, uszu, nosa, palców u rąk i nóg. W momencie zaostrzenia choroby może pojawić się tachykardia, objawy astmy, zawroty głowy, omdlenia [167]. Dodatkowo przy uwzględnieniu między innymi czynników

ryzyka i predyspozycji rodzinnych istotne są objawy choroby (obrzęk obwodowy brzucha oraz kończyn dolnych), które potwierdzają niewydolności prawej komory serca. Dlatego w celu oceny klinicznej zaawansowania choroby, obserwacji, wyborze leczenia oraz przeżywalności pacjenta, Nowojorskie Towarzystwo Kardiologiczne (ang. *New York Heart Association*, NYHA) utworzyło klasyfikację funkcjonalną zmodyfikowaną przez Światową Organizację Zdrowia (ang. *World Health Organization*, WHO) (WHO-FC; Klasy od *I* do *IV*) [20, 21, 29, 54, 92, 196, 189, 220, 257]. Opiera się ona na stopniu progresji choroby w zakresie natężenia aktywności fizycznej mogącej powodować wystąpienie objawów klinicznych, takich jak: zwiększona duszność, nadmierne zmęczenie, ból w klatce piersiowej lub odczucie zbliżającego się omdlenia [190]. Klasyfikacja WHO-FC może być rozszerzona o metodę sprawdzającą wydolność wysiłkową, którą ocenia się za pomocą testu 6-minutowego marszu (ang. *6-minute walking test*, 6MWT) uzupełniony dodatkowo sercowo-płucnym testem wysiłkowym (ang. *cardiopulmonary exercise testing*, CPET). Postępowanie diagnostyczne PAH ma również na celu wykluczenie pozostałych grup klinicznych nadciśnienia płucnego. Przykładem metody diagnostycznej wykluczającej z wyboru jest scyntygrafia wentylacyjno-perfuzyjna płuc, w której wynik wykazujący istotne nieprawidłowości w skanie perfuzji płuc sugeruje przewlekłe zakrzepowo-zatorowe PH (Grupa 4) [313, 342].

Początkowym, nieinwazyjnym i powtarzalnym badaniem w PAH jest elektrokardiogram (EKG) oraz radiogram klatki piersiowej (RTG). Oba badania mogą sugerować przerost prawej komory i powiększenie prawego przedsionka. Dodatkowo EKG obrazuje nadkomorowe zaburzenia rytmu serca np. trzepotanie przedsionków. RTG opisuje rozszerzenie pnia i głównych naczyń płucnych, co może pomóc ustalić obecność i przyczynę PAH oraz zasugerować nadciśnienie płucne związane z innym zaburzeniem np. w przebiegu chorób płuc [190]. Jednak obie procedury obarczone są zbyt małą czułością i specyficznością i nie nadają się do badań typowo przesiewowych [317]. Podstawowym, nieinwazyjnym badaniem diagnostycznym w PAH jest echokardiografia, która umożliwia ocenę morfologiczną, czynnościową oraz hemodynamiczną prawego serca między innymi poprzez szacowanie ciśnienia skurczowego prawej komory i tętnic płucnych za pomocą gradientu niedomykalności zastawki trójdzielnej i ciśnienia w prawym przedsionku [35, 124]. W diagnostyce PAH „złotym standardem” stanowi w dalszym ciągu inwazyjne cewnikowanie prawej komory serca (ang. *right heart catheterization*, RHC) i bezpośredni pomiar ciśnienia w tętnicy płucnej. To niezbędne

badanie potwierdza obecności tętniczego nadciśnienia płucnego przy jednoczesnym zróżnicowaniu PH związanego z chorobą lewej części serca (badanie ciśnienia zaklinowania i ciśnienia w lewym przedsionku). RHC obejmuje szereg pomiarów między innymi ciśnienie w prawym przedsionku, komorze serca, w tętnicy płucnej i ciśnienie zaklinowania w tętnicy płucnej, pomiar rzutu serca, płucnego oporu naczyniowego oraz pomiar nasycenia tlenem. Jednocześnie w trakcie badania RHC u chorych z podejrzeniem idiopatycznego PAH (IPAH) konieczne jest wykonanie testu oceniającego rozszerzalność naczyń płucnych (wyjątek stanowią pacjenci IPAH z niestabilnością hemodynamiczną oraz z ostrą niewydolnością RV). Zmniejszenie średniego ciśnienia w tętnicy płucnej (PAPm), o co najmniej 10 mmHg i poniżej 40 mmHg całkowitego PAPm bez zmniejszenia pojemności minutowej serca uznaje się za pozytywny wynik testu. W próbie najczęściej wykonuje się inhalacje tlenkiem azotu [208] lub iloprostu [137] oraz wlewy dożylnie z epoprostenolu [283] lub adenozyliny [133, 272]. Następnie ponownie powtarza się pomiar hemodynamiczny. Chorzy, którzy pozytywnie odpowiedzą na test wykazują zazwyczaj lepsze rokowania i mogą odnieść korzystny efekt na leczenie doustnymi inhibitorami kanałów wapniowych [282]. Pozostałe badania diagnostyczne takie jak tomografia komputerowa, rezonans magnetyczny lub badania czynnościowe układu oddechowego z gazometrią krwi tętniczej stanowią uzupełnienie dla wyżej wymienionych metod i są pomocne w określeniu oraz monitoringu PAH.

Dodatkowo pomimo braku swoistej specyficzności dla tętniczego nadciśnienia płucnego do rozpoznania oraz oceny stopnia nasilenia choroby lub odpowiedzi na leczenie służy metoda oznaczania markerów biochemicznych. Plazmatyczne biomarkery zaklasyfikowane są między innymi w oparciu o:

- a) dysfunkcję komórek śródbłonna (uszkodzenie i przebudowa naczyń) lub aktywację neurohormonalną: asymetryczna dimetyloarginina (ADMA), czynnik von Willebranda, czynnik różnicowania wzrostu 15 (GDF15), angiopoetyna, endotelina 1, adrenomedelina, koptyna;
- b) stan zapalny lub stres oksydacyjny: interleukiny prozapalne, szczególnie IL-6, IL-12p70, białko C-reaktywne, chemokiny, MCP1 oraz ligand chemokiny 10 (CXCL10), czynnik martwicy nowotworów (TNF- β), VEGF, PDGF, TGF- β 1, metabolity lipidowej peroksydacji (izoprostanyF2), osteopontyna;
- c) uszkodzenie i niewydolność prawej komory serca: troponiny T, przedsionkowy peptyd natriuretyczny (VIP), peptyd natriuretyczny (BNP/NTproBNP), homocysteina;

- d) wtórną niewydolność wielonarządową: bilirubina, kreatynina lub klirens kreatyniny, kwas moczowy;
- e) epigenetykę: regulacja transkrypcji, ekspresja genu (microRNAs [miRNAs], onkoproteina Pim1) [7, 232, 247].

Ponadto wyniki badań wykazały, iż obniżenie stężenia sodu w osoczu w trakcie PAH (≤ 136 mEq/L) sugeruje aktywację neurohormonalną w odpowiedzi na zaawansowaną niewydolność prawej komory [86]. Jednak największą wartość diagnostyczną oraz prognostyczną w tętnicznym nadciśnieniu płucnym przedstawia marker BNP/NT-proBNP, który odzwierciedla uszkodzenie mięśnia sercowego. Na podstawie stężenia BNP na poziomie 180 ng/ml oraz NT-proBNP na poziomie 1400 ng/ml rozgranicza się przypadki o dobrym i złym rokowaniu. Obniżenie tego parametru odpowiednio o 54% oraz 44% uzasadnia właściwe podejście w leczeniu PAH [83, 214]. Dodatkowo, w aspekcie znaczenia klinicznego oba parametry mogą wykazywać zależności względem wieku oraz płci [250, 330]. Istnieją sugestie wprowadzenia do leczenia PAH peptydu BNP, jako czynnika o właściwościach antyproliferacyjnych i przeciw włóknieniowych zapobiegający przebudowie naczyń płucnych [45].

1.2. Mechanizmy patofizjologiczne, leczenie oraz charakterystyka prawej komory serca w tętniczym nadciśnieniu płucnym

1.2.1. Mechanizmy patofizjologiczne

Tętnicze nadciśnienie płucne to schorzenie, które charakteryzuje się wzajemną zależnością dwóch struktur: komórek śródbłonka (ang. *endothelial cells*; ECs) i komórek mięśni gładkich tętnic płucnych (ang. *smooth muscle cells of pulmonary arteries*; PASMCs). Zaangażowane są one w procesy patologiczne wspólne dla każdej podgrupy PAH. Nieprawidłowości takie jak: nadmierny skurcz, przebudowa oraz proliferacja występują we wszystkich warstwach ściany tętnicy płucnej (*intima, media, adventitia*). Typowe zmiany obejmują włóknienie błony wewnętrznej oraz środkowej naczyń z równoczesną obecnością miofibroblastów oraz macierzy międzykomórkowych między śródbłonkiem a wewnętrzną błoną elastyczną. Dodatkowo zauważalne jest pogrubienie warstwy zewnętrznej z naciekami zapalnymi okołonaczyniowymi oraz występowanie złożonych zmian tętniakowatych, splotowatych (ang. *plexiform lesion*) oraz nietypowych zmian zakrzepowych. Nadmierne rozrastanie doprowadza do zwężenia tętnic (zwykle o średnicy mniejszej niż 500µm) i/lub do niedrożności małych najczęściej dystalnych tętniczek płucnych (zakres od 50 do 200µm) [201, 244, 262, 271]. Dalsza progresja choroby w naczyniach płucnych powoduje stopniowy wzrost oporu płucnego (PVR) oraz wzrost obciążenia następczego, co wpływa na pracę mięśnia sercowego przyczyniając się do niekorzystnej przebudowy prawej komory serca (prowadzi to do martwicy kardiomiocytów), która objawia się rozstrzenią, pogrubieniem ścian, a w następstwie zmniejszeniem frakcji wyrzutowej komory [326, 327, 258]. Skutkuje to ostrą lub przewlekłą niewydolnością prawokomorową, a w konsekwencji śmiercią pacjenta [30, 108, 125]. Proces przebudowy oraz proliferacji naczyń w PAH jest złożony, wieloczynnikowy i jest wyrazem szeregu szlaków patologicznych na poziomie komórkowym, molekularnym oraz genetycznym i nie jest do końca poznany [129]. Stąd próba wyjaśnienia rozwoju schorzenia, która opiera się między innymi na tzw. teorii „multiple-hits” lub „duble-hits”[233]. Przy odpowiedniej predyspozycji genetycznej lub nabytej mutacji (np. mutacja genu BMPR-2) w połączeniu z narażeniem środowiskowym (np. HIV, zaburzenia łaknienia, toksyny) albo współistniejącą jednostką chorobową (np. wskutek nadciśnienia wrotnego) występowanie dwóch lub więcej czynników może sugerować klasyczny PAH o wspólnym patologicznym szlaku końcowym. Teoria ta jest

podobna między innymi do hipotezy nowotworzenia komórek [324, 264] lub teorii rozwoju miażdżycy [113, 128]. Wykazano, że zamiany strukturalne tętnic płucnych w PAH są powiązane z hamowaniem, brakiem lub tzw. opornością na sygnały apoptozy (ang. *apoptosis-resistance*) w PSMCs oraz ECs, co prowadzi do wzrostu proliferujących, dysfunkcyjnych i fenotypowo zmienionych komórek. Dlatego możliwość kontrolowania apoptozy może stanowić nowy kierunek leczenia w PAH [57, 197]. Wiadomo obecnie, iż wyżej wymienione zmiany wynikają głównie z dysfunkcji śródbłonna oraz z nasilonego skurczu mięśniówki gładkiej naczyń płucnych [40].

Jednym z podstawowych mechanizmów odpowiedzialnych za patogenezę PAH są zaburzenia wydzielnicze komórek śródbłonna naczyń płucnych. Jak wykazano brak fizjologicznej, wzajemnej równowagi w strukturze ECs charakteryzuje się nadmiernym uwalnianiem mediatorów wazokonstrykcyjnych, proliferujących i prozakrzepowych takich jak: endotelina (ET-1) i tromboksan A₂ (TXA₂) [51] z równoczesnym obniżeniem wytwarzania substancji o charakterze przeciwwakrzepowym, naczyniorozkurczowym i antyproliferacyjnym np. tlenek azotu (NO) oraz prostacykliny I₂ (PGI₂) [40].

Doświadczenia potwierdzają, iż zmniejszona biodostępność tlenu azotu w PAH jest wynikiem między innymi zwiększonego stężenia endogennych inhibitorów syntazy NO (eNOS) asymetrycznej i symetrycznej dimetyloargininy (ADMA i SDMA) [267, 240] oraz nadmiernej produkcji reaktywnych form tlenu (nadtlenki) [36]. Jednocześnie zaburzenie migracji tlenu azotu do komórek mięśni gładkich naczyń obniża poziom cyklicznego 3'5' guanozynomonofosforanu (cGMP; wtórny przekaźnik NO), który fizjologicznie posiada właściwości rozkurczające i antyproliferacyjne PSMCs [47]. Ponadto znaczna fizjologiczna ekspresja fosfodiesterazy typu 5 (PDE5) w naczyniach płucnych dodatkowo inaktywuje cGMP w komórkach mięśni gładkich naczyń płucnych oraz w prawej komorze serca u pacjentów z PAH [216].

Dysfunkcja śródbłonna oraz nadmierna agregacja płytek krwi (w wyniku wyraźnego wzrostu TXA₂) w PAH powoduje zmniejszenie uwalniania prostacykliny PGI₂ i jej syntazy [203]. Działanie prostacyklin w nadciśnieniu płucnym polega na parakrynnym oddziaływaniu na komórki mięśni gładkich naczyń poprzez zwiększenie stężenia cyklicznego adenozymonofosforanu (cAMP) z jednoczesnym hamowaniem szlaków kinaz białkowych (MAPK i MLCK) indukując zahamowanie agregacji płytek krwi oraz relaksację i działanie antyproliferacyjne PSMCs [52]. Na modelu mysim zaobserwowano, iż niedobór prostacyklin powoduje rozwinięcie poważnego nadciśnienia płucnego indukowanego niedotlenieniem [122].

Dalsze badania wykazały, iż czynnik indukowany hipoksją (HIF-1 α) [17] zwiększa syntezę i uwalnianie angiopoetyny-1 [64], która pośrednio stymuluje komórki śródbłonna naczyń płucnych do nadmiernej produkcji i wydzielania między innymi serotoniny (5-HT, 5-hydroksytryptamina) prowadząc do patologicznego rozrostu PSMCs [358]. Mediatory podwyższające poziom serotoniny w osoczu takie jak: mikrozatory w krążeniu płucnym (np. w następstwie hipoksji) lub niektóre leki (np. fenfluramina, benfluoreks), przyczyniają się do uwalniania z równoczesnym hamowaniem wychwytu zwrotnego serotoniny przez płytki krwi, co doprowadza do zwiększonego ryzyka wystąpienia PAH [165]. Na modelach zwierzęcych podawanie 5-HT nasiliło nie tylko skurcz, ale również przebudowę warstwy mięśniowej naczyń płucnych [182]. Dodatkowo zaobserwowano zwiększoną ekspresję transportera dla serotoniny (SERT, 5-HTT) lub jego receptorów (np. 5-HT_{1B}-R, 5-HT_{2B}-R) [194], jako dodatkowy szlak mitogennego działania na miocyty powodując utrwalenie nadciśnienia w tętnicy płucnej [61].

Nasilony skurcz mięśniówki gładkiej naczyń płucnych jest następnym potencjalnym czynnikiem zaangażowanym w patogenezę PAH. Zaburzenie to wynika między innymi z nadekspresji receptorów membranowych na mięśniówce gładkiej np.: receptory dla endoteliny (ET-R), serotoniny (5-HTR) lub leukotrienów powodując zwężenie naczyń płucnych przyczyniając się w dalszej kaskadzie sygnalizacyjnej do działania proliferacyjnego i antyapoptycznego [63, 74]. Nieprawidłowości zachodzą również w działaniu kanałów potasowych oraz wapniowych powiązanych ze zmianami napięcia naczyniowego, rozregulowaniem homeostazy komórkowej oraz nadmierną indukcją proliferacji PSMCs [186]. Doświadczenia potwierdzają, iż przewlekłe niedotlenienie wywołane nadciśnieniem płucnym może hamować ekspresję i/lub aktywność a także zmniejszyć ilości funkcjonalnych kanałów potasowych bramkowanych napięciem (Kv1.5 u ludzi oraz Kv1.5 i Kv2.1 u szczurów) [354]. Prowadzi to do depolaryzacji błony z równoczesnym wzrostem stężenia wolnego wapnia w cytozolu ([Ca²⁺]_{cyt}), który jako drugi kluczowy przekaznik, w PAH blokuje ekspresję genów proapoptycznych [163] oraz stymuluje czynniki transkrypcyjne (np. c-jun, c-fos) zwiększając proliferację komórek PSMCs [351]. Cytolozowa homeostaza wapnia regulowana jest również przez Ca²⁺-ATP-azę2a (SERCA2a) znajdującą się w błonie siateczki śródplazmatycznej (SR), którego ekspresja w wyniku PAH ulega obniżeniu indukując napływ wewnątrzkomórkowego wapnia do cytozolu stymulując dodatkowo nasilony skurcz mięśniówki gładkiej naczyń [109]. Dodatkowo, badania na zwierzętach

wykazały zaangażowanie kanałów potasowych KCNQ (Kv7) szczególnie KCNQ4 w regulacji potencjału spoczynkowego mięśniówki gładkiej naczyń w tętnicznym nadciśnieniu płucnym [107]. Podanie selektywnych aktywatorów kanałów KCNQ takich jak retigabina i flupirtyna może być potencjalnym nowym celem terapeutycznym w PAH [143].

Ponadto w mechanizmie PAH może uczestniczyć wiele czynników zaangażowanych w *remodeling* naczyń płucnych, które opisano poniżej.

Pomimo braku klinicznych lub histopatologicznych dowodów choroby zakrzepowo-zatorowej płuc w patogenezie PAH [91, 236] wykazano, że częściowa dysfunkcja śródbłonna i nieprawidłowości w kaskadzie krzepnięcia oraz zaburzona funkcja płytek krwi może przyczynić się do rozpoczęcia lub pogłębienia charakterystycznego zjawiska zakrzepicy *in situ* tętnic płucnych zmieniając przebieg i rokowanie w PAH [164]. Jednak w większości przypadków nie jest do końca wyjaśnione, jaka jest rola ww. zaburzeń na bezpośrednią patogenezę choroby [139, 328]. Zmiany w hemostazie oraz wykrzepianie wewnątrznacyniowe są stałym procesem u pacjentów z przedklinicznym PAH sugerując fenotyp nadkrzepliwości [306]. Wydaje się, że zwiększona aktywność trombiny w osoczu odgrywa kluczową rolę w PAH [306, 337]. Podwyższone stężenie fibrynopeptydów A i B świadczy o procesie koagulacji wewnątrznacyniowej [75]. Ponadto, wzrasta poziom D-dimerów, a ich stężenie dobrze koreluje z stopniem nasilenia choroby [276]. Udowodniono, iż wzrost poziomu czynnika von Willebranda oraz inhibitora aktywatora plazminogenu (PAI-1) w osoczu odzwierciedla nie tylko stopień uszkodzenia, ale także dysfunkcyjną aktywność prozakrzepową i fibrynolityczną śródbłonna naczyń płucnych [127, 147]. Jednocześnie w przebiegu PAH wykazano obniżenie poziomu PAI-1 w PASM_c, co skutkuje zwiększoną proliferacją komórek mięśni gładkich i prowadzi do zaniku naczyń płucnych [157]. Ponadto u pacjentów w przebiegu ciężkiego PAH zauważono wzrost ekspresji nacyniowego czynnika tkankowego (TF) na błonie śródbłonna, który może pośredniczyć nie tylko w destabilizacji procesu angiogenezy poprzez odkładanie włókniaka i nadmierną aktywację trombiny [336], ale również w proliferacji i migracji komórek mięśni gładkich naczyń płucnych w PAH. Wykazano również zwiększoną aktywność mikrocząsteczek komórek TF, jako mediatorów inicjujących uszkodzenie śródbłonna [16]. Jednocześnie, obniżenie powinowactwa rozpuszczalnej trombomoduliny do receptora trombiny, zaburzenia aktywacja białka C [164, 263, 333], hamowanie tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA) [147] oraz zaburzona

równowaga produkcji i uwalniania przez ESc przeciwzkrzepowego tlenku azotu i PGI₂ [310, 321, 356] potęgują stan nadkrzepliwości oraz utrwalenia nadciśnienia płucnego u pacjentów z PAH w porównaniu z kontrolą. Ponadto w ciężkim PAH zaobserwowano istotne zmiany strukturalne i funkcjonalne naczyń płucnych pod wpływem interakcji z płytkami krwi [115, 148]. Aktywacja płytek krwi sprzyja uwalnianiu mediatorów nie tylko o charakterze prozkrzepowym, ale także prozapalnym i wazokonstrykcyjnym między innymi CD40L [349], trombokasanu A₂, serotoniny, PDGF, VEGF oraz TGF-β [275, 355].

Wydaje się, że kolejnym wspólnym czynnikiem w nadciśnieniu płucnym jest przewlekłe zapalenie. W badaniach histologicznych płuc w zmianach splotowatych naczyń zaobserwowano obecność okołonaczyniowych nacieków zapalnych, głównie z limfocytów T oraz B, ale także z licznych makrofagów, monocytów, komórek dendrytycznych i komórek tucznych [68, 311, 312]. Obserwacje wykazały istotną korelację wynikającą między stopniem zapalenia a intensywnością choroby [289]. Stan zapalny u pacjentów z idiopatycznym PAH (IPAH) charakteryzuje się między innymi obecnością krążących autoprzeciwciał w szczególności skierowanych przeciwko komórkom śródbłonka (AECA) oraz przeciwko fibroblastom (ang. *anti-fibroblast antibodies*) błony zewnętrznej naczyń [149, 302]. Dodatkowo liczne badania udowodniły, iż ciężkie PAH związane jest z chorobami o podłożu autoimmunologicznym. Na przykład toczeniem rumieniowatym układowym lub mieszaną chorobą tkanki łącznej. Natomiast leczenie immunosupresyjne i/lub za pomocą kortykosterydów wykazało poprawę stanu pacjentów z PAH [136, 266], co podkreśla zjawisko występowania charakterystycznego dla tej grupy procesu zapalnego. Ponadto kliniczne obserwacje chorych w okresie zaawansowanej niewydolności RV udowodniły 3-krotnie częstsze występowanie autoimmunologicznych chorób tarczycy w omawianej grupie pacjentów w porównaniu z kontrolą [331]. Sugerowano, iż szereg czynników zakaźnych w tym wirusy (HIV, HHV8) [53, 206] i pasożyty (schistosomatoza) [70] a także sarkoidoza [18] lub zaburzenia obejmujące różne stany zapalne naczyń płucnych odgrywają istotną rolę w procesie patogenezy nadciśnienia płucnego. Ponadto analizowano pomiar naprężenia ścinającego naczyń (ang. *wall shear stress*; WSS) z wykorzystaniem metody obliczeniowej dynamiki płynów (CFD). Badania potwierdziły uszkodzenie śródbłonka w nadciśnieniu płucnym [85, 301] w wyniku zmniejszania WSS. Może on indukować nasiloną ekspresję czynników biochemicznych między innymi białek adhezyjnych (VCAM-1 oraz ICAM-1) [146] przyczyniając się do przyciągania

mediatorów odczynu zapalnego (np. makrofagów, limfocytów) oraz płytek krwi do komórek śródbłonna [270]. Powoduje to stopniowe uwalnianie cytokin, chemokin i czynników wzrostu, które mogą pogłębić progresję PAH. Udowodniono, że w grupie krążących cytokin prozapalnych występuje zwiększony poziom przede wszystkim IL-1 β oraz IL-6 [269], czynnika martwicy nowotworu (TNF- α), P-selektyny [76, 106], które mogą korelować z pogarszającym się stanem klinicznym pacjentów z PAH. Równocześnie wzmożone uwalnianie chemokin prozapalnych i utworzenie gradientu chemotaktycznego wytwarza zdolność do różnego działania leukocyty poprzez między innymi wzrost aktywacji i przylepiania. Dlatego u pacjentów z PAH mechanizm działania chemokin opiera się głównie na rekrutacji komórek zapalnych do płuc [69]. Zaobserwowano nadekspresję między innymi fraktaliny (FKN, CX3CL1) oraz jej receptora (CX3CR1) [231], chemokiny ligandu 5 (RANTES, CCL5), która regulowana jest w wyniku aktywacji, chemotaksji i adhezji limfocytów T [69] oraz chemokiny ligandu 2 (białko MCP-1, CCL2), które reaguje z receptorami aktywowanymi na śródbłonku naczyń płucnych u pacjentów z PAH [265]. Wydaje się, że istotną rolę w prozapalnej patogenezie PAH odgrywa również czynnik jądrowy uaktywnionych komórek T (ang. *nuclear factor of activated T-cells*; NFAT). Zwiększa on transkrypcję licznych mediatorów zapalnych (np. interleukiny, TNF- α) oraz aktywuje limfocyty T i B [34]. Przy dysfunkcji komórkowej obejmującej szczególnie PASMCs oraz ECs oprócz uwalniania mediatorów naczynioruchowych i zwiększenia czynników wzrostowych zaobserwowano również nadmierny napływ wewnątrzkomórkowego wapnia, ale także aktywację czynników transkrypcyjnych np. NFAT [43]. W związku z tym sugerowano unikalny fenotyp patogenezy PAH związany ze zwiększoną ekspresją białek Bcl-2 (ang. *B-cell lymphoma-2*) oraz z hyperpolaryzacją mitochondrium [34, 242]. Dodatkowo na podstawie wyników badań na myszach zaobserwowano, iż przewlekłe niedotlenie w PAH oznacza wzrost aktywności szlaku sygnałowego RhoA/ROCK i związaną z tym nierównowagę między dysmutazą nadtlenkową (SOD) a wodorem, która może pośredniczyć w pobudzaniu NFAT przyczyniając się do wzmożonej reaktywności naczyń płucnych [248]. Podawanie *in vitro* pośrednich (cyklosporyna) lub bezpośrednich (VIVIT) inhibitorów NFAT przywracało prawidłową ekspresję (*up-regulation*) kanałów Kv1.5 oraz normalizowało mitochondrialny potencjał błonowy. W konsekwencji doprowadzało do zmniejszenia rozrostu z równoczesnym zwiększeniem apoptozy komórek PASMCs i śródbłonna naczyń płucnych [34].

Ponadto przy charakterystycznym fenotypie antyapoptycznym i wysoce proliferacyjnym u pacjentów z PAH wykazano istotną rolę receptorowych czynników wzrostowych. Przede wszystkim czynnika wzrostu pochodzenia płytkowego (PDGF-A i B) [49, 105] oraz pozostałych takich jak: podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów (b-FGF), czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF) i jego receptorów (VEGFR-1 oraz 2) oraz naskórkowy czynnik wzrostu (EGF). Wpływ EGF na komórki mięśni gładkich naczyń zależy od składnika matrycy zewnątrzkomórkowej - tenascyny C [142], która występuje razem z EGF w zmianach spłotowatych płuc sugerując bezpośredni udział w progresji choroby [76, 140]. Na podstawie doniesień zaobserwowano również, iż w uszkodzeniach spłotowatych występuje nasilona ekspresja czynnika VEGF oraz jego receptorów, jako istotny element proangiogeny w patogenezie PAH [309]. Pomimo wielu badań jego rola w regulacji angiogenezy pozostaje nadal niewyjaśniona [325]. Czynniki wzrostu działają przez transbłonowe receptory o aktywności kinazy tyrozynowej pośrednicząc w różnych procesach fizjologicznych od proliferacji i apoptozy do udziału w migracji i różnicowaniu komórek [105, 171]. Obserwacje potwierdziły, że w PAH dochodzi do zmian na poziomie wewnątrzkomórkowych sygnałów mitogennych oraz zaburzeń ekspresji i/lub funkcjonowaniu ww. czynników [59, 105, 325]. Działają one na zasadzie właściwości chemotaktycznych przede wszystkim dla komórek mięśni gładkich płuc, ale także dla komórek śródbłonka i fibroblastów [112]. W rezultacie dochodzi do wzmożonego stanu zapalnego [291], nadmiernej proliferacji i migracji komórkowej oraz do wzmożonej oporności na apoptozę [76].

Fizjologicznie EDF, VEGF, TNF- α oraz IL-1 pobudzają wtórne wydzielanie enzymów metaloproteinazy macierzy (MMP), które należą do grupy endopeptydaz (proteazy i elastazy). Posiadają one zdolność degradacji elementów macierzy pozakomórkowej (ang. *extracellular matrix*; ECM) np. kolagenu ułatwiając migrację komórek i wydzielanie czynników wzrostu regulując różne procesy komórkowe [9]. Udowodniono, iż w ciężkim PAH między śródbłonkiem a wewnętrzną blaszką sprężystą wytwarza się tzw. neointima [65] warstwa złożona z miofibroblastów i macierzy zewnątrzkomórkowej. Jest to efekt nadmiernej aktywacji i wzmożonego odkładania ECM w ścianie naczyń płucnych [168]. Zaobserwowano, że wzmożona ekspresja metaloproteinaz MMP-2 oraz MMP-9 doprowadza do degradacji elastyny (wzrost aktywności elastazy serynowej) [57] w tętnicach płucnych, przez co dodatkowo wzmacnia sygnał do aktywacji transkrypcji tenascyny C [141]. Przyczynia się to do

procesu migracji PMSCs [246]. W wyniku aktywności MMP oraz elastaz występuje również zwiększenie syntezy i odkładania kolagenu tworząc dodatkowo nietypowe zmiany splotowate (plexiform lesion) w naczyniach płucnych [46, 261].

Z czynnikami wzrostu szczególnie PGDF związana jest pośrednio rola jądrowych receptorów aktywowanych przez proliferatory peroksysomów (ang. *peroxisome proliferator-activated receptors*; PPAR γ). Fizjologiczna PPAR γ reguluje adipogenezę i metabolizm glukozy oraz może przyczynić się do wzrostu poziomu białek (angiopoetyn) sugerując zaangażowanie w angiogenezę [350]. PPAR γ ulega ekspresji nie tylko w tkance tłuszczowej, ale także w monocytach, makrofagach, komórkach śródbłonna i mięśni gładkich naczyń płucnych [72]. Jak wykazano redukcja ekspresji PPAR γ w naczyniach płucnych w wyniku hipoksji stymuluje nieprawidłową sygnalizację komórkową, który wspiera zaburzenia na poziomie PASMCs oraz ECs. Aktywuje on wzrost między innymi ET-1, PGDF jak również bierze udział w procesach zapalnych (wzrost interleukin, fraktaliny, MCP-1) [245] oraz angiogenezie, co może doprowadzić do rozwoju tętniczego nadciśnienia płucnego [299].

Ostatnio zasugerowano również inne istotne szlaki uczestniczące w patogenezie PAH, które opisano poniżej.

a) Receptor białka morfogenetycznego kości typu 2 (BMPR2)

Badania wykazały, iż mutacja linii zarodkowej w genie kodującym dla receptora BMPR2 jest główną przyczyną genetyczną, która predysponuje do PAH [242]. Białko BMP należy do nadrodziny transformującego czynnika wzrostu β (ang. *transforming growth factor β* ; TGF- β) i w obrębie naczyń krwionośnych reguluje proliferację (hamuje), różnicowanie, apoptozę oraz syntezę kolagenu. Wiele badań wykazało, iż ekspresja receptorów dla BMP (BMPR2) w PAH jest znacznie obniżona u pacjentów z mutacją w tym genie i prowadzi do deregulacji na wielu poziomach wewnątrzkomórkowej kaskady sygnalizacyjnej w komórkach śródbłonna i mięśniówce naczyń płucnych [335]. Stwierdzono, że w grupie chorych z rodzinną postacią PAH mutacja występuje, u co najmniej 70% badanych oraz do 25% w pozornie sporadycznym PAH (IPAH) [62, 303]. Potencjalnie mechanizm *remodelingu* naczyń płucnych mutacji BMPR2 jest wynikiem zmniejszenia aktywacji cytoplazmatycznego czynnika transkrypcyjnego *Smad* oraz konstytutywna aktywacja p38 kinazy białkowej aktywowanej mitogenem (p38Mapk) (brak zahamowania proliferacji komórek mięśni gładkich) [110]. Powyższe

obserwacje nie tłumaczą jednak zależności pomiędzy występowaniem mutacji a rozwojem PAH [243]. Coraz więcej dowodów sugeruje, iż kinazy proliferacyjne MAPK w tym p38, pERK oraz kinazy JNK są aktywowane również przez receptory TGF- β [242]. Jedną z hipotez proponuje, iż inne mutacje w obrębie szlaku sygnalizacyjnego BMPR2/TGF- β (np.: aktywacja mutacji receptorów TGF- β : ALK-1, endogliny) lub czynniki środowiskowe (różne choroby towarzyszące lub przyjmowane leki np. fenfluramina, substytucja estrogenów, narkotyki) mogą brać udział w patogenezie PAH. Dlatego, pomimo teorii związanej z zaburzeniami i mutacją BMPR2, która odgrywają istotną rolę na ECs oraz PSMCs przy nadmiernej proliferacji i nieodpowiedniej regulacji napięcia naczyniowego analiza alternatywnych wspólnych szlaków sygnałowych może stanowić kluczowe znaczenie w patogenezie oraz terapii PAH. Wymaga to dalszego bardziej kompleksowego podejścia do problemu [243].

b) Sygnalizacja Oct-4 oraz Notch-3

Niedawno opublikowane dane sugerują istotną rolę szlaku sygnalizacyjnego Notch-3 oraz oktameru wiążącego czynnik transkrypcyjny 4 (Oct-4, POU51) w PAH. Białka te są niezbędnymi mediatorami zapewniającymi utrzymywanie zdolności komórek macierzystych do samoodnawiania w procesach hamujących ich różnicowanie. Wydaje się, iż w wyniku hipoksji zwiększa się poziom ekspresji Oct-4, ale również wiążącego się z nim czynnika HIF-2 α przyczyniając się do wzrostu, proliferacji i różnicowania PSMCs w porównaniu do komórek normoksyjnych [84]. Receptory białkowe Notch, to pojedyncze przezbłonowe białka, które odgrywają istotną rolę w regulowaniu procesów rozwojowych naczyń takich jak: angiogeneza, waskulogeneza, przebudowana i stabilizacja naczyń oraz różnicowanie komórek mięśni gładkich naczyń i nabywanie przez mięśniówkę charakterystycznych dla niej właściwości. Na podstawie biopsji płuc pacjentów transplantacyjnych z PAH oraz badań na monokrotalinowym modelu zwierzęcym (model PAH u zwierząt) udowodniono, iż wysoki poziom, nadekspresja i aktywacja szlaku sygnalizacyjnego Notch-3 oraz jego dalszych efektorów (HES5) w tętniczkach płucnych decyduje nie tylko o ciężkości choroby i nadmiernej proliferacji mięśniówki gładkiej naczyń, ale również pośredniczy w rozwoju niedotlenienia i działaniu antyapoptycznym na PSMCs w PAH [173]. Powyższe dane sugerują, iż ww. szlaki uczestniczą w progresji i rozwoju patologicznej przebudowy tętnic płucnych u pacjentów z PAH i stanowią potencjalny nowy, istotny cel terapeutyczny.

c) Metabolizm mitochondrialny

Zaproponowano, że zaburzenia homeostazy komórkowego szlaku mitochondrialnego mogą być kolejnym istotnym czynnikiem biorącym udział w patogenezie PAH (tzw. teoria metaboliczna) [228]. Na uwagę zasługuje w szczególności przesunięcie metabolizmu glukozy z oddychania tlenowego (zahamowanie dehydrogenazy progronianowej) do procesu glikolizy tlenowej nawet w obecności tlenu (fenotyp Warburga), co sugeruje podobieństwo do patomechanizmu opisanego w komórkach nowotworowych (tzw. efekt Warburga) [129]. Dodatkowo istnieje nierównowaga pomiędzy procesami glikolizy a fosforylacją oksydacyjną w warunkach przewlekłego niedotlenienia (w wyniku aktywacji czynnika HIF-1 α) [71, 172]. Zaobserwowano liczne nieprawidłowości sygnałowe wpływające na zahamowanie czynności mitochondrium w PAH między innymi poprzez oporność na apoptozę, wpływ czynników transkrypcyjnych, zaburzenia działania kanałów Kv [225, 228]. Zastosowanie dichlorooctanu (DCA), nie tylko przywraca metabolizm oksydacyjny poprzez inhibicję kinazy dehydrogenazy pirogronianowej (PDK; ang. *pyruvate dehydrogenase kinase*), ale również zwiększa naczyniowy współczynnik apoptozy w stosunku do proliferacji zależny od mitochondrium oraz reguluje ekspresję kanałów Kv1.5 w komórkach mięśni gładkich naczyń płucnych i ECs [71].

1.2.2. Leczenie

Celem terapii w tętnicznym nadciśnieniu płucnym to poprawa jakości życia oraz zmniejszenie ryzyka przedwczesnego zgonu. Oznacza to przywrócenie i/lub zachowanie czynności chorego na poziomie II klasie funkcjonalnej wg WHO. Dodatkowo poprawna terapia to również normalizacja hemodynamiczna i funkcjonalna prawej komory przy indeksie sercowym $>2,5$ do $3,0$ L/min/m² i ciśnieniu w prawym przedsionku <8 mmHg przy jednoczesnej poprawie testu 6MWD >380 do 440 m uwzględniając saturację tlenowej mieszanej krwi żyłnej $\geq 65\%$ oraz wiek, płeć i wagę pacjenta [194, 220]. Aktualne postępowanie terapeutyczne jest złożoną procedurą obejmującą indywidualne podejście do każdego przypadku. Uwarunkowane jest wstępną oceną zaawansowania choroby, monitorowaniem reakcji pacjenta na leczenie oraz ewentualną modyfikacją terapii. Strategia leczenia PAH opiera się na trzech głównych etapach:

a) Zalecenia ogólne

Dotyczą modyfikacji stylu życia chorych z PAH takie jak: umiarkowana aktywność fizyczna, rehabilitacja, dieta, nadzorowana ciąża, antykoncepcja i HTZ, pomoc psychologiczna, obowiązkowe szczepienia, skierowanie do ośrodków referencyjnych [94, 193]. Ponadto wykonuje się wspomniany wcześniej test reaktywności naczyń, który kwalifikuje chorego do włączenia przewlekłej terapii za pomocą brokerów kanałów wapniowych (CCB).

Uzupełnieniem leczenia konwencjonalnego są doustne leki przeciwzakrzepowe stosowane we wszystkich postaciach PAH, takie jak: antagoniści witaminy K (warfaryna, acenokumarol) lub rywaroksaban [41, 239, 307]; leki moczopędne (objawowo przy niewydolności RV; diuretyki pętłowe, tiazydy i/lub spironolakton); digoksyna (pierwotnie, objawowo przy niewielkiej hipoksemii lub w przebiegu przerywanego lub przewlekłego migotania przedsionków; powoduje nieznaczny wzrost objętości minutowej oraz zmniejszenie ilości krążącej noradrenaliny) [255]; tlenoterapia (wyjątek stanowi zespół Eisenmengera) oraz suplementacja żelazem [218, 320].

b) Zalecana farmakoterapia

Terapia farmakologiczna obejmuje tzw. swoistą farmakoterapię i jest podstawą leczenia tętniczego nadciśnienia płucnego. Opiera się na mechanizmach, które biorą udział w postępującym procesie patofizjologii śródbłonna i mięśniówki gładkiej naczyń płucnych. Farmakoterapia tak dobrana doprowadza do obniżenia oporu płucnego oraz ciśnienia w tętnicach płucnych. W konsekwencji w sposób pośredni poprawia funkcję prawej komory serca. W terapii PAH rutynowo stosuje się cztery podstawowe grupy leków. Pierwsza z nich to antagoniści kanału wapniowego (ang. *calcium channel blockers*; CCB), których odpowiednio wysokie dawki w znacznym stopniu zmniejszają naczyniowy opór płucny, ciśnienie płucne i systemowe. Do najczęściej stosowanych długodziałających brokerów kanału wapniowego w PAH należą: nifedypina, diltiazem oraz amlodypina. Jednak pomimo wysokiej skuteczności CCB wykazano, iż tylko niewiele ponad 20% pacjentów z IPAHA spełnia kryteria pozytywnej odpowiedzi na ostry test wazodylatacyjny. Warto dodać, że tylko <7% chorych z IPAHA może długotrwale korzystać z terapii CCB [282]. Pozostałe grupy leków są ukierunkowane specyficznym na szlaki zaangażowane w patogenezę PAH i wpływają nie tylko na poprawę jakości życia,

ale również na polepszenie wyników klinicznych [129]. Należą do nich: analogi prostacyklin określane jako prostanoidy (epoprostenol, iloprost, treprostinil, beraprost) oraz antagoniści receptorów A i B dla endoteliny (ERA) (bosentan, ambrisentan, macitentan, sitaksentan). Ostatnią grupę leków stanowią inhibitory fosfodiesterazy typu 5 (PDE-5) takie jak: sildenafil, tadalafil oraz nowy związek – riociguat [93, 129].

Bardzo często wyniki monoterapii u pacjentów w zaawansowanej chorobie PAH (NYHA FC III/IV) są niezadowalające, ponieważ w patogenezę PAH zaangażowane są liczne drogi uczestniczące w progresji choroby. Dlatego też zaproponowano schematy terapii skojarzonej z wykorzystaniem leków swoistych. Pierwszy tzw. „*add on therapy*” polega na sekwencyjnym leczeniu skojarzonym, w którym proces terapeutyczny rozpoczyna się od podania jednego leku z ewentualnym dodaniem kolejnego, jeśli reakcja na leczenie jest niedostateczna [129]. Druga strategia tzw. „*upfront combination therapy*” jest bardziej agresywna, stosowana zwłaszcza u pacjentów z wysokim ryzykiem gdzie leczenie od razu rozpoczyna się od terapii skojarzonej (jednoczesne podanie dwóch lub trzech klas leków) [100, 285]. Skuteczność i bezpieczeństwo każdej z tych kombinacji może zmieniać się oraz uzależnione jest od stanu pacjenta, który wymaga stałego monitoringu.

Obecnie w wyniku intensywnych badań nad patomechanizmem PAH opracowano nowe metody terapii ukierunkowanej na potencjalne inne szlaki patologiczne. Są to: agonisty dla receptorów prostacykliny (IP) - selexipag i jego aktywny metabolit [284], inhibitory kinazy tyrozynowej (imatinib), wazoaktywny peptyd jelitowy (VIP), inhibitory kinazy Rho (fasudyl) [347], podaż komórek progenitorowych śródbłonna (EPC), podawanie statyn, zahamowanie aktywacji neurohormonalnej. Związki te zaproponowane przez badaczy są alternatywą leczenia PAH jednak wymagają dodatkowych badań klinicznych [195].

c) Interwencja chirurgiczna

Trzeci etap leczenia pacjentów z PAH uwarunkowany jest wstępną oceną sposobu leczenia podstawowego. Przy nieskutecznej farmakoterapii zaleca się możliwość leczenia chirurgicznego to znaczy: transplantacja płuc albo balonowa septostomia przedsionkowa, jako zabieg paliatywny lub pomostowy do przeszczepu narządu i mający na celu odciążenie prawej komory serca [94].

1.2.3. Prawa komora serca w PAH

Pomimo, iż definicja tętniczego nadciśnienia płucnego wyraża się na podstawie podwyższonego ciśnienia w tętnicy płucnej oraz dodatkowo zwiększonego naczyniowego oporu płucnego to warto zauważyć, że stopień uszkodzenia tętnic płucnych oraz wyżej wymienione wartości posiadają niewielkie znaczenie prognostyczne obrazu klinicznego choroby. Przeciwnie, integralność prawej komory serca (ang. *right ventricular*; RV) jest decydującym czynnikiem o charakterze funkcjonalnym oraz mówiącym o stopniu zaangażowania choroby i rezultacie leczenia.

Natomiast ciśnienie w prawym przedsionku (RAP) oraz pojemność minutowa serca (CO) należą do najważniejszych wskaźników rokujących przeżywalność pacjentów z PAH [50]. Prawa komora w warunkach prawidłowych ma kształt półksiężyca a jej wolna ściana jest wklęsła w porównaniu do wypukłej przegrody międzykomorowej i posiada strukturę cieńszą niż grubościenna lewa komora serca (LV) [237]. Dzięki temu RV jest podatna na wzrost naprężenia ściany, co umożliwia szybką adaptację do zmieniających się warunków napięcia wstępnego zaś w krążeniu płucnym utrzymuje niskie ciśnienie [48].

Obecnie wiadomo, iż stan tętniczego nadciśnienia płucnego możemy podzielić na postać kliniczną ostrą oraz przewlekłą. Nagłe (ostre) zwiększenie obciążenia następczego (np. masywny zator płucny lub końcowa faza niewydolności RV) indukuje ostrą dylatację a w konsekwencji gwałtowne uszkodzenie RV [273]. Jednak wyniki badań na modelu zwierzęcym wykazały, iż podanie noradrenaliny poprawiło wydajność RV poprzez zwiększenie perfuzji wieńcowej oraz bezpośredni wzrost kurczliwości mięśnia sercowego i odwrócenie wstrząsu kardiogenego [204]. Natomiast w drugim przypadku stopniowy wzrost obciążenia następczego w wyniku przewlekłego tętniczego nadciśnienia płucnego (zwiększone zapotrzebowanie na tlen oraz utrudniona perfuzja) pozwala prawej komorze serca w zależności od przypadku na dwie reakcje:

- a) adaptacyjną tzw. kompensacyjną - koncentryczny przerost z minimalną rozstrzenią lub włóknieniem z zachowaniem funkcji RV;
- b) nieprzystosowawczą tzw. dekompensacyjną - zwłóknienie, dylatacja i niewydolność RV) [254, 258] do zaistniałych warunków poprzez przerost mięśnia sercowego z jednoczesną dysfunkcją skurczową komory.

Następnie zgodnie z prawem Franka-Starlinga w celu utrzymania pojemności minutowej wzrasta obciążenie wstępne i objętość późnorozkurczowa RV. Szlakiem końcowym tych

nieprawidłowości jest wzrost ciśnienia napełnienia, rozwój dysfunkcji rozkurczowej RV z równoczesnym obniżeniem pojemności minutowej serca przyczyniając się do niewydolności prawokomorowej [213]. Ponadto wykazano zmniejszenie przepływu wieńcowego RV sugerując niedokrwienie tej części serca prowadząc do niewydolności RV [322] oraz stanu hibernacji. Dodatkowo nadmierny przerost RV u pacjentów z przewlekłym PAH spłaszcza przegrodę międzykomorową przyczyniając się równolegle do zaburzeń LV takich jak: dysfunkcja rozkurczowa, zmniejszenie frakcji wyrzutowej w trakcie skurczu oraz miejscowe zaburzenia kurczliwości [50]. Ważną rolę odgrywa zewnętrzna kompresja lewej tętnicy wieńcowej (LMCA) stanowiąc ważny element powiększenia pnia tętnicy płucnej u pacjentów z PAH [4]. Jak zaobserwowano funkcje hemodynamiczne prawej komory serca można scharakteryzować za pomocą trzech zmiennych: wspomnianego wcześniej średniego ciśnienia w tętnicy płucnej (mPAP) i średniego ciśnienia w prawym przedsionku (mRAP) oraz wskaźnika sercowego (ang. *cardiac index*; CI), (w PAH obniżony $<2,5\text{L}/\text{min}/\text{m}^2$; norma: $3,2\text{L}/\text{min}/\text{m}^2$ w spoczynku). Te trzy zmienne korelują z przeżyciem i potencjalnie mogą uzupełniać planowanie oraz kontynuację leczenia [60]. Objawy kliniczne niewydolności RV np. omdlenia lub stany przedomdleniowe, obrzęk, wzdęcie brzucha, powiększenie żył szyjnych czy duszność wysiłkowa oraz diagnostyka RV opierają się na wcześniej wymienionych objawach i metodach diagnostycznych wykorzystywanych w PAH. Natomiast na uwagę zasługują niedocenione prawdopodobnie ze względu na koszt techniki obrazowania jądrowego takie jak: SPECT (tomografia emisyjna pojedynczych fotonów), PET (pozytonowa tomografia komputerowa) oraz MIBG (^{123}L -metajodobenzylguanidyny). W zależności od użytego radioizotopu umożliwiają ocenę stopnia niedokrwienia (pomiar perfuzji), ocenę zaburzeń metabolizmu serca (glikoliza tlenowa) [11] i płuc, zaburzeń angiogenezy (zahamowanie) oraz zmian w aktywacji współczulnego układu nerwowego (aktywność adrenergiczna) dla RV i mięśnia sercowego [223, 258].

Zalecenia terapeutyczne w PAH skupiają się przede wszystkim na usunięciu dysfunkcji w naczyniach płucnych, a nie na bezpośredniej niewydolności i przeroście RV. Brakuje dowodów na skuteczność ww. leczenia, które przede wszystkim opiera się na poprawie przeprowadzanego testu 6 minutowego marszu. Jak zaobserwowano pomimo pozytywnego spadku naczyniowego oporu płucnego (PVR) w odpowiedzi na standardową terapię naczyniorozkurczową może nastąpić pogorszenie funkcji i kurczliwości RV [319]. Obecnie śmiertelność wśród pacjentów z niewydolnością RV

w PAH wynosi ponad 40% przypadków szpitalnych [44]. Pomimo zaistniałej sytuacji aktualnie nie ma żadnych oficjalnych wytycznych dotyczących terapii niewydolności RV w PAH [260]. Dodatkowo niewiele wiadomo o konkretnych mechanizmach wynikających z przerostu (RVH) i dysfunkcji RV w PAH. Nowe kierunki terapii mogą umożliwić przedłużenie prawidłowej funkcji serca oraz poprawę jakości życia pacjentów z PAH [10].

1.3. Charakterystyka wybranych związków

1.3.1. L-arginina

L-arginina (ang. *L-arginine*; synonimy: L-Arg, kwas 2-amino-5-guanidynowalerianowy), aminokwas endogenny lub tzw. względnie egzogeny, prekursor tlenku azotu (ang. *nitric oxide*; NO) o wzorze sumarycznym $C_6H_{14}N_4O_2$ został po raz pierwszy wyizolowany przez Schultza i Steigera w 1886 roku z kiełków łubinu (*Lupinus L.*). Forma D-stereoizomeru argininy nie wykazuje aktywności biologicznej. Dziesięć lat później Hedin zidentyfikował L-argininę, jako składnik białek zwierzęcych, natomiast Sorenson w 1910 roku określił strukturę chemiczną związku [177, 345]. W 1930 roku opisano syntezę argininy u ssaków. Pomimo, iż w 1904 roku zidentyfikowano w komórkach wątroby wysoką aktywność arginazy (hydrolizuje argininę do ornityny i mocznika) to dopiero odkrycie przez Krebsa i Henseleita w 1932 roku zwróciło uwagę, iż L-arginina wpływa na prawidłowe funkcjonowanie wątroby, gdzie odgrywa istotną rolę w metabolicznym cyklu mocznikowym (cykl ornitynowy), który jest odpowiedzialny za usuwanie z organizmu toksycznego amoniaku [159]. Stwierdzono również, że arginina jest niezbędnym substratem w syntezie kreatyny, która jest prekursorem kreatyniny znanej, jako wykładnik funkcji nerek [346]. Ponadto w badaniach doświadczalnych oraz klinicznych zaobserwowano, iż L-arginina jest niezbędnym aminokwasem do prawidłowego rozwoju młodych osobników w przeciwieństwie do dorosłego, zdrowego organizmu, który jest w stanie syntetyzować ją samodzielnie. Obecnie jednak uważa się, że L-arginina jest istotnym związkiem nieodzownym dla prawidłowego funkcjonowania organizmu, niezależnie od wieku i powinna być dostarczana w codziennej diecie, szczególnie w przypadku takim jak: stres, zakażenia, urazy (w tym operacje chirurgiczne), schorzenia genetyczne oraz przy niewydolności nerek [344]. W latach osiemdziesiątych XX wieku w badaniach na dorosłych szczurach zaobserwowano, że jelito cienkie jest głównym źródłem krążącej cytruliny niezbędnej do syntezy endogennej argininy [339]. W tym samym czasie zidentyfikowano, iż arginina jest prekursorem biologicznie aktywnego tlenku azotu (NO) działającego rozkurczowo na mięśniówkę naczyń krwionośnych, początkowo nazwanego śródbłonkowym czynnikiem rozszerzającym naczynia (ang. *endothelial derived relaxing factor*; EDRF) [178]. To odkrycie zainicjowało nowy etap wyjaśniający właściwości i możliwe zastosowanie kliniczne dla NO oraz L-argininy, jako jedynego substratu dla

syntezy tlenu azotu u człowieka [345]. Argininę do organizmu dostarcza się głównie z pokarmem, ale jej źródłem jest również wewnątrzkomórkowa degradacja białek oraz jej synteza w organizmie. Prawidłowe całkowite stężenie argininy w osoczu wynosi około 95-250 μ mol/L i zależy od wieku i stanu odżywienia [345]. Arginina występuje praktycznie we wszystkich białkach żywności pochodzenia zarówno roślinnego (rośliny strączkowe, orzechy, nasiona sezamu, słonecznika) jak i zwierzęcego (np. nabiał, mięso wołowe, wieprzowe, drób, ryby, skorupiaki). Dzielne zapotrzebowanie na ten aminokwas wynosi około 0,4-6g. Zaś spożycie argininy przez dorosłego człowieka to prawie 5,4g/dobę, co jest równoznaczne z dziennym prawidłowym popytem organizmu na ten związek [344]. Arginina może być bezpośrednim produktem wielu reakcji enzymatycznych zachodzących głównie w wątrobie oraz nerkach a także w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych. Są to przede wszystkim reakcje związane z degradacją L-cytruliny [345]. Arginina w komórkach w zależności od narządu lub tkanki ulega z różną intensywnością licznym kontrolowanym przemianom metabolicznym. Ponadto charakteryzuje się wysoką kompartmentacją, co oznacza, iż katabolizm tego aminokwasu obejmuje wiele szlaków komórkowych występujących nawet w obrębie tej samej komórki [345]. Do głównych enzymów metabolizujących L-argininę należą: syntazy tlenu azotu (NOS), arginazy 1 i 2 oraz dekarboksylaza ornitynowa (ODC) [202]. W wątrobie zachodzi reakcja degradacji argininy w cyklu mocznikowym do ornityny i mocznika z udziałem enzymu arginazy. Ornityna zaś jest prekursorem dla proliny i poliaminy, które albo pobudzają proliferację komórek błony śluzowej (ułatwienie gojenia ran; działanie korzystne) albo sprzyjają rozrostowi miocytów i przebudowie ścian naczyń (rozwój miażdżycy; działanie niekorzystne) [210]. W mózgu, wątrobie, nerkach, nadnerczach oraz jelicie cienkim za pomocą enzymu dekarboksylazy argininowej (ADC) arginina jest przekształcana do agmatyny i CO₂. Istnieje wiele niepotwierdzonych badań dotyczących biologicznych funkcji agmatyny, jako ewentualnego endogennego regulatora syntezy NO oraz inhibitora izoform NOS [104]. Przemiana argininy występuje również w nerkach i trzustce gdzie, jako substrat syntetyzowana jest przez enzymy guanidynoocjanu do jednego z ważniejszych metabolitów argininy – kreatyny [346]. Natomiast komórki śródbłonna naczyń krwionośnych (głównie) wykorzystują argininę do utworzenia tlenu azotu, spełniającego istotną rolę w wielu procesach fizjologicznych takich jak: obniżenie napięcia naczyń krwionośnych, hamowanie proliferacji miocytów i przebudowy ścian naczyń, hamowanie agregacji płytek krwi, rola neuroprzekaźnika w mózgu oraz

w obwodowym układzie autonomicznym [227]. Wraz z powstaniem NO wytwarza się również L-cytrulina. Enzymem, który metabolizuje ww. reakcję są syntazy tlenu azotu (NOS 1-3). Istnieją trzy odrębne izoformy syntazy tlenu azotu. Konstytutywne syntazy tlenu azotu takie jak: NOS-1(nNOS, neuronalna) oraz NOS-3 (eNOS, śródbłonkowa) występują tylko w niektórych komórkach organizmu np.: neurony, płytki, komórki śródbłonka, miocyty. Aktywowane są przez kompleks Ca^{2+} /kalmodulina powodując między innymi: rozkurcz mięśni gładkich lub kardioprotekcję, [288]. Natomiast indukowalna syntaza NOS-2 (iNOS) jest niezależna od napływu jonów Ca^{2+} i jest obecna w większości komórek. Indukcja tej syntazy następuje w wyniku stanu zapalnego lub w przypadku stresu oksydacyjnego powodując napływ dużej ilości tlenu azotu. Pod wpływem tlenu oraz wolnych rodników tlenowych wytwarza się wybitnie cytotoksyczny peroksyazotan, który aktywuje poli(ADP-rybozę) przyczyniając się do fragmentacji DNA oraz do apoptozy komórek [227]. Jak wykazano tlenek azotu w warunkach fizjologicznych działa na mięśnie gładkie naczyń krwionośnych poprzez aktywację fosfatazę zależną od cGMP. W następstwie powoduje relaksację mięśniówki gładkiej z jednoczesnym rozszerzeniem naczyń krwionośnych. cGMP szybko ulega rozkładowi pod wpływem swoistego enzymu 5-fosfodiesterazy (5-PDE), zaś blokery tego enzymu zwiększają efekt pobudzenia zakończeń nitregicznych potęgując rozszerzanie naczyń [176].

1.3.2. Nikotynamid

Nikotynamid (ang. *nicotinamide*; synonimy: amid kwasu nikotynowego, niacynamid), to łatwo rozpuszczalny w wodzie i alkoholu aktywny związek z grupy witamin B. Wspólnie z kwasem nikotynowym często definiowany, jako: niacyna, witamina B₃ lub PP. Jest podstawowym prekursorem do syntezy dinukleotydów: nikotynoamidoadeninowego (NAD^{+}) oraz fosforanu nikotynoamidoadeninowego ($NADP^{+}$). Przyczynia się do regulacji poziomu ww. koenzymów w komórce, które biorą udział w ponad dwustu różnych reakcjach biochemicznych głównie w reakcjach utleniająco-redukujących takich jak: wytwarzanie energii w skutek degradacji (katabolizm) węglowodanów, białek, tłuszczu i alkoholu oraz w reakcjach biosyntezy (anaboliczne) np. synteza makrocząsteczek łącznie z kwasami tłuszczowymi i cholesterolem [12, 32]. Nikotynamid po raz pierwszy został wyizolowany przez Elvehjema i wsp. z komórek wątroby psa [77]. Wykazano, że związek wraz z kwasem

nikotynowym może zapobiegać objawom pelagry (np. „czarny język”, ang. *black tongue*). Termin pelagra (z włoskiego *pelle*-skóra, *agra*-szorstkie; ang. *rough skin*) po raz pierwszy został użyty w 1771 roku przez włoskiego lekarza Frapolliniego, pomimo, że jednostka chorobowa została opisana dużo wcześniej, bo już 1762 roku przez hiszpańskiego lekarza Gaspera Casala. Jest to przewlekły wyniszczający zespół chorobowy związany z ciężkim niedoborem nikotynamidu. Obecnie pelagra występuje sporadycznie i dotyczy krajów słabo rozwiniętych, przypadków skrajnej anoreksji lub alkoholizmu, diety bogatej w nieprzetworzone lub całkowicie zmielone ziarna kukurydzy [116]. Wtórny niedobór nikotynamidu może wystąpić w wyniku chorób o podłożu nowotworowym, genetycznym (syndrom Hartnups’a) lub przy interakcjach lekowych [329]. Kliniczne symptomy pelagry to charakterystyczne 4”D’s”tzn.: zapalenie skóry (*dermatitis*), zaburzenia ze strony układu pokarmowego (biegunka; *diarrhea*), objawy neurologiczne (otępienie; *dementia*), a w bardzo zaawansowanych przypadkach śmierć (*death*). Suplementacja nikotynamidem powoduje remisję objawów choroby. Optymalne dzienne zalecane spożycie niacyny dla osoby dorosłej to od 14 do 20mg/dobę. Nikotynamid i kwas nikotynowy dostarczane są do organizmu głównie z pokarmem. Źródłem nikotynamidu są przede wszystkim produkty pochodzenia zwierzęcego (wysokobiałkowe chude mięso, wątroba, serce, drób, nerki, produkty mleczne) natomiast kwas nikotynowy dominuje w produktach roślinnych (pełne ziarna, rośliny strączkowe, migdały, grzyby, zielone warzywa liściaste) [298]. Dodatkowo kwas nikotynowy może być syntetyzowany endogennie w wątrobie z tryptofanu (Trp) za pośrednictwem szlaku kinureninowego (nawet 95% tego aminokwasu ulega przemianie za pośrednictwem tej drogi), którego punktem końcowym jest powstanie nikotynamidu [298]. Jednak wydajność tej reakcji jest stosunkowo nieefektywna, ponieważ oszacowano, iż z 60mg spożytego tryptofanu powstaje średnio 1mg kwasu nikotynowego. Dodatkowo ww. konwersja uzależniona jest między innymi od wpływu: hormonów, diety, odpowiedniego stężenia witamin B₂ (ryboflawina), B₆ (pirydoksyna), żelaza oraz od zachowania równowagi poziomu leucyny (nadmiar tego aminokwasu wiąże się ze spowolnieniem ww. procesu) [99]. Jednocześnie wykazano, iż egzogenne podanie nawet w zwiększonej dawce nikotynamidu (*per os*) i pomimo wzrostu wydalania jego metabolitów nie wpłynęło na syntezę tego związku *de novo* [88, 89]. Kwas nikotynowy i nikotynamid posiadają zbliżoną strukturę chemiczną jednak jak zaobserwowano różnice w ich działaniu farmakologicznym wydają się być znaczące. Kwas nikotynowy w sposób pośredni uczestniczy także w biosyntezie NAD⁺ jednak tylko on posiada właściwości

obniżające osoczowy poziom triglicerydów oraz lipoprotein o niskiej gęstości (LDL), VLDL i Lp(a) z równoczesnym podwyższeniem zawartości HDL. Badania eksperymentalne sugerują również, iż kwas nikotynowy w adipocytach jest agonistą dla białka G (G_i) sprzężonego z receptorem GPR109A hamując lipolizę trójglicerydów oraz obniżając stężenie wolnych kwasów tłuszczowych w osoczu [52, 66]. Natomiast nikotynamid nie obniża poziomu cholesterolu we krwi, ale również nie powoduje charakterystycznych objawów w tym zaczerwienienia twarzy i górnej partii tułowia (ang. *flushing*), jakie występują w czasie trwania terapii kwasem nikotynowym. Wydaje się, że nikotynamid jest nie tylko substratem dla NAD^+ , ale może być również kluczowym i bezpośrednim produktem degradacji tego koenzymu [24]. Dotychczasowe badania wskazały, iż w szlaku NAD^+ - nikotynamid zaangażowane są, co najmniej cztery klasy enzymów metabolizujących takich jak: mono-ADP-rybozylotransferaza (ARTC), polimeraza poli(ADP-rybozy) (PARP lub ARTD), cyklaza ADP-rybozy oraz sirtuiny. Opisywane reakcje katalizowane przez te enzymy mogą uczestniczyć w wielu niezbędnych procesach fizjologicznych między innymi: sygnalizacji komórkowej, transkrypcji, regulacji apoptozy, naprawy DNA, różnicowania komórek, utrzymywania stabilności genomu lub ograniczenie procesu starzenia komórek [123, 132]. Wnioskowano, iż w stanach patologicznych modulowanie aktywności ww. enzymów mogłoby przyczynić się do wielu zaburzeń. Po podaniu zewnętrznym nadmiar nikotynamidu jest metabolizowany w wątrobie głównie w wyniku reakcji metylacji przy udziale N-metylotransferazy (NNMT) z wytworzeniem N-metylonikotynamidu (NMN; MetNA, NMN^+), a następnie w wyniku utlenienia NMN (oksydaza aldehydowa) do N1-metylo-2-pirydono-5-karboksyamid (2-PYR, Met2PY, 2PY) oraz do N1-metylo-4-pirydonu-5-karboksyamid (2-PYR, Met4PY, 4PY). Drugim metabolitem nikotynamidu utlenianym przez cytochrom P450 jest N-tlenek nikotynamidu oraz 6-hydroksynikotynamid [249]. Są to końcowe produkty degradacji nikotynamidu, które wydalane są z moczem. Zaobserwowano, iż metylacja nikotynamidu może być procesem ochronnym, ponieważ nadczynność tego szlaku z równoczesnym wydzielaniem metabolitów z moczem w wyniku np. marskości wątroby zapobiega przed toksycznym wpływem wewnątrzkomórkowej akumulacji nikotynamidu wynikającej ze stanu katabolicznego wątroby [241]. Jak wynika z przeprowadzonych badań w organizmie ssaków nie występuje szlak syntezy nikotynamidu do kwasu nikotynowego [111].

2. CEL PRACY

Głównym celem przedstawionej pracy było:

- 1.** Ocenic wpływ diety w monoterapii lub w terapii skojarzonej z zastosowaniem suplementów L-argininy oraz nikotynamidu na parametry hemodynamiczne mięśnia sercowego w trakcie rozwoju tętniczego nadciśnienia płucnego u samców i samic szczura.
- 2.** Porównac jak tętnicze nadciśnienie płucne wpływa na kurczliwość mięśnia brodawkowatego serca podczas pobudzenia układu adrenergicznego u szczurów w zależności od płci oraz suplementacji L-argininą i nikotynamidem.
- 3.** Przeprowadzić analizę obrazu histologicznego i morfometrycznego w grupach kontrolnych oraz w grupach suplementowanych L-argininą i nikotynamidem w tętnicznym nadciśnieniu płucnym indukowanym monokrotaliną.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Materiał

3.1.1. Zwierzęta doświadczalne

Badania wykonano za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach nr 3 z siedzibą przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (*nr opinii 14/2013*). Główną procedurę eksperymentalną przeprowadzono na 96 szczurach typu Wistar, obu płci o początkowej masie ciała 198 ± 3 g. Zwierzęta przebywały w kontrolowanych, stałych warunkach bytowych: temperatura 23 ± 2 °C, wilgotność względna $53 \pm 2\%$, z zachowaniem 12 godzinowego cyklu oświetleniowego, po 2 zwierzęta w klatce, osobno samce, osobno samice. W czasie tygodniowej adaptacji zwierzęta otrzymywały standardową paszę i wodę *ad libitum*. Następnie szczury podzielono na 8 grup i w sposób randomizowany przyporządkowano do odpowiednich diet (Tabela 1).

Tabela 1. Podział szczurów na grupy

| Lp. | NAZWA GRUPY | STOSOWANE DIETY | SYMBOL GRUPY | |
|-----|--------------------------|--|------------------------------------|------------------------------------|
| | | | ♂ SAMIEC | ♀ SAMICA |
| 1. | Kontrola | • Pasza kontrolna AIN93G (<i>p.o.</i>) • Woda (<i>p.o.</i>) | MC (n = 6) | FC (n = 6) |
| 2. | L-ARG | • Pasza kontrola AIN93G (<i>p.o.</i>) • L-arginina (2,5% w wodzie; <i>p.o.</i>) | MArg (n = 6) | FArg (n = 6) |
| 3. | NCA | • Nikotynamid (500mg/kg paszy; <i>p.o.</i>) • Woda (<i>p.o.</i>) | MNca (n = 6) | FNca (n = 6) |
| 4. | L-ARG + NCA | • Nikotynamid (500mg/kg paszy; <i>p.o.</i>) • L-arginina (2,5% w wodzie; <i>p.o.</i>) | MArg + Nca (n = 6) | FArg + Nca (n = 6) |
| 5. | PAH | • Pasza kontrolna AIN93G (<i>p.o.</i>) • Woda (<i>p.o.</i>) | MPAH (n = 6) | FPAH (n = 6) |
| 6. | PAH + L-ARG | • Pasza kontrola AIN93G (<i>p.o.</i>) • L-arginina (2,5% w wodzie; <i>p.o.</i>) | MPAH + Arg (n = 6) | FPAH + Arg (n = 6) |
| 7. | PAH + NCA | • Nikotynamid (500mg/kg paszy; <i>p.o.</i>) • Woda (<i>p.o.</i>) | MPAH + Nca (n = 6) | FPAH + Nca (n = 6) |
| 8. | PAH + L-ARG + NCA | • Nikotynamid (500mg/kg paszy; <i>p.o.</i>) • L-arginina (2,5% w wodzie; <i>p.o.</i>) | MPAH + Arg + Nca (n = 6) | FPAH + Arg + Nca (n = 6) |

3.1.2. Diety

Jako dietę standardową zastosowano paszę AIN 93G dla gryzoni, przygotowaną przez firmę ssniff®Spezialdiäten GmbH, Soest, Niemcy, według standardów Amerykańskiego Instytutu Żywienia (AIN). Dieta pokrywała dzienne zapotrzebowanie zwierząt na wszystkie składniki odżywcze, zawierała zalecany poziom nikotynamidu dla szczurów w ilości 29 mg/kg oraz 0,63% L-argininy w paszy [219, 251].

W celu uzyskania diety bogatej w nikotynamid, paszę kontrolną AIN 93G uzupełniono dodatkowo 17-krotnie wyższą dawką nikotynamidu od zalecanej. Wzbogacona dieta zawierała 500mg nikotynamidu/kg paszy [199]. Wyżej wymienioną dietę przygotowano w firmie ssniff®Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany. Dieta bogata w L-argininę, zawierała 2,5% roztwór L-argininy (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) w wodzie do picia i wynosiła 4-krotność zalecanej dawki dla szczura [211]. Suplementacja bogata w nikotynamid oraz L-argininę została ustalona w oparciu o dane literaturowe [2, 13, 81, 129, 135, 297] i nie przekraczała poziomu toksyczności związków dla zwierząt [38, 219, 343].

Szczury w trakcie procedury eksperymentalnej posiadały wolny dostęp do paszy i wody. Stopień spożycia pokarmu mierzono co drugi dzień, ważąc butelkę z wodą lub ilość zjedzonej paszy. Średnie spożycie dzienne L-argininy lub nikotynamidu oszacowano dzieląc zmierzoną zmianę wody lub paszy obecnej w butelce lub w karmniku przez ilość dni od ostatniego pomiaru oraz przez ilość zwierząt w klatce. Zużycie L-argininy ($\text{g kg}^{-1}\text{dzień}^{-1}$) = $\text{dzienne zużycie wody} \times \text{stężenie L-argininy w wodzie/masę ciała szczura}$ [82]. Adekwatne wyliczenie zastosowano w przypadku nikotynamidu.

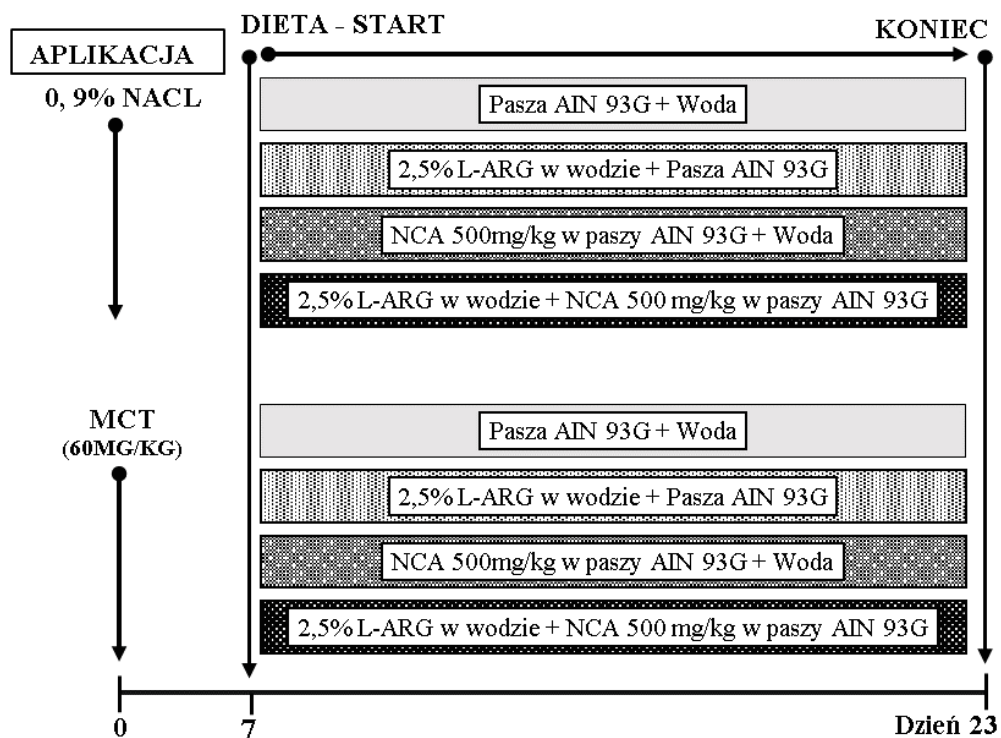
3.1.3. Indukcja tętniczego nadciśnienia płucnego

W celu wywołania tętniczego nadciśnienia płucnego (PAH) podano w jednorazowym wstrzyknięciu podskórnym (*s.c.*) roztwór monokrotaliny (MCT; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) w dawce 60 mg/kg m.c. Monokrotalinę rozpuszczono w 1N HCl, doprowadzono do pH 7,4 za pomocą 1N NaOH. Mieszaninę MCT sporządzono w oparciu o dane literaturowe [170, 217, 348].

3.1.4. Protokół doświadczenia

W pierwszym etapie eksperymentu, w dniu 0, grupom obu płci: PAH, PAH+L-ARG, PAH+NCA oraz PAH+L-ARG+NCA, podano pojedynczą dawkę monokrotaliny (60mg/kg m.c. s.c.). Pozostałe grupy otrzymały jednorazowo równą objętość 0,9% roztworu chlorku sodu (1ml/kg m.c. s.c.) [154]. Do dnia 7, zwierzęta karmiono standardową paszą i wodą. W drugim etapie doświadczenia (dzień 7), szczurom włączono diety przyporządkowane dla poszczególnych grup (Tabela 1). Procedura przebiegała do 23 dnia od aplikacji MCT. Metodyka eksperymentalna została przedstawiona na Schemacie 1.

Schemat 1. Procedura doświadczenia



3.2. Metody

3.2.1. Pomiar kurczliwości mięśnia brodawkowego

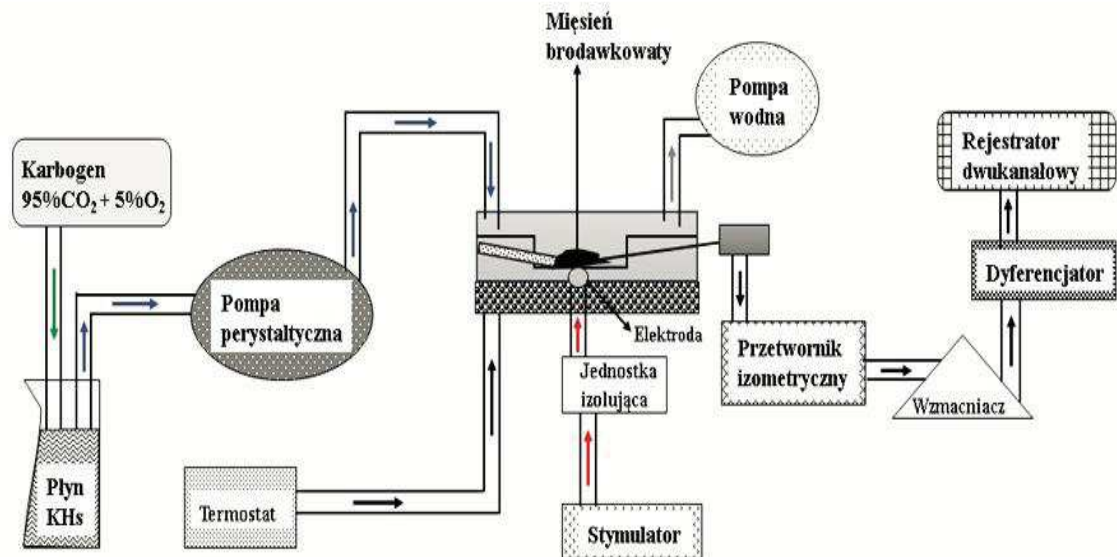
Układ aparatury eksperymentalnej przedstawiono na Schemacie 2. Zastosowana metoda jest modyfikacją metody opracowanej przez Reitera [151, 152]. Zwierzęta doświadczalne usypiano przez przedawkowanie pentobarbitalu (60mg/kg m.c. *i.p.*). Następnie otwierano klatkę piersiową na wysokości wyrostka mieczykowego i pobierano kurczące się serce. Serce umieszczano w naczyniu do preparowania wypełnionym zmodyfikowanym płynem Krebsa-Henseleita (KHs) zawierającym milimolowe stężenia soli rozcieńczonych w wodzie destylowanej, o następującym składzie: NaCl 120.4; KCl 4.9; MgCl₂ x 6H₂O 0.6; CaCl₂ 2.5; NaH₂PO₄ x H₂O 1.0; NaHCO₃ 15.3; glukoza 11.5; pirogronian sodu 2.0. Płyn KHs napowietrzano mieszaniną gazową zawierającą 95% O₂ i 5% CO₂. Roztwór schładzano do temperatury 12°C±2, co pozwoliło na bezpieczne zahamowanie skurczu serca oraz usunięcia skrzeplin krwi [341]. Następnie, jak najszybciej wyizolowywano mięsień brodawkowy z prawej komory serca o długości powyżej 3 mm i średnicy poniżej 1 mm. Wypreparowany mięsień brodawkowy umieszczano w naczyniu inkubacyjnym o pojemności 2 ml (Steiert Organ Bath, typ 813, DC Temperature Controller, typ 319, Hugo Sachs Elektronik, Niemcy), który perfundowano płynem KHs. Przez cały okres eksperymentu utrzymywano stały przepływ 8 ml/min, za pomocą pompy perystaltycznej (typ 371, Unipan, Polska), stałą temperaturę roztworu na poziomie 37°C±0,5 roztwór nasycano karbogenem, dzięki czemu otrzymywano pH płynu zbliżonym do fizjologicznego (pH 7,4). W celu uzyskania maksymalnej siły skurczu, mięsień brodawkowy wstępnie obciążano (4mN±0,12; 1mN=0,1g). Mięsień brodawkowy znajdował się w kontakcie z dwiema srebrnymi elektrodami, dzięki którym pobudzano mięsień prądem prostokątnym o częstotliwości 1 Hz, czasie trwania impulsu 3ms, długości cyklu podstawowego 2000ms, amplitudzie 20% powyżej napięcia progowego (0,6V±0,3) generowanej przez stymulator z jednostką izolującą (ST-02, Experimentia, Węgry). Za pomocą przemiennika izometrycznego (F-30, HSE, Niemcy) i dyferencjatora z mostkiem pomiarowym typu 336 (HSE, Niemcy) połączonym z dwukanałowym rejestratorem liniowym (Model 202, Cole-Parmer, Stany Zjednoczone), mierzono następujące parametry:

- siłę skurczu (Fc),
- szybkość skurczu (+dF/dt),

- szybkość rozkurczu ($-dF/dt$).

Do każdego eksperymentu przystępowano po wstępnej stabilizacji mięśnia brodawkowatego trwającej 60 minut.

Schemat 2. Układ aparatury



3.2.2. Badanie wpływu aminy sympatomimetycznej na kurczliwość mięśnia brodawkowatego.

Po 60 minutowej stabilizacji mięśnia brodawkowatego za pomocą noradrenaliny badano wpływ pobudzenia receptorów α oraz β adrenergicznych na siłę skurczu oraz szybkość skurczu i rozkurczu mięśnia u szczurów obu płci, które otrzymywały suplementy diety w trakcie rozwoju tętniczego nadciśnienia płucnego. Noradrenalinę rozpuszczano w wodzie destylowanej, a następnie podawano w stężeniach od 0,1 do 100 μ M. Okres inkubacji mięśnia brodawkowatego w poszczególnych stężeniach noradrenaliny wynosił 5 minut, dzięki temu osiągnęto maksymalne działanie leku. Po tym czasie oceniano ww. parametry. Za kontrolę w każdym przypadku przyjmowano zmodyfikowany płyn KHs, a stężenie dla noradrenaliny nie przekraczało 0,1% całej objętości roztworu i nie wpływało na pomiar poszczególnych parametrów.

3.2.3. Procedura histopatologiczna i pomiar morfometryczny tętnic płucnych

W celu obiektywizacji zmian naczyniowych będących skutkiem tętniczego nadciśnienia płucnego, jak również skuteczności zastosowania obu diet, przeprowadzono ocenę histopatologiczną wraz z pomiarem morfometrycznym tętnic płucnych. Z grupy kontrolnej oraz z grup badawczych wyodrębniono od 3 do 6 zwierząt wg Tabeli 2. W czasie procedury histologicznej zrezygnowano z 21 przypadków, ponieważ stwierdzono nieprawidłowości związane z błędnym pobraniem materiału biologicznego. Analiza materiału obejmowała całość tkanki płucnej, a nie tylko wybranych miejsc i opierała się na ocenie jakościowej oraz na pomiarze ilościowym danych preparatów.

Tabela 2. Ilość przypadków wybranych do badań histopatologicznych i morfometrycznych

| NAZWA GRUPY | ILOŚĆ PRZYPADKÓW W GRUPIE | | SYMBOL DO DOKUMENTACJI FOTOGRAFICZNEJ |
|----------------------|------------------------------|----------|--|
| | ♂ SAMIEC | ♀ SAMICA | |
| Kontrola | 4 | 4 | A |
| PAH | 3 | 4 | B |
| L-ARG | 5 | 5 | C |
| PAH+L-ARG | 4 | 5 | D |
| NCA | 5 | 5 | E |
| PAH+NCA | 6 | 4 | F |
| L-ARG+NCA | 4 | 6 | G |
| PAH+L-ARG+NCA | 6 | 5 | H |

Od każdego zwierzęcia pobierano płuca, które po wyjęciu z klatki piersiowej zabezpieczano za pomocą utrwalenia w czystym roztworze wodnym 8% zbuforowanej formaliny przez minimum 7 dni. Płuca obciążano za pomocą skrawków ligniny, dzięki czemu tkanka nie unosiła się swobodnie na powierzchni utrwalacza i nie uległa procesom gnilnym. Po tym czasie, narząd płukano w wodzie bieżącej, odsączano i przeprowadzano w procesorze tkankowym (Citadel 2000, Shandon, Thermo Electron Corporation, Wielka

Brytania) przez szeregi alkoholu etylowego, acetonu, ksylenu oraz parafinę o temperaturze topnienia $57^{\circ}\text{C}\pm 1$. Następnie zatapiano w bloczki parafinowe. Mikrotomem saneczkowym (Slide 2003, pfm medical ag, Niemcy) krojono po sześć skrawków o grubości $1,5\mu\text{m}$ z każdego wyznaczonego przypadku i nanoszono na szkiełka podstawowe. Następnie, skrawki odparafinowano, poddano procedurze uwodnienia i przystępowano do procedury rutynowego barwienia hematoksyliną Mayera, później eozyną (H+E). Po przeprowadzeniu barwienia, szkiełka z materiałem odwadniano za pomocą malejącego szeregu alkoholi, fenolu, ksylenu i zamykano szkiełkiem przykrywkowym. Preparaty histologiczne oceniano pod mikroskopem świetlnym (Carl Zeiss, typ JenaMed, Niemcy), posiadający okular 10x i obiektywy 10x, 20x oraz 40x, które powiększały odpowiednio 100x, 200x i 400x. Ogólna interpretacja morfologiczna składała się z minimum 15 pól widzenia przekroju poprzecznego każdego z sześciu skrawków w danym przypadku i obejmowała cechy strukturalne, a także dodatkowe zmiany histologiczne pomocne w diagnostyce. Analiza morfometryczna preparatów histologicznych została przeprowadzona w powiększeniu 400x z wykorzystaniem zestawu zawierającego mikroskop świetlny, kamerę cyfrową (Olympus, typ DP21, Japonia) oraz komputer posiadający oprogramowanie (cell[®]Sens Standard 1.7, Olympus, Japonia) służącym do cyfrowego pomiaru obrazu histologicznego. Losowo dokonywano wyboru dwóch rodzajów tętnic płucnych tj.: dystalnych tętniczek znajdujących się w otoczeniu pęcherzyków płucnych (średnica naczyń od 30 do $100\mu\text{m}$) oraz tętnic występujących przy oskrzelikach (średnica naczyń od 100 do $200\mu\text{m}$). Następnie przeprowadzano pomiary na grubość ściany danej tętniczki w niżej wymieniony sposób: od wewnętrznego światła naczynia do ściany zewnętrznej naczynia, w dwóch miejscach: najgrubszym i najcieńszym. W sumie analiza morfometryczna obejmowała serię 20 pomiarów w każdym wyznaczonym przypadku. Na końcu całego postępowania histopatomorfometrycznego sporządzano dokumentację fotograficzną.

3.2.4. Pomiar masy ciała i masy serca

Wszystkie zwierzęta kontrolne oraz doświadczalne były ważone na początku eksperymentu (Dzień 0), po czternastym dniu od aplikacji 0,9% NaCl i monokrotaliny (Dzień 14) oraz w dniu zakończenia doświadczenia (Dzień 23). Zmiana wagi ciała była kontrolowana i zapisywana. Zebrane wyniki stabelaryzowano i obliczono średnią masę ciała zwierząt z każdego obserwowanego okresu.

W celu oceny stopnia przerostu prawej komory serca w każdym przypadku, po wyizolowaniu mięśnia brodawkowatego, serce dzielono na dwie części: wolną ścianę prawej komory serca (RV) oraz wolną ścianę lewej komory (LV) wraz z przegrodą serca (S), każdą część osobno ważono. Następnie określano wskaźnik progresji prawej komory serca: $RV/(LV+S)$, który jest niezależny od masy ciała [23, 79, 90]. Oceniano zależność ciężaru poszczególnych komór do końcowej masy ciała (FBW), jako wyznacznika przerostu każdej z komór serca: dla prawej komory (RV/FBW), dla lewej komory z przedsionkiem ($LV+S/FBW$). Dodatkowo dokonywano pomiaru całkowitej wagi serca do końcowej masy ciała (HW/FBW).

3.2.5. Pomiar stężenia nikotynamidu w osoczu

W celu określenia skuteczności podaży diet, oznaczono poziom nikotynamidu i jego metabolitów (Met-2PY, Met-4PY, 4-PYP, Met-NA) w osoczu. Pomiary dokonywano przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją masową (LC/MS). Poziom nikotynamidu zbadano u szczurów obu płci po 23 dniach trwania eksperymentu w następujących grupach: kontrolnej, karmionych nikotynamidem bez i w indukowanym tętnicznym nadciśnieniu płucnym. Próbkę krwi pobierano z tętnicy udowej uśpionych pentobarbitem zwierząt do probówki zawierającej cytrynian (v/v 9:1). Następnie probówki wirowano (3000g) przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Otrzymane osocze przechowywano w temperaturze -80°C do momentu oznaczeń. Procedurę oznaczeń zrealizowano według wcześniej opracowanej metody [287].

Poziom L-argininy w osoczu nie oznaczono, ponieważ suplementacja tego związku była zgodna z poprzednio opisywanymi procedurami przedstawionymi w literaturze [184, 252].

3.3. Substancje farmakologiczne wykorzystane w doświadczeniach

- L-arginina, monokrotalina, noradrenalina zostały zakupione w firmie Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Stany Zjednoczone;
- Płyn Krebsa-Henselaita został sporządzony przy użyciu związków zakupionych w firmie POCH, Gliwice, Polska;
- Morbital zakupiono w firmie Biowet, Puławy, Polska;
- 0,9% roztwór soli fizjologicznej został zakupiona w firmie Polpharma S.A., Starogard Gdański;
- Nikotynamid, który dodano do paszy AIN 93N, został zakupiony od firmy ssniff®Spezialdiäten GmbH, Soest, Niemcy;
- Pasza AIN 93N została zakupiona od firmy ssniff®Spezialdiäten GmbH, Soest, Niemcy;
- Woda destylowana wykorzystywana do sporządzania roztworów, została otrzymana przez filtrację przy użyciu filtrów Milli-RO w aparacie Millipore zakupionego w firmie Merck Millipore, Darmstadt, Niemcy.

3.4. Analiza statystyczna

Siłę skurczu (F_c) przedstawiono w mN ($1g=1mN$), a szybkość skurczu ($+dF/dt$) oraz rozkurczu ($-dF/dt$) w mN/s. Poziom nikotynamidu w osoczu wyrażono w $\mu\text{mol/L}$. Pomiar morfometryczny wyrażono w μm .

Każdy wynik eksperymentu sformułowano, jako średnia arytmetyczna \pm średni błąd standardowy (SEM). Krzywe stężenie-odpowiedź analizowano za pomocą standardowego oprogramowania komputerowego Pharm/PCS wersja 4.0. Różnica między średnimi wartościami dla danych zgrupowanych określano za pomocą testu *t*-Studenta. Do analizy statystycznej zastosowano metodę analizy wariancji (test ANOVA) uzupełniony testem post-hoc z wielokrotnym porównaniem (test Newman-Keuls).

Za istotne statystycznie przyjmowano wartości przy $P<0,05$.

4. WYNIKI

4.1. Ocena stanu przyjmowania diety

W trakcie 23 dni trwania eksperymentu wszystkie zwierzęta miały swobodny dostęp do paszy i wody.

4.1.1. Dzielne średnie spożycie paszy i wody po zastosowaniu L-argininy i nikotynamidu u samców i samic szczura bez lub z indukowanym tętnicznym nadciśnieniem płucnym.

U samców zaobserwowano, że średnie spożycie paszy w grupie kontrolnej ($20,0 \pm 0,72$ g) oraz w grupie przyjmującej L-argininę ($20,18 \pm 0,64$ g) było istotnie statystycznie wyższe w porównaniu do grup: NCA ($16,91 \pm 0,8$ g), PAH ($17,54 \pm 0,39$ g) oraz PAH+L-ARG ($16,63 \pm 0,66$ g). Natomiast łączne podawanie obu diet w tętnicznym nadciśnieniu płucnym (PAH+L-ARG+NCA: $19,36 \pm 0,38$ g) spowodowało istotny statystycznie wzrost średniego spożycia paszy w porównaniu z grupami NCA ($P < 0,05$) oraz PAH+L-ARG ($P < 0,05$) (Wykres 1 w Załączniku).

U samic nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w średnim spożyciu paszy i wody między grupami. Warto jednak zauważyć, że poziom spożywanej paszy u samic traktowanych monokrotaliną wykazywał tendencję spadkową (PAH: $13,45 \pm 0,37$; PAH+L-ARG: $13,81 \pm 0,37$; PAH+NCA: $13,86 \pm 0,95$; PAH+L-ARG+NCA: $13,63 \pm 0,45$ g) w porównaniu do grup bez nadciśnienia płucnego (Kontrola: $16,6 \pm 0,93$; L-ARG: $14,54 \pm 0,43$; NCA: $15,59 \pm 1,25$; L-ARG+NCA: $13,45 \pm 0,43$ g) (Wykres 1 w Załączniku).

4.1.2. Dzielne średnie spożycie L-argininy i nikotynamidu u samców i samic szczura bez lub z indukowanym tętnicznym nadciśnieniem płucnym

W tabeli 3 przedstawiono średnie dzienne spożycie L-argininy (g) i nikotynamidu (mg) w pożywieniu/kg m.c./dzień w grupach zwierząt obu płci suplementowanych dietą bogatą w badane związki.

W grupach zwierząt obu płci otrzymujących L-argininę oraz suplementowanych L-argininą w tętnicznym nadciśnieniem płucnym nie zaobserwowano istotnej statystycznie różnicy w średniej dziennej ilości spożywanej diety.

Średnie dzienne spożycie nikotynamidu u samców PAH+NCA oraz PAH+L-ARG+NCA statystycznie istotnie wzrosło odpowiednio o 26,83% oraz 28,25% w porównaniu do grupy NCA oraz odpowiednio o 14,85% i 16,14% w porównaniu do grupy L-ARG+NCA. Dodatkowo zaobserwowano, że spożycie nikotynamidu w grupie L-ARG+NCA było także istotne statystycznie wyższe ($P < 0,05$) w porównaniu z grupą samców NCA.

Przeciwnie, u samic pomimo tendencji spadkowych w dziennym spożyciu nikotynamidu w grupach z tętnicznym nadciśnieniem płucnym nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w porównaniu z grupami NCA oraz L-ARG+NCA (Tabela 3).

Tabela 3. Dzielne średnie spożycie L-argininy (L-ARG) i nikotynamidu (NCA) w grupach samców (♂) i samic (♀) szczura suplementowanych L-argininą i nikotynamidem bez lub z indukowanym tętnicznym nadciśnieniem płucnym (PAH); ANOVA + test Newman-Keuls; wartości przedstawiono, jako średnia ± SEM.

(♂) Samiec – *** - $P < 0,001$ lub * - $P < 0,05$ vs. NCA; ## - $P < 0,01$ vs. L-ARG+NCA;

(♀) Samica – NS.

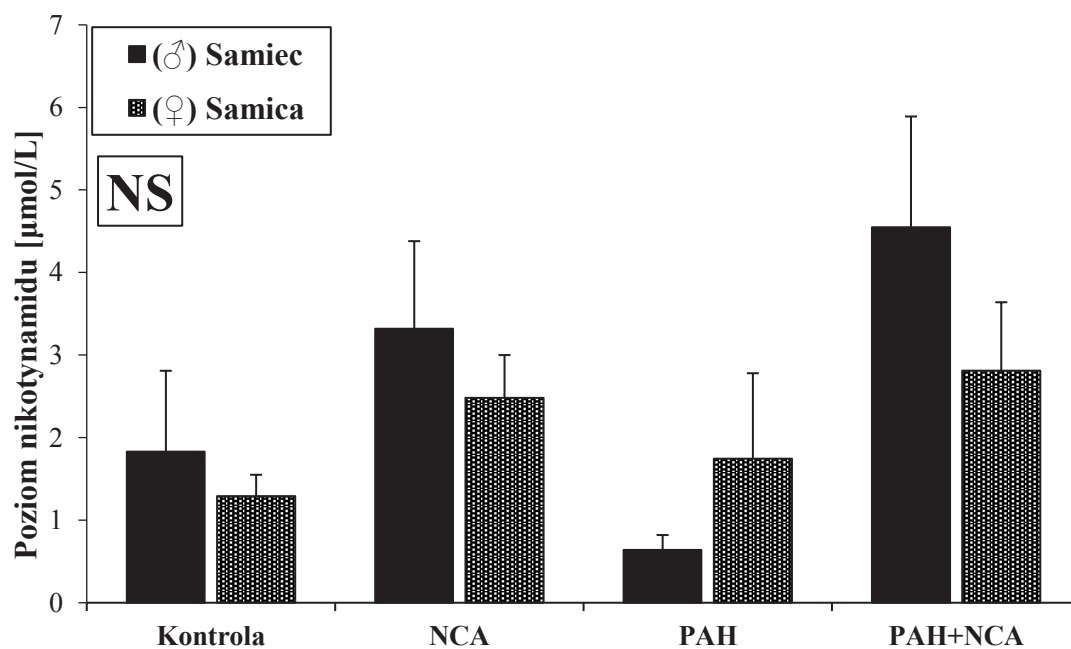
| NAZWA GRUPY | ♂SAMIEC | ♀SAMICA |
|---|----------------------------|------------|
| Spożycie L-argininy [g/kg/dzień] | | |
| L-ARG | 1,905±0,038 | 1,87±0,053 |
| L-ARG+NCA | 1,908±0,043 | 1,82±0,068 |
| PAH+L-ARG | 1,81±0,156 | 1,72±0,147 |
| PAH+L-ARG+NCA | 1,98±0,11 | 1,77±0,116 |
| Spożycie nikotynamidu [mg/kg/dzień] | | |
| NCA | 24,63±0,94 | 31,72±2,19 |
| L-ARG+NCA | 27,20±0,54* | 30,52±1,6 |
| PAH+NCA | 31,24±0,77*** ## | 27,71±1,89 |
| PAH+L-ARG+NCA | 31,59±0,83*** ## | 28,0±0,59 |

4.2. Ocena stężenia nikotynamidu w osoczu u samców i samic szczura po zastosowaniu diety bogatej w nikotynamid bez lub z indukowanym tętnicznym nadciśnieniu płucnym.

Analiza stężenia nikotynamidu (Wykres 2) w osoczu samców i samic szczura w grupach z lub bez tętniczego nadciśnienia płucnego wykazała, iż pomimo tendencji wzrostu stężenia NCA w grupach suplementowanych doustnie nikotynamidem w dawce 500mg/kg paszy (grupa NCA oraz grupa PAH+NCA) nie stwierdzono różnic w poziomie nikotynamidu między badanymi grupami.

Tabela 4 (w Załączniku) przedstawia stężenia metabolitów nikotynamidu w osoczu szczura obu płci bez lub z tętnicznym nadciśnieniem płucnym po suplementacji NCA. W grupach samców i samic otrzymujących nikotynamid (NCA oraz PAH+NCA) zaobserwowano istotnie statystyczny wzrost poziomu ($P < 0,05-0,001$) badanych metabolitów nikotynamidu (Met-NA, Met2PY oraz Met4PY) w porównaniu do wyników uzyskanych w grupie kontrolnej oraz w grupie z PAH. Natomiast poziom parametru 4PYR w osoczu nie różnił się istotnie statystycznie w żadnej z badanych grup obu płci ($P=NS$).

Wykres 2. Stężenie nikotynamidu w osoczu u samców i samic szczura bez lub z indukowanym tętnicznym nadciśnieniem płucnym (PAH) po zastosowaniu diety bogatej nikotynamid (NCA); ANOVA + test Neuman-Keules; wartości statystycznie nieistotne (NS) przedstawiono, jako średnia \pm SEM.



4.3. Ocena masy ciała oraz masy serca

4.3.1. Przyrost masy ciała (BW) po stosowaniu L-argininy i nikotynamidu u samców (♂) i samic (♀) szczura bez lub z indukowanym tętnicznym nadciśnieniem płucnym

Początkowa średnia masa ciała wszystkich zwierząt (Dzień 0) utrzymywała się w zbliżonym zakresie i wynosiła: dla samców 200 ± 2 g dla samic 196 ± 2 g. W ciągu 23 dni eksperymentu wszystkie szczury obu płci przybierały stopniowo na wadze, ale w porównaniu z grupą kontrolną oraz z grupami otrzymującymi same suplementy diety, masa ciała zwierząt potraktowanych monokrotaliną była hamowana od 14 do 23 dnia badania.

U samców przewlekłe podawanie L-argininy, nikotynamidu oraz łączne podawanie L-argininy z nikotynamidem nie wpłynęło na przyrost masy ciała zwierząt w czasie 23 dni trwania eksperymentu.

Natomiast tętniczne nadciśnienie płucne (grupa MPAH) spowodowało statystycznie istotne zmniejszenie przyrostu masy ciała już w 14 dniu eksperymentu odpowiednio o 9,93%, 10,4%, 9,03% oraz 8% ($P < 0,001$ lub $P < 0,01$) w porównaniu do grup MC, MArg, MNca oraz MArg+Nca. Istotnie statystycznie obniżenie masy ciała w grupie z PAH utrzymywała się do 23 dnia eksperymentu i wynosiło odpowiednio 17%, 18,8%, 18,34% oraz 17,7% ($P < 0,001$) w porównaniu do grup MC, MArg, MNca i MArg+Nca.

Natomiast podawanie L-argininy, nikotynamidu oraz skojarzonych diet w tętnicznym nadciśnieniu płucnym spowodowało istotne statystycznie podwyższenie wagi ciała już w 14 dniu badania (różnica między porównanymi grupami wynosiła odpowiednio 5,12%, 4,6% oraz 2,85%) w porównaniu do grupy z MPAH ($P < 0,05$ - $0,001$). Podobnie w dniu 23 stwierdzono znamienne statystycznie wzrost BW ($P < 0,001$) w grupach MPAH+Arg, MPAH+Nca oraz MPAH+Arg+Nca odpowiednio o 16,23%, 9,6% oraz 11% w porównaniu do grupy MPAH.

Pomimo skuteczności zastosowania diet z dodatkiem L-argininy, nikotynamidu oraz połączenia diet w tętnicznym nadciśnieniu płucnym, odnotowano istotny statystycznie spadek masy ciała samców ($P < 0,05$ - $0,001$) od 14 dnia (średnie zmniejszenie przyrostu masy ciała o od 3% do 6%) do 23 dnia (średnio o od 9% do 11%) eksperymentu

w porównaniu do grupy kontrolnej i grup otrzymujących suplementy diety bez PAH (Wykres 3 w Załączniku).

U samic zaobserwowano, iż w 14 dniu doświadczenia zastosowane diety z dodatkiem L-argininy i nikotynamidu u wszystkich badanych grupach spowodowało istotny statystycznie spadek przyrostu masy ciała odpowiednio dla: FArg: 6%; FNca: 4,6%; FArg+Nca: 3,3%; FPAH: 9,3%; FPAH+Arg: 4,8%; FPAH+Nca: 6,4% oraz FPAH+Arg+Nca: 8,19% w porównaniu do grupy kontrolnej ($P < 0,05-0,001$).

Podobnie, w 23 dniu eksperymentu stwierdzono znamienne statystycznie spadek masy ciała samic dla grup odpowiednio dla: FArg: 6,17%; FNca: 9%; FArg+Nca: 5,86%; FPAH: 10,11%; FPAH+Arg: 7,09%; FPAH+Nca: 8,45% oraz FPAH+Arg+Nca: 10,12% w porównaniu do zwierząt z grupy kontrolnej ($P < 0,001$).

Dodatkowo, masa ciała zwierząt w grupach FPAH oraz FPAH+Arg+Nca statystycznie istotnie zmalała ($P < 0,05-0,001$) w porównaniu do grup FNca oraz FArg+Nca (Wykres 4 w Załączniku).

4.3.2. Parametry przerostu prawej komory serca po stosowaniu

L-argininy i nikotynamidu u samców i samic szczura bez i z indukowanym tętnicznym nadciśnieniem płucnym

MASA PRAWEJ KOMORY SERCA (RV)

U zwierząt obu płci, pojedyncza aplikacja monokrotaliny spowodowała, statystycznie istotny wzrost ($P<0,001$) końcowej masy RV w porównaniu do pozostałych grup eksperymentalnych. Zastosowane diety statystycznie znamienne obniżyły masę prawej komory serca u samców ($P<0,001$) i samic ($P<0,001$) szczura w porównaniu z grupą PAH.

U samców L-arginina w tętnicznym nadciśnieniu płucnym zaobserwowano nieznacznie, ale statystycznie istotne obniżenie ($P<0,01$) masy RV w porównaniu do grupy PAH. Wykazano również istotny przerost masy prawej komory serca w grupie PAH+L-ARG w odniesieniu do grup: Kontrola ($P<0,001$); L-ARG+NCA ($P<0,01$), L-ARG, NCA, PAH+NCA oraz PAH+L-ARG+NCA ($P<0,05$).

U samic zaobserwowano istotny statystycznie przerost ($P<0,05$) prawej komory serca w grupie PAH+NCA w porównaniu do grupy kontrolnej, L-ARG oraz PAH+L-ARG+NCA (Wykres 5).

PRZEROST PRAWEJ KOMORY SERCA WYRAŻONY, JAKO STOSUNEK MASY PRAWEJ KOMORY SERCA DO LEWEJ KOMORY Z PRZEGRODĄ SERCA (RV/LV+S)

Wskaźnik przerostu prawej komory serca, jako parametr RV/LV+S tzw. indeks Flutona, stanowi wyznacznik, który jest niezależny od końcowej masy ciała.

U samców podawanie diety z dodatkiem L-argininy i/lub nikotynamidu w tętnicznym nadciśnieniu płucnym znamienne statystycznie obniżyło wskaźnik RV/LV+S w porównaniu do grupy PAH ($0,46\pm 0,016g$). Wskaźnik RV/LV+S wynosił odpowiednio dla grup: PAH+L-ARG: $0,33\pm 0,026g$; PAH+NCA: $0,25\pm 0,01g$; PAH+L-ARG+NCA: $0,29\pm 0,006g$.

W grupach samców otrzymujących diety eksperymentalne bez PAH parametr RV/LV+S wynosił odpowiednio: L-ARG: $0,29 \pm 0,026$ g; NCA: $0,25 \pm 0,006$ g oraz L-ARG+NCA: $0,26 \pm 0,04$ g i nie różnił się statystycznie znamienne w porównaniu do kontroli ($0,24 \pm 0,008$ g) (Wykres 6).

W grupie samic wskaźnik RV/LV+S w tętnicznym nadciśnieniu płucnym ($0,63 \pm 0,03$ g) istotnie statystycznie wzrósł w porównaniu do grup: PAH+L-ARG: $0,31 \pm 0,05$ g; PAH+NCA: $0,3 \pm 0,018$ g oraz PAH+L-ARG+NCA: $0,24 \pm 0,008$ g.

U samic za normę przyjmuje się wartość grupy kontrolnej, która wynosiła $0,23 \pm 0,006$ g. Nie odnotowano statystycznie istotnych zmian dla każdej z grup u samic otrzymujących diety z dodatkiem L-argininy i/lub nikotynamidu bez tętniczego nadciśnienia płucnego (Wykres 6).

STOSUNEK MASY PRAWEJ KOMORY SERCA DO KOŃCOWEJ MASY CIAŁA (RV/FBW)

Parametr RV/FBW statystycznie istotnie wzrósł w grupach z PAH u samców ($P < 0,001$) i samic ($P < 0,001$) w porównaniu do grupy kontrolnej oraz grup otrzymujących diety eksperymentalne.

Natomiast podawanie diety z dodatkiem L-argininy i/lub nikotynamidu w tętnicznym nadciśnieniu płucnym spowodowało statystycznie istotne obniżenie ($P < 0,001$) wskaźnika RV/FBW u zwierząt obu płci w porównaniu z grupą PAH (Wykres 7).

U samców wyjątek stanowiła grupa PAH+L-ARG, gdzie odnotowano nieznaczny, ale statystycznie znamienne wzrost ($P < 0,05$) wskaźnika RV/FBW w porównaniu do grupy kontrolnej.

U samic zaobserwowano, że podanie nikotynamidu w tętnicznym nadciśnieniu płucnym spowodowało statystycznie istotne podwyższenie ($P < 0,05$) wartości wskaźnika RV/FBW w porównaniu do grupy kontrolnej oraz grup: L-ARG, L-ARG+NCA i PAH+L-ARG+NCA (Wykres 7).

STOSUNEK MASY LEWEJ KOMORY SERCA WRAZ Z PRZEGRODĄ DO KOŃCOWEJ MASY CIAŁA (LV+S/FBW)

U samców wskaźnik LV+S/FBW był nieznacznie, ale istotnie statystycznie podwyższony ($P<0,05$) w grupie PAH+NCA w porównaniu do grup: Kontroli, NCA oraz PAH. Podobną zależność zaobserwowano w grupie PAH+L-ARG+NCA ($P<0,05$) w porównaniu do grup: Kontrola, L-ARG+NCA oraz PAH (Wykres 8 w Załączniku).

Paradoksalnie u samic w grupie z tętnicznym nadciśnieniem płucnym odnotowano statystycznie istotnie wyraźne obniżenie ($P<0,05-0,001$) wartości wskaźnika LV+S/FBW w porównaniu do wszystkich pozostałych grup eksperymentalnych.

Dodatkowo u samic w grupie PAH+NCA zaobserwowano istotnie statystyczny wzrost ($P<0,05-0,001$) wskaźnika LV+S/FBW w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych (Wykres 8 w Załączniku).

STOSUNEK MASY SERCA DO KOŃCOWEJ MASY CIAŁA (HW/FBW)

W grupie samców z tętnicznym nadciśnieniem płucnym wskaźnik HW/FBW wykazywał statystycznie znamienny wzrost wartości ($P<0,05-0,001$) w porównaniu do grupy kontrolnej oraz grup otrzymujących same suplementy diety.

Przewlekłe podawanie diety z dodatkiem L-argininy i/lub nikotynamidu w tętnicznym nadciśnieniu płucnym spowodowało statystycznie istotny spadek wartości wskaźnika HW/FBW w porównaniu do grupy PAH (wyjątek stanowi grupa PAH+L-ARG $P<0,05$) (Tabela 5 w Załączniku).

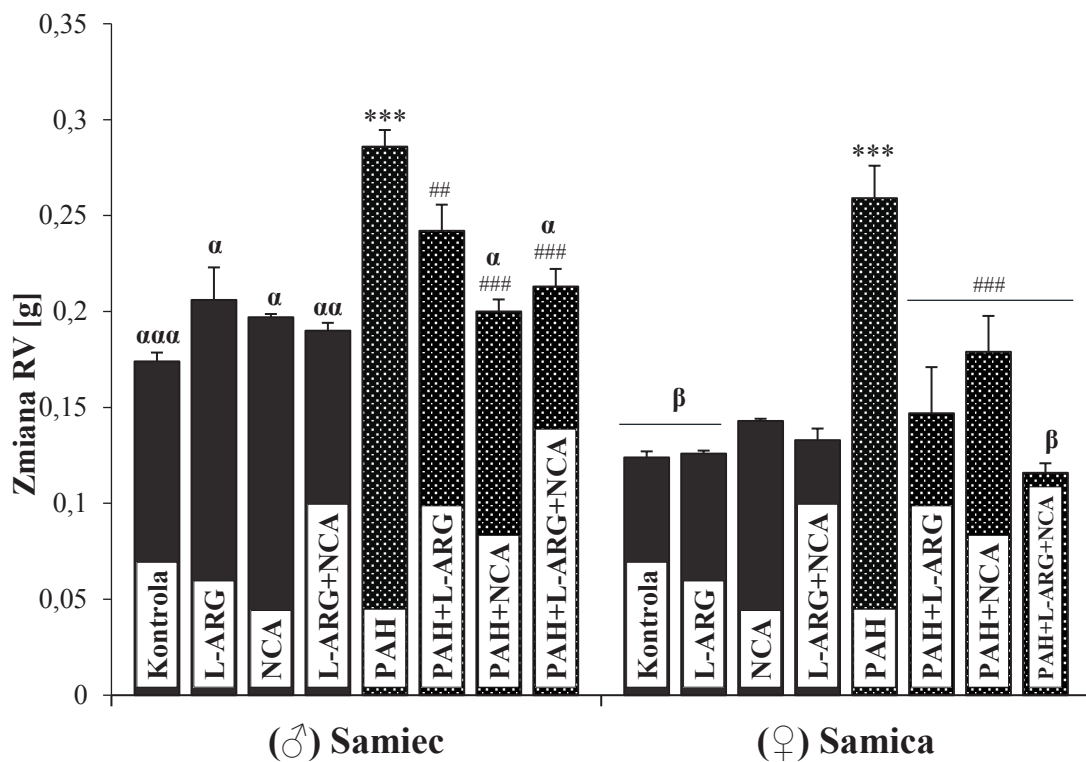
U samic zaobserwowano, że przewlekłe podawanie nikotynamidu w tętnicznym nadciśnieniu płucnym spowodowało znamienne statystycznie podwyższenie ($P<0,01$) wskaźnika HW/FBW w porównaniu do pozostałych grup eksperymentalnych. Wyjątek stanowią grupy: PAH oraz PAH+NCA ($P=NS$) (Tabela 5 w Załączniku).

Dodatkowe wskaźniki zebrane w Tabeli 5 (w Załączniku), których nie opisano służyły, jako wartości potrzebne na rzecz obliczeń w prezentowanej pracy.

Wykres 5. Masa prawej komory serca (RV) po stosowaniu L-argininy (L-ARG) i/lub nikotynamidu (NCA) u samców (♂) i samic (♀) szczura bez lub z indukowanym tętnicznym nadciśnieniem płucnym (PAH); ANOVA + test Newman-Keuls; wartości przedstawione, jako średnia ± SEM.

(♂) Samiec: *** - $P < 0,001$ vs Kontrola, L-ARG, NCA lub L-ARG+NCA; ### - $P < 0,001$ lub ## - $P < 0,01$ vs. PAH; $\alpha\alpha\alpha$ – $P < 0,001$ lub $\alpha\alpha$ – $P < 0,01$ lub α – $P < 0,05$ vs. PAH+L-ARG;

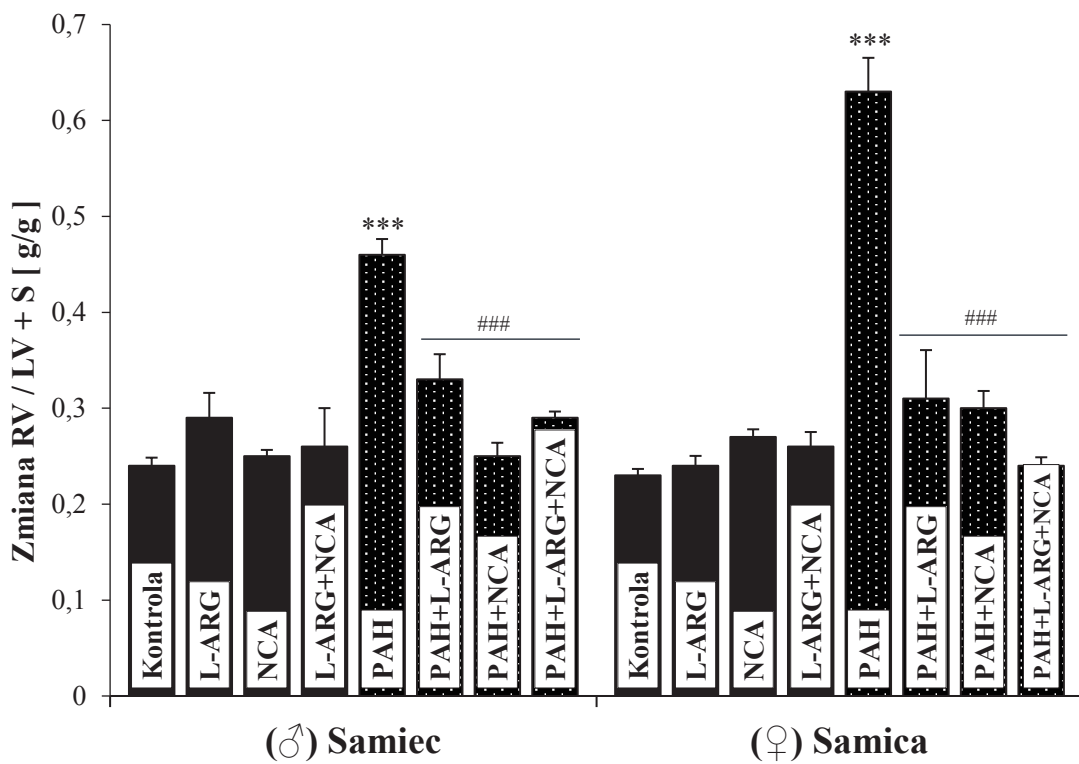
(♀) Samica: *** - $P < 0,001$ vs. Kontrola, L-ARG, NCA lub L-ARG+NCA; ### - $P < 0,001$ vs. PAH; β – $P < 0,05$ vs. PAH+NCA.



Wykres 6. Stosunek prawej komory serca (RV) do lewej komory serca z przegrodą serca (LV+S) po stosowaniu L-argininy (L-ARG) i niktynamidu (NCA) u samców (♂) i samic (♀) szczura bez lub z indukowanym tętnicznym nadciśnieniem płucnym; ANOVA + test Newman-Keuls; wartości przedstawione, jako średnia ± SEM.

(♂) Samiec: *** - $P < 0,001$ vs. Kontrola, L-ARG, NCA lub L-ARG+NCA; ### - $P < 0,001$ vs. PAH

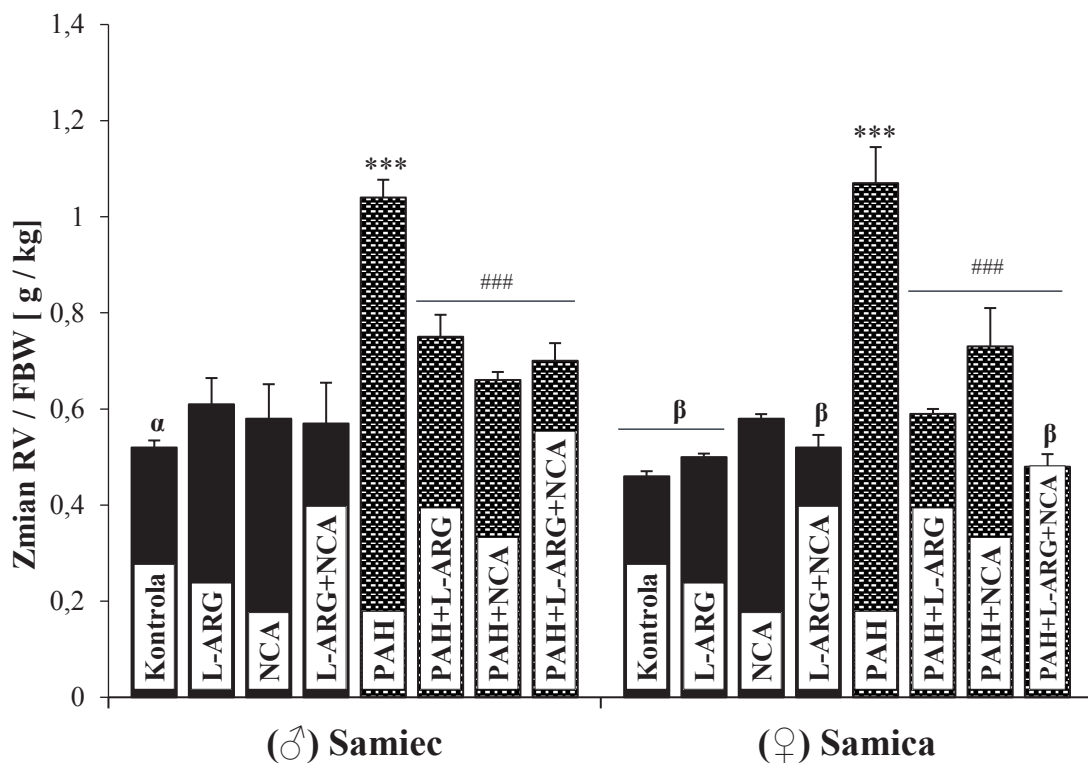
(♀) Samica: *** - $P < 0,001$ vs. Kontrola, L-ARG, NCA lub L-ARG+NCA; ### - $P < 0,001$ vs. PAH.



Wykres 7. Stosunek masy prawej komory serca (RV) do końcowej masy ciała (FBW) po zastosowaniu L-argininy (L-ARG) i niktynamidu (NCA) u samców (♂) i samic (♀) szczura bez lub z tętniczym nadciśnieniem płucnym (PAH); ANOVA + test Newman-Keuls; wartości przedstawione, jako średnia ± SEM.

(♂) Samiec: *** - $P < 0,001$ vs. Kontrola, L-ARG, NCA lub L-ARG+NCA; ### - $P < 0,001$ vs. PAH; α - $P < 0,05$ vs. PAH+L-ARG

(♀) Samica: *** - $P < 0,001$ vs. Kontrola, L-ARG, NCA lub L-ARG+NCA; ### - $P < 0,001$ vs. PAH; β - $P < 0,05$ vs. PAH+NCA.



4.4. Ocena wyjściowych parametrów kurczliwości mięśnia brodawkowatego serca

4.4.1. Siła skurczu (Fc) mięśnia brodawkowatego serca po zastosowaniu

**L-argininy (L-ARG) i/lub nikotynamidu (NCA) u samców (♂) i samic (♀)
szczura bez lub z indukowanym tętnicznym nadciśnieniem płucnym (PAH)**

U samców pomimo tendencji zmniejszania początkowej siły skurczu w grupie z tętnicznym nadciśnieniem płucnym (MPAH: $0,95 \pm 0,08$) nie stwierdzono statystycznie znamienych różnic w porównaniu do grupy kontrolnej (MC: $1,4 \pm 0,29$) (Wykres 9 A).

Zastosowane diety bogatej w L-argininę i/lub nikotynamid u samców z tętnicznym nadciśnieniem płucnym (MPAH+Arg: $1,13 \pm 0,17$; MPAH+Nca: $0,86 \pm 0,08$ i MPAH+Arg+Nca: $0,85 \pm 0,04$ mN; n=6) spowodowały, iż początkowa siła skurczu wykazywała tendencję porównywalną do grup otrzymujących suplementy diety bez tętniczego nadciśnienia płucnego (MArg: $1,27 \pm 0,25$; MNca: $0,81 \pm 0,06$ i MArg+Nca: $0,82 \pm 0,04$ mN; n=6). Wartości te nie były statystycznie znamienne (P=NS).

Dodatkowo zastosowane suplementy diety w grupach bez oraz z PAH obniżyły wyjściową siłę skurczu mięśnia sercowego w porównaniu do grupy kontrolnej jednak ta różnica nie była statystycznie znamienna (Wykres 9 A).

Natomiast u samic (Wykres 9 B) z tętnicznym nadciśnieniem płucnym (FPAH: $1,44 \pm 0,16$ mN) spoczynkowa siła skurczu znamienne statystycznie uległa podwyższeniu (P<0,01 lub P<0,001) w porównaniu do pozostałych grup badanych (FC: $0,96 \pm 0,17$; FArg: $0,91 \pm 0,07$; FNca: $0,63 \pm 0,05$; FArg+Nca: $0,64 \pm 0,04$; FPAH+Arg: $0,78 \pm 0,15$; FPAH+Nca: $0,68 \pm 0,02$ oraz FPAH+Arg+Nca: $0,76 \pm 0,11$ mN; n=6).

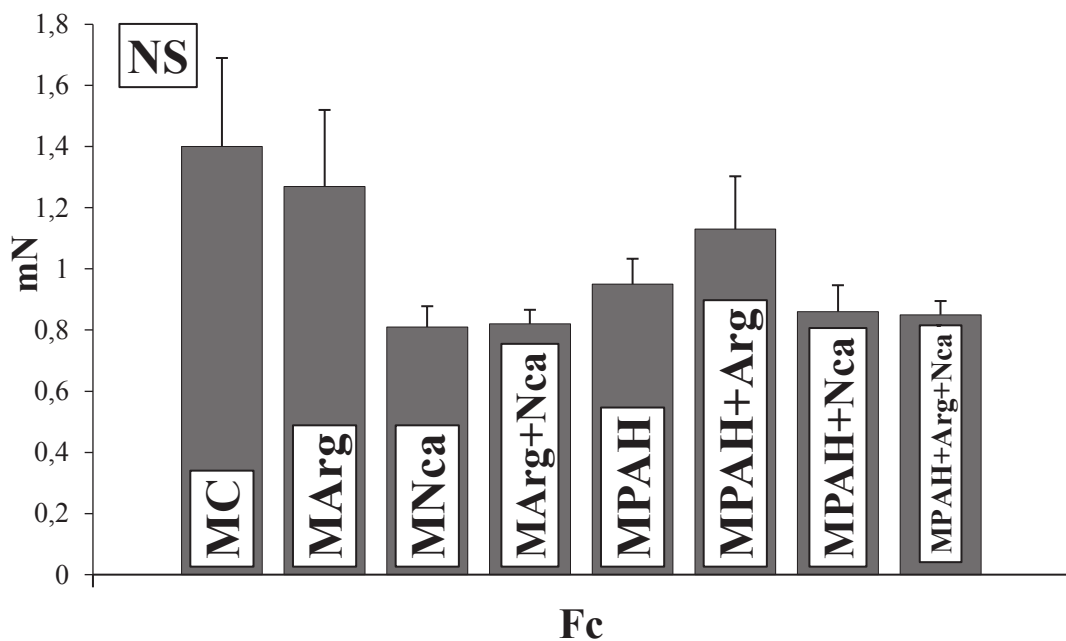
Przewlekłe podawanie diet bogatych w L-argininę i/lub nikotynamid w tętnicznym nadciśnieniu płucnym spowodowało istotne statystycznie obniżenie (P<0,001) początkowej siły skurczu w porównaniu do grupy z FPAH.

Zastosowanie diet bogatych w L-argininę i/lub nikotynamid wykazywało tendencję zmniejszenia parametrów wyjściowych siły skurczu mięśnia brodawkowatego w grupach bez tętniczego nadciśnienia płucnego w porównaniu do grupy kontrolnej. Jednak te wartości nie były statystycznie istotne.

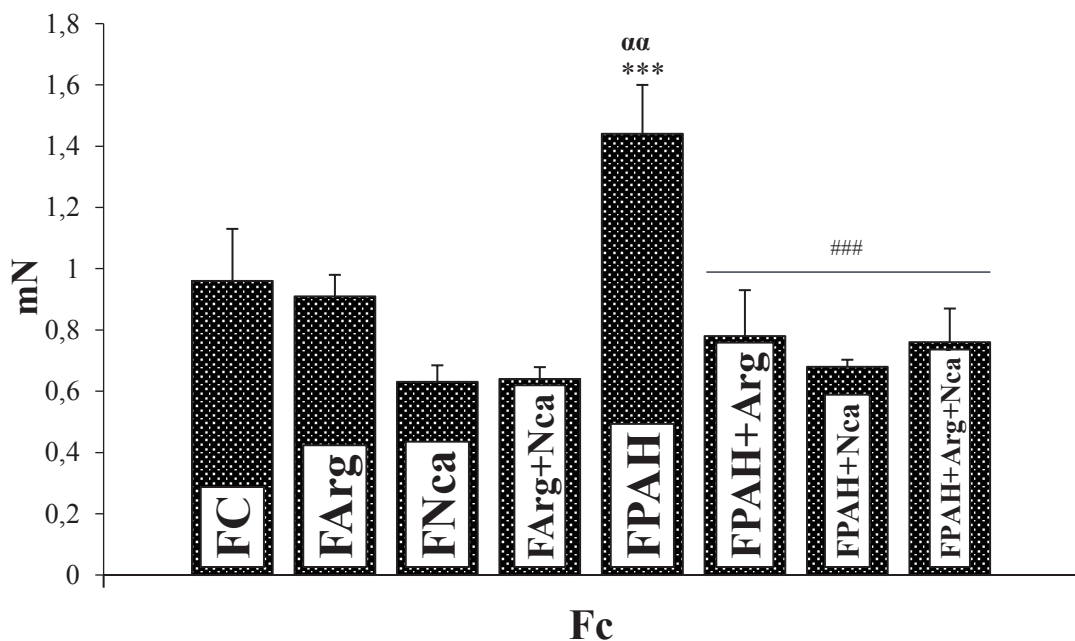
Nie stwierdzono znamienych różnic w działaniu L-argininy i nikotynamidu między grupami: FArg, FNca, FArg+Nca a FPAH+Arg, FPAH+Nca, FPAH+Arg+Nca (Wykres 9 B).

Wykres 9. Wyjściowa siła skurczu (Fc) mięśnia brodawkowatego serca po stosowaniu L-argininy (L-ARG) i/lub nikotynamidu (NCA) u (♂) samców (A) oraz (♀) samic (B) szczura bez lub z indukowanym tętniczym nadciśnieniem płucnym (PAH); ANOVA + test Newman-Keuls; wartości statystycznie istotnie przedstawiono, jako średnia ± SEM. (♂) Samiec – NS; (♀) Samica - *** - P<0,001 vs. FNca lub FArg+Nca; αα - P<0,01 vs. FC lub FArg; ### - P<0,001 vs. FPAH.

A.



B.



4.4.2. Szybkość skurczu (+dF/dt) i rozkurczu (-dF/dt) mięśnia brodawkowatego po zastosowaniu L-argininy (L-ARG) i/lub nikotynamidu (NCA) u samców (♂) i samic (♀) szczura bez lub z indukowanym tętniczym nadciśnieniem płucnym (PAH)

W grupie samców (Wykres 10) z rozwiniętym tętniczym nadciśnieniem płucnym stwierdzono istotny statystycznie spadek parametrów wyjściowych szybkości skurczu (MPAH: $2,53 \pm 0,31$ mN/s) oraz rozkurczu (MPAH: $1,2 \pm 0,17$ mN/s) w porównaniu do grupy kontrolnej oraz grup otrzymujących diety bogate w L-argininę i/lub nikotynamid. Odpowiednio, szybkość skurczu dla grup: MC: $3,41 \pm 0,33$; MArg: $4,32 \pm 0,18$; MNca: $3,74 \pm 0,37$; MArg+Nca: $4,06 \pm 0,13$ mN/s ($P < 0,05 - 0,001$) oraz szybkość rozkurczu dla grup: MC: $1,96 \pm 0,33$; MArg: $2,05 \pm 0,08$; MNca: $1,83 \pm 0,1$; MArg+Nca: $2,13 \pm 0,05$ mN/s ($P < 0,01 - 0,001$).

Przewlekłe podawanie L-argininy w tętniczym nadciśnieniu płucnym istotnie odwracało efekt PAH przez wzrost spoczynkowej szybkości skurczu (MPAH+Arg: $4,23 \pm 0,31$ mN/s; $P < 0,001$) oraz rozkurczu (MPAH+Arg: $2,13 \pm 0,13$ mN/s; $P < 0,001$).

U samców otrzymujących nikotynamid w tętniczym nadciśnieniu płucnym odnotowano znamienne statystyczne wyraźne zwiększenie początkowej szybkości skurczu (MPAH+Nca: $4,76 \pm 0,17$ mN/s; $P < 0,001$) oraz rozkurczu (MPAH+Nca: $2,23 \pm 0,09$ mN/s) w porównaniu do grupy z PAH.

Łączne podawanie L-argininy i nikotynamidu w tętniczym nadciśnieniu płucnym spowodowało znamienne statystycznie wzrost początkowej prędkości skurczu (MPAH+Arg+Nca: $4,08 \pm 0,1$ mN/s; $P < 0,01$) oraz rozkurczu (MPAH+Arg+Nca: $1,85 \pm 0,04$ mN/s; $P < 0,01$) w porównaniu do grupy z samym tętniczym nadciśnieniem płucnym.

Praktycznie nie zaobserwowano różnicy między grupami otrzymującymi samą L-argininę i nikotynamid, a grupami z tętniczym nadciśnieniem płucnym traktowanymi ww. dietami. Wyjątkiem stanowi grupa samców MPAH+Nca, gdzie odnotowano znamienne statystycznie niewielki wzrost szybkości skurczu ($P < 0,05$) mięśnia sercowego w porównaniu do grupy kontrolnej (Wykres 10).

W grupie samic tętnicze nadciśnienie płucne (Wykres 11), również spowodowało istotne statystycznie obniżenie wartości wyjściowych szybkości skurczu (FPAH: $1,86 \pm 0,22$ mN/s) oraz szybkości rozkurczu (FPAH: $0,89 \pm 0,097$ mN/s) w porównaniu do

grupy kontrolnej oraz grup otrzymujących diety bogate w L-argininę i/lub nikotynamid. Odpowiednio, szybkość skurczu dla grup: FC: $3,09 \pm 0,35$; FArg: $2,74 \pm 0,39$; FNca: $3,06 \pm 0,08$; FArg+Nca: $2,85 \pm 0,12$ mN/s ($P < 0,05$) oraz szybkość rozkurczu: FC: $1,63 \pm 0,11$; FArg: $1,49 \pm 0,19$; FNca: $1,73 \pm 0,087$; FArg+Nca: $1,53 \pm 0,038$ mN/s ($P < 0,01-0,001$).

Podobnie jak w grupie samców, podanie L-argininy u samic w PAH spowodowało statystycznie znamienne wzrost spoczynkowej szybkości skurczu (FPAH+Arg: $3,37 \pm 0,38$ mN/s; $P < 0,01$) oraz rozkurczu (FPAH+Arg: $1,43 \pm 0,17$ mN/s; $P < 0,01$) w porównaniu do grupy samic z samym nadciśnieniem płucnym.

U samic otrzymujących nikotynamid w tętnicznym nadciśnieniu płucnym, również zaobserwowano istotnie statystycznie znaczący wzrost początkowej wartości szybkości skurczu ($3,76 \pm 0,089$ mN/s; $P < 0,001$) oraz szybkości rozkurczu ($1,8 \pm 0,15$ mN/s; $P < 0,001$) w porównaniu do grupy z PAH.

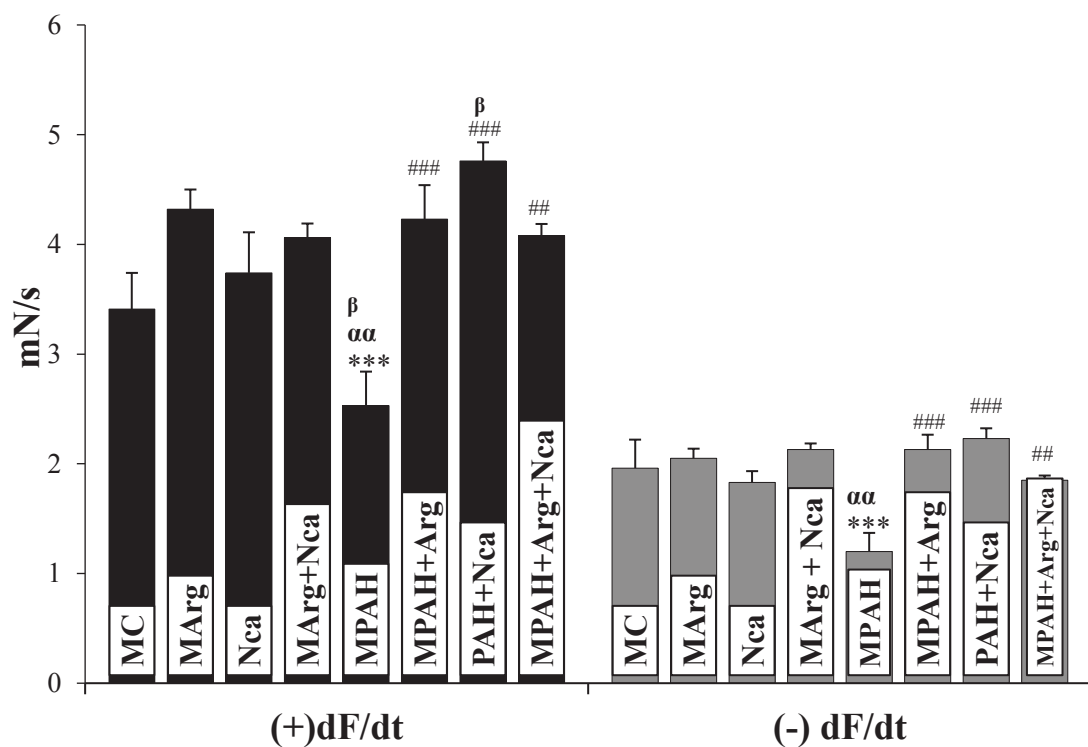
Łączne podawanie suplementów diety L-argininy i nikotynamidu w indukowanym tętnicznym nadciśnieniu płucnym spowodowało statystycznie znamienne wyraźny wzrost początkowych wartości $+dF/dt$ ($3,9 \pm 0,25$ mN/s; $P < 0,001$) oraz $-dF/dt$ ($2,13 \pm 0,08$ mN/s; $P < 0,001$) w porównaniu do grupy z samym PAH. Dodatkowo u samic otrzymujących połączoną dietę z L-argininą i nikotynamidem w tętnicznym nadciśnieniu płucnym odnotowano statystycznie zamienny wzrost wyjściowej szybkości skurczu w porównaniu do grup: FC: $P < 0,05$; FArg: $P < 0,01$; oraz FArg+Nca: $P < 0,05$. Również zaobserwowano istotny statystycznie wzrost spoczynkowej szybkości rozkurczu w grupie FPAH+Arg+Nca w porównaniu do grupy FPAH+Arg ($P < 0,01$).

Wartość spoczynkowa szybkości skurczu ($+dF/dt$) nie różniła się znacząco między grupami samic otrzymujących same suplementy w porównaniu do grup z PAH w skojarzeniu z dietami (Wykres 11).

Wykres 10. Parametry wyjściowe szybkości skurczu (+dF/dt) i rozkurczu (-dF/dt) mięśnia brodawkowatego serca po stosowaniu L-argininy (L-ARG) i/lub nikotynamidu (NCA) u samców (♂) szczura bez lub z indukowanym tętniczym nadciśnieniem płucnym (PAH); ANOVA + test Newman-Keuls; wartości statystycznie istotnie przedstawiono, jako średnia ± SEM.

(+) dF/dt - *** - P<0,001 vs. MArg lub MArg+Nca; αα - P< 0,01 vs. MNca; β - P<0,05 vs. MC; ### - P<0,001 lub ## - P<0,01 vs. MPAH;

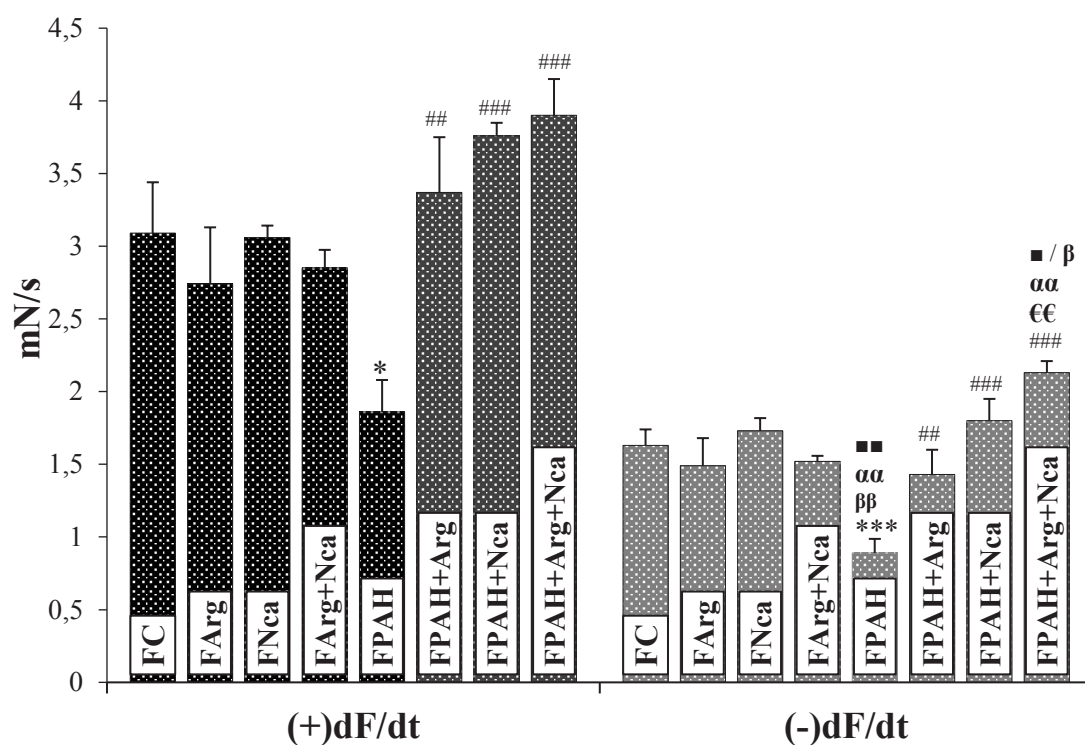
(-) dF/dt - *** - P<0,001 vs. MArg lub MArg+Nca; αα - P<0,01 vs. MC lub MNca; ### - P<0,001 lub ## - P<0,01 vs. MPAH.



Wykres 11. Parametry wyjściowe szybkości skurczu (+dF/dt) i rozkurczu (-dF/dt) mięśnia brodawkowatego serca po stosowaniu L-argininy (L-ARG) i/lub nikotynamidu (NCA) u samic (♀) szczura bez lub z indukowanym tętniczym nadciśnieniem płucnym (PAH); ANOVA + test Newman-Keuls; wartości statystycznie istotnie przedstawiono, jako średnia ± SEM.

(+) dF/dt - * - P<0,05 vs. FC, FArg, FNca lub FArg+Nca; ### - P<0,001 lub ## - P<0,01 vs. FPAH;

(-) dF/dt - *** - P<0,001 vs. FNca; ■ - P<0,01 lub ■ - P<0,05 vs. FC; αα - P<0,01 vs. FArg; ββ - P<0,01 lub β - P<0,05 vs. FArg+Nca; ### - P<0,001 lub ## - P<0,01 vs. FPAH; €€ - P<0,01 vs. FPAH+Arg.



4.5. Ocena wpływu noradrenaliny na parametry kurczliwości mięśnia sercowego

4.5.1. Wpływ noradrenaliny na zmianę siły skurczu (ΔF_c) mięśnia brodawkowego serca po zastosowaniu L-argininy (L-ARG) i/lub nikotynamidu (NCA) u samców (♂) i samic (♀) szczura bez lub z indukowanym tętnicznym nadciśnieniem płucnym (PAH)

Stymulacja adrenergiczna o silnym działaniu inotropowo dodatnim pozwala uzyskać szybki wzrost siły skurczu mięśnia sercowego (Wykresy 12 - 14).

SZCZURY OTRZYMUJĄCE DIETĘ Z DODATKIEM L-ARGININY

U samców wzrastające stężenia noradrenaliny wywoływały istotne statystycznie mniejszą siłę skurczu mięśnia sercowego w grupie traktowanej L-argininą oraz w grupie MPAH+Arg (odpowiednio: $0,13 \pm 0,06$ oraz $0,11 \pm 0,02$ mN; $P < 0,05$ w stężeniu $1 \mu\text{M}$) w porównaniu do grupy kontrolnej (MC: $0,35 \pm 0,06$ mN).

W grupie samców z PAH noradrenalina wywoływała statystycznie znamienne nasilony ($P < 0,01-0,05$) efekt inotropowo dodatni w stężeniu od 1 do $10 \mu\text{M}$ w porównaniu do grupy otrzymującej samą L-argininę. W stężeniu $10 \mu\text{M}$ maksymalny efekt noradrenaliny w grupie PAH wynosił $0,46 \pm 0,12$ mN (Wykres 12 A).

Natomiast w grupie samców otrzymujących L-argininę w tętnicznym nadciśnieniu płucnym zaobserwowano wyraźne obniżenie odpowiedzi ($P < 0,01-0,05$) na wysokie stężenia noradrenaliny w porównaniu do grupy z samym PAH. Zmiany te były istotne statystycznie począwszy od stężenia $1 \mu\text{M}$ do $30 \mu\text{M}$ podawania noradrenaliny i w stężeniu $10 \mu\text{M}$ efekt ten wynosił $0,05 \pm 0,02$ mN ($P < 0,01$).

Warto zauważyć, że wzrastające stężenia noradrenaliny nie spowodowały wystąpienia różnic między grupą samców otrzymujących samą L-argininę, a grupą z PAH suplementowaną L-argininą (Wykres 13 A).

Przeciwnie, u samic (Wykres 12 B) pomimo wyraźnej tendencji do wzrostu działania wysokich stężeń noradrenaliny w grupie przypadków z tętnicznym nadciśnieniem płucnym, nie zaobserwowano statystycznie znamiennych różnic w porównaniu do pozostałych grup. E_{max} w stężeniu $10 \mu\text{M}$ dla FPAH wynosił: $0,43 \text{ mN} \pm 0,16$ vs. FC: $0,23 \pm 0,04$; FArg: $0,09 \pm 0,05$; FPAH+Arg: $0,23 \pm 0,07$ mN.

Noradrenalina w grupie samic kontrolnych, traktowanych L-argininą oraz otrzymujących L-argininę w tętnicznym nadciśnieniu płucnym działała wyraźnie słabiej na amplitudę siły skurczu (ΔF) w sposób zależny od dawki. Otrzymane wartości nie różniły się statystycznie w porównaniu do grupy FPAH (Wykres 12 B).

SZCZURY OTRZYMUJĄCE DIETĘ Z DODATKIEM NIKOTYNAMIDU

Noradrenalina, w grupie samców (Wykres 13 A) z tętnicznym nadciśnieniem płucnym spowodowała znamienne statystycznie zwiększenie (MPAH: $0,45 \pm 0,08$ mN) siły skurczu w stężeniu $3 \mu\text{M}$ w porównaniu do grupy kontrolnej (MC: $0,28 \pm 0,05$ mN; $P < 0,05$). W grupie z PAH zaobserwowano również, istotne nasilenie działania inotropowo dodatniego noradrenaliny w stężeniu $3 \mu\text{M}$ (MPAH: $0,45 \pm 0,08$ mN) oraz w stężeniu $10 \mu\text{M}$ (MPAH: $0,46 \pm 0,12$ mN) w porównaniu do grupy otrzymującej sam nikotynamid (odpowiednio: $0,17 \pm 0,05$ mN; $P < 0,01$ oraz $0,12 \pm 0,07$ mN; $P < 0,05$).

U samców z PAH traktowanych nikotynamidem zaobserwowano istotne osłabienie działania inotropowo dodatniego wzrastających stężeń noradrenaliny w porównaniu do grupy samców z samym tętnicznym nadciśnieniem płucnym. Znamienny efekt noradrenaliny występował w stężeniach: od $0,1 \mu\text{M}$ do $0,3 \mu\text{M}$ ($P < 0,01 - 0,05$) oraz w stężeniach: od $3 \mu\text{M}$ do $30 \mu\text{M}$ ($P < 0,001 - 0,05$).

Wartości między grupą kontrolną oraz otrzymującą nikotynamid bez lub w indukowanym tętnicznym nadciśnieniu płucnym zasadniczo nie różniły się znamienne statystycznie w działaniu noradrenaliny. Wyjątkiem stanowi grupa samców MPAH+Nca, gdzie zaobserwowano w stężeniu $3 \mu\text{M}$ istotne statystycznie osłabienie ($P < 0,05$) efektu noradrenaliny w porównaniu do grupy kontrolnej (Wykres 13 A).

W grupie samic (Wykres 13 B) z tętnicznym nadciśnieniem płucnym, również odnotowano wzrost ΔF_c pod wpływem noradrenaliny w porównaniu do pozostałych grup. Jednak przeciwnie do grupy samców z PAH, wartości te nie były istotne statystyczne (NS) między grupami.

W przypadku grupy samic otrzymujących nikotynamid w PAH noradrenalina, działała istotnie statystycznie słabiej (FPAH+Nca: $0,05 \pm 0,02$ mN; $P < 0,05$) na amplitudę siły skurczu tylko w stężeniu $30 \mu\text{M}$ w porównaniu do grupy z samym tętnicznym nadciśnieniem płucnym (FPAH: $0,42 \pm 0,15$ mN) (Wykres 13 B).

Warto również zauważyć, że wzrastające stężenia noradrenaliny wywoływały tendencję do silniejszego działania u samic pozostających na diecie z samym nikotynamidem w porównaniu do grupy kontrolnej oraz FPAH+Nca. Jednak różnice te nie były znamienne statystycznie.

SZCZURY OTRZYMUJĄCE POŁĄCZONĄ DIETĘ ZAWIERAJĄCĄ L-ARGINIĘ I NIKOTYNAMID

Noradrenalina, w sposób zależny od stężenia wywoływała zwiększoną ($P < 0,01-0,05$) siłę skurczu mięśnia sercowego w grupie samców z tętniczym nadciśnieniem płucnym w porównaniu do pozostałych grup. A począwszy od stężenia $0,3\mu\text{M}$ do $10\mu\text{M}$, efekt noradrenaliny w grupie PAH, wykazywał statystyczną znamienność w porównaniu do grupy oraz MArg+Nca (Wykres 14 A).

Odmienne, u samców z tętniczym nadciśnieniem płucnym otrzymujących połączenie diet L-argininę i nikotynamid odnotowano osłabienie ($P < 0,01-0,05$) działania inotropowo dodatniego noradrenaliny w porównaniu do grupy MPAH. Znamienny statystycznie efekt występował w stężeniu noradrenaliny od $0,3\mu\text{M}$ do $10\mu\text{M}$.

Ponadto zaobserwowano w stężeniu $1\mu\text{M}$ w grupie kontrolnej istotne znamienne wzrost (MC: $0,35 \pm 0,05\text{mN}$) w działaniu noradrenaliny w porównaniu do grupy MArg+Nca ($0,13 \pm 0,02\text{mN}$; $P < 0,05$) oraz grupy MPAH+Arg+Nca ($0,13 \pm 0,02\text{mN}$; $P < 0,01$) (Wykres 14 A).

W grupie samic (Wykres 14 B) z tętniczym nadciśnieniem płucnym również stwierdzono, że noradrenalina w sposób zależny od dawki wywoływała wzrost ($P < 0,05$) siły skurczu mięśnia sercowego. Otrzymane wartości były statystycznie istotne w stężeniu 10 i $30\mu\text{M}$ w porównaniu do grupy otrzymującej połączone diety L-argininę i nikotynamid.

Podobnie jak w przypadku samców, w grupie samic FPAH+Arg+Nca odnotowano osłabienie ($P < 0,05$) działania inotropowo dodatniego noradrenaliny w stężeniu 10 i $30\mu\text{M}$ w porównaniu do grupy z samym PAH.

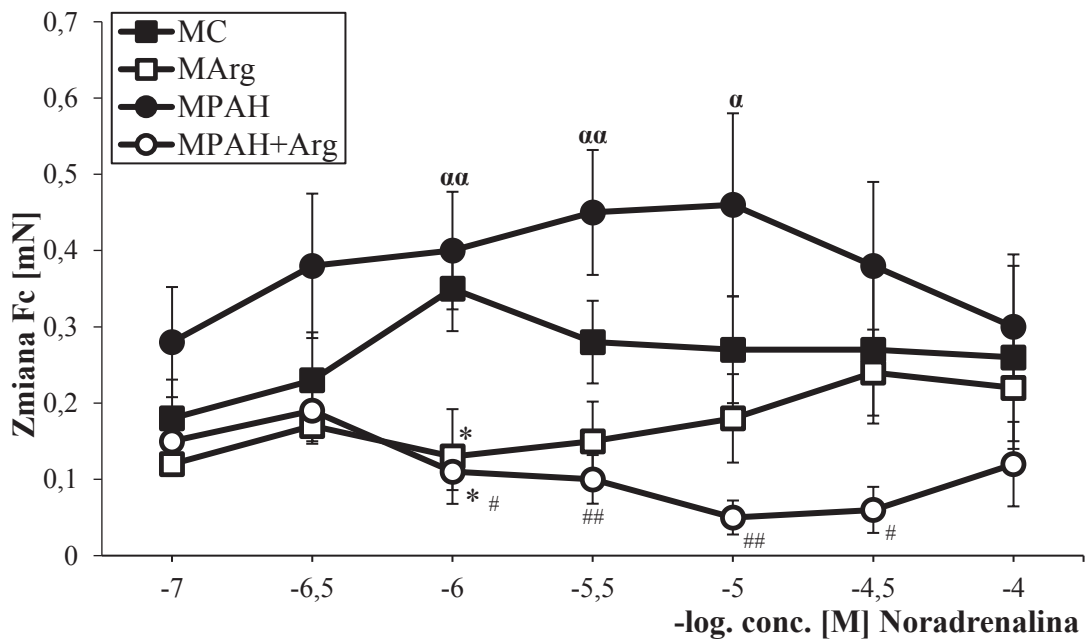
Poza tym, nie stwierdzono różnic między wartościami w grupie kontrolnej oraz otrzymującej L-argininę w skojarzeniu z nikotynamidem bez lub z tętniczym nadciśnieniem płucnym (Wykres 14 B).

Wykres 12. Wpływ noradrenaliny (NOR) na zmianę siły skurczu (ΔFc) mięśnia brodawkowego u (σ) samców (A) oraz (φ) samic (B) szczura po zastosowaniu L-argininy (L-ARG) bez lub z indukowanym tętnicznym nadciśnieniem płucnym (PAH); ANOVA + test Newman-Keuls; wartości przedstawiono, jako średnia \pm SEM.

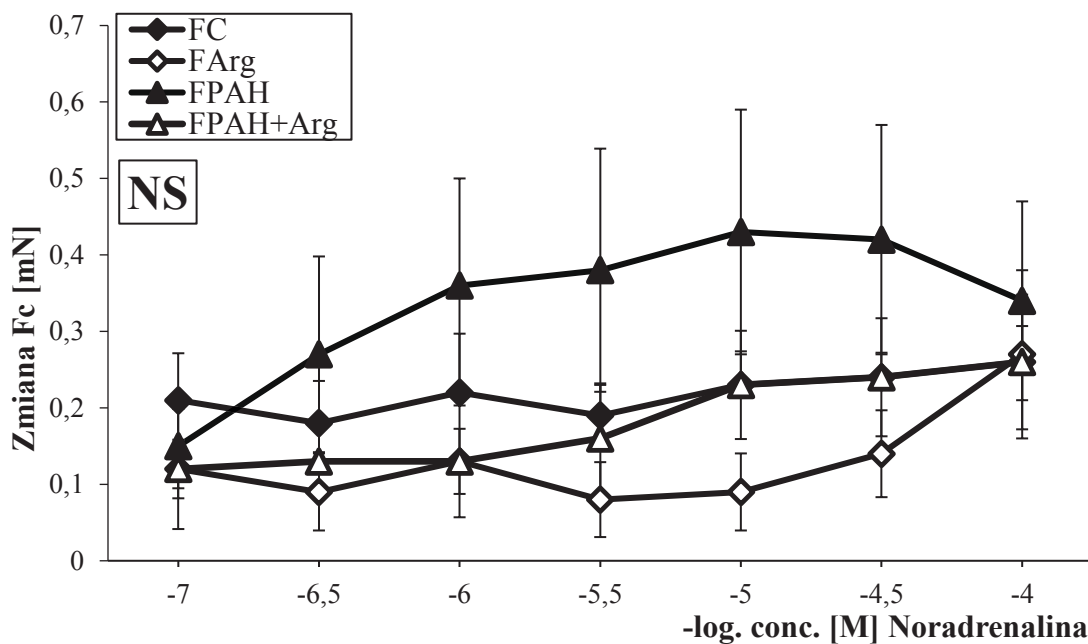
A. (σ) Samiec - * - $P < 0,05$ vs. MC; $\alpha\alpha$ – $P < 0,01$ lub α – $P < 0,05$ vs. MArg; ## - $P < 0,01$ lub # - $P < 0,05$ vs. MPAH;

B. (φ) Samica – NS.

A.



B.

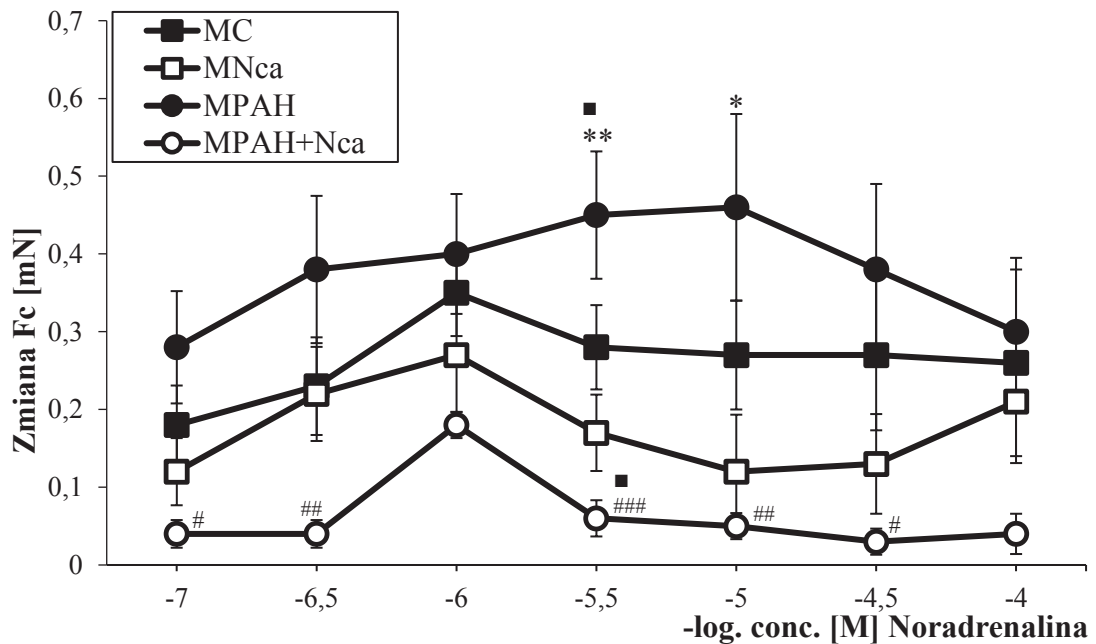


Wykres 13. Wpływ noradrenaliny (NOR) na zmianę siły skurczu (ΔFc) mięśnia brodawkowego u (σ) samców (A) oraz (φ) samic (B) szczura po zastosowaniu nikotynamidu (NCA) bez lub z indukowanym tętniczym nadciśnieniem płucnym (PAH); ANOVA + test Newman-Keuls; wartości przedstawiono, jako średnia \pm SEM.

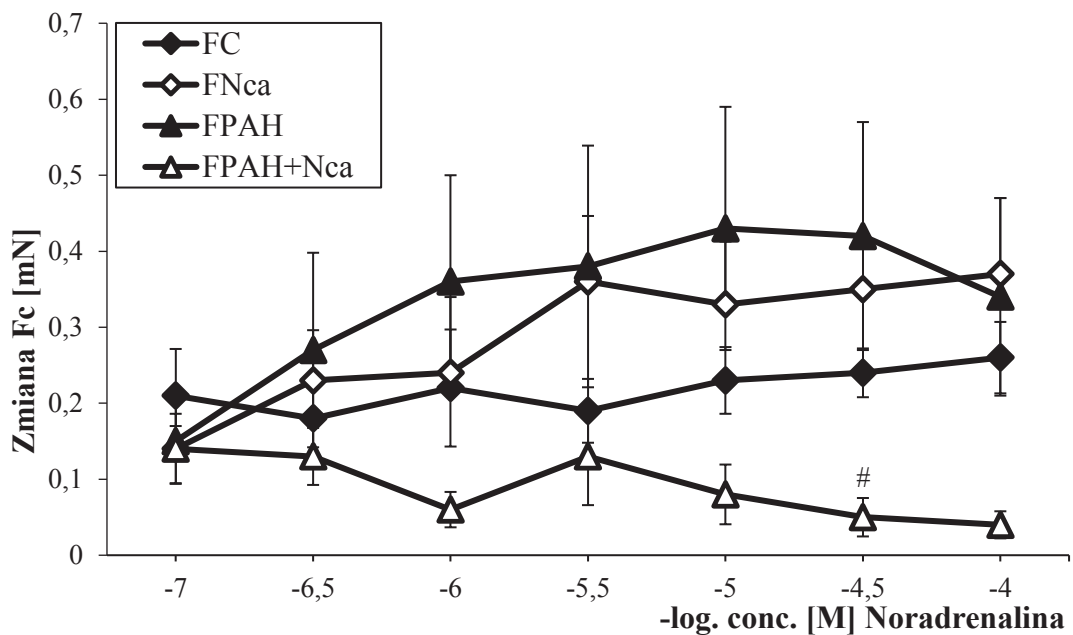
A. (σ) Samiec - ** - $P < 0,01$ lub * - $P < 0,05$ vs. MNca; ■ - $P < 0,05$ vs. MC; ### - $P < 0,001$ lub ## - $P < 0,01$ lub # - $P < 0,05$ vs. MPAH;

B. (φ) Samica - # - $P < 0,05$ vs. FPAH.

A.



B.

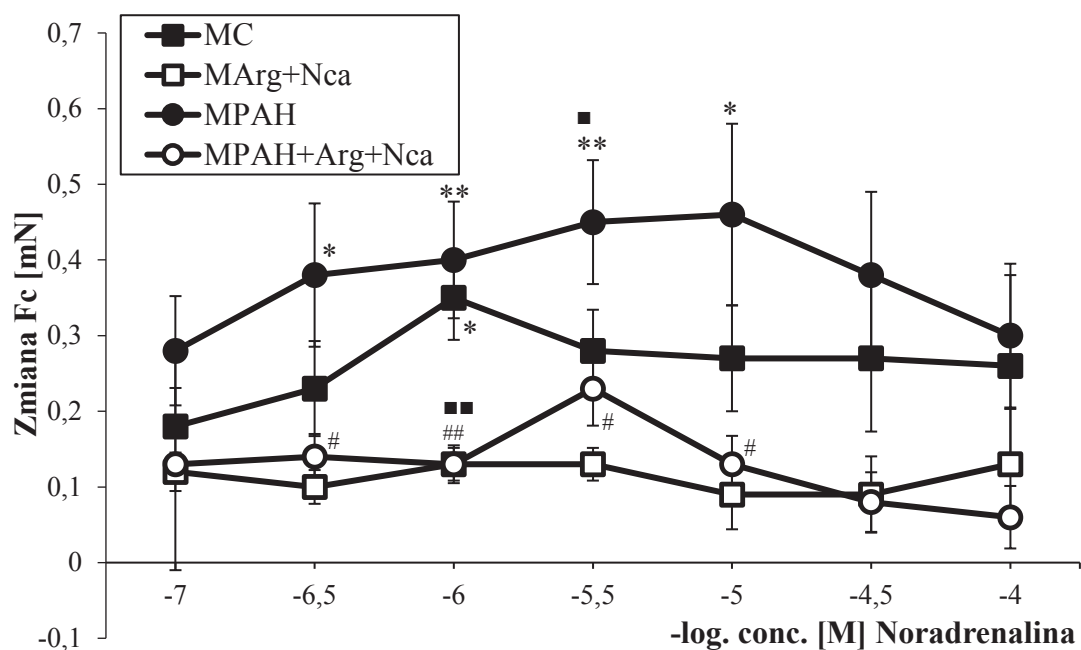


Wykres 14. Wpływ noradrenaliny (NOR) na zmianę siły skurczu (ΔFc) mięśnia brodawkowego u (σ) samców (A) oraz (♀) samic (B) szczura po stosowaniu łącznego podawania L-argininy i nikotynamidu (L-ARG+NCA) bez lub z indukowanym tętnicznym nadciśnieniem płucnym (PAH); ANOVA + test Newman-Keuls; wartości przedstawiono, jako średnia \pm SEM.

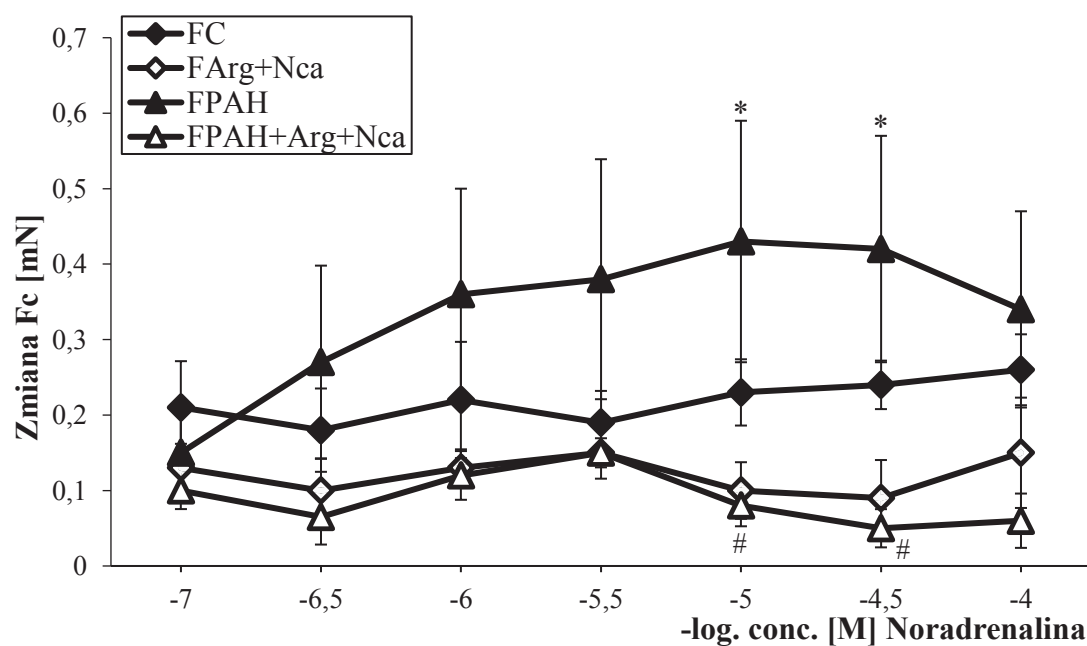
A. (σ) Samiec - ** - $P < 0,01$ lub * - $P < 0,05$ vs. MArg+Nca; ■■ - $P < 0,01$ lub ■ - $P < 0,05$ vs. MC; ## - $P < 0,01$ lub # - $P < 0,05$ vs. MPAH;

B. (♀) Samica - * - $P < 0,05$ vs. FArg+Nca; # - $P < 0,05$ vs. FPAH.

A.



B.



4.5.2. Wpływ noradrenaliny na zmianę szybkości skurczu ($\Delta+dF/dt$) oraz rozkurczu ($\Delta-dF/dt$) mięśnia brodawkowatego serca po zastosowaniu L-argininy (L-ARG) i/lub nikotynamidu (NCA) u samców (♂) i samic (♀) szczura bez lub z indukowanym tętniczym nadciśnieniem płucnym (PAH)

Na wykresach 15-20 przedstawiono zmiany zależności efektu szybkości skurczu oraz rozkurczu od stężenia noradrenaliny bez lub z tętniczym nadciśnieniem płucnym u samców i samic szczura w terapii pojedynczej lub skojarzonej zawierającej L-argininę i nikotynamid.

SZCZURY OTRZYMUJĄCE DIETĘ Z DODATKIEM L-ARGININY

W grupie samców traktowanych L-argininą zaobserwowano początkowy wzrost działania noradrenaliny. Jednak, efekt ten w stężeniu od $10\mu\text{M}$ i wyższych wykazywał tendencję do zmniejszenia amplitudy $+dF/dt$. Ponadto, noradrenalina wykazywała obniżenie szybkości rozkurczu. Nie odnotowano żadnych statystycznych różnic pomiędzy grupami.

W grupie zwierząt z rozwiniętym tętniczym nadciśnieniem płucnym wzrastające stężenia noradrenaliny wywoływały wzrost amplitudy szybkości skurczu oraz rozkurczu ($P=NS$) w porównaniu do pozostałych grup badanych. Uzyskane wartości nie były istotne statystycznie (Wykres 15 A oraz Wykres 16 A).

Natomiast u samców otrzymujących dietę z L-argininą w PAH noradrenalina w sposób zależny od stężenia wywoływała zmniejszenie szybkości skurczu oraz rozkurczu mięśnia sercowego. Efekt ten był statystycznie znamieny tylko w $+dF/dt$ w stężeniu 10 i $30\mu\text{M}$ (odpowiednio: $P<0,05$ oraz $P<0,01$) w porównaniu do grupy samców z PAH (Wykres 15 A).

Przeciwnie, w przypadku samic z PAH, stopniowy wzrost stężenia noradrenaliny spowodował istotne statystycznie zmniejszenie ($P<0,05$) szybkości skurczu mięśnia brodawkowatego w stężeniu $10\mu\text{M}$ w porównaniu do grupy kontrolnej (Wykres 15 B). Paradoksalnie, u samic z PAH noradrenalina, wywoływała statystycznie znamieny wzrost szybkości rozkurczu w porównaniu do grupy kontrolnej ($P<0,05$) oraz otrzymującej L-argininę ($P<0,01$) (Wykres 16 B).

Efekt noradrenaliny w grupie samic traktowanych L-argininą wykazywał zmniejszenie $+dF/dt$ oraz $-dF/dt$. Jednak u samic działanie noradrenaliny na szybkość skurczu była w przeciwieństwie do grupy samców, statystycznie istotne w stężeniu 0,3 oraz $10\mu\text{M}$ (odpowiednio: $P<0,01$ oraz $P<0,05$) w porównaniu do grupy kontrolnej samic (Wykres 15 B oraz Wykres 16 B).

Ponadto, w przypadku samic otrzymujących L-argininę w tętnicznym nadciśnieniu płucnym zaobserwowano statystycznie istotne obniżenie ($P<0,05$) amplitudy tylko dla $-dF/dt$ w porównaniu do grupy samic z PAH (Wykres 16 B).

SZCZURY OTRZYMUJĄCE DIETĘ Z DODATKIEM NIKOTYNAMIDU

U samców noradrenalina, w sposób zależny od dawki wywoływała tendencję do wzrostu szybkości skurczu oraz w niewielkim stopniu szybkości rozkurczu w grupie kontrolnej, grupie otrzymującej nikotynamid oraz grupie z tętnicznym nadciśnieniem płucnym. Otrzymane wartości nie różniły się statystycznie.

U samców z PAH traktowanych nikotynamidem zaobserwowano wyraźną statystycznie znamioną zdolność do hamowania wysokich stężeń noradrenaliny. Począwszy od stężenia $10\mu\text{M}$ i wyższych, efekt noradrenaliny osłabiał szybkość skurczu ($P<0,01-0,05$) w porównaniu do grupy z samym PAH.

Ponadto, w grupie samców MPAH+Nca zaobserwowano istotne statystycznie obniżenie ($P<0,05$) szybkości skurczu przy działaniu noradrenaliny w stężeniu $30\mu\text{M}$ w porównaniu do grupy otrzymującej sam nikotynamid (Wykres 17 A). Stwierdzono również, że w grupie MPAH+Nca działanie noradrenaliny wyrażane, jako $-dF/dt$ uległo osłabieniu w porównaniu do MPAH. Różnice między tymi wartościami były statystycznie nieznamiennie (Wykres 18 A).

Z kolei, u samic traktowanych samym nikotynamidem odnotowano, że stopniowy wzrost stężenia noradrenaliny spowodował statystycznie znamienne wyraźne nasilenie ($P<0,01-0,05$) szybkości skurczu mięśnia sercowego w porównaniu do grupy kontrolnej. Różnica między otrzymanymi wartościami wyrażała się w stężeniach od $0,3\mu\text{M}$ do $100\mu\text{M}$ (Wykres 17 B).

W grupie samic z tętnicznym nadciśnieniem płucnym odnotowano, przeciwnie niż do grupy samców z PAH, osłabienie ($P<0,001-0,05$) szybkości skurczu pod wpływem

noradrenaliny. Począwszy od stężenia 0,1 μM i wyższych, efekt noradrenaliny wykazywał istotność statystyczną w porównaniu do wartości grupy samic FNca.

Dodatkowo, w przypadku grupy samic FPAH+Nca efekt noradrenaliny spowodował znaczące statystycznie zwiększenie wartości $+dF/dt$ w stężeniu od 0,3 do 100 μM ($P < 0,001-0,05$) w porównaniu do grupy samic otrzymujących nikotynamid. Nie odnotowano żadnych statystycznych różnic w działaniu noradrenaliny między grupą samic FPAH, a FPAH+Nca (Wykres 17 B).

Przeciwnie do wartości $+dF/dt$ samic, wzrastające stężenia noradrenaliny spowodowały wzrost szybkości rozkurczu ($-dF/dt$) w grupie samic z tętnicznym nadciśnieniem płucnym, a obniżenie wartości w przypadku grupy kontrolnej oraz grupy FPAH+Nca. Nie zaobserwowano statystycznych różnic między tymi wartościami.

W grupie samic otrzymujących nikotynamid obserwowano nasilenie ($P < 0,05$) działania inotropowo dodatniego noradrenaliny wartości $-dF/dt$ w stężeniu 0,3 oraz 3 μM w porównaniu do grupy kontrolnej (Wykres 18 B).

SZCZURY OTRZYMUJĄCE POŁĄCZONĄ DIETĘ ZAWIERAJĄCĄ L-ARGININĘ I NIKOTYNAMID

W grupie samców z indukowanym tętnicznym nadciśnieniem płucnym, noradrenalina wywoływała statystycznie znamienne zwiększenie amplitudy szybkości skurczu (30 μM : $P < 0,05$) w porównaniu do grupy MArg+Nca oraz rozkurczu (0,3 μM : $P < 0,05$) w porównaniu do grupy kontrolnej oraz grupy MArg+Nca (Wykres 19 A oraz Wykres 20 A).

Ponadto, w grupie samców odnotowano statystycznie znamienne obniżenie efektów działania noradrenaliny dla wartości $+dF/dt$ w stężeniu 30 μM dla grupy MArg+Nca: $P < 0,05$ w porównaniu do grupy kontrolnej oraz dla grupy MPAH+Arg+Nca: $P < 0,05$ w porównaniu do grupy kontrolnej i grupy z PAH (Wykres 19 A). Podobny efekt odnotowano dla wartości $-dF/dt$ w stężeniu 100 μM dla grupy MArg+Nca: $P < 0,05$ w porównaniu do grupy kontrolnej oraz dla grupy MPAH+Arg+Nca w stężeniu 0,3 μM ($P < 0,05$) w porównaniu do grupy z samym tętnicznym nadciśnieniem płucnym (Wykres 20 A).

W grupie samic z tętnicznym nadciśnieniem płucnym obserwowano tendencję do wyraźnego osłabienia szybkości skurczu pod wpływem noradrenaliny w porównaniu

do pozostałych grup. Różnice między tymi wartościami były statystycznie nieistotne (Wykres 19 B). Przeciwnie, efekt noradrenaliny w grupie samic z PAH spowodował nasilenie szybkości rozkurczu w porównaniu do pozostałych grup. Działanie to było szczególnie istotne statystycznie między grupą FPAH a grupą FArg+Nca w stężeniu $1\mu\text{M}$ ($P<0,05$) (Wykres 20 B).

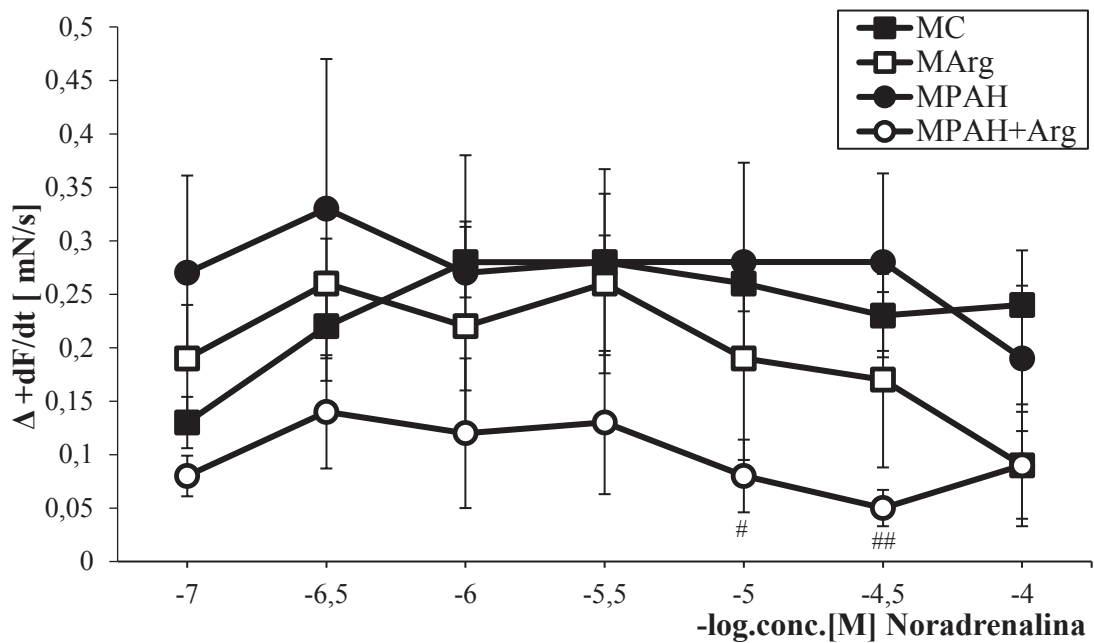
Działanie noradrenaliny w grupie samic z PAH traktowanych L-argininą i nikotynamidem wykazywało statystycznie znamienne ($0,1\mu\text{M}$: $P<0,05$) wzrost szybkości skurczu w porównaniu do grupy z samym PAH (Wykres 19 B). Natomiast efekt noradrenaliny pomimo tendencji osłabienia szybkości rozkurczu nie wykazywał istotnych statystycznie różnic między grupą FPAH+Arg+Nca a grupą FPAH (Wykres 20 B).

Wykres 15. Wpływ noradrenaliny (NOR) na zmianę szybkości skurczu (+dF/dt) mięśnia brodawkowego u (♂) samców (A) oraz (♀) samic (B) szczura po zastosowaniu L-argininy (L-ARG) bez lub z indukowanym tętniczym nadciśnieniem płucnym (PAH); ANOVA + test Newman-Keuls; wartości przedstawiono, jako średnia ± SEM.

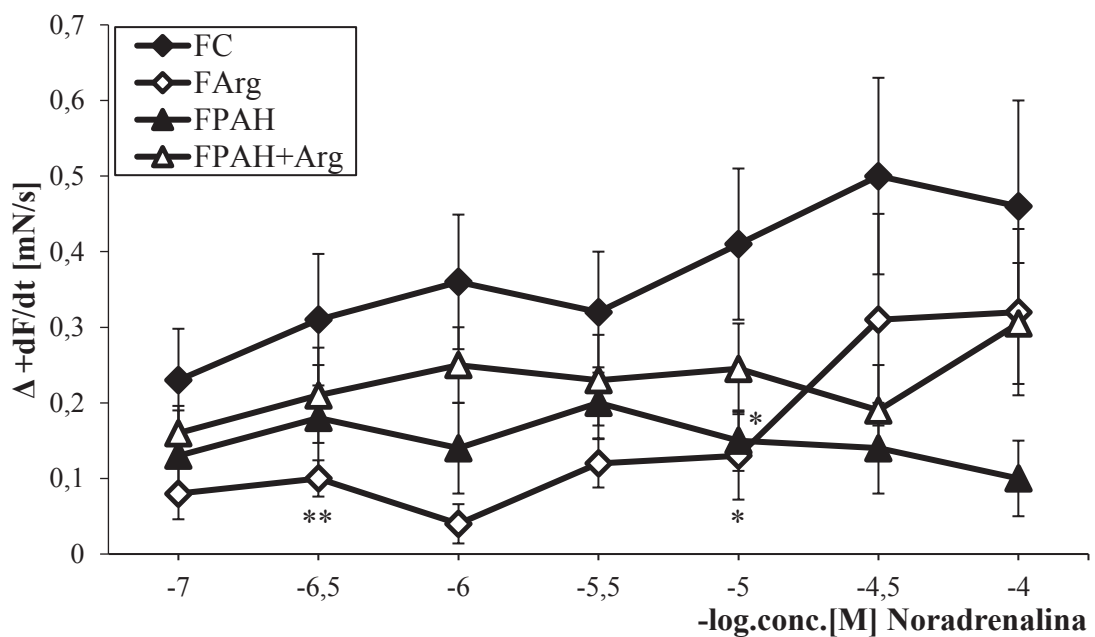
A. (♂) Samiec - ## - P<0,01 lub # - P<0,05 vs. MPAH;

B. (♀) Samica - ** - P<0,01 lub * - P<0,05 vs. FC.

A.



B.

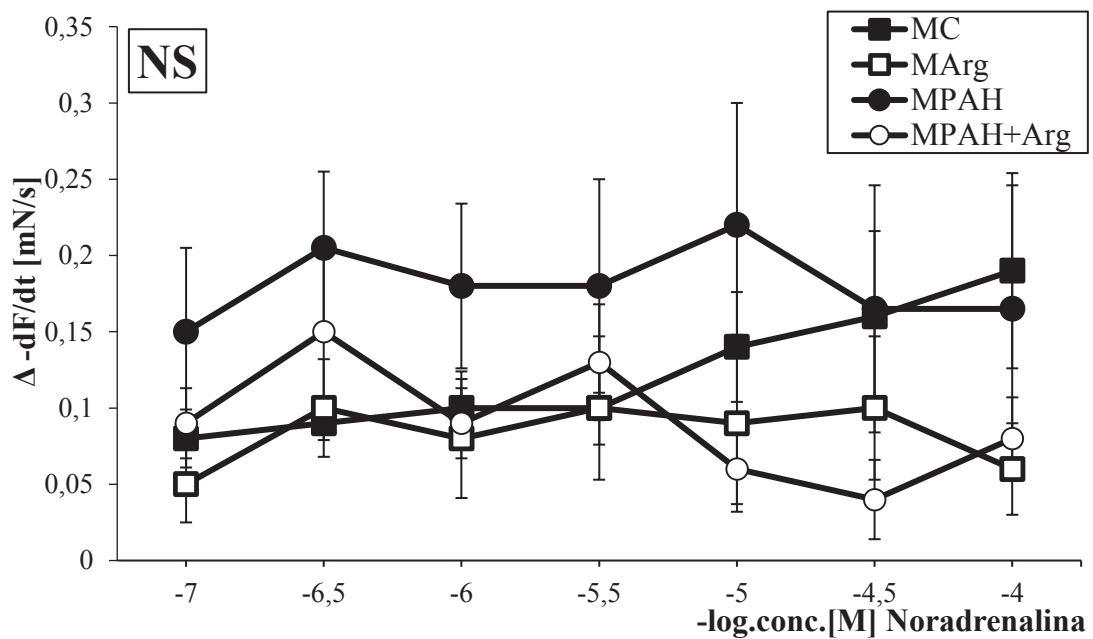


Wykres 16. Wpływ noradrenaliny (NOR) na zmianę szybkości rozkurczu ($-dF/dt$) mięśnia brodawkowego u (σ) samców (A) oraz (♀) samic (B) szczura po zastosowaniu L-argininy (L-ARG) bez lub z indukowanym tętniczym nadciśnieniem płucnym (PAH); ANOVA + test Newman-Keuls; wartości przedstawiono, jako średnia \pm SEM.

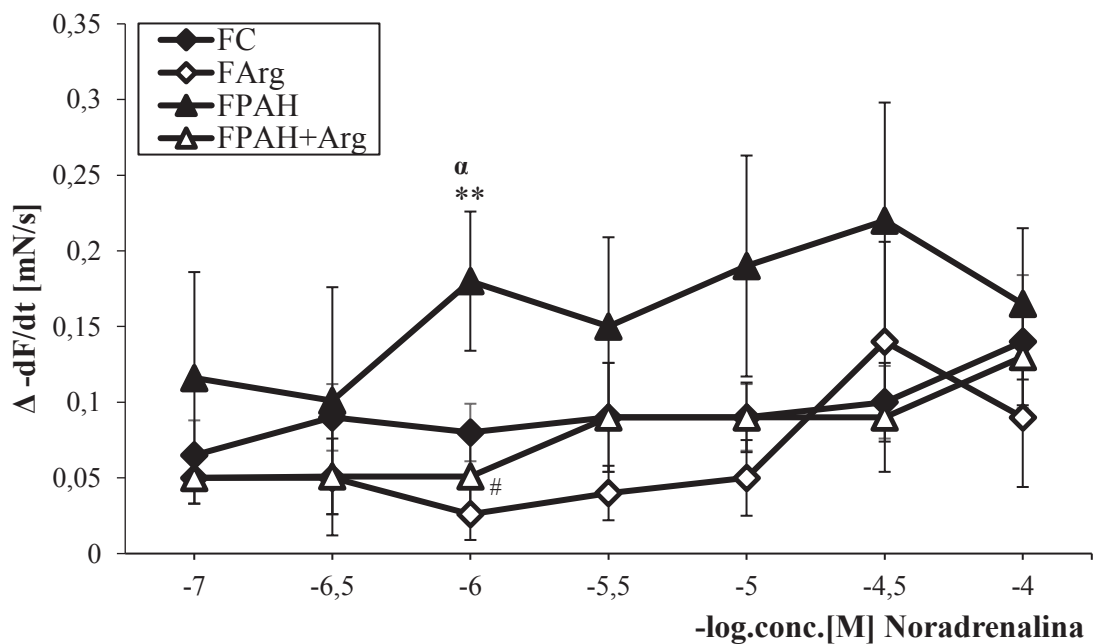
A. (σ) Samiec – NS;

B. (♀) Samica - ** - $P < 0,01$ vs. FArg; α - $P < 0,05$ vs. FC; # - $P < 0,05$ vs. FPAH.

A.



B.

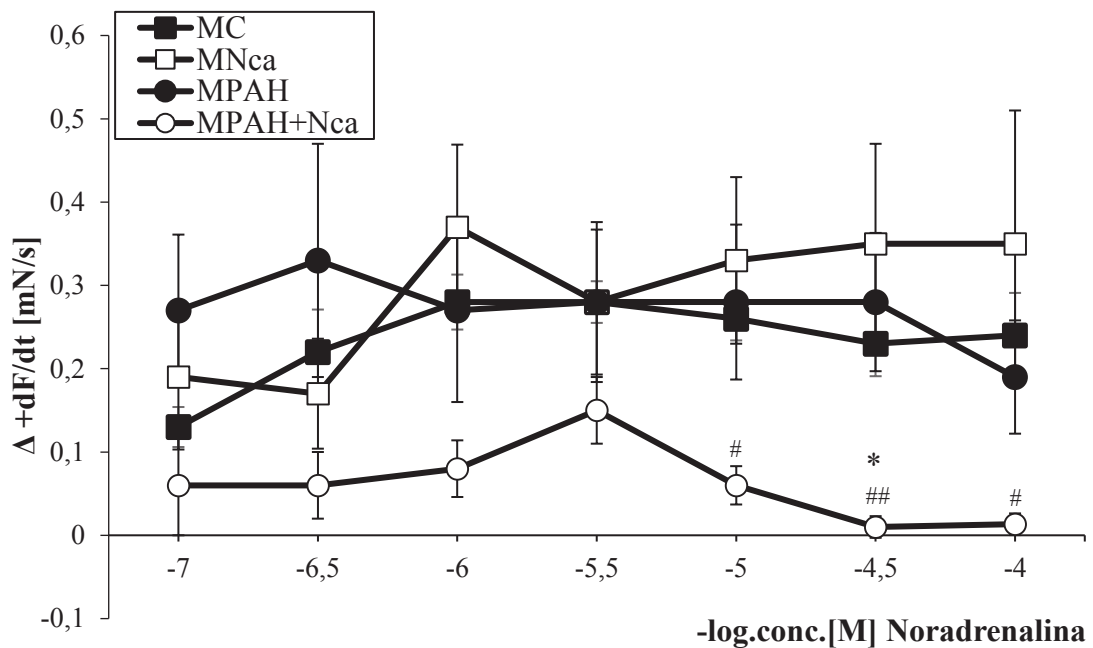


Wykres 17. Wpływ noradrenaliny (NOR) na zmianę szybkości skurczu (+dF/dt) mięśnia brodawkowego u (♂) samców (A) oraz (♀) samic (B) szczura po zastosowaniu nikotynamidu (NCA) bez lub z indukowanym tętniczym nadciśnieniem płucnym (PAH); ANOVA + test Newman-Keuls; wartości przedstawiono, jako średnia ± SEM.

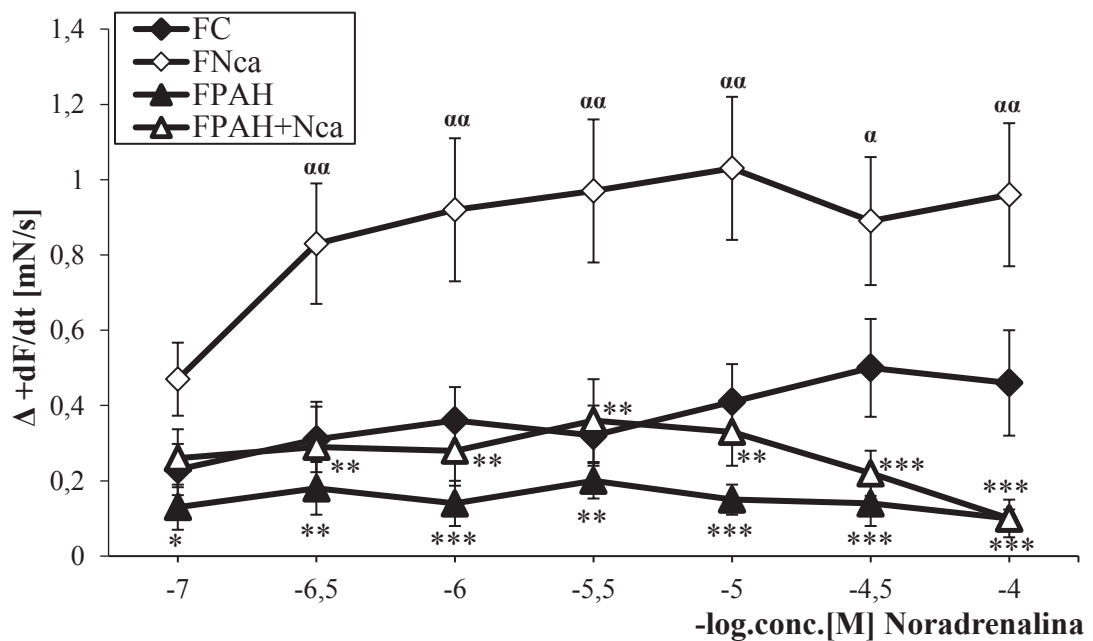
A. (♂) Samiec - * - P<0,05 vs. MNca; ## - P<0,01 lub # - p<0,05 vs. MPAH;

B. (♀) Samica - ***- P<0,001 lub **- P<0,01 lub*- P<0,05 vs. FNca; $\alpha\alpha$ - P<0,01 lub α - P<0,05 vs. FC.

A.



B.

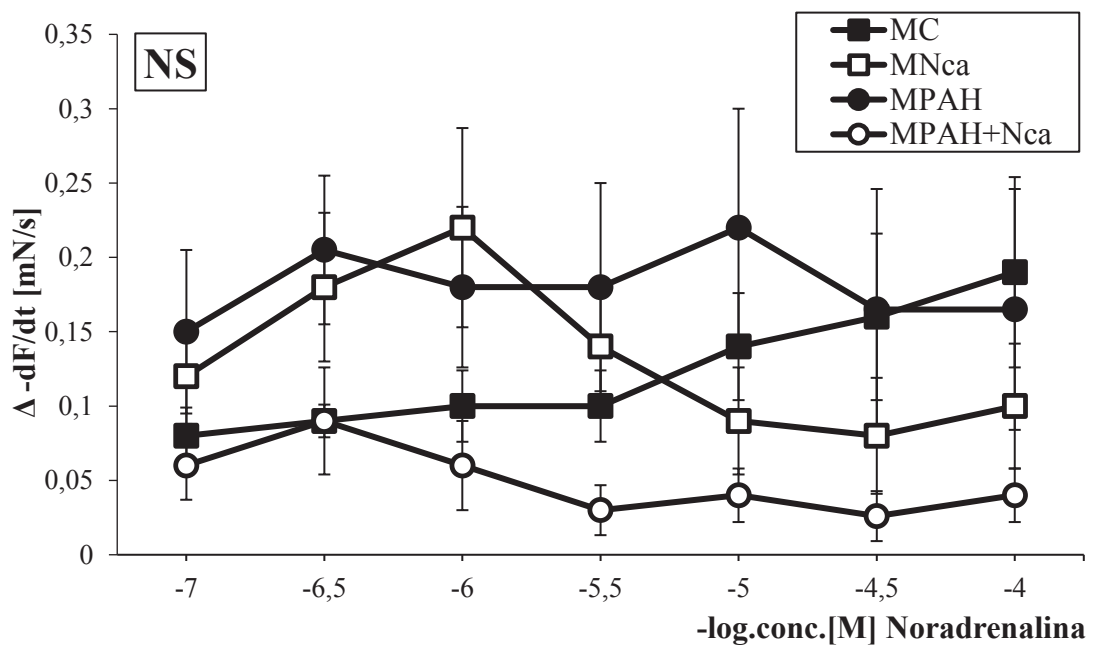


Wykres 18. Wpływ noradrenaliny (NOR) na zmianę szybkości rozkurczu ($-dF/dt$) mięśnia brodawkowatego u (σ) samców (A) oraz (♀) samic (B) szczura po zastosowaniu nikotynamidu (NCA) bez lub z indukowanym tętniczym nadciśnieniem płucnym (PAH); ANOVA + test Newman-Keuls; wartości przedstawiono, jako średnia \pm SEM.

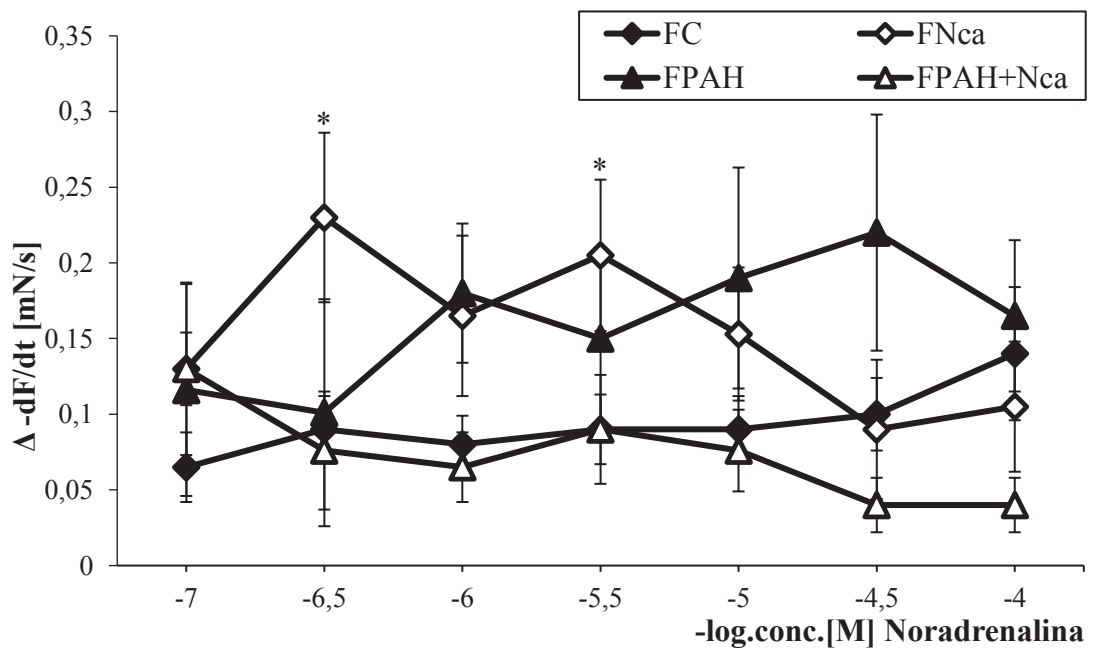
A. (σ) Samiec – NS;

B. (♀) Samica - * - $P < 0,05$ vs. FC.

A.



B.

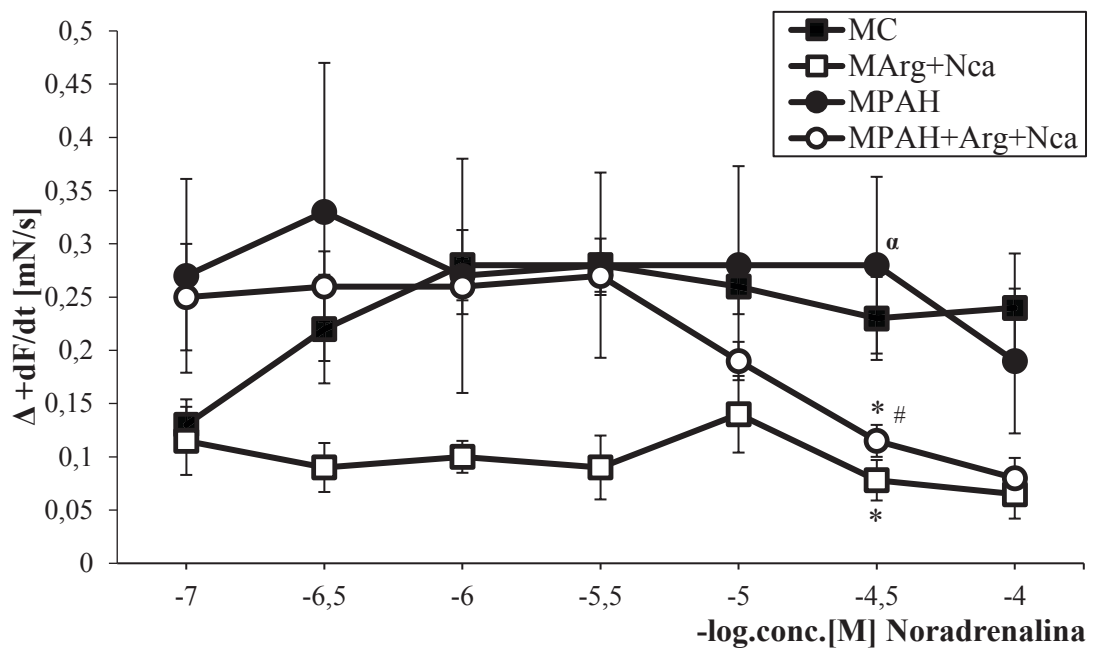


Wykres 19. Wpływ noradrenaliny (NOR) na zmianę szybkości skurczu ($+dF/dt$) u (σ) samców (A) oraz (♀) samic (B) szczura po stosowaniu łącznego podawania L-argininy i nikotynamidu (L-ARG+NCA) bez lub z indukowanym tętniczym nadciśnieniem płucnym (PAH); ANOVA + test Newman-Keuls; wartości przedstawiono, jako średnia \pm SEM.

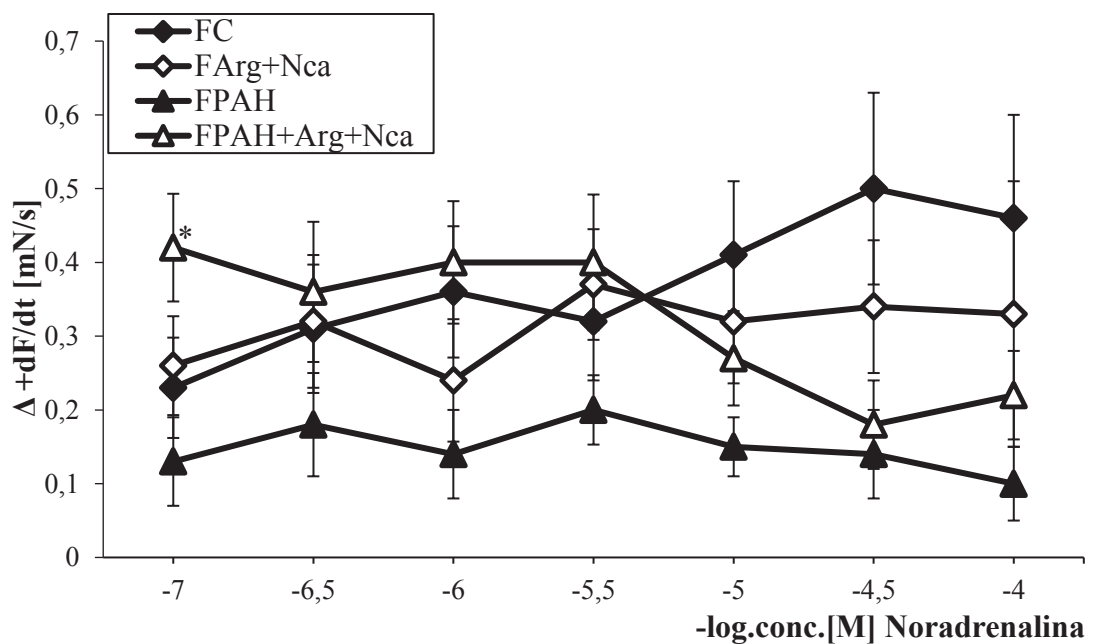
A. (σ) Samiec - * - $P < 0,05$ vs. MC; α - $p < 0,05$ vs. MArg+Nca; # - $P < 0,05$ vs. MPAH;

B. (♀) Samica - # - $P < 0,05$ vs. FPAH.

A.

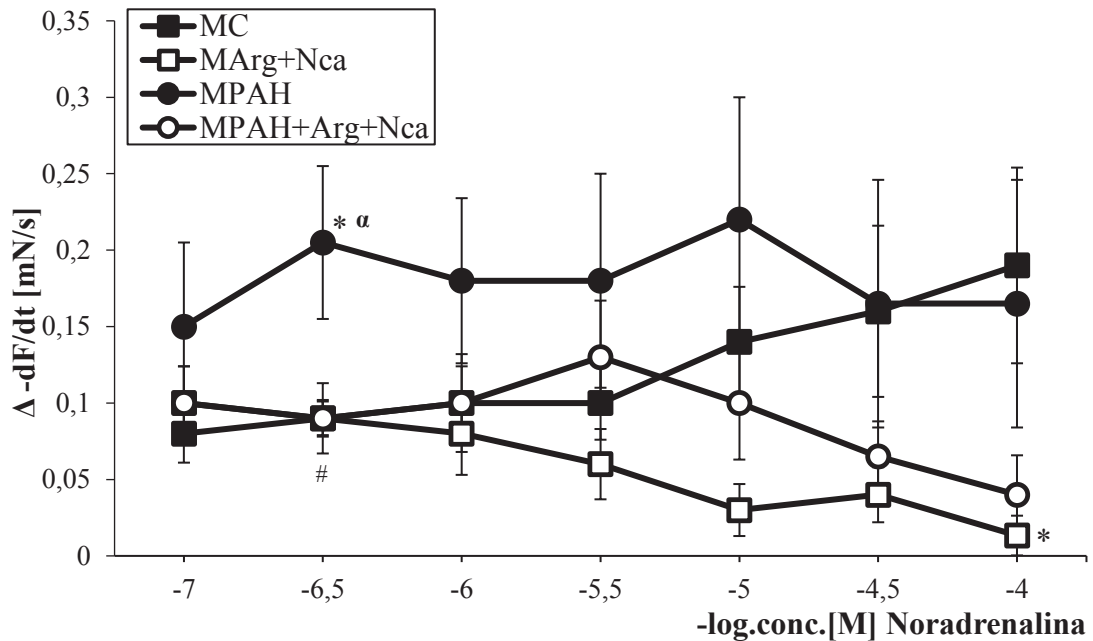


B.

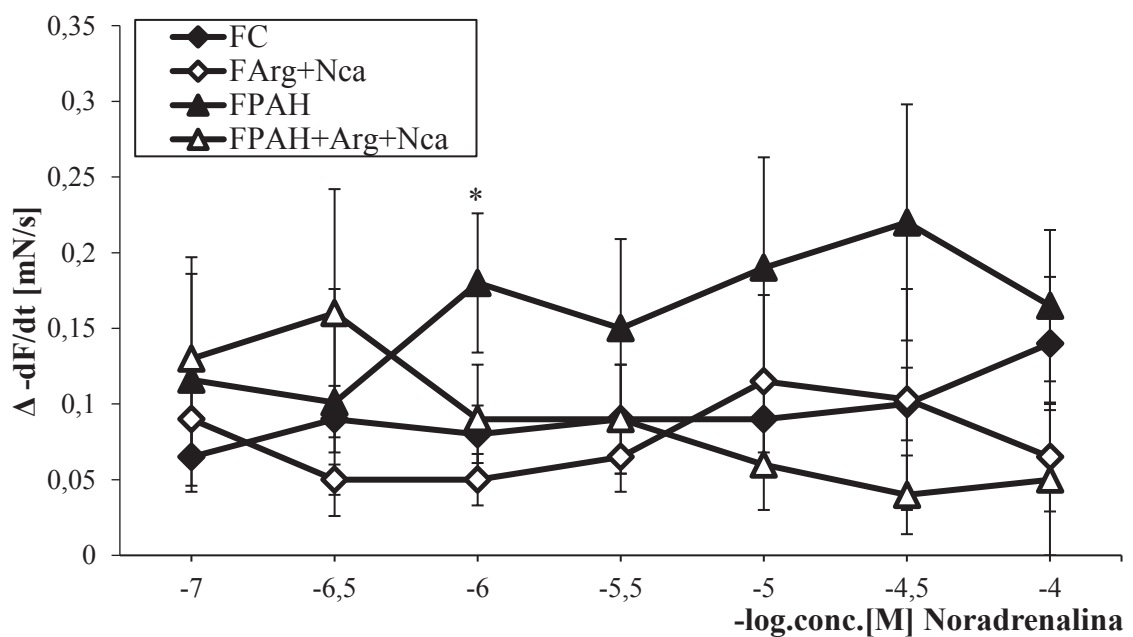


Wykres 20. Wpływ noradrenaliny (NOR) na zmianę szybkości rozkurczu ($-dF/dt$) u (♂) samców (A) oraz (♀) samic (B) szczura po stosowaniu łącznego podawania L-argininy i nikotynamidu (L-ARG+NCA) bez lub z indukowanym tętnicznym nadciśnieniem płucnym; ANOVA + test Newman-Keuls; wartości przedstawiono, jako średnia \pm SEM. A. (♂) Samiec - * - $P < 0,05$ vs. MC; α - $P < 0,05$ vs. MArg+Nca; # - $P < 0,05$ vs. MPAH; B. (♀) Samica - * - $P < 0,05$ vs. FArg+Nca.

A.



B.



4.6. Ocena obrazu histopatologicznego oraz pomiar morfometryczny tętnic płucnych

4.6.1. Analiza obrazu histopatologicznego po stosowaniu

L-argininy (L-ARG) i/lub nikotynamidu (NCA) u samców (♂) i samic (♀) szczura bez lub z indukowanym tętniczym nadciśnieniem płucnym

Po 23 dniach od aplikacji monokrotaliny wywołującej tętnicze nadciśnienie płucne, zostały poddane ocenie w mikroskopie świetlnym, preparaty histopatologiczne wykonane z tkanki płucnej szczura obu płci. Zmiany w obrazie histopatologicznym umieszczono w tabeli 6 A dla samców i w tabeli 6 B dla samic oraz na fotografiach 1-2.

W grupie kontrolnej oraz w grupie otrzymującej L-argininę u samców i samic szczura nie stwierdzono zmian morfologicznych w obrazie tętnic płucnych, odpowiadały normie.

Jednak, przewlekłe podawanie nikotynamidu u zwierząt obu płci spowodowało: obrzęk (u samców 10%; u samic 40%) oraz reakcje zapalne wewnątrznaczyniowe obejmujące głównie małe tętnice płucne (u samców 10%; u samic 60%). Dodatkowo u samic w grupie FNca obraz morfologiczny tętniczek płucnych wykazał wykrzepianie wewnątrznaczyniowe (10% przypadków).

Analiza mikroskopowa tętniczego nadciśnienia płucnego indukowanego monokrotaliną prezentowała charakterystyczny obraz histopatologiczny tętnic płucnych [22].

U samców z PAH zaobserwowano zmiany martwicze, obrzęk okołonaczyniowy, śródmiąższowe zapalenie płuc oraz nacieki zapalne wewnątrznaczyniowe, obraz nieznacznej niedodmy, obecność wylewów śródpecherzykowych oraz czopów płytkowych, makrofagi. W wyniku zwiększenia przerostu błony środkowej tętnic płucnych w obrazie histologicznym poprzez zmniejszenie światła naczynia zaobserwowano nadmierną i postępującą niedrożność naczyń płucnych, która występowała u ponad 90% przypadków. Dodatkowo zauważono zanik małych tętniczek płucnych (o średnicy do 0,3 mm) w wyniku nawarstwiania się błony środkowej (twory cebulowate), które utrudniały interpretacje przypadków. Wewnątrz ścian pogrubiałych tętniczek płucnych szczególnie tych znajdujących się blisko oskrzelików, widoczne były drobne kanały kapilarne, które tworzyły wrażenie splotu naczyń.

U samic z tętnicznym nadciśnieniem płucnym indukowanym monokrotaliną oprócz wymienionych wyżej zmian, obraz morfologiczny cechował się dużą ilością makrofagów, znaczną bezpowietrznością miąższu płucnego (niedodmą) oraz naciekami zapalnymi okołonaczyniowymi. Charakterystyczny dla samic z PAH był obrzęk u ponad 80% przypadków. Zaobserwowano jednak mniejszy przerost błony środkowej naczyń płucnych w porównaniu do samców.

Obraz morfologiczny tkanki płucnej u zwierząt obu płci otrzymujących L-argininę w tętnicznym nadciśnieniu płucnym wykazał, iż zmiany charakterystyczne dla PAH indukowanego monokrotaliną uległy zmniejszeniu: u samców w ponad 70% przypadków, a u samic w ponad 60% przypadków.

Natomiast szczury otrzymujące nikotynamid w indukowanym tętnicznym nadciśnieniu płucnym pomimo zmniejszenia przerostu tętniczek płucnych, a co za tym idzie zwiększenie światła tętnic płucnych szczególnie wśród oskrzelików płucnych oraz zmniejszenia obszarów niedodmy, zaobserwowano w obu grupach obecność komórek zapalnych wewnątrznaczyniowych, makrofagów oraz obrzęk naczyń.

Łączne podawanie diet w tętnicznym nadciśnieniu płucnym po aplikacji MCT obu płci zatrzymało zmiany występujące w PAH u ponad 70% badanych przypadków.

Tabela 6. Wpływ L-argininy (L-Arg) i nikotynamidu (Nca) na obraz morfologiczny tętnic płucnych u samców (A) i samic (B) szczura bez lub z indukowanym tętnicznym nadciśnieniem płucnym (PAH).

Interpretacja tabel:

- 0 – niestwierdzone zmiany; wygląd tkanki odpowiadał normie;
- skala od + (obecność danego uszkodzenia) do +++ (bardzo poważne i rozległe uszkodzenie badanej tkanki).

A.

| Zmiana Symbol Grupy | Zmiany w tętnicach płucnych | | Szklwienie z zatarciem budowy naczyń | Nacieki zapalne | | Wylewy | Obrzęk | Makrofagi | Symbol grupy na fotografii |
|---------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--|-----------------|------------------------|--------|--------|-----------|-------------------------------------|
| | Pogrubienie ścian naczyń | Zwężenie światła naczyń | | Wokół naczyń | W ścianie naczyń | | | | |
| MC | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | A |
| MPAH | +++ | ++ /+++ | ++ /+++ | ++ | +++ | ++ | ++ | ++ /+++ | B |
| MArg | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | C |
| MPAH + Arg | 0 | 0 | 0 | 0 | + | 0 | + | + | D |
| MNca | 0 | 0 | 0 | 0 | + | 0 | + | 0 | E |
| MPAH + Nca | + /++ | 0 | 0 | + | + /++ | 0 | ++ | ++ | F |
| MArg + Nca | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | + | 0 | G |
| MPAH + Arg +Nca | + | 0 | 0 | 0 /+ | 0 /+ | 0 | ++ | 0 | H |

B.

| Zmiana Symbol Grupy | Zmiany w tętnicach płucnych | | Szklwienie z zatarciem budowy naczyń | Nacieki zapalne | | Wylewy | Obrzęk | Makrofagi | Symbol grupy na fotografii |
|---------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--|-----------------|------------------------|--------|--------|-----------|-------------------------------------|
| | Pogrubienie ścian naczyń | Zwężenie światła naczyń | | Wokół naczyń | W ścianie naczyń | | | | |
| FC | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | A |
| FPAH | ++ /+++ | + /++ | ++ | +++ | + /++ | ++ | +++ | +++ | B |
| FArg | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | + | 0 | C |
| FPAH + Arg | + | 0 | 0 | + | + | 0 | + /++ | + | D |
| FNca | 0 | 0 | + | 0 | 0 /+ | + | + | 0 | E |
| FPAH + Nca | + | 0 | 0 | 0 | + /++ | 0 | +++ | 0 | F |
| FArg + Nca | 0 | 0 | 0 | 0 | ± | 0 | 0 /+ | 0 | G |
| FPAH + Arg +Nca | + | 0 | 0 | + | 0 | 0 | + | + | H |

4.6.2. Analiza morfometryczna po stosowaniu

L-argininy (L-ARG) i/lub nikotynamidu (NCA) u samców (♂) i samic (♀) szczura bez lub z indukowanym tętniczym nadciśnieniem płucnym

Przestawiono pomiary morfometryczne na grubość ściany tętnic płucnych o rozpiętości od 25 do 200µm, dzięki którym uzyskano ilościowy opis różnic pomiędzy badanymi grupami.

Na wykresach 21 A oraz B wykazano, iż tętnicze nadciśnienie płucne indukowane monokrotaliną u szczurów obu płci spowodowało statystycznie znaczne zwiększenie grubości ściany tętniczek płucnych znajdujących się wśród pęcherzyków płucnych zarówno w rejonie najgrubszym ($P<0,001$), jak i w rejonie najcieńszym ($P<0,001$) naczyń w porównaniu z wynikami grupy kontrolnej obu płci. U samców odpowiednio o 155,74% oraz 180,37%, a u samic odpowiednio o 117,34% oraz 115,75%. Podobne statystycznie istotne ($P<0,001$) różnice zaobserwowano między grupami z PAH obu płci, a grupami otrzymującymi same suplementy diety.

Podawanie L-argininy, nikotynamidu oraz połączenia L-argininy i nikotynamidu w tętniczym nadciśnieniu płucnym spowodowało statystycznie istotne zredukowanie ($P<0,001$) grubości tętnic płucnych w obu mierzonych regionach w porównaniu z grupą z samym PAH. U samców odpowiednio dla danej grupy w rejonie najgrubszym (Wykres 21 A) o 54,37%, 49,30% oraz 54,60%, a w rejonie najcieńszym (Wykres 21 B) odpowiednio o 53,11%, 54,84% oraz 60,30%. U samic w rejonie najgrubszym (Wykres 21 A) odpowiednio o 43,93%, 50,64% oraz 47,42%, a w rejonie najcieńszym (Wykres 21 B) pomiaru tętniczek odpowiednio o 52,20%, 57,0 % oraz 62,70%.

U samców nie zaobserwowano różnic w zmianie parametrów grubości tętniczek płucnych wśród pęcherzyków między wynikami grup otrzymujących same suplementy diety, a grupami z tętniczym nadciśnieniem płucnym po zastosowaniu diet (Wykres 21 A i B).

Przeciwnie u samic wykazano niewielki istotny statystycznie wzrost grubości ściany naczyń płucnych w rejonie najgrubszym w grupie PAH+L-ARG ($P<0,05$) oraz w grupie PAH+L-ARG+NCA ($P<0,05$) w porównaniu do grup odpowiednio L-ARG oraz L-ARG+NCA (Wykres 21 A).

Dodatkowo u samic stwierdzono statystycznie istotne zmniejszenie grubości ściany tętnic płucnych w rejonie najcieńszym w grupach otrzymujących same suplementy diety ($P < 0,05-0,01$) w porównaniu do grupy kontrolnej (Wykres 21 B).

Na wykresach 22 A i B przedstawiono pomiary grubości tętnic płucnych wśród oskrzelików płucnych.

Podobnie jak opisano wyżej w tętnicznym nadciśnieniu płucnym indukowanym MCT obu płci zaobserwowano statystycznie istotny wyraźny wzrost grubości ściany tętnic płucnych zarówno w rejonie najgrubszym (u samców o 192,33%; u samic o 115,0%) oraz najcieńszym (u samców o 262,73%; u samic o 139,74%) w porównaniu do grupy kontrolnej ($P < 0,001$).

Przewlekłe podawanie diet eksperymentalnych w tętnicznym nadciśnieniu płucnym spowodowało statystycznie istotne obniżenie ($P < 0,001$) parametrów grubości ściany tętnic płucnych w porównaniu do grupy PAH obu płci. U samców w rejonie najgrubszym tętniczek płucnych w grupie PAH+L-ARG 61,33%, w grupie PAH+NCA 53,75% oraz w grupie PAH+L-ARG+NCA 60,81% (Wykres 22 A). W rejonie najcieńszym odpowiednio do grup: 69,87%; 63,30% oraz 71,12% (Wykres 22 B). U samic w rejonie najgrubszym tętniczek płucnych okołooskrzelowych w grupie PAH+L-ARG 41,69%, PAH+NCA 52,31% oraz w grupie PAH+L-ARG+NCA 48,78% (Wykres 22 A), a w rejonie najcieńszym naczyń odpowiednio: 53,86%; 58,65% oraz 62,13% (Wykres 22 B).

Oba mierzone parametry grubości ścian tętnic płucnych w obszarze oskrzelików płucnych u samców nie różniły się statystycznie znamienne między grupami otrzymującymi suplementy diety bez lub z tętnicznym nadciśnieniem płucnym. Wyjątek stanowi grupa samców PAH+NCA, gdzie zaobserwowano niewielki, ale istotny wzrost grubości ściany tętniczek w rejonie najgrubszym w porównaniu do grupy kontrolnej ($P < 0,05$) oraz grupy NCA ($P < 0,01$) (Wykres 22 A).

Natomiast u samic w obszarze oskrzelików płucnych w grupie otrzymującej nikotynamid ($P < 0,05$) oraz połączenie diet L-argininy i nikotynamidu ($P < 0,01$) odnotowano statystycznie istotne obniżenie parametrów grubości ścian tętnic płucnych w rejonie najgrubszym w porównaniu do grupy kontrolnej oraz L-ARG (Wykres 22 A).

Podobnie w rejonie najcieńszym zaobserwowano statystycznie istotne zmniejszenie grubości ściany tętnic płucnych w grupach L-ARG ($P<0,01$), NCA ($P<0,01$) oraz L-ARG+NCA ($P<0,001$) w porównaniu do grupy kontrolnej samic (Wykres 22 B).

Dodatkowo w rejonie najgrubszym u samic otrzymujących L-argininę w tętnicznym nadciśnieniu płucnym analiza morfometryczna wykazała statystycznie istotne zwiększenie o 31,21% ($P<0,05$) grubości ściany tętniczek płucnych w porównaniu do grupy L-ARG.

Również pomimo skuteczności diet w grupie samic PAH+L-ARG+NCA odnotowano statystycznie istotne zwiększenie grubości ściany w rejonie najgrubszym o 48,24% ($P<0,01$) oraz w rejonie najcieńszym o 36,83% ($P<0,05$) tętnic płucnych w porównaniu do grupy L-ARG+NCA (Wykres 22 A i B).

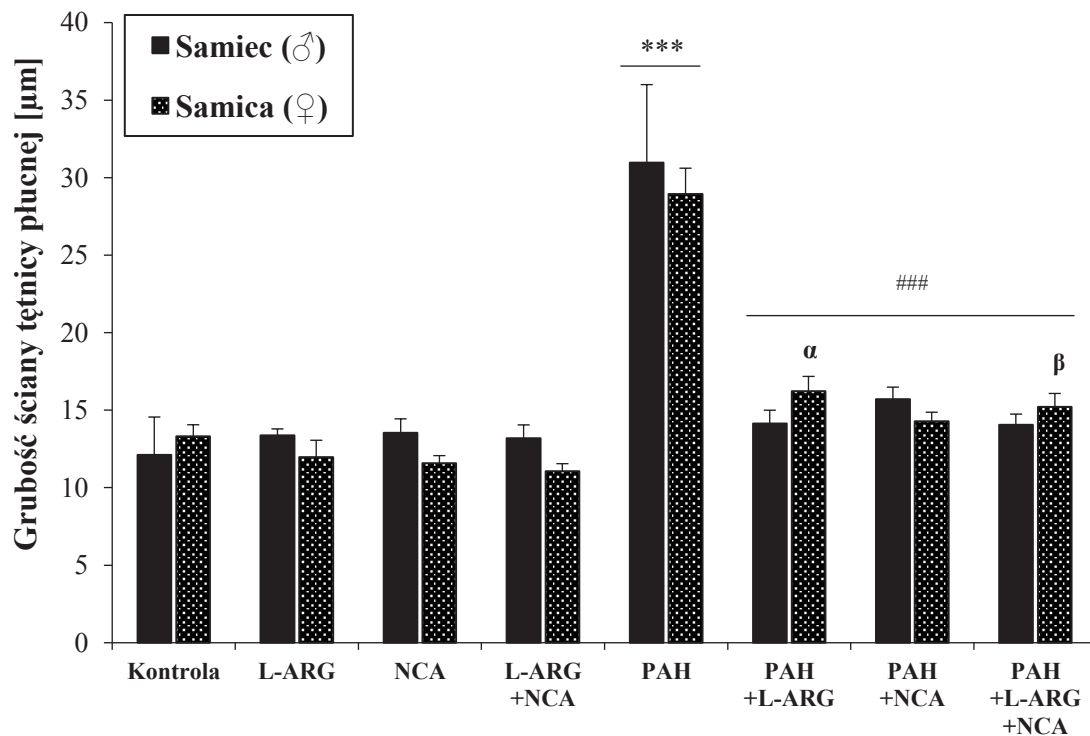
Wykres 21. Grubości ściany naczyń płucnych po zastosowaniu L-argininy (L-ARG) i/lub nikotynamidu (NCA) u samców (♂) i samic (♀) szczura bez lub z indukowanym tętnicznym nadciśnieniem płucnym (PAH).

Pomiar tętniczek płucnych w otoczeniu pęcherzyków płucnych w miejscu najgrubszym (A) oraz w miejscu najcieńszym (B) ściany tętnicy płucnej; ANOVA + test Newman-Keuls; wartości przedstawiono, jako średnia ± SEM.

A. Obszar pęcherzyków płucnych – pomiar tętniczki w miejscu najgrubszym

(♂) Samiec: *** - $P < 0,001$ vs. Kontrola, L-ARG, NCA lub L-ARG+NCA; ### - $P < 0,001$ vs. PAH;

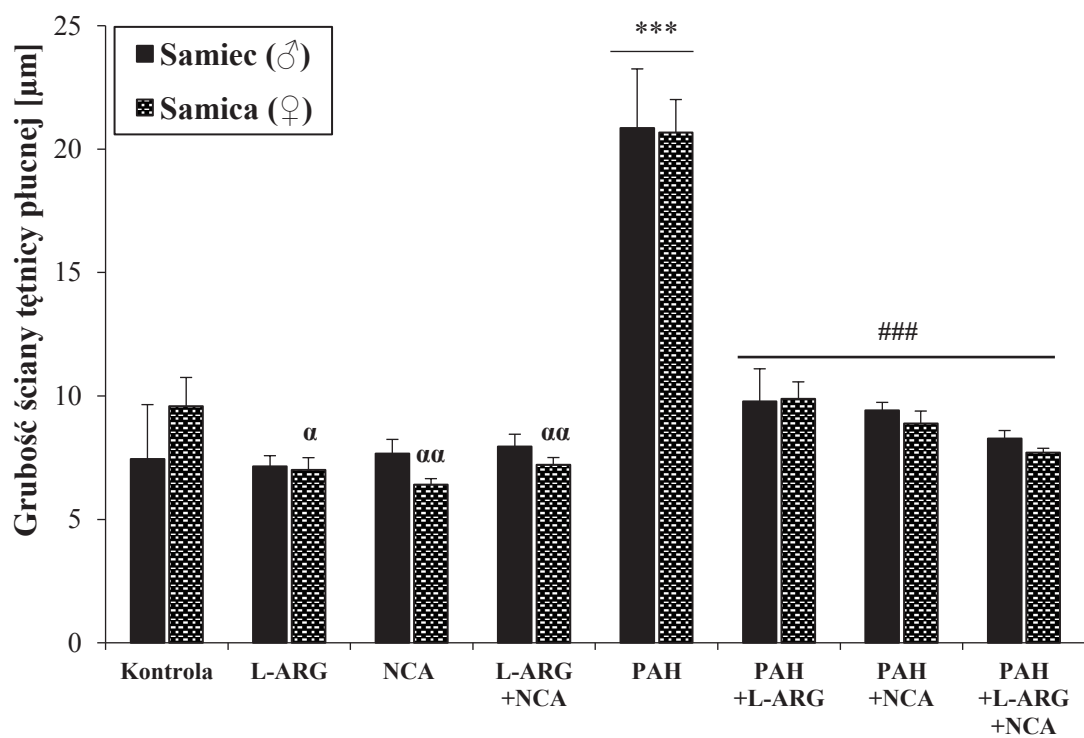
(♀) Samica: *** - $P < 0,001$ vs. Kontrola, L-ARG, NCA lub L-ARG+NCA; ### - $P < 0,001$ vs. PAH; α – $P < 0,05$ vs. L-ARG; β – $P < 0,05$ vs. L-ARG+NCA.



B. Obszar pęcherzyków płucnych – pomiar tętniczki w miejscu najcieńszym

(♂) Samiec: *** - $P < 0,001$ vs. Kontrola, L-ARG, NCA lub L-ARG+NCA; ### - $P < 0,001$ vs. PAH;

(♀) Samica: *** - $P < 0,001$ vs. Kontrola, L-ARG, NCA lub L-ARG+NCA; ### - $P < 0,001$ vs. PAH; $\alpha\alpha$ – $P < 0,01$ lub α - $P < 0,05$ vs. Kontrola.

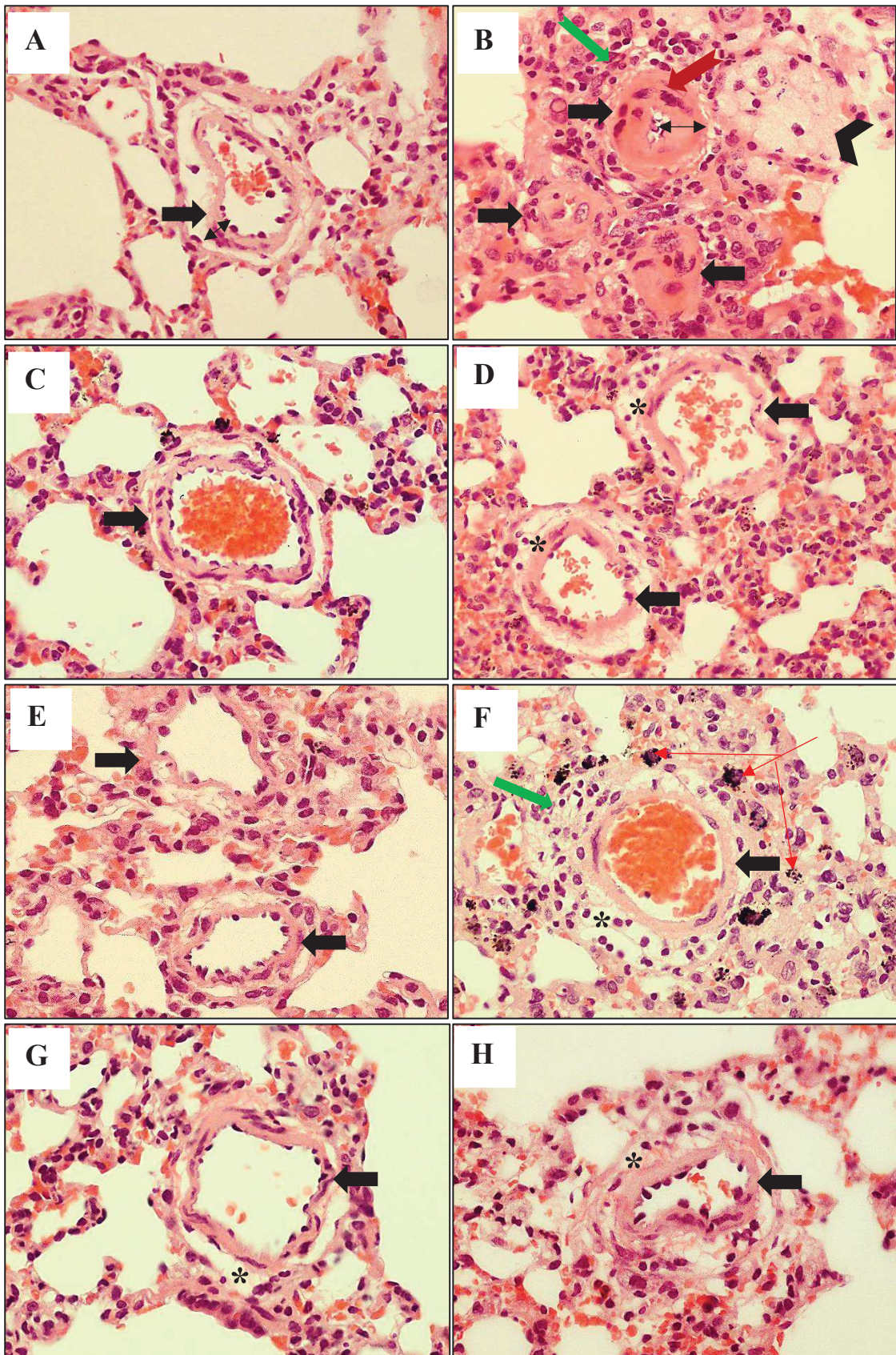


Fotografia 1. Obraz morfologiczny- przekrój poprzeczny tkanki płucnej z tętnicami płucnymi w otoczeniu pęcherzyków płucnych u (♂) samców (Fotografia 1 A) oraz u (♀) samic (Fotografia 1 B) szczura otrzymujących L-argininę i/lub nikotynamid bez lub z indukowanym tętniczym nadciśnieniem płucnym.

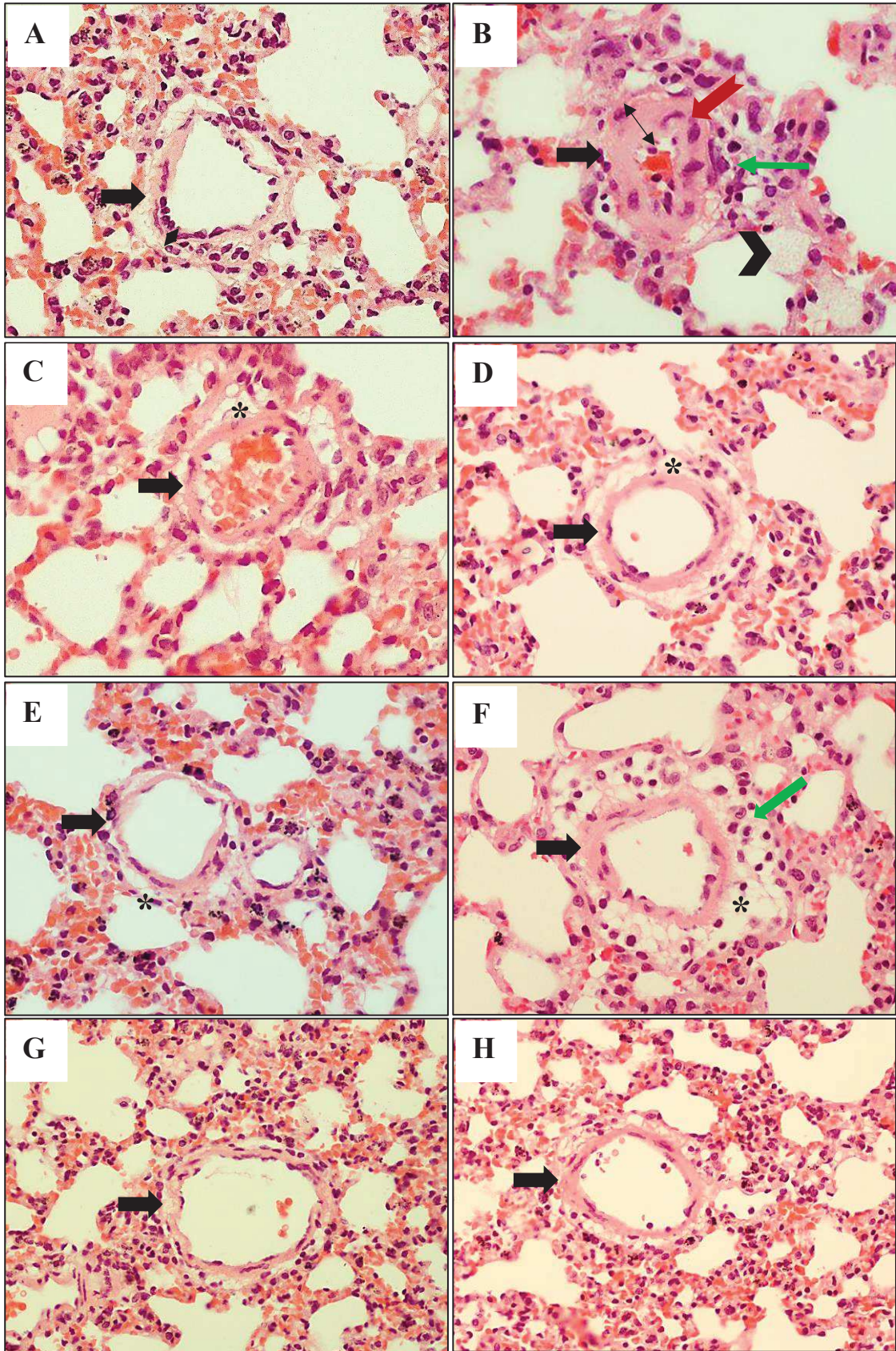
Mikroskop świetlny; barwienie H+E; powiększenie 400x.

Odnośniki do fotografii:

- ➡ - tętniczka płucna
- ↔ - obszar mierzony tętniczki płucnej w rejonie najgrubszym
- ➡ - grubość ściany tętniczki (szkliwienie)
- ➡ - nacieki zapalne okołonaczyniowe (*periarteriolitis*)
- ➡ - hemosyderocyty – jako wykładnik krwinkotoków okołonaczyniowych
- * - obrzęk okołonaczyniowy
- ➡ - makrofagi o cechach cytologicznych lipofagów



Fotografia 1 A. Zmiany histopatologiczne u samców (♂) szczura bez lub z PAH w tętniczkach wewnątrzplucnych i w ich otoczeniu pod wpływem L-argininy (L-Arg) i nikotynamidu (Nca) – głównie zmiany grubości ściany tętniczek; A- Kontrola; B- PAH; C- L-Arg; D- PAH+L-Arg; E- Nca; F- PAH+Nca; G- L-Arg+Nca; H- PAH+L-Arg+Nca.



Fotografia 1 B. Zmiany histopatologiczne u samic (♀) szczura bez lub z PAH w tętniczkach wewnątrzplucnych i w ich otoczeniu pod wpływem L-argininy (L-Arg) i nikotynamidu (Nca) – głównie zmiany grubości ściany tętniczek; A- Kontrola; B- PAH; C- L-Arg; D- PAH+L-Arg; E- Nca; F- PAH+Nca; G- L-Arg+Nca; H- PAH+L-Arg+Nca.

Wykres 22. Grubości ściany naczyń płucnych po zastosowaniu L-argininy (L-ARG) i/lub nikotynamidu (NCA) u samców (♂) i samic (♀) szczura bez lub z indukowanym tętnicznym nadciśnieniem płucnym (PAH).

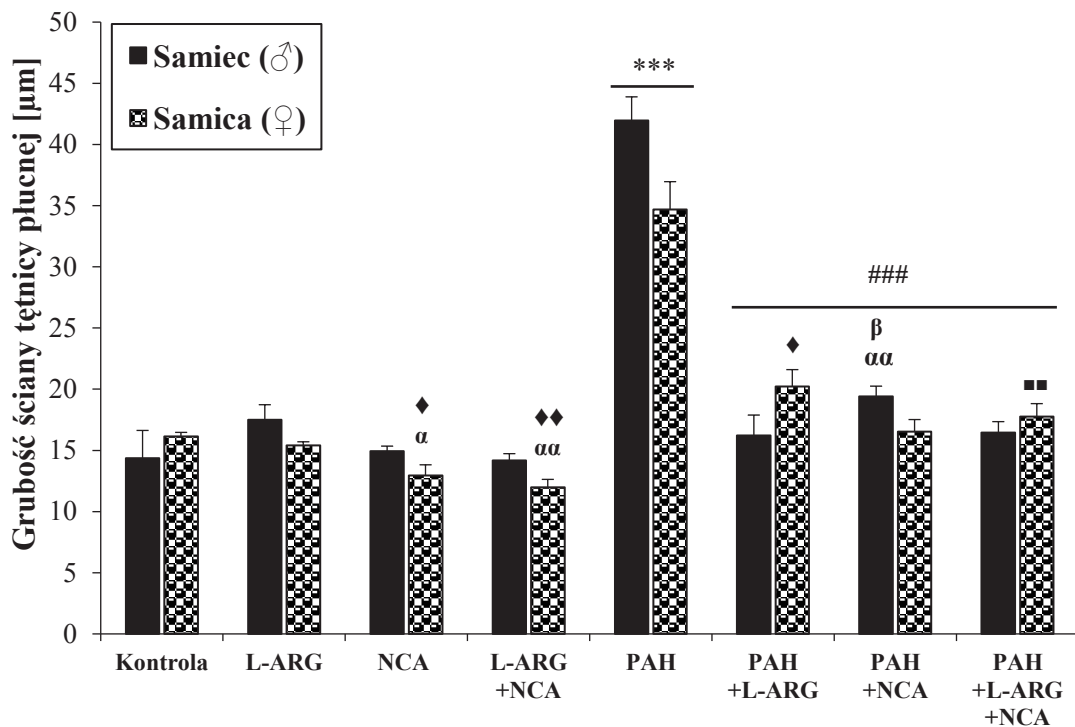
Pomiar tętniczek płucnych w otoczeniu oskrzelików płucnych w miejscu najgrubszym (A) oraz w miejscu najcieńszym (B) ściany tętnicy płucnej.

ANOVA + test Newman-Keuls; wartości przedstawiono, jako średnia ± SEM.

A. Obszar oskrzelików płucnych – pomiar tętniczki w miejscu najgrubszym

(♂) Samiec: *** - $P < 0,001$ vs. Kontrola, L-ARG, NCA lub L-ARG+NCA; #### - $P < 0,001$ vs. PAH; $\alpha\alpha$ – $P < 0,01$ vs. NCA; β – $P < 0,05$ vs. Kontrola;

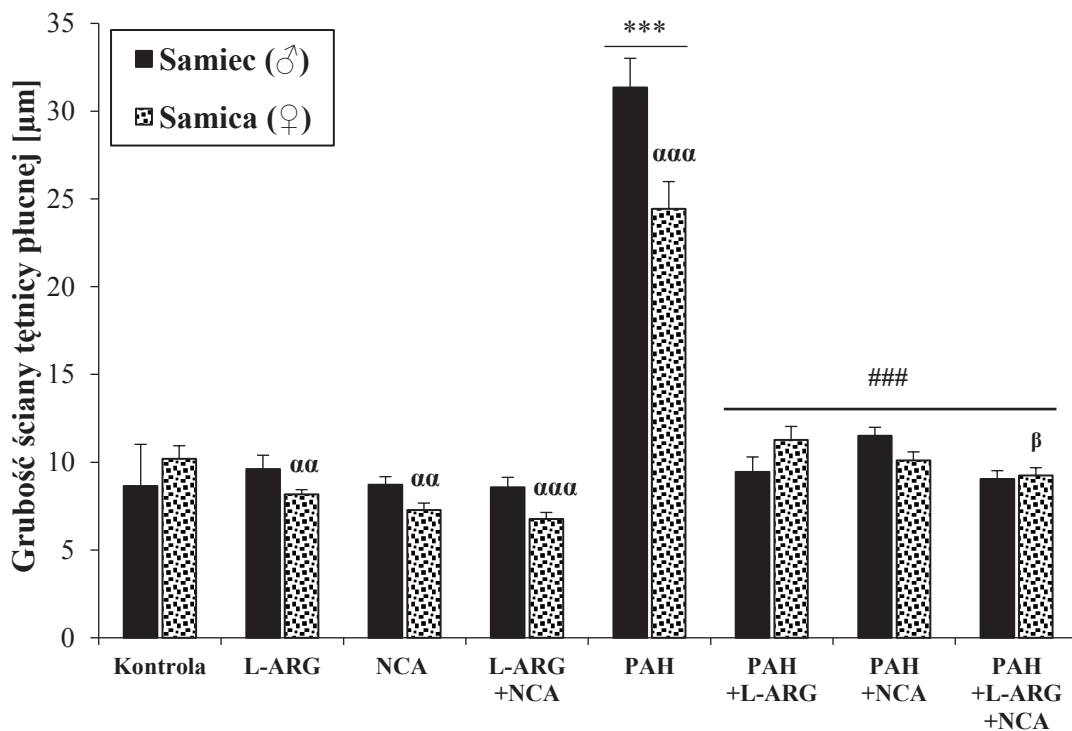
(♀) Samica: *** - $P < 0,001$ vs. Kontrola, L-ARG, NCA lub L-ARG+NCA; #### - $P < 0,001$ vs. PAH; $\alpha\alpha$ – $P < 0,01$ lub α – $P < 0,05$ vs. Kontrola; $\diamond\diamond$ - $P < 0,01$ lub \diamond - $P < 0,05$ vs. L-ARG; $\blacksquare\blacksquare$ - $P < 0,01$ vs. L-ARG+NCA.



B. Obszar oskrzelików płucnych – pomiar tętniczki w miejscu najcieńszym

(♂) Samiec: *** - $P < 0,001$ vs. Kontrola, L-ARG, NCA lub L-ARG+NCA; ### - $P < 0,001$ vs. PAH;







(♀) Samica: *** - $P < 0,001$ vs. L-ARG, NCA lub L-ARG+NCA; ### - $P < 0,001$ vs. PAH; $\alpha\alpha\alpha$ – $P < 0,001$ lub $\alpha\alpha$ – $P < 0,01$ vs. Kontrola; β – $P < 0,05$ vs. L-ARG+NCA.

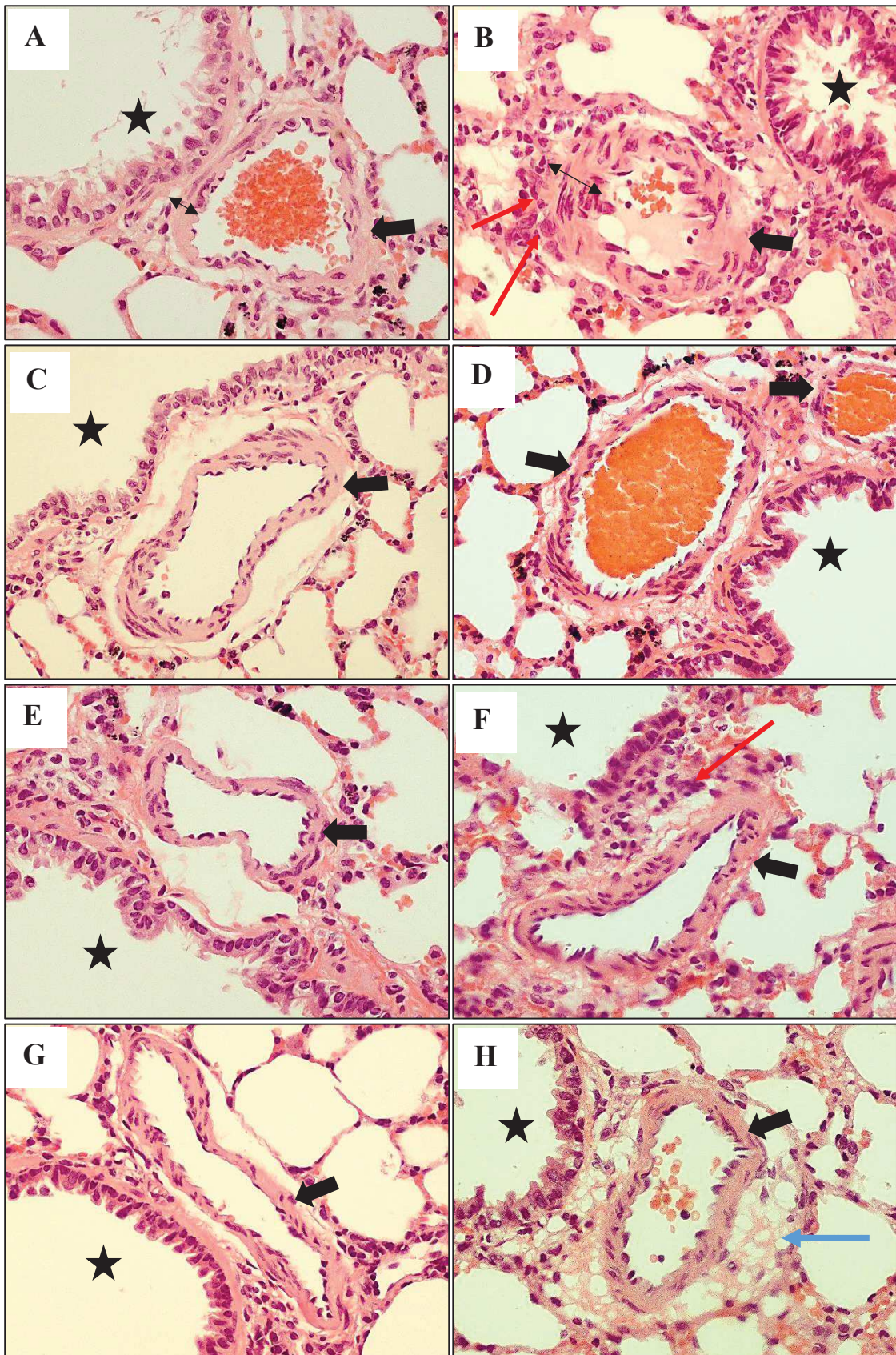


Fotografia 2. Obraz morfologiczny- przekrój poprzeczny tkanki płucnej z tętnicami płucnymi w otoczeniu oskrzelików płucnych u (♂) samców (Fotografia 1 A) oraz u (♀) samic (Fotografia 1 B) szczura otrzymujących L-argininę i/lub nikotynamid bez lub z indukowanym tętniczym nadciśnieniem płucnym (PAH).

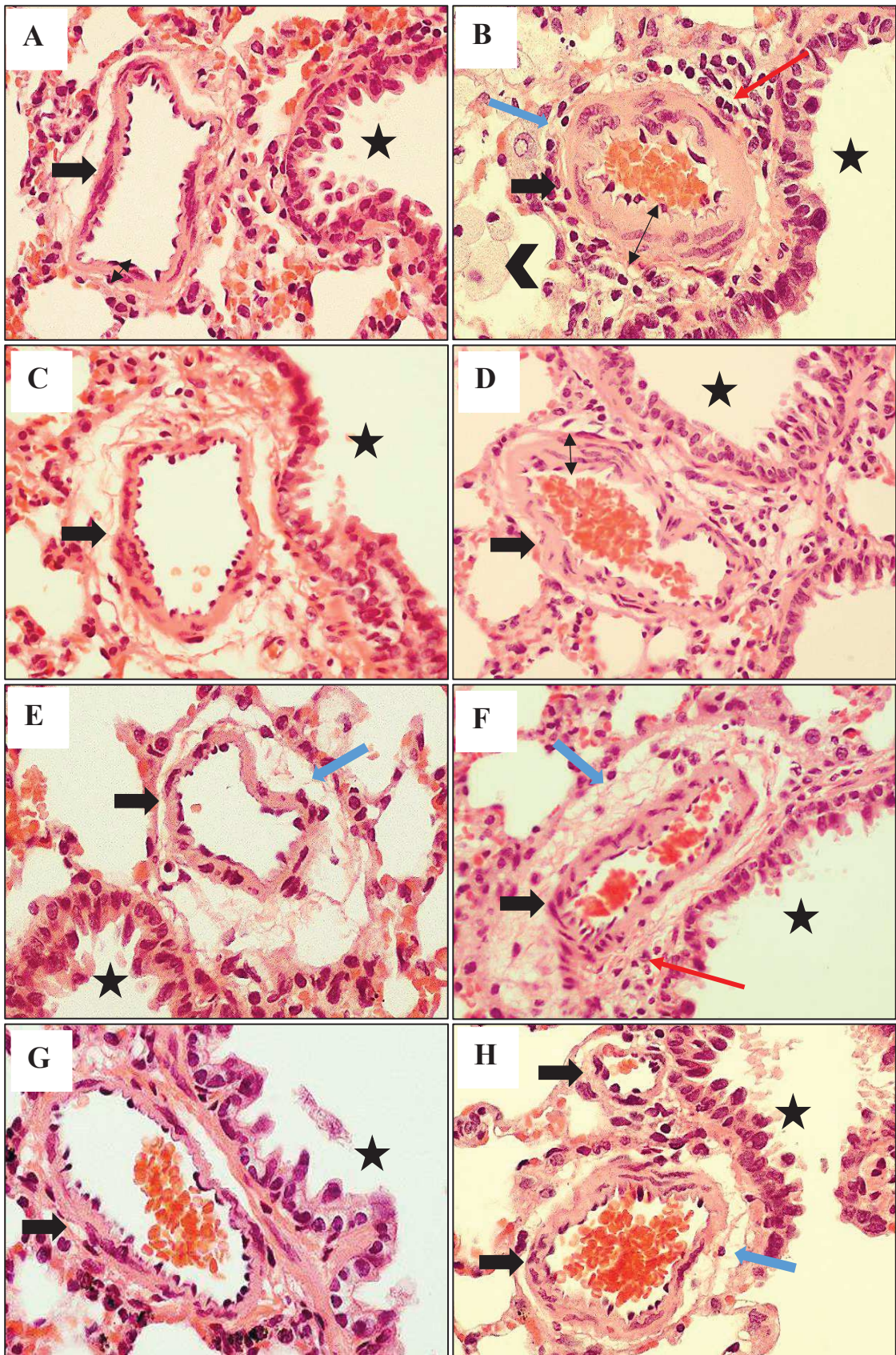
Mikroskop świetlny; barwienie H+E; powiększenie 400x.

Odnośniki do fotografii:

-  - tętniczka płucna
-  - obszar mierzony tętniczki płucnej w rejonie najgrubszym
-  - oskrzelek płucny
-  - naciek okołonaczyniowy z komórek zapalnych (*periarteriolitis*)
-  - obrzęk okołonaczyniowy
-  - makrofagi o cechach cytologicznych lipofagów



Fotografia 2 A. Zmiany histopatologiczne u samców (♂) szczura bez lub z PAH w tętnicach okołoskrzelikowych i w ich otoczeniu pod wpływem L-argininy (L-Arg) i nikotynamidu (Nca) – głównie zmiany grubości ściany tętnic; A- Kontrola; B- PAH; C- L-Arg; D- PAH+L-Arg; E- Nca; F- PAH+Nca; G- L-Arg+Nca; H- PAH+L-Arg+Nca.



Fotografia 2 B. Zmiany histopatologiczne u samic (♀) szczura bez lub z PAH w tętnicach okołoskrzelikowych i w ich otoczeniu pod wpływem L-argininy (L-Arg) i nikotynamidu (Nca) – głównie zmiany grubości ściany tętnic; A- Kontrola; B- PAH; C- L-Arg; D- PAH+L-Arg; E- Nca; F- PAH+Nca; G- L-Arg+Nca; H- PAH+L-Arg+Nca.

5. DYSKUSJA

Przedstawiona praca miała na celu dokonanie analizy wpływu przewlekłego, doustnego podawania L-argininy i nikotynamidu w monoterapii lub w terapii skojarzonej na pracę mięśnia sercowego oraz na zmiany na poziomie krążenia płucnego z uwzględnieniem dysfunkcji prawej komory serca (RV) w trakcie rozwoju tętniczego nadciśnienia płucnego w zależności od płci na modelu zwierzęcym. Obecnie w dostępnym piśmiennictwie brakuje doniesień dotyczących ewentualnego współdziałania ww. związków na układ sercowo-naczyniowy w warunkach doświadczalnego tętniczego nadciśnienia płucnego względem płci.

W celu dokonania analizy wartości otrzymanych wyników w przedstawionej pracy należy odnieść się do wybranego modelu doświadczalnego oraz porównać otrzymane rezultaty z dotychczas opublikowanymi badaniami w obszarze tętniczego nadciśnienia płucnego. Idealny zwierzęcy model eksperymentalny powinien obejmować kluczowe kliniczne, hemodynamiczne oraz histopatologiczne cechy ludzkiego PAH [259]. Wiadomo obecnie, iż wszystkie modele doświadczalne nadciśnienia płucnego charakteryzują się swoistymi cechami i pozwalają na uzyskanie danej grupy PH (tzn. 1, 3 oraz 4). Dodatkowo dostarczają cennych informacji odnoszących się do faz rozwoju choroby oraz wskazują na nowe hipotezy niezbędne do wyjaśnienia komórkowych i molekularnych ścieżek patomechanizmu PAH, które ostatecznie wpłyną na przeżywalność i jakość życia pacjenta. Zaproponowano kilka różnych podziałów modeli doświadczalnych z użyciem zwierząt [180, 221, 259], wśród których wyróżnia się modele klasyczne oraz alternatywne [280]. Obserwacje potwierdzają, iż pomimo wieloletnich prób dostępne modele nie oddają w pełni ludzkiego PAH, sugerując kluczową rolę wcześniej wspomnianej hipotezy „multiple-hits” w patogenezie tego schorzenia. Dlatego brane są również pod uwagę modele łączące kilka różnych ścieżek patogenezy, które mogą sugerować uzyskanie cięższej postaci tego schorzenia z lepszym odwzorowaniem ludzkiego PAH w obrazie histologicznym i hemodynamicznym. Przedstawione modele mogą obejmować modyfikację tych klasycznych takich jak: modele oparte na jednorazowym podaniu monokrotaliny w połączeniu z: pneumonektomią lub zwiększonym przepływem płucnym (ang. *aorto-caval shunt*) [318], niedoborem receptora dla endoteliny B(ET_B) oraz modelem przewlekłego niedotlenienia w połączeniu z iniekcją inhibitora VEGF - SU5416 [221]. Natomiast wśród dostępnych i nadal

testowanych alternatywnych modeli zwierzęcych warunkujących rozwój PAH wyróżnia się między innymi: PAB (ang. *pulmonary arterial banding*; zwężenie taśmą pnia płucnego), Fawn-Hooded Rat (FHR; wyselekcjonowany szczep szczurzy charakteryzujący się spontanicznie rozwijającym się nadciśnieniem płucnym w odpowiedzi na łagodne niedotlenienie), modele uwarunkowane modyfikacjami genetycznymi takimi jak: wytworzenie nadekspresji genu dla: Ang-1, IL-6, S100A4/Mts1, 5-HTT, TGF- α i TNF- α oraz modele z delecją (ang. *knockout model*): BMPR II, apolipoproteiny-E i neprylizyny [221]. Okazuje się, iż modele łączone oraz alternatywne pomimo zaawansowania procedury mogą być stosunkowo kosztowne lub wymagać sporych umiejętności technicznych. Dodatkowo związane są z wysoką śmiertelnością zwierząt oraz nie obejmują wszystkich złożonych cech PAH [180]. Dlatego większość przeprowadzonych badań doświadczalnych na zwierzętach odnosi się do dwóch klasycznych modeli takich jak: przewlekłe niedotlenienie (ang. *chronic hypoxia model*; CH) oraz indukcja PAH w wyniku podania monokrotaliny (ang. *monocrotaline-induced PAH*; MCT). W pierwszym przypadku nadciśnienie płucne wywołuje się poprzez umieszczenie zwierzęcia (najczęściej myszy lub szczura) najczęściej w komorze hipobarycznej. Cechą charakterystyczną przewlekłej hipoksji jest silna reakcja skurczowa naczyń płucnych na ww. warunki. Jednocześnie zaobserwowano przebudowę dystalnych części tętnic płucnych z proliferacją warstwy środkowej tętnic i odkładaniem macierzy międzykomórkowych oraz istotny wzrost ciśnienia skurczowego prawej komory z jej przerostem. Zaletą opisywanego modelu jest nie tylko prostota realizacji, ale charakterystyczna powtarzalność i możliwość odwzorowania metody na danym szczepie zwierząt. Natomiast istnieją również ograniczenia stosowania ww. modelu, z których najistotniejszą jest zmienność międzygatunkowa na przewlekłe niedotlenienie, wiek zwierząt oraz brak dowodów niewydolności prawej komory serca. Ponadto w odpowiedzi na niedotlenienie zaobserwowano umiarkowany lub całkowity brak stanu zapalnego i zmian zarostowych lub splotowatych charakterystycznych dla pacjentów z ciężkim PAH. Dlatego też powyższy model eksperymentalny zaproponowano w przypadkach opisujących sytuacje kliniczne nadciśnienia płucnego w przebiegu chorób płuc i/lub hipoksji (grupa 3 PH) takich jak: śródmiąższowa choroba płuc, zaburzenia oddychania podczas snu, ciężka przewlekła obturacyjna choroba płuc lub przewlekła ekspozycja na dużych wysokościach [357].

Drugim klasycznym indukowanym, chemicznym modelem przewlekłego nadciśnienia płucnego jest zwierzęcy model monokrotalinowy. Monokrotalina (MCT) to

makrocykliczny alkaloid pirolizydynowy uzyskiwany z nasion rośliny z gatunku *Crotalaria spectabilis* [120]. Dokładny mechanizm działania tego związku nie jest poznany. Uważa się jednak, iż związany jest on z metabolizmem wątrobowym monokrotaliny przy udziale cytochromu P450 (CYP3A4) z wytworzeniem aktywnego pirolu metabolitu dehydromonokrotaliny (MCTP), który ingeruje w prawidłową syntezę białek oraz DNA i odpowiada za toksyczne działanie związku [23]. Po podaniu MCTP występuje charakterystyczny tzw. „syndrom monokrotalinowy”, który objawia się między innymi: ostrym martwiczym zapaleniem tętnic płucnych lub przerostem prawej komory serca [102]. Obecnie wyżej wymieniony model zwierzęcy jest często wykorzystywany w badaniach eksperymentalnych ze względu na uproszczoną procedurę techniczną, charakterystyczną powtarzalność, niski koszt oraz przede wszystkim możliwość uzyskania zgodności zmian patofizjologicznych i zastosowań terapeutycznych podobnych do „ludzkiego” PAH [271].

W przedstawionej pracy zastosowano model doświadczalny tętniczego nadciśnienia płucnego indukowanego monokrotaliną. Metoda ta była już wcześniej stosowana w naszych badaniach między innymi w badaniach na mięśniówce gładkiej tętnicy ogonowej szczura [153]. W piśmiennictwie opisywano tętnicze nadciśnienie płucne indukowane MCT w zakresie dawek od 40 do 300 mg/kg m.c. z różnymi okresami latencji wystąpienia PAH [222]. Mogą one wynosić odpowiednio: trzy, siedem, czternaście, dwadzieścia jeden lub trzydzieści pięć dni. Różnice dotyczą także czasu podania leków o możliwym działaniu terapeutycznym lub profilaktycznym (zakres: od siedmiu do czterdziestu dwóch dni) [271]. Dodatkowo większość schematów opiera się na zapobiegawczym działaniu badanych związków polegającym na przewlekłym dawkowaniu substancji przed lub od razu po iniekcji monokrotaliny [217]. Meyrick i wsp. wykazali, iż po 3 dniach od spożycia monokrotaliny (dawka 1g/kg paszy) widoczna była przebudowa dystalnych tętnic płucnych. Zaś po upływie 7 do 14 dni zaobserwowano zmiany zapalne w płucach, uszkodzenie śródbłonna oraz przebudowa tętnic płucnych z równoczesnym nagromadzeniem się makrofagów i komórek jednojądrzastych oraz widoczny przerost prawej komory serca [200, 224]. Zmiany te potwierdzają badania morfometryczne wykazujące znaczący przerost ścian tętnic płucnych [280]. Jednakże jak zaobserwowano istotnym ograniczeniem zastosowania monokrotaliny jest zmienność międzygatunkowa, ale również w niektórych przypadkach zmienność wśród szczepu danych zwierząt. Dlatego wśród zwierząt eksperymentalnych najlepiej rozwijającym oraz indukującym szereg zmian charakterystycznych dla „ludzkiego” PAH jest szczur [73,

102]. Jednakże monokrotalina powoduje występowanie pewnych anomalii niezwiązanych z „ludzką” postacią PAH takie jak: nadmierny obrzęk pęcherzyków i naczyń płucnych, niedrożność żył, obniżenie ciśnienia parcjalnego tlenu we krwi. Wysokie dawki monokrotaliny (60-300mg/kg m.c.) mogą przyczynić się do działania hepatoksycznego, kardiogenego lub nefrotoksycznego [102, 280]. Zaobserwowano, iż wszystkie ww. nieprawidłowości mogą odpowiadać za zwiększoną śmiertelność zwierząt. Ahmed i wsp. odnotowali, iż po 21 dniach eksperymentu śmiertelność wśród zwierząt otrzymujących MCT wzrasta o 27% [135]. Natomiast po upływie 35 dni od indukcji MCT odnotowano niski współczynnik przeżycia zwierząt wynoszący 35% [292]. Jednak pomimo wyżej wymienionych niedogodności w badaniach za pomocą tego modelu dokonano szeregu ocen dla poszczególnych związków stosowanych w celu leczenia PAH takich jak: imatynib, hamowanie kinazy Rho (fasudyl), ETA, inhibitory transportera serotoniny, inhibitory PDE-5, statyny, inhibitor kinazy tyrozynowej i wiele innych [180]. Niewątpliwymi zaletami wybranego w pracy modelu monokrotalinowego są liczne zmiany charakterystyczne dla patogenezy PAH między innymi znaczne upośledzenie frakcji wyrzutowej prawej komory serca prowadzące do jej przerostu, zwiększenie stresu oksydacyjnego oraz nadmierna aktywność markerów prozapalnych w wyniku zmian w regulacji iNOS [135]. Dodatkowo w omawianej pracy w celu ograniczenia ryzyka wystąpienia nadmiernej śmiertelności wśród zwierząt przedstawiony model doświadczalny mieścił się w granicy do 23 dni eksperymentu od iniekcji MCT z jednoczesnym zachowaniem zmian patologicznych zaobserwowanych dla tętniczego nadciśnienia płucnego indukowanego monokrotaliną, co zostało potwierdzone w badaniach morfometrycznych tkanki płucnej. Ponadto warto zwrócić uwagę, iż wiele modeli badawczych terapii nadciśnienia płucnego u zwierząt opiera się na przewlekłym pozajelitowym zastosowaniu związków terapeutycznych (np. podanie podskórnym lub częściej dootrzewnowym), a nie suplementacji doustnej. Zastosowana doustna suplementacja wiązała się również z ograniczeniem stresu lub cierpienia zwierząt doświadczalnych.

W niemiejszej pracy dokonano analizy pojedynczego oraz łącznego wpływu L-argininy i nikotynamidu na model tętniczego nadciśnienia płucnego indukowanego monokrotaliną w grupie samców, ale również samic szczura. Celem przeprowadzonych badań było zrozumienie podstawowych mechanizmów działania związków poprzez badanie ich wpływu na hemodynamikę prawej komory serca oraz na obraz histopatomorfometryczny tętnic płucnych w PAH.

Odkrycie, iż arginina jest naturalnym donorem NO pokazało nowe możliwości terapeutyczne zastosowania tego aminokwasu. Wcześniej, bowiem była wykorzystywana, jako ogniwo cyklu mocznikowego najczęściej w przypadkach detoksykacji organizmu w wyniku zatrucia amoniakiem, w stanach astenicznych, niedożywieniu, hepatoksyczności lub jako związek zwiększający odporność mięśni na zmęczenie podczas długotrwałego wysiłku [156]. Niektóre choroby np. miażdżyca, hipercholesterolemia lub nadciśnienie płucne powodują istotne obniżenie stężenia NO. Dlatego w licznych badaniach podawano L-Arg doustnie oraz w infuzji. Potwierdzono korzystne działanie w stanach chorobowych jednak podobny efekt był widoczny również u osób zdrowych [226]. Wnioskowano, iż wazodylatacyjne działanie argininy jest efektem zwiększonego dostępu substratu wewnątrzkomórkowego dla produkcji NO. Jednak warunek skuteczności leczenia zależy tylko od aktywności konstytutywnej syntazy tlenku azotu zaś podanie nadmiaru substratu nie powoduje wytworzenia dużych ilości NO. Widoczne jest to w momencie porównania stężenia wewnątrzkomórkowej argininy ze stałą szybkości reakcji (K_m ; stała Michaelisa-Menten) syntazy NO, gdzie wewnątrzkomórkowe stężenie L-Arg wynosiło kilkaset μmol a K_m dla syntazy tlenku azotu około $5\mu\text{mol}$. Zjawisko to nazwano „paradoksem argininy” [160] i definiowane jest w sytuacji gdzie podawanie egzogennej argininy zwiększa aktywność NO, mimo nadmiaru stężenia L-Arg w organizmie. Powstało wiele hipotez próbujących wyjaśnić zaistniałe zjawisko [209]. Pomimo wielu kontrowersji liczne badania potwierdziły korzystny wpływ krótko- i długotrwałej suplementacji L-argininą na wytwarzanie tlenku azotu. Z dostępnych publikacji wynika, iż NO wykazuje właściwości naczyniorozszerzające, hamuje również adhezję i agregację leukocytów i płytek krwi. Substancja ta redukuje napięcie ściany naczyń jednocześnie obniżając jej przepuszczalność dla innych związków (np. hormony, monocyty). Korzystne działanie tlenku azotu wynika również z jego właściwości antyoksydacyjnych i antyproliferacyjnych. L-arginina może zaś regulować produkcję NO w zaburzeniach związanych z nadprodukcją ww. związku [209]. Dodatkowo może działać również na zmniejszenie wolnych rodników oraz zminimalizowanie stanu zapalnego. W obrębie serca redukuje opór płucny [278] oraz utrzymuje niski indeks prawej komory, zwiększa kurczliwość mięśnia sercowego, zmniejsza reakcję na stres oksydacyjny oraz zwiększa relaksację miocytów [56].

W dostępnym piśmiennictwie opisano również ochronne działanie nikotynamidu na ostre uszkodzenie płuc wywołane w wyniku między innymi niedokrwienia/reperfuzji,

endotoksyn lub stresu oksydacyjnego [174]. W niniejszym badaniu przedstawiono, iż związek ten skutecznie zahamował rozwój indukowanego przez monokrotalinę PAH. Istnieje wiele układów doświadczalnych opisujących właściwości biologiczne i terapeutyczne nikotynamidu. Na uwagę zasługuje model z polimerazą poli(ADP-rybozy) (PARP). Należy do rodziny enzymów jądrowych wykorzystując NAD^+ , jako substrat i katalizuje przeniesienie polimeru poli(ADP-rybozy) na białka akceptorowe (np. glutaminian, asparaginian). Wpływa to na ich właściwości funkcjonalne. Fizjologicznie PARP uczestniczy między innymi w: naprawie nici DNA, utrzymaniu nierozzerwalności genomu, *remodelingu* chromatyny, różnicowaniu komórek, transkrypcji, transformacji nowotworowej, apoptozie oraz modulacji wewnątrzkomórkowej lokalizacji czynników transkrypcyjnych (np.: p53, NK- κ B) [1, 150]. Jak wykazano w następstwie uszkodzenia DNA np. w odpowiedzi na reaktywne formy tlenu, wolne rodniki lub peroksyazotyny aktywność PARP gwałtownie wzrasta zaś przedłużający się stan dysfunkcji powoduje obniżenie stężenia NAD^+ i ATP (zaburzenie homeostazy metabolicznej). W konsekwencji może to doprowadzać do ostrej niewydolności komórkowej lub nekrozy [187]. PARP-1 w stanie hiperaktywnym przez wzbudzenie czynników transkrypcyjnych reguluje w górę ekspresję genów prozapalnych [26] oraz uczestniczy w patogenezie wielu chorób takich jak: udar, wstrząs, zawał mięśnia sercowego, cukrzyca, stany zapalne różnego pochodzenia, alergia, astma oraz zaburzenia nowotworowe lub neurodegeneracyjne (choroba Parkinsona, Alzheimer) [323]. Zasugerowano, iż niedobór lub inaktywacja PARP-1 może przyczynić się do uzyskania znacznego stopnia stabilności genomowej. Większość przeprowadzonych badań doświadczalnych wykazało, iż zastosowanie nikotynamidu, jako inhibitora PARP wskazuje przede wszystkim na jego cytoprotekcyjne działanie polegające na zahamowaniu fragmentacji DNA oraz usuwaniu zarówno *in vitro* jak i *in vivo* czynników odpowiedzialnych za uszkodzenie komórek [300]. Rola nikotynamidu w komórkach mięśni gładkich naczyń (bezpośrednio hamuje obkurczanie mięśniówki) [42] komórkach mięśnia sercowego [15] lub komórkach nowotworowych (szczególnie BRCA1 i BRCA2) to hamowanie aktywność PARP na poziomie mitochondrialnym powodując utrzymanie stężenia ATP na odpowiednim poziomie [230, 316]. Nikotynamid wykorzystano również, jako czynnik neuroprotekcyjny w ostrym lub przewlekłym uszkodzeniu mózgu poprzez normalizowanie poziomu biomarkerów stresu oksydacyjnego [131] oraz w warunkach niedokrwienia/niedotlenienia tkanki mózgowej poprzez zminimalizowanie udaru [277]. Istnieją badania eksperymentalne na szczurach potwierdzające korzystny wpływ

nikotynamidu na cukrzycę insulinozależną. Zasugerowano, że ochronne działanie na komórki β trzustki wynika z hamowania apoptozy i zapobiegania wytwarzania NO [6]. Dodatkowo suplementacja szczurów nikotynamidem w cukrzycy indukowanej streptozotocyną może posiadać działanie ochronne na wzrost peroksydacji lipidów w trzustce (docelowy narząd STZ), jako czynnik osłaniający przed wytwarzaniem wolnych rodników, ale nie zapobiega rozwojowi cukrzycy STZ [199]. Zaobserwowano również pozytywną odpowiedź na nikotynamid w cukrzycowej neuropatii obwodowej, który przyczynia się do zwalczania zaburzeń nerwowo-naczyniowych lub zahamowania deficytu przewodnictwa nerwowego. Jednak powyższe odkrycie nie przyniosło oczekiwanych rezultatów i wymaga dalszych bardziej szczegółowych badań [293]. Liczne badania sugerują, iż nikotynamid jest silnym inhibitorem wielu cytokin prozapalnych takich jak: IL- β , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α , którego mechanizm nie wynika z hamowania PARP [315]. Ponadto nikotynamid hamuje transformację limfocytów, molekule adhezyjnej ICAM-1, tłumi kompleks zgodności tkankowej MHC klasy II [119] oraz zmniejsza aktywność makrofagów [332]. Posiada również zdolność usuwania wolnych rodników oraz hamuje indukowalną syntazę NO (iNOS) [234]. Wyżej wymienione właściwości przeciwzapalne nikotynamidu najczęściej próbowano wykorzystać w dermatologii oraz w schorzeniach na tle reumatoidalnym [316]. Działanie nikotynamidu próbowano wykorzystać również w chorobach neurodegeneracyjnych (np. choroba Parkinsona, zespół otępienia) [1]. Nikotynamid może również hamować aktywność pozostałych enzymów uczestniczących w metabolizmie NAD⁺ takich jak: mono-ADP-rybozylotransferazę lub sirtuiny. Wyniki badań na zwierzętach wykazały również, iż dieta bogata w nikotynamid może regulować receptory SUR2A w mięśniu sercowym poprzez wzrost NAD⁺ i aktywowanie promotora SUR2 przez czynnik transkrypcyjny c-jun jednocześnie zwiększając odporność mięśnia sercowego na reakcję niedokrwienia/reperfuzji [58, 296]. Jak wspomniano wyżej badano również odpowiedź nikotynamidu na ostre uszkodzenie płuc w wyniku niedokrwienia/reperfuzji na izolowanym płucu szczura. Wyniki eksperymentu sugerują istotny cytoprotekcyjny wpływ nikotynamidu na płuca poprzez możliwe zahamowanie PARP z ewentualną zdolnością do usuwania cytokin prozapalnych, wolnych rodników oraz iNOS [285]. Doświadczenie zostało potwierdzone w obecności silnego aktywatora neutrofilii potwierdzając ochronne działanie nikotynamidu hamując kaskadę zapalną prowadzącą do uszkodzenia tego narządu [174].

W przedstawionym badaniu wykazano, iż terapia doustną L-argininą i nikotynamidem w sposób skuteczny wywierała ochronne działanie na układ sercowo-naczyniowy po 7-dniowym okresie wywołania indukowanego tętniczego nadciśnienia płucnego u samców oraz samic szczura. Korzystne efekty ochronne mogą prawdopodobnie wynikać z dostarczenia za pomocą diety wysokich dawek ww. związków. W badanych przypadkach suplementacja L-argininą i nikotynamidem nie wpływała na dzienne spożycie paszy i wody obu płci. Dlatego wpływ leczenia ww. związków na model nadciśnienia płucnego był niezależny od spożycia innych składników odżywczych występujących w diecie. L-argininę podawano szczurom obu płci w wodnym roztworze o stężeniu 2,5%, co odpowiada dawce w zakresie od 1,6 do 2,2 g/kg m.c./dobę, która dodatkowo odnosi się do średniego spożycia wody przez szczury wynoszącego od 16 do 22 ml/dobę. W przeprowadzonym badaniu dzienna średnia dawka L-argininy wynosiła dla samców i samic w grupie kontrolnej odpowiednio 1,905 oraz 1,87 g/kg m.c. Zastosowana dawka L-argininy to 4-krotność dawki zwykłej dla szczura wynoszącej średnio 0,5g/kg m.c./dobę przy dziennym spożyciu 20ml wody. Natomiast nikotynamid podawano szczurom obu płci w dawce 500mg/kg paszy, co odpowiada około 37,5 mg/kg m.c. /dobę przy dziennym spożyciu 15g paszy. W przeprowadzonym eksperymencie dawka nikotynamidu wynosiła 15-krotność dawki zwykłej wynoszącej 2,25mg/kg m.c./dobę. W grupach kontrolnych średnie dzienne spożycie nikotynamidu dla samców wynosiło 24,63 a dla samic 31,72 mg/kg m.c. Wyżej opisane suplementowanie doustne L-argininy i nikotynamidu jest zgodne z zaleceniami NRC i charakteryzuje się niewielką toksycznością dla wysokich dawek [219, 343]. Dodatkowo Sasaki i wsp. opierali się na podobnym modelu badając poziom L-argininy w osoczu [268]. Ponadto badania kliniczne potwierdziły, iż biodostępność L-argininy po podaniu doustnym wynosi około 70% i jest stosunkowo wolna od działań ubocznych [55]. Jednak już podawanie bardzo wysokich dawek L-argininy (ok. 5g/kg m.c./dobę) może powodować ryzyko zwiększenie wytwarzania wolnych rodników tlenowych przyczyniając się do zmniejszenia uwalniania tlenu azotu z jednoczesnym niepowodzeniem doświadczenia [81]. Taki model doświadczalny często stosowany jest w badaniach na szczurach z niewydolnością serca. Natomiast podawanie doustne wysokich dawek nikotynamidu do tej pory wiązało się przede wszystkim z terapią cukrzycy, hiperlipidemii lub chemioterapią [8, 37]. W przeprowadzonych badaniach wykazano, iż dzienne spożycie nikotynamidu w monoterapii oraz terapii skojarzonej z L-argininą znacząco wzrasta odpowiednio o 26,83% i 28,25% w grupie samców zaś

u samic występuje efekt odwrotny (obniżenie spożycia nikotynamidu o odpowiednio 12,64% i 11,72%). Nie koreluje to jednak z poziomem nikotynamidu oraz jego metabolitów w osoczu w obu grupach. Interesującą obserwacją jest to, iż doustne podanie nikotynamidu wpłynęło na wzrost tego związku oraz jego metabolitów Met-Na, Met-2PY, Met-4PY oraz 4-PYR w osoczu u samców oraz samic szczura w grupach kontrolnych otrzymujących nikotynamid oraz w grupach z nadciśnieniem płucnym poddanej terapii nikotynamidem. Natomiast poziom ww. związku uległ obniżeniu w grupie z nadciśnieniem płucnym szczególnie u osobników płci męskiej. Wiedza na temat aktywacji szlaku nikotynamidowego w PAH u szczurów jest mało poznana. Obserwacje te można porównać z niedawno opublikowanymi spostrzeżeniami, iż nadciśnienie płucne może być związane z aktywnością szlaku z wykorzystaniem metabolitów nikotynamidu [80]. Ponadto nikotynamid może wywierać ochronne działanie poprzez zmniejszenie aktywności PARP z równoczesnym przywróceniem zawartości ATP w komórce [174]. Zaobserwowano, że w trakcie PAH z suplementacją nikotynamidem nastąpił wzrost poziomu tego związku w osoczu szczególnie u samców w stopniu porównywalnym do grupy otrzymującej sam nikotynamid. Odpowiedź ta korelowała z podwyższonym poziomem MNA w osoczu [80]. Dodatkowo wcześniejsze badania kliniczne potwierdzają, iż suplementacja L-argininą u pacjentów z PAH wyraźnie poprawiła ciśnienie w tętnicy płucnej oraz parametry hemodynamiczne serca [198, 215]. W przedstawionej pracy nie badano mechanizmów odpowiedzialnych za wyżej opisaną obserwację. Nieznana jest przyczyna tych różnic i wymaga dalszego wyjaśnienia.

W przeprowadzonych badaniach aplikacja monokrotaliny spowodowała znaczne zmniejszenie końcowej masy ciała zwierząt z szczególnym wskazaniem na samce szczura. Obserwacje te są zgodne z wcześniej opublikowanymi spostrzeżeniami dotyczącymi wystąpienia objawów anorektycznych po ekspozycji na MCT [205, 290]. Warto zauważyć, iż terapia L-argininą oraz nikotynamidem w grupie samców częściowo odwróciła efekt monokrotaliny powodując wzrost końcowej masy ciała zwierząt. W grupie samic pomimo sukcesywnego przyrostu masy ciała zaobserwowano w grupach leczonych niewielki wzrost końcowej masy ciała. Dodatkowo w grupach kontrolnych otrzymujących terapię również wystąpiło zjawisko zmniejszenia przyrostu masy ciała już od 14 dnia suplementacji. Bardzo możliwe, iż za zaistniałe różnice odpowiada metabolizm wątrobowy względem płci dla badanych związków. Nie jest to jednak oczywiste i pozostaje do wyjaśnienia [183]. W przeprowadzonych badaniach pomimo

spadku masy ciała zwierząt doświadczalnych nie zaobserwowano przypadków śmiertelnych [2].

W wyniku tętniczego nadciśnienia płucnego dochodzi do przewlekłego obciążenia mięśnia sercowego, co w konsekwencji prowadzi do przerostu prawej komory serca. Uszkodzenie RV jest jedną z głównych przyczyn umieralności pacjentów z PAH. Przerost mięśnia sercowego może być indukowany w ramach modeli doświadczalnych wykorzystujących substancje toksyczne takie jak: kokaina, aldehyd octowy, doksorubicyna lub MCT. Prowadzą one do zwiększenia poziomu katecholamin, obciążenia hemodynamicznego oraz do indukcji niedotlenienia [170]. W niniejszym badaniu zastosowano model monokrotalinowy, który powoduje powolnie rozwijający się model hemodynamicznego PAH prowadzący do przerostu prawej komory serca [334], co również zostało zaobserwowane w naszych badaniach. Przerost RV może przyczynić się do rozwoju dysfunkcji rozkurczowej RV oraz zmniejszenia pojemności minutowej prawej komory, co charakteryzuje typową niewydolność prawokomorową [48]. Przerost prawej komory serca został potwierdzony również przez obecność zwiększonego tzw. indeksu Fulton'a z jednoczesnym wzrostem wskaźnika RV/FBW, zwłaszcza w grupie samic z PAH. Obserwacje te są zgodne z wcześniej przeprowadzonymi pomiarami przerostu RV, który jest konsekwencją jednorazowego wstrzyknięcia MCT [38, 170] i wskazuje na znaczny przerost RV w odpowiedzi na wystąpienie przebudowy w obrębie naczyń płucnych w PAH [155, 305]. W piśmiennictwie zasugerowano również bezpośredni wpływ hormonów płciowych na prawą komorę serca niezależnie od efektu dysfunkcji tętnic płucnych. U samców podanie metabolitu estradiolu zapobiegło rozwojowi PAH indukowanego monokrotaliną zaś u samic z obustronnym usunięciem jajników (owariektomia) zastosowanie progesteronu wpłynęło ochronnie na indukowane tętnicze nadciśnienie płucne [304, 305]. Ponadto nadmierny przerost RV u samic z PAH spowodował jednocześnie prawdopodobne uciśnięcie lewej komory serca. Ostatecznie, więc istnieje możliwość ograniczonego napełnienia LV przyczyniając się do dysfunkcji rozkurczowej [117, 154]. W grupie samców takiego zjawiska nie zaobserwowano. Natomiast w wyniku 16-dniowej monoterapii lub terapii w skojarzeniu badanych związków doszło do normalizacji masy prawej komory serca oraz zmianę stosunku RV/LV+S oraz parametru RV w odniesieniu do końcowej masy ciała zarówno u samców jak i samic ze szczególnym uwzględnieniem poprawy w grupach samic. Efekt ten jest widoczny szczególnie w łącznym podawaniu obu związków. Jest to zgodne z wcześniej opublikowanymi danymi, wykazującymi, iż zastosowanie L-argininy w terapii

skojarzonej powoduje zahamowanie objawów PAH [2, 348]. Natomiast ochronne działanie nikotynamidu u samców zostało potwierdzone w badaniach nad ostrym uszkodzeniem płuc, gdzie w sposób zależny od dawki nikotynamid osłabił działanie silnego aktywatora neutrofilii [174]. Pomimo tych obserwacji samice z indukowanym PAH leczone nikotynamidem zachowały wyższy wskaźnik przerostu RV oraz RV/FBW przy jednoczesnym braku zmniejszenia lewej komory serca. W grupie samców w tej grupie efekt działania nikotynamidu był odwrotny.

Wyżej wymienione obserwacje korelują z obrazem histologicznym oraz pomiarem morfometrycznym. Potwierdziły one skuteczność zastosowanej metody rozwoju tętniczego nadciśnienia płucnego indukowanego monokrotaliną oraz udokumentowały przyczynę typowych objawów niewydolności prawej komory serca. W obrazie histologicznym w grupach z PAH zaobserwowano charakterystyczne pogrubienie ścian naczyń z równoczesnym zwężeniem światła tętnic, który zauważalny był szczególnie w tętniczkach wśród pęcherzyków płucnych obu płci. Dodatkowo zaobserwowano stan zapalny i obrzęk płuc, który jest charakterystyczny dla modelu MCT. Powyższe obserwacje mają potwierdzenie w danych literaturowych [185]. W wyniku podania monokrotaliny prawdopodobnie nastąpiło wywołanie stresu oksydacyjnego oraz znaczny wzrost wytwarzania ROS w płucach oraz w tkankach RV z równoczesnym zwiększeniem cytotoxyczości w komórkach śródbłonna tętnic płucnych. Natomiast zastosowanie w monoterapii lub w połączeniu badanych związków normalizuje obraz histologiczny u samców i samic szczura. Szczególnie w grupach samców otrzymujących L-argininę oraz połączenie diet L-argininy z nikotynamidem wykazano poprawę obrazu morfologicznego [348]. Jednym z mechanizmów zaobserwowanego pozytywnego wpływu badanych związków może być związany ze zniesieniem stresu oksydacyjnego, redukcją stanu zapalnego a w konsekwencji zmniejszeniem aktywności iNOS. Warto odnotować, iż w grupie samic z PAH otrzymujących nikotynamid obraz histologiczny był zdecydowanie bardziej niekorzystny. Zaobserwowano bardziej rozległy stan zapalny i obrzęk w porównaniu do kontroli. Jednocześnie koreluje to z widocznym, ale nie znamionym przerostem RV, pomimo że analiza morfometryczna nie wykazała znaczących różnic. Inna opcja wystąpienia ww. nieprawidłowości może być podyktowana niespecyficznymi zmianami indukowanymi przez monokrotalinę lub odmienny metabolizm wątrobowy tej substancji u samic. Nie mniej jednak w opisywanej pracy nie zaobserwowano istotnych różnic wpływu monokrotaliny oraz zastosowanej terapii względem płci na obraz histologiczny

i morfometryczny. Być może przeprowadzenie badania immunohistochemicznego w preparatach mikroskopowych z zastosowaniem ww. modelu doświadczalnego dostarczyłoby nowych informacji o mechanizmach wpływu leczenia L-argininą oraz nikotynamidem na rozwój PAH u samców i samic szczura, co będzie przedmiotem naszych dalszych badań.

Przeprowadzone eksperymenty wyraźnie udowodniły, iż terapeutyczne dawki L-argininy oraz nikotynamidu w monoterapii oraz w skojarzeniu zmieniły parametry wyjściowe siły skurczu mięśnia brodawkowatego prawej komory serca bez lub z tętnicznym nadciśnieniem płucnym indukowanego monokrotaliną u szczurów obu płci. Mięsień brodawkowaty ze względu na wielkość oraz równoległe ułożenie kardiomiocytów jest często stosowanym uproszczonym modelem serca za pomocą, którego można badać bezpośrednio kurczliwość [341]. W przedstawionej pracy wykazano, iż indukowane tętniczne nadciśnienie płucne w grupie samców zmniejszyło podstawową siłę skurczu mięśnia sercowego. Może mieć to związek z regulacją w dół receptorów β_1 -adrenergicznych w kardiomiocytach w wyniku podania MCT oraz towarzyszące temu znaczne zmniejszenie wzrostu zawartości wewnątrzkomórkowego cAMP [169]. Występujące w takich warunkach zwiększone zużycie tlenu może przekładać się na zmniejszenie prędkości skracania oraz napięcia izometrycznego [341]. Warto zaznaczyć, iż bezpośrednie działanie kardi toksyczne MCT może mieć również wpływ na funkcję komory prawej. Na zmniejszenie siły skurczu obserwowanej podczas rozwoju PAH może mieć wpływ również przerost RV, jak to udowodnił Henkens i wsp. [118]. Sugerowanie zwiększonego obciążenia następczego RV ma potwierdzenie również w obniżeniu parametrów wyjściowych szybkości skurczu oraz rozkurczu serca (są to istotne parametry, które wzbogacają możliwość oceny funkcji serca i dynamiki jego pracy) w grupie samców i samic szczura z PAH. Natomiast wyniki pomiarów w grupie samic w tętnicznym nadciśnieniu płucnym indukowanym monokrotaliną wykazują znamienne wzrost podstawowej siły skurczu mięśnia brodawkowatego. W związku z powyższym można zasugerować, iż kardiomiocyty u samców posiadają większą wrażliwość i ulegają większemu przerostowi mięśnia sercowego niż u samic. Jest to zgodne z wcześniej opublikowanymi badaniami klinicznymi opisującymi efekt ochronny estrogenów, które dodatkowo zmniejszają apoptozę kardiomiocytów [340].

Zastosowanie L-argininy i nikotynamidu pojedynczo lub w skojarzeniu skutecznie znormalizowało podstawowe parametry mechaniczne mięśnia sercowego obu płci ze szczególnie znamienym zmniejszeniem siły skurczu u samic. Jak wspomniano

L-arginina jest prekursorem tlenku azotu, który jest produktem reakcji katalizowanej przez syntazę tlenku azotu. Dodatkowo L-arginina wywiera nieznaczne inotropowo ujemnie działanie na mięsień sercowy. Tlenek azotu działa poprzez aktywację cykazy guanylowej powodując wzrost stężenia cGMP, który aktywuje kinazy proteinowe i fosfodiesterazy. Wpływ tlenku azotu na układ krążenia polega na wazorelaksacji oraz na hamowaniu aktywacji i agregacji płytek krwi, a także na redukowaniu proliferacji mięśni gładkich. W PAH obserwuje się dysfunkcję śródbłonna, co w konsekwencji może prowadzić do zmniejszenia biodostępności NO. Tlenek azotu parakrylnie rozszerza naczynia krwionośne, odgrywa również rolę w regulowaniu napięcia naczyniowego i kurczliwości mięśnia sercowego. Nikotynamid, jako czynnik cytoprotekcyjny, ale również przeciwzapalny oraz jako ewentualny modulator podjednostki SUR2A kanałów potasowych ATP-zależnych w kardiomiocytach. W związku z tym może spełniać istotną rolę w kardioprotekcji oraz poprawiać wydolności mięśnia sercowego poprzez hamowanie poli(ADP-rybozy) i zapobieganiu hamowania oddychania mitochondrialnego z równoczesnym obniżeniem ATP w komórkach. Dodatkowo nikotynamid posiada właściwości przeciwzapalne wynikające z hamowania syntazy iNOS oraz zdolności usuwania wolnych rodników. Wzajemna zależność tych dwóch składników może przyczynić się do poprawy funkcji serca u chorych w III lub IV klasie wg NYHA lub ewentualnie przesunąć chorego do klasy I lub II, poprawiając wydolność fizyczną i zmniejszyć objawy tętniczego nadciśnienia płucnego. Pomimo faktu, iż ochronny mechanizm działania obu suplementów może być wieloczynnikowy, to odnotowana poprawa hemodynamiki i funkcji mięśnia sercowego spowodowana suplementacją wymienionych związków jest znacząca. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń nie można jednoznacznie stwierdzić przyczyny zaistniałego zjawiska, które pozostaje do wyjaśnienia.

Mięsień sercowy w spoczynku działa przy submaksymalnym potencjale skurczowym [39] posiadając jednocześnie znaczne rezerwy skurczowe i w razie rosnącego zapotrzebowania układu krążenia może z łatwością zmienić siłę oraz szybkość skurczu. Szybkość akcji serca zależy od działania układu współczulnego (uwalnianie noradrenaliny) oraz przywspółczulnego (uwalnianie acetylocholin). W wyniku stresu następuje uwalnianie nadmiaru noradrenaliny w końcówkach nerwowych oraz bezpośrednio uwalnianie adrenaliny do krwioobiegu. Powoduje to zwiększenie częstości akcji serca (efekt chronotropowy) oraz siły skurczu (efekt inotropowy) [39]. Stymulacja układu adrenergicznego w izolowanym mięśniu brodawkowatym serca powinna

powodować wzrost siły skurczu, szybkości skurczu oraz stopnia relaksacji (działanie lusitropowe). Efekty te są często pośrednio zależne od stymulacji receptorów β -adrenergicznych. Obecnie na podstawie badań klinicznych stwierdzono, iż odpowiedź adrenergiczna serca znacząco zmienia się w przebiegu niewydolności serca [39]. W przedstawionej pracy zbadano działanie noradrenaliny, jako selektywnego agonistę receptorów adrenergicznych α i β_1 . Podskórne podanie monokrotaliny prowadzi do zwiększenia wydajności prawej komory serca i wywołanie inotropowo dodatniej odpowiedzi mięśnia brodawkowatego serca [39]. W przedstawionej pracy zaobserwowano ww. efekt pobudzenia mięśnia sercowego noradrenaliną oraz znamieny wzrost siły skurczu we wszystkich badanych grupach indukowanych monokrotaliną. Natomiast podanie doustne wysokich dawek L-argininy oraz nikotynamidu w leczeniu skojarzonym oraz w monoterapii PAH zmniejszyło (unormowało) pozytywny efekt inotropowy mięśnia brodawkowatego prawej komory serca. Jednym z ciekawych spostrzeżeń w przeprowadzonym doświadczeniu jest nieoczekiwany wzrost siły skurczu po podaniu noradrenaliny w grupie samic otrzymujących sam nikotynamid z jednoczesnym spadkiem przyrostu siły skurczu w grupie samic otrzymujących nikotynamid w tętniczym nadciśnieniu płucnym. Powyższy efekt koreluje ze zmianą szybkości skurczu mięśnia brodawkowatego, co sugeruje ewentualną zmienność metabolizmu nikotynamidu względem płci. Dalsza analiza tego zjawiska wymaga kolejnych badań.

Przedstawione badania nie pozwalają na pełne wyjaśnienie mechanizmów molekularnych podstaw protekcyjnego działania L-argininy i nikotynamidu w przebiegu tętniczego nadciśnienia płucnego. Wpływ ochronnego działania nikotynamidu na badany układ sercowo-naczyniowy może wynikać z jego działania, jako wymiatacza wolnych rodników i toksyn, jako efektu hamującego poli(ADP-rybozę) lub jako możliwe hamowanie aktywności enzymów metabolizujących NAD z jednoczesnym podwyższeniem stężenia wewnątrzkomórkowego NAD. Działanie ochronne nikotynamidu może również wynikać z aktywacji metabolitów nikotynamidu z uwzględnieniem między innymi wazoprotekcyjnego, przeciwzapalnego przeciwwakrzepowego działania N-metylonikotynamidu. Natomiast korzystny efekt wpływu podawania doustnego L-argininy w tętniczym nadciśnieniu płucnym został udokumentowany już w badaniach klinicznych [215]. Dodatkowo wykazano pozytywne działanie L-argininy u szczurów po aplikacji MCT gdzie stwierdzono zmniejszenie podwyższonego ciśnienia w tętnicy płucnej (PAP). Wykazano również, iż leczenie samą

L-argininą bez tętniczego nadciśnienia płucnego nie wpływa na PAP. Powoduje to brak wytwarzania endogennego NO w grupach otrzymujących samą L-Arg [268]. Jednocześnie stosowanie L-argininy z nikotynamidem zmniejsza wytwarzanie przez komórki reaktywnych form tlenu poprawiając biologiczną aktywność tlenku azotu, który jest syntetyzowany w komórkach śródbłonna naczyniowego [2]. Zastosowanie skojarzonej doustnej terapii L-argininy i nikotynamidu w tętnicznym nadciśnieniu płucnym indukowanym monokrotaliną jest obiecującym nowym podejściem w terapii PAH, jak to wykazano w przedstawionej pracy i może być w przyszłości wykorzystywany w praktyce klinicznej. Omawiana praca wykazała, że terapeutyczne podawanie i/lub włączenie do leczenia skojarzonego suplementów diety L-argininy i nikotynamidu może być alternatywnym sposobem leczenia tej ciężkiej choroby o złym rokowaniu.

6. WNIOSKI

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że:

1. Tętnicze nadciśnienie płucne (PAH) indukowane monokrotaliną wywiera istotny wpływ na kurczliwość serca, powodując obniżenie wyjściowych parametrów mechanicznych z wyjątkiem siły skurczu u samic szczura oraz zwiększoną odpowiedzią adrenergiczną serca z wyjątkiem zmniejszenia szybkości skurczu ($+dF/dt$) tylko u samic z PAH.
2. PAH powoduje zwiększenie grubości ścian tętnic płucnych (bardziej zaznaczone u samców) oraz niekorzystne zmiany w obrazie histopatologicznym płuc u samców i samic szczura oraz przerost prawej komory serca (bardziej zaznaczony u samic).
3. Zastosowanie L-argininy u zwierząt z PAH powoduje normalizację podstawowej siły skurczu w odniesieniu do grup kontrolnych i zmniejszenie odpowiedzi adrenergicznej mięśnia brodawkowatego. Wyjątek stanowi wpływ noradrenaliny na wzrost parametru $+dF/dt$ w grupie samic otrzymujących L-argininę z PAH.
4. Suplementacja L-argininy zmniejsza przerost prawej komory serca u samców i samic szczura oraz grubość ścian tętnic płucnych (zaznaczony bardziej u samców) z równoczesnym ograniczeniem występowania patologicznych zmian w obrazie morfologicznym w porównaniu do zwierząt z PAH.
5. Przewlekłe podawanie nikotynamidu u zwierząt z indukowanym tętniczym nadciśnieniem płucnym normalizuje podstawową siłę skurczu z jednoczesnym istotnym zwiększeniem szybkości skurczu i rozkurczu niezależnie od płci oraz zmniejszenie odpowiedzi adrenergicznej mięśnia brodawkowatego i przerost prawej komory serca (bardziej zaznaczone u samców) z redukują przebudowy ścian tętnic płucnych (bardziej zaznaczone u samic) i normalizacją obrazu morfologicznego płuc.
6. Skojarzone podawanie L-argininy z nikotynamidem w warunkach rozwoju tętniczego nadciśnienia płucnego wpływa w sposób istotny na normalizację wyjściowych parametrów mechanicznych oraz odpowiedzi adrenergicznej mięśnia sercowego u samców i samic szczura oraz zmniejsza przerost prawej komory serca i znacznie ogranicza przebudowę ścian tętnic płucnych okołopęcherzykowych i okołoskrzelikowych z równoczesną poprawą obrazu histopatologicznego tkanki płucnej w większym stopniu niż monoterapia każdym z badanych związków.

7. STRESZCZENIE

Wstęp: Tętnicze nadciśnienie płucne (PAH) to złożony stan patofizjologiczny charakteryzujący się zwężeniem, przebudową i proliferacją małych tętnic płucnych z postępującym wzrostem oporu płucnego. Prowadzi to do przerostu prawego przedsionka oraz niewydolności prawej komory serca a w konsekwencji śmierci pacjenta. Zaburzona funkcja prawej komory serca jest decydującym czynnikiem mówiącym o wydolności wysiłkowej i dalszym prognozowaniu pacjenta z PAH. Mimo postępów w leczeniu PAH przeżywalność nadal jest niesatysfakcjonująca a rokowanie bez odpowiedniej terapii celowanej są niekorzystne. Sugeruje się, iż zastosowanie L-argininy i nikotynamidu może być alternatywą w sposobie leczenia PAH. L-arginina oprócz właściwości typowych dla tlenku azotu takich jak: naczyniorozszerzalność, hamowanie adhezji i agregacji leukocytów i płytek krwi może regulować produkcję NO w zaburzeniach związanych z nadprodukcją ww. związku. Może działać na zmniejszenie wolnych rodników oraz zminimalizowanie stanu zapalnego. W obrębie serca redukuje opór płucny oraz utrzymuje niski indeks prawej komory, zwiększa kurczliwości mięśnia sercowego, zmniejsza reakcję na stres oksydacyjny oraz zwiększa relaksację miocytów. Liczne badania sugerują, iż nikotynamid jest silnym inhibitorem wielu cytokin prozapalnych. Posiada również zdolność usuwania wolnych rodników oraz hamuje indukowalną syntazę NO (iNOS). Wyniki badań wykazały również, iż dieta bogata w nikotynamid może regulować receptory SUR2A w mięśniu sercowym poprzez wzrost NAD⁺ jednocześnie zwiększając odporność mięśnia sercowego na reakcję niedokrwienie/reperfuzji. Niewiele jest prac dotyczących oceny wpływu tętniczego nadciśnienie płucnego indukowanego monokrotaliną na mięsień sercowy w zależności od płci. Nieznany jest również wpływ stosowania L-argininy w skojarzeniu z nikotynamidem na serce w zależności od płci.

Cel: Próba oceny wpływu doustnej terapii L-argininą i nikotynamidem na układ sercowo-naczyniowy samców i samic szczura w tętnicznym nadciśnieniu płucnym indukowanym monokrotaliną. W warunkach eksperymentalnych dokonano analizy wpływu ww. związków na podstawowe parametry mięśnia brodawkowego takie jak: siła skurczu, szybkość skurczu oraz rozkurczu; parametry hemodynamiczne mięśnia sercowego w trakcie pobudzenia układu adrenergicznego; parametry przerostu prawej komory serca; obraz histopatologiczny i pomiar morfometryczny tętnic płucnych.

Material i metody: Procedurę eksperymentalną przeprowadzono na 96 szczurach typu Wistar, obu płci o początkowej masie ciała 198 ± 3 g. Zastosowano model doświadczalny tętniczego nadciśnienia płucnego indukowanego monokrotaliną (jednorazowe podanie podskórne; dawka 60mg/kg m.c.). Po 7-dniowym okresie indukcji PAH przystępowano do podania 16-dniowej monoterapii lub w leczeniu skojarzonym dwóch związków: L-argininy (2,5% roztwór) oraz nikotynamidu (500mg/kg paszy). Po 23 dniach od iniekcji monokrotaliny izolowano mięsień brodawkowaty z prawej komory serca. Pomiar kurczliwości mięśnia brodawkowatego przeprowadzano za pomocą aparatury *Steiert Organ Bath* (Hugo Sachs Elektronik, Niemcy). Dodatkowo, dokonywano pomiaru wskaźników przerostu prawej komory serca. Oznaczano również masę ciała szczurów w poszczególnych grupach. W celu stwierdzenia zmian zachodzących w pod wpływem monoterapii oraz terapii łączonej w PAH dokonywano oceny patomorfologicznej oraz morfometrycznej tętnic płucnych.

Wyniki i wnioski: Na podstawie przeprowadzonych w tej pracy badań stwierdzono, iż tętnicze nadciśnienie płucne (PAH) indukowane monokrotaliną wywiera istotny wpływ na kurczliwość mięśnia sercowego, powodując obniżenie wyjściowych parametrów mechanicznych z wyjątkiem siły skurczu u samic szczura (istotny wzrost parametru Fc). Dodatkowo wykazano zwiększoną odpowiedź adrenergiczną serca z wyjątkiem zmniejszenia szybkości skurczu ($+dF/dt$) tylko u samic z PAH. Tętnicze nadciśnienie płucne powoduje zwiększenie grubości ścian tętnic płucnych (bardziej zaznaczone u samców) oraz niekorzystne zmiany w obrazie histopatologicznym płuc (obrzęk, stan zapalny) u samców i samic szczura oraz przerost prawej komory serca (bardziej niekorzystne u samic). Zastosowanie w monoterapii L-argininy lub nikotynamidu u zwierząt z PAH powoduje normalizację podstawowej siły skurcz (u samców podwyższona; u samic obniżona) w odniesieniu do grup kontrolnych oraz zwiększenie parametrów wyjściowych $+dF/dt$ i $-dF/dt$ niezależnie od płci. Dodatkowo monoterapia zmniejsza odpowiedź adrenergiczną mięśnia brodawkowatego. Wyjątek stanowi wpływ noradrenaliny na wzrost parametru $+dF/dt$ w grupie samic otrzymujących L-argininę w PAH. Przewlekła terapia L-argininą w PAH zmniejsza przerost prawej komory serca (zaznaczony bardziej u samic) szczura oraz grubość ścian tętnic płucnych (zaznaczony bardziej u samców) z równoczesnym ograniczeniem występowania patologicznych zmian w obrazie morfologicznym w porównaniu do zwierząt z PAH. Przewlekłe podawanie nikotynamidu u zwierząt z indukowanym tętniczym nadciśnieniem zmniejsza przerost prawej komory serca (bardziej zaznaczone u samców) ze zmniejszeniem

przebudowy ścian tętnic płucnych (bardziej zaznaczone u samic) i normalizacją obrazu morfologicznego płuc. Skojarzone podawanie L-argininy z nikotynamidem w warunkach rozwoju tętniczego nadciśnienia płucnego wpływa na korzystną istotną normalizację wyjściowych parametrów mechanicznych oraz odpowiedzi adrenergicznej mięśnia sercowego u samców i samic szczura w odniesieniu do grupy kontrolnej oraz grup będących na monodietach w PAH. Ponadto skojarzona dieta bardziej normalizuje przerost prawej komory serca i znacznie ogranicza przebudowę ścian tętnic płucnych okołopęcherzykowych i okołoskrzelikowych z równoczesną poprawą obrazu histopatologicznego tkanki płucnej w większym stopniu niż monoterapia każdym z badanych związków. Przeprowadzone badania pozwalają sugerować, iż terapia skojarzona może posiadać potencjalne korzyści wynikające z zachowania efektywności obu związków opartej na hamowaniu obserwowanych zmian wywołanych przez aplikację monokrotalną indukującej tętnicze nadciśnienie płucne a zauważalna odmienna odpowiedź na suplementację sugeruje na różnice w zakresie wydajności mięśnia sercowego w zależności od płci.

8. SUMMARY

Background: Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a complex pathophysiological condition characterized by the reduction, reconstruction, and proliferation of small pulmonary arteries and progressive increase in pulmonary resistance. Such changes lead to right ventricular hypertrophy and right heart failure and as the consequence will lead to the death of the patients. The dysfunctional right ventricular function is a decisive factor in terms of further prognosis of PAH patients. Though progress in PAH treatment, patient survival is still unsatisfactory and prognosis without appropriate targeted therapy is unfavorable. It is suggested that the use of L-arginine and nicotinamide may be an alternative in the treatment of PAH. Beside L-arginine typical properties as a nitric oxide such as vasodilatation, inhibition of adhesion and aggregation of leukocytes and platelets, may regulate the production of NO in disorders related to overproduction of nitric oxide. It can work to reduce free radicals and to minimize inflammation. In the heart reduces pulmonary resistance and maintains a low right ventricular index, increases myocardial contractility, reduces reaction to oxidative stress and increases myocardial relaxation. Different studies suggest that nicotinamide is a potent inhibitor of many proinflammatory cytokines. It also has the ability to remove free radicals and inhibits the inducible NO synthase (iNOS). Studies have also shown that nicotinamide-rich diets can regulate SUR2A receptors in the myocardium by increasing NAD⁺ while increasing myocardial resistance to ischemia/reperfusion. There isn't many publications on the assessment are there any differences between males and females cardiac muscle in the arterial pulmonary hypertension induced by monocrotaline. Also unknown remains the effect of combined treatment of L-arginine and nicotinamide on the heart according to the gender.

Aim: To evaluate the effect of supplementation L-arginine and nicotinamide on the cardiovascular system of male and female rats in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. Under the experimental conditions the effects of drugs on the basic parameters of papillary muscle such as: developed tension (Fc), the velocity of contraction (+dF/dt) and relaxation (-dF/dt). We were analyzing hemodynamic parameters of the myocardium during stimulation of the adrenergic system and parameters of right ventricular hypertrophy. In addition, we did the histopathological picture and pulmonary arterial morphometric measurement.

Materials and methods: The experimental procedure was performed on 96 Wistar rats, both sexes with an initial body weight of 198±3g. An experimental model of pulmonary

hypertension induced by monocrotaline (single-dose subcutaneous injection, 60mg/kg b.w.) was used. After 7 days of PAH induction, 16-day supplementation of monotherapy L-arginine (2.5% solution) and nicotinamide (500 mg/kg feed) were administered. After 23 days since the monocrotaline injection, papillary muscle was isolated from the right ventricle. Measurement of papillary contractility was performed using Steiert Organ Bath apparatus (Hugo Sachs Elektronik, Germany). In addition, right ventricular hypertrophy indicators were measured. The weight of the rats in the individual groups was also determined. In order to detect changes occurring under the influence of monotherapy and combined therapy in PAH, pathological and morphometric assessment of pulmonary arteries was performed.

Results and conclusions: Studies have shown that monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension (PAH) have a significant effect on myocardial contractility. It decreases the mechanical parameters except for the developed tension in rat females (significant increase in Fc). Additionally it cause increased cardiac adrenergic response with the exception of the reduced velocity of contraction (+dF/dt) only in females with PAH. MCT-induced pulmonary hypertension resulted in increased pulmonary arterial wall thickness (significant increase in males) and pathohistological changes in the lung of male and female rats and right ventricular hypertrophy (significant increase in females). The use of monotherapy L-arginine or nicotinamide in PAH animals, regardless to the gender, normalizes the basal contraction force (in males increase but in the female decrease) for control groups and (an increase in baseline parameters +dF/dt and -dF/dt. In addition, this monotherapy reduces the adrenergic response of papillary muscle. The exception is the effect of noradrenaline on the increase in the parameter +dF/dt in the group of females receiving L-arginine in PAH. Long-term L-arginine therapy in PAH reduces right ventricular hypertrophy (more significant in females) and pulmonary artery wall thickness (more significant in males) while reducing pathological morphological changes compared to PAH animals. Long-term therapy of nicotinamide in animals with PAH reduces right ventricular hypertrophy (more significant in males) with reduced pulmonary artery wall remodeling (more significant in females) and normalization of lung morphology. Combined therapy of L-arginine with nicotinamide MCT-induced pulmonary hypertension resulted in significant beneficial normalization of baseline mechanical parameters and myocardial adrenergic responses in male and female rats with reference to the control group and the monotherapy groups in PAH. In addition, the mixed diet more normalizes right ventricular hypertrophy and significantly reduces the

reconstruction of peri-alveolar and pericardial pulmonary arteries with simultaneous improvement of histopathological pulmonary tissue image to a greater degree than monotherapy of each tested compounds. These studies have suggested that combination therapy may have the potential benefit of maintaining the efficacy of both compounds based on the inhibition of observed monocrotaline-induced pulmonary hypertension and a different response to supplementation must underlie gender-based differences in cardiac performance.

9. PIŚMIENICTWO

1. Abd Elmageed Z.Y., Naura A.S., Errami Y., Zerfaoui M.: The poly (ADP-ribose) polymerases (PARPs): new roles in intracellular transport. *Cell Signal* 2012; 24:1-8.
2. Ahmed L.A., Obaid A.A., Zaki H.F., Agha A.M.: Naringenin adds to the protective effect of L-arginine in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats: favorable modulation of oxidative stress, inflammation and nitric oxide. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2014; 62:161-70.
3. Al-Ansari E., Du H.K., Yu L., Ochoa C.D., Garg H.G., Quinn D.A., Hales C.A.: Low-molecular-weight heparin inhibits hypoxic pulmonary hypertension and vascular remodeling in guinea pigs. *Chest* 2007; 132:1898-905.
4. Albadri, K., Jensen, J. M., Christiansen, E. H., Mellemkjær, S., Nielsen-Kudsk, J. E.: Left main coronary artery compression in pulmonary arterial hypertension. *Pulm. Circ.* 2015; 5: 734–736.
5. Al-Dalaen S., Alzyoud J., Al-Qtaitat A.: The effects of L-Arginine in modulating liver antioxidant biomarkers within carbon tetrachloride induced hepatotoxicity: experimental study in rats. *Biomed Pharmacol. J.* 2016; 9:1.
6. Alenzi F.Q.: Effect of nicotinamide on experimental induced diabetes. *Iran J. Allergy Asthma Immunol.* 2009; 8:11-8.
7. Anwar A., Ruffenach G., Mahajan A., Eghbali M., Umar S.: Novel biomarkers for pulmonary arterial hypertension. *Respir. Res.* 2016; 17:88.
8. ApSimon M.M., Rawling J.M., Kirkland J.B.: Nicotinamide megadosing increases hepatic poly (ADP-ribose) levels in choline-deficient rats. *J. Nutr.* 1995;125:1826-32
9. Apte S.S., Parks W.C.: Metalloproteinases: A parade of functions in matrix biology and an outlook for the future. *Matrix Biol.* 2015; 44-46:1-6.
10. Archer S. L., Weir E. K., Wilkins M. R.: The Basic Science of Pulmonary Arterial Hypertension for Clinicians: new concepts and experimental therapies. *Circulation* 2010; 121: 2045–2066.
11. Archer S.L., Fang Y.H., Ryan J.J., Piao L.: Metabolism and bioenergetics in the right ventricle and pulmonary vasculature in pulmonary hypertension. *Pulm. Circ.* 2013; 3:144-52.
12. Axelrod A.E., Madden R.J., Elvehjem C.A.: The effect of a nicotinic acid deficiency upon the coenzyme I content of animal tissues. *Chemistry* 1939; 131:85-93.
13. Badawy A.A., Evans M.: The regulation of rat liver tryptophan pyrrolase activity by reduced nicotinamide-adenine dinucleotide (phosphate). Experiments with glucose and nicotinamide. *Biochem. J.* 1976; 156:381-90.
14. Badesch D.B., Raskob G.E., Elliott C.G., Krichman A.M., Farber H.W., Frost A.E., Barst R.J., Benza R.L., Liou T.G., Turner M., Giles S., Feldkircher K., Miller D.P., McGoon M.D.: Pulmonary arterial hypertension: baseline characteristics from the REVEAL Registry. *Chest* 2010; 137:376-87.
15. Badole S.L., Chaudhari S.M., Jangam G.B., Kandhare A.D., Bodhankar S.L.: Cardioprotective activity of pongamia pinnata in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. *Biomed Res. Int.* 2015; 2015:403291.
16. Bakouboula B., Morel O., Faure A., Zobairi F., Jesel L., Trinh A., Zupan M., Canuet M., Grunebaum L., Brunette A., Desprez D., Chabot F., Weitzenblum E., Freyssinet J.M., Chaouat A., Toti F.: Procoagulant membrane microparticles correlate with the

- severity of pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2008; 177:536-43.
17. Ball M.K., Waypa G.B., Mungai P.T., Nielsen J.M., Czech L., Dudley V.J., Beussink L., Dettman R.W., Berkelhamer S.K., Steinhorn R.H., Shah S.J., Schumacker P.T.: Regulation of hypoxia-induced pulmonary hypertension by vascular smooth muscle hypoxia-inducible factor-1 α . *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2014; 189:314-24.
 18. Barnett C.F., Bonura E.J., Nathan S.D., et al.: Treatment of sarcoidosis-associated pulmonary hypertension: a two-center experience. *Chest* 2009; 135:1455-1461.
 19. Barnett C.F., Hsue P.Y.: Human Immunodeficiency Virus–Associated Pulmonary Arterial Hypertension. *Clinics in chest medicine* 2013; 34:283-292.
 20. Barst R.J., Chung L., Zamanian R.T., Turner M., McGoon M.D.: Functional class improvement and 3-year survival outcomes in patients with pulmonary arterial hypertension in the REVEAL Registry. *Chest* 2013; 144:160-8.
 21. Barst R.J., McGoon M., Torbicki A., Sitbon O., Krowka M.J., Olschewski H., Gaine S.: Diagnosis and differential assessment of pulmonary arterial hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2004; 43:40S-47S.
 22. Baybutt R.C., Molteni A.: Dietary β -carotene protects lung and liver parenchyma of rats treated with monocrotaline. *Toxicology* 1999; 137: 69-80.
 23. Baybutt R.C., Rosales C., Brady H., Molteni A.: Dietary fish oil protects against lung and liver inflammation and fibrosis in monocrotaline treated rats. *Toxicology* 2002; 175:1-13.
 24. Belenky P., Bogan K.L., Brenner C.: NAD⁺ metabolism in health and disease. *Trends Biochem. Sci.* 2007; 32:12-9. Erratum in: *Trends Biochem. Sci.* 2008; 33:1.
 25. Benavente C.A., Jacobson M.K., Jacobson E.L.: NAD in skin: therapeutic approaches for niacin. *Curr. Pharm. Des.*, 2009; 15:29-38.
 26. Beneke S.: Poly (ADP-ribose) polymerase activity in different pathologies—the link to inflammation and infarction. *Exp. Gerontol.* 2008; 43:605-14.
 27. Benyó Z., Gille A., Bennett C.L., Clausen B.C., Offermanns S.: Nicotinic Acid-Induced Flushing Is Mediated by Activation of Epidermal Langerhans Cells. *Mol. Pharmacol.* 2006; 70: 1844-1849.
 28. Benza R.L., Miller D.P., Barst R.J., Badesch D.B., Frost A.E., McGoon M.D.: An evaluation of long-term survival from time of diagnosis in pulmonary arterial hypertension from the REVEAL Registry. *Chest* 2012; 142:448-56.
 29. Benza R.L., Miller D.P., Gomberg-Maitland M., Frantz R.P., Foreman A.J., Coffey Ch.S., Frost A., Barst R.J., Badesch D.B., Elliott C.G., Liou T.G., McGoon M.D.: Predicting survival in pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2010; 122:164-172.
 30. Berra G., Noble S., Soccia P.M., Beghetti M., Lador F.: Pulmonary hypertension in the elderly: a different disease? *Breathe* 2016;12:43-49.
 31. Bode-Böger S.M., Scalera F., Ignarro L.J.: The L-arginine paradox: Importance of the L-arginine/asymmetrical dimethylarginine ratio. *Pharmacol. Ther.* 2007; 114:295-306.
 32. Bogan K.L., Brenner C.: Nicotinic acid, nicotinamide, and nicotinamide riboside: a molecular evaluation of NAD⁺ precursor vitamins in human nutrition. *Annu. Rev. Nutr.* 2008;28:115-30.
 33. Bogdański P., Pupek-Musialik D., Jabłeczka W., Bryl W.: Suplementacja L-argininy w nadciśnieniu tętniczym — fakty i kontrowersje. *Nadciśnienie tętnicze* 2001;5:133-140.

34. Bonnet S., Rochefort G., Sutendra G., Archer S.L., Haromy A., Webster L., Hashimoto K., Bonnet S.N., Michelakis E.D.: The nuclear factor of activated T cells in pulmonary arterial hypertension can be therapeutically targeted. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2007; 104:11418-23.
35. Bossone E., D'Andrea A., D'Alto M., Citro R., Argiento P., Ferrara F., Cittadini A., Rubenfire M., Naeije R.: Echocardiography in pulmonary arterial hypertension: from diagnosis to prognosis. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* 2013; 26:1-14.
36. Bowers R., Cool C., Murphy R.C., Tuder R.M., Hopken M.W., Flores S.C., Voelkel N.F.: Oxidative stress in severe pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2004; 169:764-9.
37. Boyonoski A.C., Spronck J.C., Jacobs R.M., Shah G.M., Poirier G.G., Kirkland J.B.: Pharmacological intakes of niacin increase bone marrow poly (ADP-ribose) and the latency of ethylnitrosourea-induced carcinogenesis in rats. *J. Nutr.* 2002; 132:115-20.
38. Broderick T.L., Wang Y., Gutkowska J., Wang D., Jankowski M.: Downregulation of oxytocin receptors in right ventricle of rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Acta. Physiol.* 2010; 200:147-58.
39. Brown L., Miller J., Dagger A., Sernia C.: Cardiac and vascular responses after monocrotaline-induced hypertrophy in rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1998; 31:108-15.
40. Budhiraja R., Tuder R.M., Hassoun P.M.: Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Circulation* 2004; 109:159-65.
41. Büller H.R., Prins M.H., Lensin A.W., Decousus H., Jacobson B.F., Minar E., Chlumsky J., Verhamme P., Wells P., Agnelli G., Cohen A., Berkowitz S.D., Bounameaux H., Davidson B.L., Misselwitz F., Gallus A.S., Raskob G.E., Schellong S., Segers A.: Oral rivaroxaban for the treatment of symptomatic pulmonary embolism. *N. Engl. J. Med.* 2012; 366:1287-97.
42. Burns D.M., Ruddock M.W., Walker M.D., Allen J.M., Kennovin G.D., Hirst D.G.: Nicotinamide-inhibited vasoconstriction: lack of dependence on agonist signaling pathways. *Eur. J. Pharmacol.* 1999; 374:213-20.
43. Bushdid P.B., Osinska H., Waclaw R.R., Molkentin J.D., Yutzey K.E.: NFATc3 and NFATc4 are required for cardiac development and mitochondrial function. *Circ. Res.* 2003; 92:1305-13.
44. Campo A., Mathai S.C., Le Pavec J., Zaiman A.L., Hummers L.K., Boyce D., Houston T., Lechtzin N., Chami H., Girgis R.E., Hassoun P.M.: Outcomes of hospitalisation for right heart failure in pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. J.* 2011; 38:359-67.
45. Casserly B., Klinger J.R.: Brain natriuretic peptide in pulmonary arterial hypertension: biomarker and potential therapeutic agent. *Drug Des. Devel Ther.* 2009; 3:269-87.
46. Chelladurai P., Seeger W., Pullamsetti S.S.: Matrix metalloproteinases and their inhibitors in pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* 2012; 40:766-82.
47. Chen C.N., Watson G., Zhao L.: Cyclic guanosine monophosphate signalling pathway in pulmonary arterial hypertension. *Vascul. Pharmacol.* 2013; 58:211-8.
48. Chen E.P., Craig D.M., Bittner H.B., Davis R.D., Van Trigt P.: Pharmacological strategies for improving diastolic dysfunction in the setting of chronic pulmonary hypertension. *Circulation* 1998; 97:1606-12.

49. Chen J., Cui X., Qian Z., Li Y., Kang K., Qu J., Li L., Gou D.: Multi-omics analysis reveals regulators of the response to PDGF-BB treatment in pulmonary artery smooth muscle cells. *BMC Genomics* 2016; 17:781.
50. Chin K.M., Kim N.H., Rubin L.J.: The right ventricle in pulmonary hypertension. *Coron. Artery Dis.* 2005; 16:13-8.
51. Christman B.W., McPherson C.D., Newman J.H., King G.A., Bernard G.R., Groves B.M., Loyd J.E.: An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N. Engl. J. Med.* 1992; 327:70-5.
52. Clapp L.H., Finney P., Turcato S., Tran S., Rubin L.J., Tinker A.: Differential effects of stable prostacyclin analogs on smooth muscle proliferation and cyclic AMP generation in human pulmonary artery. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2002; 26:194-201.
53. Cool C.D., Rai P.R., Yeager M.E., Hernandez-Saavedra D., Serls A.E., Bull T.M., Geraci M.W., Brown K.K., Routes J.M., Tudor R.M., Voelkel N.F.: Expression of human herpesvirus 8 in primary pulmonary hypertension. *N. Engl. J. Med.* 2003; 349:1113-22.
54. Corciova F.C., Arsenescu-Georgescu C.: Prognostic Factors in Pulmonary Hypertension. *Maedica* 2012; 7:30-37.
55. Costa W.S., Ribeiro M.N., Cardoso L.E., Dornas M.C., Ramos C.F., Gallo C.B., Sampaio F.J.: Nutritional supplementation with L-arginine prevents pelvic radiation-induced changes in morphology, density, and regulating factors of blood vessels in the wall of rat bladder. *World J. Urol.* 2013; 31:653-8.
56. Cotton J.M., Kearney M.T., Shah A.M.: Nitric oxide and myocardial function in heart failure: friend or foe? *Heart* 2002; 88:564-6.
57. Cowan K.N., Heilbut A., Humpl T., Lam C., Ito S., Rabinovitch M.: Complete reversal of fatal pulmonary hypertension in rats by a serine elastase inhibitor. *Nat. Med.* 2000; 6:698-702.
58. Crawford R.M., Jovanović S., Budas G.R., Davies A.M., Lad H., Wenger R.H., Robertson K.A., Roy D.J., Ranki H.J., Jovanović A.: Chronic mild hypoxia protects heart-derived H9c2 cells against acute hypoxia/reoxygenation by regulating expression of the SUR2A subunit of the ATP-sensitive K⁺ channel. *J. Biol. Chem.* 2003; 278:31444-55
59. Dahal B.K., Cornitescu T., Tretyn A., Pullamsetti S.S., Kosanovic D., Dumitrascu R., Ghofrani H.A., Weissmann N., Voswinckel R., Banat G.A., Seeger W., Grimminger F., Schermuly R.T.: Role of epidermal growth factor inhibition in experimental pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2010; 181:158-67.
60. D'Alonzo G.E., Barst R.J., Ayres S.M., Bergofsky E.H., Brundage B.H., Detre K.M., Fishman A.P., Goldring R.M., Groves B.M., Kernis J.T., Levy P.S., Pietra G.G., Reid L.M., Reeves J.T., Rich S., Vreim C.E., Williams G.W., Wu M.: Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann. Intern Med.* 1991; 115:343-9.
61. de Caestecker M.: Serotonin Signaling in Pulmonary Hypertension. *Circulation Research* 2006; 98:1229-1231.
62. Deng Z., Morse J.H., Slager S.L., Cuervo N., Moore K.J., Venetos G., Kalachikov S., Cayanis E., Fischer S.G., Barst R.J., Hodge S.E., Knowles J.A.: Familial primary pulmonary hypertension (gene PPH1) is caused by mutations in the bone morphogenetic protein receptor-II gene. *Am. J. Hum. Genet.* 2000; 67:737-44.

63. Deuchar G.A., Hicks M.N., Cobbe S.M., Docherty C.C., MacLean M.R.: Pulmonary responses to 5-hydroxytryptamine and endothelin-1 in a rabbit model of left ventricular dysfunction. *Cardiovasc. Res.* 1998; 38:500-7.
64. Dewachter L., Adnot S., Fadel E., Humbert M., Maitre B., Barlier-Mur A.M., Simonneau G., Hamon M., Naeije R., Eddahibi S.: Angiopoietin/Tie2 pathway influences smooth muscle hyperplasia in idiopathic pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2006; 174:1025-33.
65. Dickinson M.G., Bartelds B., Molema G., Borgdorff M.A., Boersma B., Takens J., Weij M., Wichers P., Sietsma H., Berger R.M.: Egr-1 expression during neointimal development in flow-associated pulmonary hypertension. *Am. J. Pathol.* 2011; 179:2199-209.
66. Digby J.E., McNeill E., Dyar O.J., Lam V., Greaves D.R., Choudhury R.P.: Anti-inflammatory effects of nicotinic acid in adipocytes demonstrated by suppression of fractalkine, RANTES, and MCP-1 and upregulation of adiponectin. *Atherosclerosis* 2010;209:89-95.
67. Doggrel S.A., Brown L.: Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc. Res.* 1998; 39:89-105.
68. Dorfmueller P., Perros F., Balabanian K., Humbert M.: Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *European Respiratory Journal* 2003; 22: 358-363.
69. Dorfmueller P., Zarka V., Durand-Gasselini I., Monti G., Balabanian K., Garcia G., Capron F., Coulomb-Lherminé A., Marfaing-Koka A., Simonneau G., Emilie D., Humbert M.: Chemokine RANTES in severe pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2002; 165:534-9.
70. dos Santos Fernandes C.J., Jardim C.V., Hovnanian A., Hoette S., Dias B.A., Souza S., Humbert M., Souza R.: Survival in schistosomiasis-associated pulmonary arterial hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2010; 56: 715-20.
71. Dromparis P., Sutendra G., Michelakis E.D.: The role of mitochondria in pulmonary vascular remodeling. *J. Mol. Med. Berl.* 2010; 88:1003-10.
72. Duan S.Z., Usher M.G., Mortensen R.M.: Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated effects in the vasculature. *Circ. Res.* 2008; 102:283-94.
73. Dumitrascu R., Koebrich S., Dony E., Weissmann N., Savai R., Pullamsetti S. S., Schermuly R. T.: Characterization of a murine model of monocrotaline pyrrole-induced acute lung injury. *BMC Pulm. Med.* 2008; 8: 25.
74. Eddahibi S., Guignabert C., Barlier-Mur A.M., Dewachter L., Fadel E., Dartevielle P., Humbert M., Simonneau G., Hanoun N., Saurini F., Hamon M., Adnot S.: Cross talk between endothelial and smooth muscle cells in pulmonary hypertension: critical role for serotonin-induced smooth muscle hyperplasia. *Circulation* 2006; 113:1857-64.
75. Eisenberg P.R., Lucore C., Kaufman L., Sobel B.E., Jaffe A.S., Rich S.: Fibrinopeptide A levels indicative of pulmonary vascular thrombosis in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation* 1990; 82:841-7.
76. El Chami H., Hassoun P.M.: Immune and Inflammatory Mechanisms in Pulmonary Arterial Hypertension. *Progress in cardiovascular diseases* 2012; 55:218-228.
77. Elvehjem C.A., Madden R.J., Strong F.M., Wolley D.W.: The isolation and identification of the anti-black tongue factor. 1937. *J. Biol. Chem.* 2002; 277:e22.
78. Farhat M.Y., Chen M.F., Bhatti T., Iqbal A., Cathapermal S., Ramwell P.W.: Protection by oestradiol against the development of cardiovascular changes associated with monocrotaline pulmonary hypertension in rats. *Br. J. Pharmacol.* 1993; 110:719-23.

79. Farhat M.Y., Vargas R., Dinga B., Ramwell P.W.: In vitro effect of oestradiol on thymidine uptake in pulmonary vascular smooth muscle cell: role of the endothelium. *Br J. Pharmacol.* 1992; 107: 679–683.
80. Fedorowicz A., Mateuszuk Ł., Kopec G., Skórka T., Kutryb-Zajac B., Zakrzewska A., Walczak M., Jakubowski A., Łomnicka M., Słomińska E., Chlopicki S.: Activation of the nicotinamide N-methyltransferase (NNMT)-1-methylnicotinamide (MNA) pathway I pulmonary hypertension. *Respir. Res.* 2016; 17:108.
81. Feng Q., Fortin A.J., Lu X., Malcolm J., Arnold O.: Effects of l-arginine on endothelial and cardiac function in rats with heart failure. *Eur. J. Pharmacol.* 1999; 376:37–44.
82. Feng Q., Sun X., Lu X., Edvinsson L., Hedner T.: Decreased responsiveness of vascular postjunctional alpha1-, alpha2-adrenoceptors and neuropeptide Y1 receptors in rats with heart failure. *Acta Physiol. Scand.*, 1999;166(4):285-91.
83. Fijalkowska A., Kurzyna M., Torbicki A., Szewczyk G., Florczyk M., Pruszczyk P., Szturmowicz M.: Serum N-terminal brain natriuretic peptide as a prognostic parameter in patients with pulmonary hypertension. *Chest* 2006; 129:1313-21.
84. Firth A.L., Yao W., Remillard C.V., Ogawa A., Yuan J.X.: Upregulation of Oct-4 isoforms in pulmonary artery smooth muscle cells from patients with pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2010; 298:L548-57.
85. Fisher A.B., Chien S., Barakat A.I., Nerem R.M.: Endothelial cellular response to altered shear stress. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2001; 281:L529-33.
86. Forfia P.R., Mathai S.C., Fisher M.R., Houston-Harris T., Hemnes A.R., Champion H.C., Girgis R.E., Hassoun P.M.: Hyponatremia predicts right heart failure and poor survival in pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2008; 177:1364-9.
87. Frost A.E., Badesch D.B., Barst R.J., Benza R.L., Elliott C.G., Farber H.W., Krichman A., Liou T.G., Raskob G.E., Wason P., Feldkircher K., Turner M., McGoon M.D.: The changing picture of patients with pulmonary arterial hypertension in the United States: how REVEAL differs from historic and non-US Contemporary Registries. *Chest* 2011; 139:128-37.
88. Fukuwatari T., Shibata K.: Effect of nicotinamide administration on the tryptophan-nicotinamide pathway in humans. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 2007; 77:255-62.
89. Fukuwatari T., Wada H., Sasaki R., Shibata K.: Effects of excess nicotinamide administration on the urinary excretion of nicotinamide N-oxide and nicotinuric acid by rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2004; 68:44-50.
90. Fulton R.M., Hutchinson E.C., Jones A.M.: Ventricular weight in cardiac hypertrophy. *Br. Heart J.* 1952; 14:413-420.
91. Fuster V., Steele P.M., Edwards W.D., Gersh B.J., McGoon M.D., Frye R.L.: Primary pulmonary hypertension: natural history and the importance of thrombosis. *Circulation* 1984; 70:580-7.
92. Galiè N., Brundage B.H., Ghofrani H.A., Oudiz R.J., Simonneau G., Safdar Z., Shapiro S., White R.J., Chan M., Beardsworth A., Frumkin L., Barst R.J.: Tadalafil therapy for pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2009; 119:2894-903.
93. Galiè N., Corris P.A., Frost A., Girgis R.E., Granton J., Jing Z.C., Klepetko W., McGoon M.D., McLaughlin V.V., Preston I.R., Rubin L.J., Sandoval J., Seeger W., Keogh A.: Updated treatment algorithm of pulmonary arterial hypertension. *Turk Kardiyol. Dern. Ars.* 2014; 42 Suppl 1:78-94.
94. Galiè N., Humbert M., Vachiery J.L., Gibbs S., Lang I., Torbicki A., Simonneau G.,

- Peacock A., Vonk Noordegraaf A., Beghetti M., Ghofrani A., Gomez Sanchez M.A., Hansmann G., Klepetko W., Lancellotti P., Matucci M., McDonagh T., Pierard L.A., Trindade P.T., Zompatori M., Hoeper M.: 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur. Respir. J.* 2015; 46: 903-75.
95. Galiè N., Palazzini M., A., Manes A.: Pulmonary hypertension and pulmonary arterial hypertension: a clarification is needed. *European Respiratory J.* 2010; 36:986-990.
 96. Galiè N., Torbicki A., Barst R., Dartevelle P., Haworth S., Higenbottam T., Olschewski H., Peacock A., Pietra G., Rubin L.J., Simonneau G., Priori S.G., Garcia M.A., Blanc J.J., Budaj A., Cowie M., Dean V., Deckers J., Burgos E.F., Lekakis J., Lindahl B., Mazzotta G., McGregor K., Morais J., Oto A., Smiseth O.A., Barbera J.A., Gibbs S., Hoeper M., Humbert M., Naeije R., Pepke-Zaba J.: Task Force. Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension. The Task Force on Diagnosis and Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension of the European Society of Cardiology. *Eur. Heart J.* 2004; 25:2243-78.
 97. Gerges C., Gerges M., Skoro-Sajer N., Zhou Y., Zhang L., Sadushi-Kolici R., Jakowitsch J., Lang M.B., Lang I.M.: Hemodynamic Thresholds for Precapillary Pulmonary Hypertension. *Chest* 2016;149:1061-73.
 98. Germain M., Eyries M., Montani D., Poirier O., Girerd B., Dorfmueller P., Coulet F., Nadaud S., Maugenre S., Guignabert C., Carpentier W., Vonk-Noordegraaf A., Lévy M., Chaouat A., Lambert J.C., Bertrand M., Dupuy A.M., Letenneur L., Lathrop M., Amouyel P., de Ravel T.J., Delcroix M., Austin E.D., Robbins I.M., Hemnes A.R., Loyd J.E., Berman-Rosenzweig E., Barst R.J., Chung W.K., Simonneau G., Tréguët D.A., Humbert M., Soubrier F.: Genome-wide association analysis identifies a susceptibility locus for pulmonary arterial hypertension. *Nat. Genet.* 2013; 45:518-21.
 99. Ghafoorunissa, Rao B. S. N.: Effect of leucine on enzymes of the tryptophan–niacin metabolic pathway in rat liver and kidney. *Biochem. J.* 1973; 134: 425–430.
 100. Ghofrani H.A., Humbert M.: The role of combination therapy in managing pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. Rev.* 2014; 23:469-75.
 101. Gombert-Maitland M., Dufton C., Oudiz R.J., Benza R.L.: Compelling evidence of long-term outcomes in pulmonary arterial hypertension? A clinical perspective. *J. Am. Coll Cardiol.* 2011; 57:1053-61.
 102. Gomez-Arroyo J.G., Farkas L., Alhussaini A.A., Farkas D., Kraskauskas D., Voelkel N.F., Bogaard H.J.: The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2012; 302:L363-9.
 103. Grignola J.C.: Hemodynamic assessment of pulmonary hypertension. *World J. Cardiol.* 2011; 3:10-17
 104. Grillo M.A., Colombatto S.: Metabolism and function in animal tissues of agmatine, a biogenic amine formed from arginine. *Amino Acids* 2004; 26:3-8.
 105. Grimminger F., Schermuly R.T.: PDGF receptor and its antagonists: role in treatment of PAH. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2010; 661:435-46.
 106. Groth A., Vrugt B., Brock M., Speich R., Ulrich S., Huber L.C.: Inflammatory cytokines in pulmonary hypertension. *Respiratory Research* 2014; 15:47.
 107. Gurney A.M., Joshi S., Manoury B.: KCNQ Potassium Channels: New Targets for Pulmonary Vasodilator Drugs? *Adv. Exp. Med. Biol.* 2010; 661: 405-17.

108. Haddad F., Spruijt O.A., Denault A.Y., Mercier O., Brunner N., Furman D., Fadel E., Bogaard H.J., Schnittger I., Vrtovec B., Wu J.C., de Jesus Perez V., Vonk-Noordegraaf A., Zamanian R.T.: Right heart score for predicting outcome in idiopathic, familial, or drug- and toxin-associated pulmonary arterial hypertension. *JACC Cardiovasc. Imaging.* 2015; 8:627-38.
109. Hadri L., Kratljan R.G., Benard L., Maron B.A., Dorfmueller P., Ladage D., Guignabert C., Ishikawa K., Aguero J., Ibanez B., Turnbull I.C., Kohlbrenner E., Liang L., Zsebo K., Humbert M., Hulot J.S., Kawase Y., Hajjar R.J., Leopold J.A.: Therapeutic efficacy of AAV1.SERCA2a in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2013;128:512-23.
110. Harper R.L., Reynolds A.M., Bonder C.S., Reynolds P.N.: BMPR2 gene therapy for PAH acts via Smad and non-Smad signalling. *Respiology*, 2016; 21:727-33.
111. Hassa P. O., Haenni S. S., Elser M., Hottiger M. O.: Nuclear ADP-Ribosylation Reactions in Mammalian Cells: Where Are We Today and Where Are We Going? *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2006; 70:789–829.
112. Hassoun P.M., Mouthon L., Barberà J.A., Eddahibi S., Flores S.C., Grimminger F., Jones P.L., Maitland M.L., Michelakis E.D., Morrell N.W., Newman J.H., Rabinovitch M., Schermuly R., Stenmark K.R., Voelkel N.F., Yuan J.X., Humbert M.: Inflammation, growth factors, and pulmonary vascular remodeling. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2009; 54:S10-9.
113. Hawker R.J., Aukland A.: Platelet survival, atherosclerotic intermittent claudication and ticlopidine. *Atherosclerosis* 1984; 50: 147–158.
114. Heath D., Edwards J.E.: The pathology of hypertensive pulmonary vascular disease; a description of six grades of structural changes in the pulmonary arteries with special reference to congenital cardiac septal defects. *Circulation* 1958;18: 533-47.
115. Heffner J.E., Sahn S.A., Repine J.E.: The role of platelets in the adult respiratory distress syndrome. Culprits or bystanders? *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1987;135:482-92.
116. Hegyi J., Schwartz R.A., Hegyi V.: Pellagra: dermatitis, dementia, and diarrhea. *Int. J. Dermatol.* 2004;43:1-5.
117. Hemnes A.R., Champion H.C.: Right heart function and haemodynamics in pulmonary hypertension. *Int. J. Clin. Pract. Suppl.* 2008; 160:11-9.
118. Henkens I.R., Mouchaers K.T., Vliegen H.W., van der Laarse W.J., Swenne C.A., Maan A.C., Draisma H.H., Schaliij I., van der Wall E.E., Schaliij M.J., Vonk-Noordegraaf A.: Early changes in rat hearts with developing pulmonary arterial hypertension can be detected with three-dimensional electrocardiography. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007; 293:H1300-7.
119. Hiromatsu Y., Yang D., Miyake I., Koga M., Kameo J., Sato M., Inoue Y., Nonaka K.: Nicotinamide decreases cytokine-induced activation of orbital fibroblasts from patients with thyroid-associated ophthalmopathy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1998;83:121-4.
120. Hislop A., Reid L.: Arterial changes in *Crotalaria spectabilis*-induced pulmonary hypertension in rats. *Br. J. Exp. Pathol.* 1974; 55:153–163.
121. Hoepfer M.M., Bogaard H.J., Condliffe R., Frantz R., Khanna D., Kurzyna M., Langleben D., Manes A., Satoh T., Torres F., Wilkins M.R., Badesch D.B.: Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. *J. Am. Coll Cardiol.*, 2013; 62:D42-50.
122. Hoshikawa Y., Voelkel N.F., Gesell T.L., Moore M.D., Morris K.G., Alger L.A., Narumiya S., Geraci M.W.: Prostacyclin receptor-dependent modulation of pulmonary vascular remodeling. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001;164:314-8.

123. Houtkooper R.H., Cantó C., Wanders R.J., Auwerx J.: The secret life of NAD⁺: an old metabolite controlling new metabolic signaling pathways. *Endocr. Rev.* 2010;31:194-223.
124. Howard L.S., Grapsa J., Dawson D., Bellamy M., Chambers J.B., Masani N.D., Nihoyannopoulos P., Simon R Gibbs J.: Echocardiographic assessment of pulmonary hypertension: standard operating procedure. *Eur. Respir. Rev.* 2012; 21: 239-48.
125. Howard L.S.: Prognostic factors in pulmonary arterial hypertension: assessing the course of the disease. *Eur. Respir. Rev.* 2011;20:236-42.
126. Howell K., Costello C.M., Sands M., Dooley I., McLoughlin P.: L-Arginine promotes angiogenesis in the chronically hypoxic lung: a novel mechanism ameliorating pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2009; 296:L1042-50.
127. Huber K., Beckmann R., Frank H., Kneussl M., Mlczoch J., Binder B.R.: Fibrinogen, t-PA, and PAI-1 plasma levels in patients with pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1994; 150: 929-33.
128. Hudson B.I., Harja E., Moser B., Schmidt A.M.: Soluble levels of receptor for advanced glycation endproducts (sRAGE) and coronary artery disease: the next C-reactive protein? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:879-82.
129. Humbert M., Lau E.M., Montani D., Jaïs X., Sitbon O., Simonneau G.: Advances in therapeutic interventions for patients with pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2014; 130:2189-208.
130. Humbert M., Sitbon O., Chaouat A., Bertocchi M., Habib G., Gressin V., Yaici A., Weitzenblum E., Cordier J.F., Chabot F., Dromer C., Pison C., Reynaud-Gaubert M., Haloun A., Laurent M., Hachulla E., Simonneau G.: Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2006; 173:1023-30.
131. Ibrahim S.S., Rizk S.M.: Nicotinamide: A cytoprotectant against streptozotocin-induced diabetic damage in wistar rat brains. *African Journal of Biochemistry and Research* 2008;2:174–180.
132. Imai S., Guarente L.: NAD⁺ and Sirtuins in Aging and Disease. *Trends Cell Biol.* 2014; 24: 464–471.
133. Inbar S., Schrader B.J., Kaufmann E., Vestal R.E., Rich S.: Effects of adenosine in combination with calcium channel blockers in patients with primary pulmonary hypertension. *J. Am. Coll Cardiol.* 1993; 21:413-8.
134. Ito K., Hayashi K., Nakashima T., Murakami T.: Alteration of fate of vasoactive autacoids in pulmonary circulation following monocrotaline-induced lung vascular injury in rats. *Br. J. Pharmacol.* 1988; 94:1167-74.
135. Jackson T.M., Rawling J.M., Roebuck B.D., Kirkland J.B.: Large supplements of nicotinic acid and nicotinamide increase tissue NAD⁺ and poly (ADP-ribose) levels but do not affect diethylnitrosamine-induced altered hepatic foci in Fischer-344 rats. *J. Nutr.* 1995; 125:1455-61.
136. Jais X., Launay D., Yaici A., Le Pavec J., Tchérakian C., Sitbon O., Simonneau G.,Humbert M.: Immunosuppressive therapy in lupus- and mixed connective tissue disease-associated pulmonary arterial hypertension: a retrospective analysis of twenty-three cases. *Arthritis Rheum.* 2008; 58:521-31.
137. Jing Z.C., Jiang X., Han Z.Y., Xu X.Q., Wang Y., Wu Y., Lv H., Ma C.R., Yang Y.J., Pu J.L.: Iloprost for pulmonary vasodilator testing in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. J.* 2009; 33:1354-60.

138. Jing Z.C., Xu X.Q., Han Z.Y., Wu Y., Deng K.W., Wang H., Wang Z.W., Cheng X.S., Xu B., Hu S.S., Hui R.T., Yang Y.J.: Registry and survival study in Chinese patients with idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. *Chest* 2007; 132:373-9.
139. Johnson S.R., Mehta S., Granton J.T.: Anticoagulation in pulmonary arterial hypertension: a qualitative systematic review. *Eu. Resp. J.* 2006; 28:999-1004.
140. Jones P.L., Crack J., Rabinovitch M.: Regulation of tenascin-C, a vascular smooth muscle cell survival factor that interacts with the alpha v beta 3 integrin to promote epidermal growth factor receptor phosphorylation and growth. *J. Cell Biol.* 1997; 139:279-93.
141. Jones P.L., Jones F.S., Zhou B., Rabinovitch M.: Induction of vascular smooth muscle cell tenascin-C gene expression by denatured type I collagen is dependent upon a beta3 integrin-mediated mitogen-activated protein kinase pathway and a 122-base pair promoter element. *J. Cell Sci.* 1999; 112:435-45.
142. Jones P.L., Rabinovitch M.: Tenascin-C is induced with progressive pulmonary vascular disease in rats and is functionally related to increased smooth muscle cell proliferation. *Circ. Res.* 1996; 79:1131-42.
143. Joshi S., Sedivy V., Hodyc D., Herget J., Gurney A.M.: KCNQ modulators reveal a key role for KCNQ potassium channels in regulating the tone of rat pulmonary artery smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2009; 329:368-76.
144. Kamanna V.S., Ganji S.H., Kashyap M.L.: Niacin: An old drug rejuvenated. *Curr. Atheroscler. Rep.* 2009; 11: 45.
145. Kane G.C., Maradit-Kremers H., Slusser J.P., Scott C.G., Frantz R.P., McGoon M.D.; Integration of clinical and hemodynamic parameters in the prediction of long-term survival in patients with pulmonary arterial hypertension. *Chest*, 2011; 139:1285-93.
146. Kato G.J., Martyr S., Blackwelder W.C., Nichols J.S., Coles W.A., Hunter L.A., Brennan M.L., Hazen S.L., Gladwin M.T.: Levels of soluble endothelium-derived adhesion molecules in patients with sickle cell disease are associated with pulmonary hypertension, organ dysfunction, and mortality. *Br. J. Haematol.* 2005; 130:943-53.
147. Katta S., Vadapalli S., Sastry B.K.S., Nallari P.: t-plasminogen activator inhibitor-1 polymorphism in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Indian Journal of Human Genetics* 2008;14:37-40.
148. Kentera D., Susić D., Veljković V., Tucaković G., Koko V.: Pulmonary artery pressure in rats with hereditary platelet function defect. *Respiration* 1988; 54:110-4.
149. Kherbeck N., Tamby M.C., Bussone G., Dib H., Perros F., Humbert M., Mouthon L.: The role of inflammation and autoimmunity in the pathophysiology of pulmonary arterial hypertension. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2013; 44:31-8.
150. Kiliańska Z., Żołnierczyk J., Węsierska-Gądek J.: Biologiczna aktywność polimerazy poli(ADP-rybozy)-1. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 2010; 64: 344-363.
151. Kocić I., Dworakowska D., Dworakowski R.: Different aspects of the effects of thapsigargin on automatism, contractility and responsiveness to phenylephrine in cardiac preparations from rats and guinea pigs. *Pharmacol. Res.* 1998; 37:273-80.
152. Kocić I., Konstański Z.: The effects of potassium channel modulators on the simulated ischaemia-induced changes in contractility and responsiveness to phenylephrine of rat-isolated papillary muscle. *Pharmacol. Res.* 1998; 38:183-9.
153. Kocić I., Szczepańska R., Wapniarska I.: Estrogen-induced relaxation of the rat tail artery is attenuated in rats with pulmonary hypertension. *Pharmacol. Rep.* 2010; 62:95-9.

154. Kögler H., Hartmann O., Leineweber K., Nguyen van P., Schott P., Brodde O.E., Hasenfuss G.: Mechanical load-dependent regulation of gene expression in monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy in the rat. *Circ. Res.* 2003; 93:230-7.
155. Koo H.S., Kim K.Ch., Hong Y.M.: Gene expressions of nitric oxide synthase and matrix metalloproteinase-2 in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats after bosentan treatment. *Korean Circ. J.* 2011;41:83-90.
156. Kostka-Trąbka E.: Arginina — znany aminokwas o nowych możliwościach zastosowań klinicznych. *Ordynator Leków* 2002; 3: 15–19.
157. Kouri F.M., Queisser M.A., Königshoff M., Chrobak I., Preissner K.T., Seeger W., Eickelberg O.: Plasminogen activator inhibitor type 1 inhibits smooth muscle cell proliferation in pulmonary arterial hypertension. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2008; 40: 1872-82.
158. Kovacs G., Berghold A., Scheidl S., Olschewski H.: Pulmonary arterial pressure during rest and exercise in healthy subjects: a systematic review. *Eur. Respir. J.* 2009; 34:888-94.
159. Krebs H.A., Henseleit K.: Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. *Wochenschr* 1932; 11: 757.
160. Kurz, S., Harrison, D. G.: Insulin and the arginine paradox. *J. Clin. Invest.*, 1997; 99: 369–370.
161. Kurzyna M.: Epidemiologia i leczenie nadciśnienia płucnego w Polsce AD 2015; 5 Ogólnopolska Konferencja Sekcji Krążenia płucnego PTK. Warszawa, 16-17 października 2015; http://www.ptkardio.pl/Epidemiologia_i_leczenie_nadcisnienia_plucnego_w_Polsce_AD_2015-2485
162. Kwapiszewska G., Hoffmann J., Kovacs G., Stacher E., Olschewski A., Olschewski H.: Pulmonary Arterial Hypertension. *Pneumologie*, 2016; Epub ahead of print.
163. Landsberg J.W., Yuan J.X.: Calcium and TRP channels in pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation. *News Physiol. Sci.* 2004; 19:44-50.
164. Lannan K.L., Phipps R.P., White R.J.: Thrombosis, platelets, microparticles and PAH: more than a clot. *Drug Discov. Today* 2014;19:1230-5.
165. Launay J.M., Hervé P., Peoc'h K., Tournois C., Callebert J., Nebigil C.G., Etienne N., Drouet L., Humbert M., Simonneau G., Maroteaux L.: Function of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary hypertension. *Nat. Med.* 2002; 8:1129-35.
166. Le Cras T.D., Kim D.H., Gebb S., Markham N.E., Shannon J.M., Tuder R.M., Abman S.H.: Abnormal lung growth and the development of pulmonary hypertension in the Fawn-Hooded rat. *Am. J. Physiol.* 1999; 277:L709-18.
167. Le R.J., Fenstad E.R., Maradit-Kremers H., McCully R.B., Frantz R.P., McGoon M.D., Kane G.C.: Syncope in adults with pulmonary arterial hypertension. *J. Am. Coll Cardiol.* 2011; 58:863-7.
168. Lee K.M., Tsai K.Y, Wang N., Ingber D.E.: Extracellular matrix and pulmonary hypertension: control of vascular smooth muscle cell contractility. *Am. J. Physiol.* 1998; 274:H76-82.
169. Leineweber K., Seyfarth T., Abraham G., Gerbershagen H.P., Heinroth-Hoffmann I., Pönicke K., Brodde O.E.: Cardiac beta-adrenoceptor changes in monocrotaline-treated rats: differences between membrane preparations from whole ventricles and isolated ventricular cardiomyocytes. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2003; 41:333-42.

170. Leineweber K., Seyfarth T., Brodde O-E.: Chamber-specific alterations of noradrenaline uptake (uptake₁) in right ventricles of monocrotaline-treated rats. *Br. J. Pharmacol.* 2000; 131:1438-1444.
171. Lemmon M.A., Schlessinger J.: Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2010; 141:1117-34.
172. Leopold J.A., Maron B.A.: Molecular Mechanisms of Pulmonary Vascular Remodeling in Pulmonary Arterial Hypertension. *Int. J. Mol. Sci.* 2016; 17.
173. Li X., Zhang X., Leathers R., Makino A., Huang C., Parsa P., Macias J., Yuan J.X., Jamieson S.W., Thistlethwaite P.A.: Notch3 signaling promotes the development of pulmonary arterial hypertension. *Nat. Med.* 2009; 15:1289-97.
174. Lin C.-C., Hsieh N.-K., Liou H. L., Chen H. I.: Niacinamide mitigated the acute lung injury induced by phorbol myristate acetate in isolated rat's lungs. *J. Biomed. Sci.* 2012; 19: 27
175. Ling Y., Johnson M.K., Kiely D.G., Condliffe R., Elliot C.A., Gibbs J.S., Howard L.S., Pepke-Zaba J., Sheares K.K., Corris P.A., Fisher A.J., Lordan J.L., Gaine S., Coghlan J.G., Wort S.J., Gatzoulis M.A., Peacock A.J.: Changing demographics, epidemiology, and survival of incident pulmonary arterial hypertension: results from the pulmonary hypertension registry of the United Kingdom and Ireland. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2012; 186:790-6.
176. Liu H., Liu Z.Y., Guan Q.: Oral sildenafil prevents and reverses the development of pulmonary hypertension in monocrotaline-treated rats. *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* 2007; 6:608-13.
177. Loscalzo J.: What we know and don't know about L-arginine and NO. *Circulation* 2000; 101:2126-9.
178. Loscalzo, J.: The Identification of Nitric Oxide as Endothelium-derived Relaxing Factor. *Circ. Res.* 2013; 113: 100–103.
179. Ma L., Roman-Campos D., Austin E.D., Eyries M., Sampson K.S., Soubrier F., Germain M., Trégouët D.A., Borczuk A., Rosenzweig E.B., Girerd B., Montani D., Humbert M., Loyd J.E., Kass R.S., Chung W.K.: A novel channelopathy in pulmonary arterial hypertension. *N. Engl. J. Med.* 2013; 369:351-61.
180. Maarman G., Lecour S., Butrous G., Thienemann F., Sliwa K.: A comprehensive review: the evolution of animal models in pulmonary hypertension research; are we there yet? *Pulm. Circ.* 2013; 3:739-56.
181. Machado R.D., Koehler R., Glissmeyer E., Veal C., Suntharalingam J., Kim M., Carlquist J., Town M., Elliott C.G., Hoeper M., Fijalkowska A., Kurzyna M., Thomson J.R., Gibbs S.R., Wilkins M.R., Seeger W., Morrell N.W., Gruenig E., Trembath R.C., Janssen B.: Genetic association of the serotonin transporter in pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2006; 173:793-7.
182. MacLean M.R., Herve P., Eddahibi S., Adnot S.: 5-hydroxytryptamine and the pulmonary circulation: receptors, transporters and relevance to pulmonary arterial hypertension. *Br. J. Pharmacol.* 2000; 131:161-168.
183. Mair K.M., Johansen A.K., Wright A.F., Wallace E., MacLean M.R.: Pulmonary arterial hypertension: basis of sex differences in incidence and treatment response. *Br. J. Pharmacol.* 2014; 171:567-79.
184. Malfatti C.R.M., da Silva L.A., Pereira R.A., Michel R.G., Snak A.L., dos Santos F.S.: Acute hypothalamic administration of L-arginine increases feed intake in rats. *Rev. Nutr.* 2015; 28: 55-63.
185. Mam V., Tanbe A. F., Vitali S. H., Arons E., Christon H. A., Khalil R. A.: Impaired

- Vasoconstriction and Nitric Oxide-Mediated Relaxation in Pulmonary Arteries of Hypoxia- and Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertensive Rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2010; 332: 455–462.
186. Mandegar M., Remillard C.V., Yuan J.X.: Ion channels in pulmonary arterial hypertension. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 2002; 45:81-114.
 187. Martin D.R., Lewington A.J., Hammerman M.R., Padanilam B.J.: Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase attenuates ischemic renal injury in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2000; 279:R1834-40.
 188. Marx N., Duez H., Fruchart J.C., Staels B.: Peroxisome proliferator-activated receptors and atherogenesis: regulators of gene expression in vascular cells. *Circ. Res.* 2004; 94:1168-78.
 189. Mathai S.C., Suber T., Khair R.M., Kolb T.M., Damico R.L., Hassoun P.M.: Health-related quality of life and survival in pulmonary arterial hypertension. *Ann. Am. Thorac Soc.* 2016; 13:31-9.
 190. McGoon M., Guterman D., Steen V., Barst R., McCrory D.C., Fortin T.A., Loyd J.E.: Screening, early detection, and diagnosis of pulmonary arterial hypertension: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2004; 126: 14S-34S.
 191. McGoon M.D., Miller D.P.: REVEAL: a contemporary US pulmonary arterial hypertension registry. *Eur. Respir. Rev.* 2012; 21:8-18.
 192. McGoon M.D., Peacock A.J., Pepke-Zaba J., Pulido T., Rich S., Rosenkranz S., Suissa S., Humbert M.: Pulmonary arterial hypertension: epidemiology and registries. *J. Am. Coll Cardiol.* 2013; 62:D51-9.
 193. McLaughlin V.V., Archer S.L., Badesch D.B., Barst R.J., Farber H.W., Lindner J.R., Mathier M.A., McGoon M.D., Park M.H., Rosenson R.S., Rubin L.J., Tapson V.F., Varga J., Harrington R.A., Anderson J.L., Bates E.R., Bridges C.R., Eisenberg M.J., Ferrari V.A., Grines C.L., Hlatky M.A., Jacobs A.K., Kaul S., Lichtenberg R.C., Lindner J.R., Moliterno D.J., Mukherjee D., Pohost G.M., Rosenson R.S., Schofield R.S., Shubrooks S.J., Stein J.H., Tracy C.M., Weitz H.H., Wesley D.J.: ACCF/AHA. ACCF/AHA 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension: a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association: developed in collaboration with the American College of Chest Physicians, American Thoracic Society, Inc., and the Pulmonary Hypertension Association. *Circulation* 2009;119:2250-94.
 194. McLaughlin V.V., Gaine S.P., Howard L.S., Leuchte H.H., Mathier M.A., Mehta S., Palazzini M., Park M.H., Tapson V.F., Sitbon O.: Treatment goals of pulmonary hypertension. *J. Am. Coll Cardiol.* 2013; 62:D73-81.
 195. McLaughlin V.V., Shah S.J., Souza R., Humbert M.: Management of pulmonary arterial hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2015; 65:1976-97.
 196. McLaughlin V.V., Sitbon O., Badesch D.B., Barst R.J., Black C., Galiè N., Rainisio M., Simonneau G., Rubin L.J.: Survival with first-line bosentan in patients with primary pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* 2005; 25:244-9.
 197. McMurtry M.S., Bonnet S., Wu X., Dyck J.R., Haromy A., Hashimoto K., and Michelakis E.D.: Dichloroacetate prevents and reverses pulmonary hypertension by inducing pulmonary artery smooth muscle cell apoptosis. *Circ. Res.* 2004; 95:830–840.
 198. Mehta S., Stewart D.J., Langleben D., Levy R.D.: Short-term pulmonary vasodilation with L-arginine in pulmonary hypertesion. *Circulation* 1995; 92:1539-45.
 199. Melo S.S., Arantes M.R., Meirelles M.S., Jordão A.A. Jr., Vannucchi H.: Lipid

- peroxidation in nicotinamide-deficient and nicotinamide-supplemented rats with streptozotocin-induced diabetes. *Acta Diabetol.* 2000;37:33-9.
200. Meyrick B., Reid L.: Development of pulmonary arterial changes in rats fed *Crotalaria spectabilis*. *Am. J. Pathol.* 1979; 94: 37–51
 201. Meyrick B.: The pathology of pulmonary artery hypertension. *Clin. Chest Med.* 2001; 22:393-404.
 202. Mielczarek-Puta M., Chrzanowska A., Graboń W., Barańczyk-Kuźma A.: New insights into arginase. Part II. Role in physiology and pathology. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 2008; 62:214-21.
 203. Mitchell, J. A., Ahmetaj-Shala, B., Kirkby, N. S., Wright, W. R., Mackenzie, L. S., Reed, D. M., Mohamed, N.: Role of prostacyclin in pulmonary hypertension. *Glob. Cardiol. Sci. Pract.* 2014: 382–393.
 204. Molloy W.D., Lee K.Y., Girling L., Schick U., Prewitt R.M.: Treatment of shock in a canine model of pulmonary embolism. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1984; 130:870-4.
 205. Molteni A., Ward W.F., Ts'ao C.H., Solliday N.H.: Monocrotaline pneumotoxicity in mice. *Virchows. Arch. B. Cell. Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 1989; 57:149-55.
 206. Montani D., Achouh L., Marcelin A.G., Viard J.-P., Hermine O., Canioni D., Sitbon O., Simonneau G., Humbert M.: Reversibility of pulmonary arterial hypertension in HIV/HHV8-associated Castleman's disease. *European Respiratory Journal* 2005; 26: 969-972.
 207. Mooi W.J., Grüngerg K.: Histopathology of pulmonary hypertensive diseases. *Curr. Diagnostic Pathol.* 2006; 12: 429–440.
 208. Morales-Blanhir J., Santos S., de Jover L., Sala E., Paré C., Roca J., Rodriguez-Roisin R., Barberà J.A.: Clinical value of vasodilator test with inhaled nitric oxide for predicting long-term response to oral vasodilators in pulmonary hypertension. *Respir. Med.* 2004; 98:225-34.
 209. Mori M.: Regulation of nitric oxide synthesis and apoptosis by arginase and arginine recycling. *J. Nutr.* 2007; 137:1616S-1620S.
 210. Morris S.M. Jr.: Arginine metabolism: boundaries of our knowledge. *J. Nutr.* 2007; 137:1602S-1609S.
 211. Moura J.R., Sass N., Guimarães S.B., Vasconcelos P.R., Mattar R., Kulay L. Jr.: Effects of L-arginine oral supplements in pregnant spontaneously hypertensive rats. *Acta Cir. Bras.* 2006; 21:192-6.
 212. Mukerjee D., St George D., Coleiro B., Knight C., Denton C.P., Davar J., Black C.M., Coghlan J.G.: Prevalence and outcome in systemic sclerosis associated pulmonary arterial hypertension: application of a registry approach. *Ann. Rheum. Dis.* 2003; 62: 1088-93.
 213. Naeije R., Manes A.: The right ventricle in pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. Rev.* 2014; 23:476-87.
 214. Nagaya N., Nishikimi T., Uematsu M., Satoh T., Kyotani S., Sakamaki F., Kakishita M., Fukushima K., Okano Y., Nakanishi N., Miyatake K., Kangawa K.: Plasma brain natriuretic peptide as a prognostic indicator in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation* 2000; 102:865-70.
 215. Nagaya N., Uematsu M., Oya H., Sato N., Sakamaki F., Kyotani S., Ueno K., Nakanishi N., Yamagishi M., Miyatake K.: Short-term oral administration of L-arginine improves hemodynamics and exercise capacity in patients with precapillary pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 2001; 163:887-91.

216. Nagendran J., Archer S.L., Soliman D., Gurtu V., Moudgil R., Haromy A., St Aubin C., Webster L., Rebeyka I.M., Ross D.B., Light P.E., Dyck J.R., Michelakis E.D.: Phosphodiesterase type 5 is highly expressed in the hypertrophied human right ventricle, and acute inhibition of phosphodiesterase type 5 improves contractility. *Circulation* 2007; 116:238-48.
217. Naito Y., Hosokawa M., Hao H., Sawada H., Hirotani S., Iwasaku T., Okuhara Y., Eguchi A., Hirota S., Ohyanagi M., Tsujino T., Masuyama T.: Impact of dietary iron restriction on the development of monocrotaline-induced pulmonary vascular remodeling and right ventricular failure in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013; 436:145-51.
218. Naito Y., Hosokawa M., Hao H., Sawada H., Oboshi M., Iwasaku T., Okuhara Y., Morisawa D., Eguchi A., Hirotani S., Tsujino T., Masuyama T.: Effects of iron restriction on monocrotaline-induced pulmonary vascular remodeling. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2014; 63.
219. National Research Council (US) Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition. *Nutrient Requirements of Laboratory Animals: Fourth Revised Edition* 1995. Washington (DC): National Academies Press (US); 1995.
220. Nickel N., Golpon H., Greer M., Knudsen L., Olsson K., Westerkamp V., Welte T., Hoepfer M.M.: The prognostic impact of follow-up assessments in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. J.* 2012; 39:589-96.
221. Nogueira-Ferreira R., Faria-Costa G., Ferreira R., Henriques-Coelho T.: *Animal Models for the Study of Pulmonary Hypertension: Potential and Limitations.* *Cardiol. Cardiovasc. Med.* 2016; 1: 1-22.
222. Nogueira-Ferreira R., Vitorino R., Ferreira R., Henriques-Coelho T.: Exploring the monocrotaline animal model for the study of pulmonary arterial hypertension: A network approach. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 2015;35:8-16.
223. Ohira H., Beanlands R.S., Davies R.A., Mielniczuk L.: The role of nuclear imaging in pulmonary hypertension. *J. Nucl. Cardiol.* 2015;22:141-57.
224. Pak O., Janssen W., Ghofrani H.A., Seeger W., Grimminger F., Schermuly R.T., Weissmann N.: Animal models of pulmonary hypertension: role in translational research. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 2010; 181:279–288.
225. Pak O., Sommer N., Hoeres T., Bakr A., Waisbrod S., Sydykov A., Haag D., Esfandiary A., Kojonazarov B., Veit F., Fuchs B., Weisel F.C., Hecker M., Schermuly R.T., Grimminger F., Ghofrani H.A., Seeger W., Weissmann N.: Mitochondrial hyperpolarization in pulmonary vascular remodeling. Mitochondrial uncoupling protein deficiency as disease model. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2013; 49:358-67.
226. Panza J.A., Casino P.R., Badar D.M., Quyyumi A.A.: Effect of increased availability of endothelium-derived nitric oxide precursor on endothelium-dependent vascular relaxation in normal subjects and in patients with essential hypertension. *Circulation* 1993; 87:1475-81.
227. Paton J.F., Kasparov S., Paterson D.J.: Nitric oxide and autonomic control of heart rate: a question of specificity. *Trends Neurosci.* 2002;25:626-31.
228. Paulin R., Michelakis E.D.: The metabolic theory of pulmonary arterial hypertension. *Circ. Res.* 2014; 115:148-64.
229. Peacock A., Murphy N.F., McMurray J.J.V., Caballero L., Stewart S.: An epidemiological study of pulmonary arterial hypertension in Scotland. *Eur. Respir. J.* 2007; 30:104 –109.

230. Peralta-Leal A., Rodríguez-Vargas J.M., Aguilar-Quesada R., Rodríguez M.I., Linares J.L., de Almodóvar M.R., Oliver F.J.: PARP inhibitors: new partners in the therapy of cancer and inflammatory diseases. *Free Radic. Biol. Med.* 2009; 47:13-26.
231. Perros F., Dorfmüller P., Souza R., Durand-Gasselín I., Godot V., Capel F., Adnot S., Eddahibi S., Mazmanian M., Fadel E., Hervé P., Simonneau G., Emilie D., Humbert M.: Fractalkine-induced smooth muscle cell proliferation in pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* 2007; 29:937-43.
232. Pezzuto B., Badagliacca R., Poscia R., Ghio S., D'Alto M., Vitulo P., Mulè M., Albera C., Volterrani M., Fedele F., Vizza C.D.: Circulating biomarkers in pulmonary arterial hypertension: update and future direction. *J. Heart Lung Transplant* 2015; 34: 282-305.
233. Piacentini E., López-Aguilar J., García-Martín C., Villagrà A., Saenz-Valiente A., Murias G., Fernández-Segoviano P., Hotchkiss J.R., Blanch L.: Effects of vascular flow and PEEP in a multiple hit model of lung injury in isolated perfused rabbit lungs. *J. Trauma.* 2008; 65:147-53.
234. Pieper A.A., Verma A., Zhang J., Snyder S.H.: Poly (ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death. *Trends Pharmacol. Sci.* 1999; 20:171-81.
235. Pietra G.G., Capron F., Stewart S., Leone O., Humbert M., Robbins I.M., Reid L.M., Tuder R.M.: Pathologic assessment of vasculopathies in pulmonary hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2004; 43:25S-32S.
236. Pietra G.G., Edwards W.D., Kay J.M., Rich S., Kernis J., Schloo B., Ayres S.M., Bergofsky E.H., Brundage B.H., Detre K.M., et al.: Histopathology of primary pulmonary hypertension. A qualitative and quantitative study of pulmonary blood vessels from 58 patients in the National Heart, Lung, and Blood Institute, Primary Pulmonary Hypertension Registry. *Circulation* 1989;80:1198-206.
237. Piwko G., Kosiński A., Kamiński R., Orzelska-Blomberg M., Nowicka E., Kozłowski D., Grzybiak M.: Arterial hypertension and remodeling of the right ventricle in gross-anatomy assessment – preliminary study. *Geriatrics* 2015; 9: 3-10.
238. Presberg K.W., Dincer H.E.: Pathophysiology of pulmonary hypertension due to lung disease. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 2003; 9: 131-8.
239. Preston I.R., Roberts K.E., Miller D.P., Sen G.P., Selej M., Benton W.W., Hill N.S., Farber H.W.: Effect of Warfarin Treatment on Survival of Patients With Pulmonary Arterial Hypertension (PAH) in the Registry to Evaluate Early and Long Term PAH Disease Management (REVEAL). *Circulation* 2015; 132:2403-11.
240. Pullamsetti S., Kiss L., Ghofrani H.A., Voswinckel R., Haredza P., Klepetko W., Aigner C., Fink L., Moyal J.P., Weissmann N., Grimminger F., Seeger W., Schermuly R.T.: Increased levels and reduced catabolism of asymmetric and symmetric dimethylarginines in pulmonary hypertension. *FASEB J.* 2005; 19:1175-7.
241. Pumpo R., Sarnelli G., Spinella A., Budillon G., Cuomo R.: The metabolism of nicotinamide in human liver cirrhosis: a study on N-methylnicotinamide and 2-pyridone-5-carboxamide production. *Am. J. Gastroenterol.* 2001; 96:1183-7.
242. Rabinovitch M.: Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J. Clin. Invest.* 2012; 122:4306-4313.
243. Rabinovitch M.: Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J. Clin. Invest.* 2008; 118: 2372–2379.
244. Rabinovitch M.: Pathology of pulmonary hypertension. *Progress in Pediatric Cardiology* 2001; 12:223-247.

245. Rabinovitch M.: PPARgamma and the pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2010; 661:447-58.
246. Rabinovitch M.: Pulmonary hypertension: updating a mysterious disease. *Cardiovasc. Res.* 1997; 34:268-72.
247. Rameh V., Kossaify A.: Role of Biomarkers in the Diagnosis, Risk Assessment, and Management of Pulmonary Hypertension. *Biomark. Insights* 2016; 11:85-89.
248. Ramiro-Diaz J.M., Nitta C.H., Maston L.D., Codianni S., Giermakowska W., Resta T.C., Gonzalez Bosc L.V.: NFAT is required for spontaneous pulmonary hypertension in superoxide dismutase 1 knockout mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2013; 304:L613-25.
249. Real, A. M., Hong, S., Pissios, P.: Nicotinamide N-Oxidation by CYP2E1 in human liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.* 2013; 41: 550–553.
250. Redfield M.M., Rodeheffer R.J., Jacobsen S.J., Mahoney D.W., Bailey K.R., Burnett J.C. Jr.: Plasma brain natriuretic peptide concentration: impact of age and gender. *J. Am. Coll Cardiol.* 2002; 40:976-82.
251. Reeves P.G., Nielsen F.H., Fahey G.C. Jr.: AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.*, 1993; 123: 1939-51.
252. Reyes A.A., Porras B.H., Chasalow F.I., Klahr S.: L-arginine decreases the infiltration of the kidney by macrophages in obstructive nephropathy and puromycin-induced nephrosis. *Kidney Int.* 1994; 45:1346-54.
253. Rich S., Dantzker D.R., Ayres S.M., Bergofsky E.H., Brundage B.H., Detre K.M., Fishman A.P., Goldring R.M., Groves B.M., Koerner S.K., et al.: Primary pulmonary hypertension. A national prospective study. *Ann. Intern. Med.* 1987; 107: 216-23.
254. Rich S., Pogoriler J., Husain A.N., Toth P.T., Gomberg-Maitland M., Archer S.L.: Long-term effects of epoprostenol on the pulmonary vasculature in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Chest* 2010; 138:1234-9.
255. Rich S., Seidlitz M., Dodin E., Osimani D., Judd D., Genthner D., McLaughlin V., Francis G.: The short-term effects of digoxin in patients with right ventricular dysfunction from pulmonary hypertension. *Chest* 1998; 114:787–792.
256. Rubin L.J., Hopkins W.: Overview of pulmonary hypertension in adults. <https://www.uptodate.com/contents/overview-of-pulmonary-hypertension-in-adults>; 2016.
257. Rubin L.J.: American College of Chest Physicians. Diagnosis and management of pulmonary arterial hypertension: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2004; 126: 7S-10S.
258. Ryan J. J., Archer S. L.: The right ventricle in pulmonary arterial hypertension: disorders of metabolism, angiogenesis and adrenergic signaling in right ventricular failure. *Res.* 2014; 115: 176–188.
259. Ryan J., Bloch K., Archer S.L.: Rodent models of pulmonary hypertension: harmonisation with the world health organisation's categorisation of human PH. *Int. J. Clin. Pract. Suppl.* 2011:15-34.
260. Ryan J.J., Huston J., Kutty S., Hatton N.D., Bowman L., Tian L., Herr J.E., Johri A.M., Archer S.L.: Right ventricular adaptation and failure in pulmonary arterial hypertension. *Can. J. Cardiol.* 2015; 31:391-406.
261. Safdar Z., Tamez E., Chan W., Arya B., Ge Y., Deswal A., Bozkurt B., Frost A., Entman M.: Circulating collagen biomarkers as indicators of disease severity in

- pulmonary arterial hypertension. *JACC Heart Fail*, 2014; 2:412-21. Erratum in: *JACC Heart Fail* 2015; 3:345.
262. Sahara M., Sata M., Morita T., Nakamura K., Hirata Y., Nagai R.: Diverse contribution of bone marrow-derived cells to vascular remodeling associated with pulmonary arterial hypertension and arterial neointimal formation. *Circulation* 2007; 115:509-17.
 263. Sakamaki F., Kyotani S., Nagaya N., Sato N., Oya H., Satoh T., Nakanishi N.: Increased plasma P-selectin and decreased thrombomodulin in pulmonary arterial hypertension were improved by continuous prostacyclin therapy. *Circulation* 2000; 102: 2720-5.
 264. Sakao S., Tatsumi K.: Vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension: multiple cancer-like pathways and possible treatment modalities. *Int. J. Cardiol.* 2011; 147:4-12.
 265. Sanchez O., Marcos E., Perros F., Fadel E., Tu L., Humbert M., Darteville P., Simonneau G., Adnot S., Eddahibi S.: Role of endothelium-derived CC chemokine ligand 2 in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2007;176:1041-7.
 266. Sanchez O., Sitbon O., Jaïs X., Simonneau G., Humbert M.: Immunosuppressive therapy in connective tissue diseases-associated pulmonary arterial hypertension. *Chest* 2006; 130:182-9.
 267. Sanli C., Oguz D., Olgunturk R., Tunaoglu F.S., Kula S., Pasaoglu H., Gulbahar O., Cevik A.: Elevated homocysteine and asymmetric dimethyl arginine levels in pulmonary hypertension associated with congenital heart disease. *Pediatr. Cardiol.* 2012; 33:1323-31.
 268. Sasaki S., Asano M., Ukai T., Nomura N., Maruyama K., Manabe T., Mishima A.: Nitric oxide formation and plasma L-arginine levels in pulmonary hypertensive rats. *Respir. Med.* 2004; 98:205-12.
 269. Savale L., Tu L., Rideau D., Izziki M., Maitre B., Adnot S., Eddahibi S.: Impact of interleukin-6 on hypoxia-induced pulmonary hypertension and lung inflammation in mice. *Respir. Res.* 2009; 27; 10:6.
 270. Savoia C., Sada L., Zezza L., Pucci L., Lauri F.M., Befani A., Alonzo A., Volpe M.: Vascular inflammation and endothelial dysfunction in experimental hypertension. *Int. J. Hypertens.* 2011; 2011:281240.
 271. Schermuly R.T., Kreisselmeier K.P., Ghofrani H.A., Yilmaz H., Butrous G., Ermert L., Ermert M., Weissmann N., Rose F., Guenther A., Walmrath D., Seeger W., Grimminger F.: Chronic sildenafil treatment inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2004; 169:39-45.
 272. Schrader B.J., Inbar S., Kaufmann L., Vestal R.E., Rich S.: Comparison of the effects of adenosine and nifedipine in pulmonary hypertension. *J. Am. Coll Cardiol.* 1992; 19: 1060-4.
 273. Schulman D.S., Matthay R.A.: The right ventricle in pulmonary disease. *Cardiol. Clin.* 1992;10:111-35.
 274. Seferian A., Chaumais M.C., Savale L., Günther S., Tubert-Bitter P., Humbert M., Montani D.: Drugs induced pulmonary arterial hypertension. *Presse Med.* 2013; 42: e303-10.
 275. Shen L., Shen J., Pu J., He B.: Aspirin attenuates pulmonary arterial hypertension in rats by reducing plasma 5-hydroxytryptamine levels. *Cell Biochem. Biophys.* 2011; 61:23-31.

276. Shitrit D., Bendayan D., Rudensky B., Izbicki G., Huerta M., Fink G., Kramer M.R.: Elevation of ELISA d-dimer levels in patients with primary pulmonary hypertension. *Respiration* 2002; 69:327-9.
277. Siegel C. S., McCullough L. D.: Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) and nicotinamide: sex differences in cerebral ischemia. *Neuroscience* 2013; 237: 223–231.
278. Sim J.-Y. : Nitric oxide and pulmonary hypertension. *Korean J. Anesthesiol.* 2010; 58: 4–14.
279. Simonneau G., Galiè N., Rubin L.J., Langleben D., Seeger W., Domenighetti G., Gibbs S., Lebrec D., Speich R., Beghetti M., Rich S., Fishman A.: Clinical classification of pulmonary hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2004; 43:5S-12S.
280. Simonneau G., Gatzoulis M.A., Adatia I., Celermajer D., Denton C., Ghofrani A., Gomez Sanchez M.A., Krishna Kumar R., Landzberg M., Machado R.F., Olschewski H., Robbins I.M., Souza R.: Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2013; 62:D34-41.
281. Simonneau G., Robbins I.M., Beghetti M., Channick R.N., Delcroix M., Denton C.P., Elliott C.G., Gaine S.P., Gladwin M.T., Jing Z.C., Krowka M.J., Langleben D., Nakanishi N., Souza R.: Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2009; 54:S43-54.
282. Sitbon O, Humbert M, Jaïs X, Ioos V, Hamid AM, Provencher S, Garcia G, Parent F, Hervé P, Simonneau G. Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation.* 2005 Jun14;111(23):3105-11.
283. Sitbon O., Brenot F., Denjean A., Bergeron A., Parent F., Azarian R., Herve P., Raffestin B., Simonneau G.: Inhaled nitric oxide as a screening vasodilator agent in primary pulmonary hypertension. A dose-response study and comparison with prostacyclin. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995; 151:384-9.
284. Sitbon O., Channick R., Chin K.M., Frey A., Gaine S., Galiè N., Ghofrani H.A., Hoepfer M.M., Lang I.M., Preiss R., Rubin L.J., Di Scala L., Tapson V., Adzerikho I., Liu J., Moiseeva O., Zeng X., Simonneau G., McLaughlin V.V.; GRIPHON Investigators: Selexipag for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *N. Engl. J. Med.* 2015; 373:2522-33.
285. Sitbon O., Jaïs X., Savale L., Cottin V., Bergot E., Macari E.A., Bouvaist H., Dauphin C., Picard F., Bulifon S., Montani D., Humbert M., Simonneau G.: Upfront triple combination therapy in pulmonary arterial hypertension: a pilot study. *Eur. Respir. J.* 2014; 43:1691-7.
286. Sitbon O., Lascoux-Combe C., Delfraissy J.F., Yeni P.G., Raffi F., De Zuttere D., Gressin V., Clerson P., Sereni D., Simonneau G.: Prevalence of HIV-related pulmonary arterial hypertension in the current antiretroviral therapy era. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2008; 177:108-13.
287. Slominska E.M., Adamski P., Lipinski M., Swierczynski J., Smolenski R.T.: Liquid chromatographic/mass spectrometric procedure for measurement of NAD catabolite in human and rat plasma and urine. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2006; 25:1245-9.
288. Solomonson L.P., Flam B.R., Pendleton L.C., Goodwin B.L., Eichler D.C.: The caveolar nitric oxide synthase/arginine regeneration system for NO production in endothelial cells. *J. Exp. Biol.* 2003; 206:2083-7.
289. Stacher E., Graham B.B., Hunt J.M., Gandjeva A., Groshong S.D., McLaughlin V.V., Jessup M., Grizzle W.E., Aldred M.A., Cool C.D., Tuder R.M.: Modern age

- pathology of pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2012; 186:261-72.
290. Steffen B.T., Lees S.J., Booth F.W.: Anti-TNF treatment reduces rat skeletal muscle wasting in monocrotaline-induced cardiac cachexia. *J. Appl. Physiol.* (1985) 2008; 105:1950-8.
291. Steiner M.K., Syrkina O.L., Kolliputi N., Mark E.J., Hales C.A., Waxman A.B.: Interleukin-6 overexpression induces pulmonary hypertension. *Circ. Res.* 2009; 104:236-44.
292. Stenmark K.R., Meyrick B., Galie N., Mooi W.J., McMurtry I.F.: Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2009; 297:L1013-32.
293. Stevens M.J., Li F., Drel V.R., Abatan O.I., Kim H., Burnett D., Larkin D., Obrosova I.G.: Nicotinamide reverses neurological and neurovascular deficits in streptozotocin diabetic rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2007; 320:458-64.
294. Strange G., Playford D., Stewart S., Deague J.A., Nelson H., Kent A., Gabbay E.: Pulmonary hypertension: prevalence and mortality in the Armadale echocardiography cohort. *Heart* 2012; 98:1805-11.
295. Su C.F., Liu D.D., Kao S.J., Chen H.I.: Nicotinamide abrogates acute lung injury caused by ischaemia/reperfusion. *Eur. Respir. J.* 2007; 30:199-204.
296. Sukhodub A., Du Q., Jovanović S., Jovanović A.: Nicotinamide-rich diet protects the heart against ischaemia-reperfusion in mice: A crucial role for cardiac SUR2A. *Pharmacol. Res.* 2010; 61: 564–570.
297. Sukhodub A., Sudhir R., Du Q., Jovanović S., Reyes S., Jovanović A.: Nicotinamide-rich diet improves physical endurance by up-regulating SUR2A in the heart. *J. Cell Mol. Med.* 2011; 15:1703-12.
298. Surjana D., Halliday G.M., Damian D.L.: Role of nicotinamide in DNA damage, mutagenesis, and DNA repair. *J. Nucleic. Acids* 2010; 2010. pii: 157591.
299. Sutliff R.L., Kang B.-Y., Hart C.M.: PPAR γ as a potential therapeutic target in pulmonary hypertension. *Therapeutic advances in respiratory disease* 2010; 4:143-160.
300. Szabó C., Dawson V.L.: Role of poly (ADP-ribose) synthetase in inflammation and ischaemia-reperfusion. *Trends Pharmacol. Sci.* 1998; 19:287-98.
301. Tang B.T., Pickard S.S., Chan F.P., Tsao P.S., Taylor C.A., Feinstein J.A.: Wall shear stress is decreased in the pulmonary arteries of patients with pulmonary arterial hypertension: An image-based, computational fluid dynamics study. *Pulm. Circ.* 2012; 2:470-6.
302. Terrier B., Tamby M.C., Camoin L., Guilpain P., Broussard C., Bussone G., Yaïci A., Hotellier F., Simonneau G., Guillemin L., Humbert M., Mouthon L.: Identification of target antigens of antifibroblast antibodies in pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2008; 177:1128-34.
303. Thomson J.R., Machado R.D., Pauciulo M.W., Morgan N.V., Humbert M., Elliott G.C., Ward K., Yacoub M., Mikhail G., Rogers P., Newman J., Wheeler L., Higenbottam T., Gibbs J.S., Egan J., Crozier A., Peacock A., Allcock R., Corris P., Loyd J.E., Trembath R.C., Nichols W.C.: Sporadic primary pulmonary hypertension is associated with germline mutations of the gene encoding BMPR-II, a receptor member of the TGF-beta family. *J. Med. Genet.* 2000; 37:741-5.

304. Tofovic P.S., Salah E.M., Mady H.H., Jackson E.K., Melhem M.F.: Estradiol metabolites attenuate monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2005;46:430-7.
305. Tofovic P.S., Zhang X., Petrusevska G.: Progesterone inhibits vascular remodeling and attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in estrogen-deficient rats. *Prilozi.* 2009; 30:25-44.
306. Tournier A., Wahl D., Chaouat A., Max J.P., Regnault V., Lecompte T., Chabot F.: Calibrated automated thrombography demonstrates hypercoagulability in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Thromb. Res.* 2010; 126:e418-22.
307. Tronov V.A., Konstantinov E.M., Petrakou E., Tsilimigaki S., Piperakis S.M.: Nicotinamide "protects" resting lymphocytes exposed to hydrogen peroxide from necrosis but not from apoptosis. *Cell Biol. Toxicol.* 2002; 18:359-67.
308. Tuder R.M., Abman S.H., Braun T., Capron F., Stevens T., Thistlethwaite P.A., Haworth S.G.: Development and pathology of pulmonary hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2009; 54:S3-9.
309. Tuder R.M., Chacon M., Alger L., Wang J., Taraseviciene-Stewart L., Kasahara Y., Cool C.D., Bishop A.E., Geraci M., Semenza G.L., Yacoub M., Polak J.M., Voelkel N.F.: Expression of angiogenesis-related molecules in plexiform lesions in severe pulmonary hypertension: evidence for a process of disordered angiogenesis. *J. Pathol.* 2001; 195:367-74.
310. Tuder R.M., Cool C.D., Geraci M.W., Wang J., Abman S.H., Wright L., Badesch D., Voelkel N.F.: Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1999; 159:1925-32.
311. Tuder R.M., Groves B., Badesch D.B., Voelkel N.F.: Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *The American Journal of Pathology* 1994; 144:275-285.
312. Tuder R.M., Voelkel N.F.: Pulmonary hypertension and inflammation. *J. Lab. Clin. Med.* 1998; 132: 16-24.
313. Tunariu N., Gibbs S.J., Win Z., Gin-Sing W., Graham A., Gishen P., Al-Nahhas A.: Ventilation-perfusion scintigraphy is more sensitive than multidetector CTPA in detecting chronic thromboembolic pulmonary disease as a treatable cause of pulmonary hypertension. *J. Nucl. Med.* 2007; 48:680-4.
314. Turanlahti M.I., Laitinen P.O., Sarna S.J., Pesonen E.: Nitric oxide, oxygen, and prostacyclin in children with pulmonary hypertension. *Heart*, 1998; 79:169-74.
315. Ungerstedt J.S., Blömbäck M., Söderström T.: Nicotinamide is a potent inhibitor of proinflammatory cytokines. *Clin. Exp. Immunol.* 2003; 131:48-52.
316. Vachiery J.L., Adir Y., Barbera J.A. et al. Pulmonary hypertension due to left heart disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2013; 62: D100–D108.
317. Vachiéry J.L., Gaine S.: Challenges in the diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. Rev.* 2012; 21:313-20.
318. van Albada M.E., Schoemaker R.G., Kemna M.S., Cromme-Dijkhuis A.H., van Veghel R., Berger R.M.: The role of increased pulmonary blood flow in pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. J.* 2005; 26:487-93.
319. van de Veerdonk M.C., Kind T., Marcus J.T., Mauritz G.J., Heymans M.W., Bogaard H.J., Boonstra A., Marques K.M., Westerhof N., Vonk-Noordegraaf A.: Progressive right ventricular dysfunction in patients with pulmonary arterial hypertension responding to therapy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2011; 58:2511-9.

320. van Empel V.P., Lee J., Williams T.J., Kaye D.M.: Iron deficiency in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Heart Lung Circ.* 2014; 23:287-92.
321. van Hinsbergh V.W.: Endothelium--role in regulation of coagulation and inflammation. *Semin Immunopathol.* 2012; 34: 93-106.
322. van Wolferen S.A., Marcus J.T., Westerhof N., Spreeuwenberg M.D., Marques K.M., Bronzwaer J.G., Henkens I.R., Gan C.T., Boonstra A., Postmus P.E., Vonk-Noordegraaf A.: Right coronary artery flow impairment in patients with pulmonary hypertension. *Eur. Heart J.* 2008; 29:120-7.
323. Virág L., Szabó C.: The therapeutic potential of poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol. Rev.* 2002; 54:375-429.
324. Voelkel N.F., Cool C., Lee S.D., Wright L., Geraci M.W., Tuder R.M.: Primary pulmonary hypertension between inflammation and cancer. *Chest* 1998; 114: 225S-230S.
325. Voelkel N.F., Gomez-Arroyo J.: The role of vascular endothelial growth factor in pulmonary arterial hypertension. The angiogenesis paradox. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2014; 51:474-84.
326. Voelkel N.F., Quaiñe R.A., Leinwand L.A., Barst R.J., McGoon M.D., Meldrum D.R., Dupuis J., Long C.S., Rubin L.J., Smart F.W., Suzuki Y.J., Gladwin M., Denholm E.M., Gail D.B.: Right ventricular function and failure. *Circulation* 2006; 114:1883-91.
327. Vonk Noordegraaf A., Galiè N.: The role of the right ventricle in pulmonary arterial hypertension. *European Respiratory Review* 2011; 20: 243-253.
328. Wagenvoort C.A., Mulder P.G.: Thrombotic lesions in primary plexogenic arteriopathy. Similar pathogenesis or complication? *Chest* 1993; 103:844-9.
329. Wan P., Moat S., Anstey A.: Pellagra: a review with emphasis on photosensitivity. *Br. J. Dermatol.* 2011;164:1188-200.
330. Wang T.J., Larson M.G., Levy D., Leip E.P., Benjamin E.J., Wilson P.W., Sutherland P., Omland T., Vasan R.S.: Impact of age and sex on plasma natriuretic peptide levels in healthy adults. *Am. J. Cardiol.* 2002; 90:254-8.
331. Wawrzyńska L., Kurzyna M., Kuca P., Fijałkowska A., Kober J., Florczyk M., Torbicki A.: Autoimmune thyroid diseases in patients with primary pulmonary hypertension. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2004; 72:19-22.
332. Weiss R., Schilling E., Grahnert A., Kölling V., Dorow J., Ceglarek U., Sack U., Hauschildt S.: Nicotinamide: a vitamin able to shift macrophage differentiation toward macrophages with restricted inflammatory features. *Innate Immun.* 2015; 21:813-26.
333. Welsh C.H., Hassell K.L., Badesch D.B., Kressin D.C., Marlar R.A.: Coagulation and fibrinolytic profiles in patients with severe pulmonary hypertension. *Chest* 1996; 110: 710-7.
334. Werchan P.M., Summer W.R., Gerdes A.M., McDonough K.H.: Right ventricular performance after monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol.* 1989; 256:H1328-36.
335. West J.D., Austin E.D., Gaskill C., Marriott S., Baskir R., Bilousova G., Jean J.C., Hemnes A.R., Menon S., Bloodworth N.C., Fessel J.P., Kropski J.A., Irwin D., Ware L.B., Wheeler L, Hong C.C., Meyrick B., Loyd J.E., Bowman A.B., Ess K.C., Klemm D.J., Young P.P., Merryman W.D., Kotton D., Majka S.M.: Identification of a common Wnt-associated genetic signature across multiple cell types in pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2014; 307:C415-30.

336. White R.J., Meoli D.F., Swarthout R.F., Kallop D.Y., Galaria I.I., Harvey J.L., Miller C.M., Blaxall B.C., Hall C.M., Pierce R.A., Cool C.D., Taubman M.B.: Plexiform-like lesions and increased tissue factor expression in a rat model of severe pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2007; 293:L583-90.
337. White, R.J.: Thrombin and platelets in pulmonary hypertension: a lot more than clot. *Advances in Pulmonary Hypertension* 2012; 11, 1: 19-24.
338. Widlitz A., Barst R.J.: Pulmonary arterial hypertension in children. *Eur. Respir. J.* 2003; 21:155-76.
339. Windmueller H.G., Spaeth A.E.: Source and fate of circulating citrulline. *Am. J. Physiol.* 1981; 241:E473-80.
340. Wolbrette D., Naccarelli G., Curtis A., Lehmann M., Kadish A.: Gender differences in arrhythmias. *Clin. Cardiol.* 2002; 25:49-56.
341. Wong Y.Y., Handoko M.L., Mouchaers K.T.B., de Man F.S., Vonk Noordegraaf A., van der Laarse W.J.: Reduced mechanical efficiency of rat papillary muscles related to degree of hypertrophy of cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2010; 298: H1190-H1197.
342. Worsley D.F., Palevsky H.I., Alavi A.: Ventilation-perfusion lung scanning in the evaluation of pulmonary hypertension. *J. Nucl. Med.* 1994; 35:793-6.
343. Wu G., Bazer F.W., Cudd T.A., Jobgen W.S., Kim S.W., Lassala A., Li P., Matis J.H., Meininger C.J., Spencer T.E.: Pharmacokinetics and safety of arginine supplementation in animals. *J. Nutr.* 2007; 137: 1673S-1680S.
344. Wu G., Meininger C.J., Knabe D.A., Bazer F.W., Rhoads J.M.: Arginine nutrition in development, health and disease. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 2000;3:59-66.
345. Wu G., Morris S.M. Jr.: Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem. J.* 1998; 336:1-17.
346. Wyss M., Kaddurah-Daouk R.: Creatine and creatinine metabolism. *Physiol. Rev.* 2000; 80:1107-213.
347. Xiao J.W., Zhu X.Y., Wang Q.G., Zhang D.Z., Cui C.S., Zhang P., Chen H.Y., Meng L.L.: Acute effects of Rho-kinase inhibitor fasudil on pulmonary arterial hypertension in patients with congenital heart defects. *Circ. J.* 2015; 79:1342-8.
348. Yang D.L., Zhang H.G., Xu Y.L., Gao Y.H., Yang X.J., Hao X.Q., Li X.H.: Resveratrol inhibits right ventricular hypertrophy induced by monocrotaline in rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2010; 37:150-5.
349. YanYun P., Wang S., Yang J., Chen B., Sun Z., Ye L., Zhu J., Wang X.: Interruption of CD40 Pathway Improves Efficacy of Transplanted Endothelial Progenitor Cells in Monocrotaline Induced Pulmonary Arterial Hypertension. *Cell Physiol. Biochem.* 2015; 36:683-96.
350. Yoon J.C., Chickering T.W., Rosen E.D., Dussault B., Qin Y., Soukas A., Friedman J.M., Holmes W.E., Spiegelman B.M.: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma target gene encoding a novel angiopoietin-related protein associated with adipose differentiation. *Mol. Cell Biol.* 2000; 20:5343-9.
351. Yu Y., Sweeney M., Zhang S., Platoshyn O., Landsberg J., Rothman A., Yuan J.X.: PDGF stimulates pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation by upregulating TRPC6 expression. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2003; 284:C316-30.
352. Yuan J.X., Aldinger A.M., Juhaszova M., Wang J., Conte J.V. Jr, Gaine S.P., Orens J.B., Rubin L.J.: Dysfunctional voltage-gated K⁺ channels in pulmonary artery smooth muscle cells of patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation* 1998; 98:1400-6.

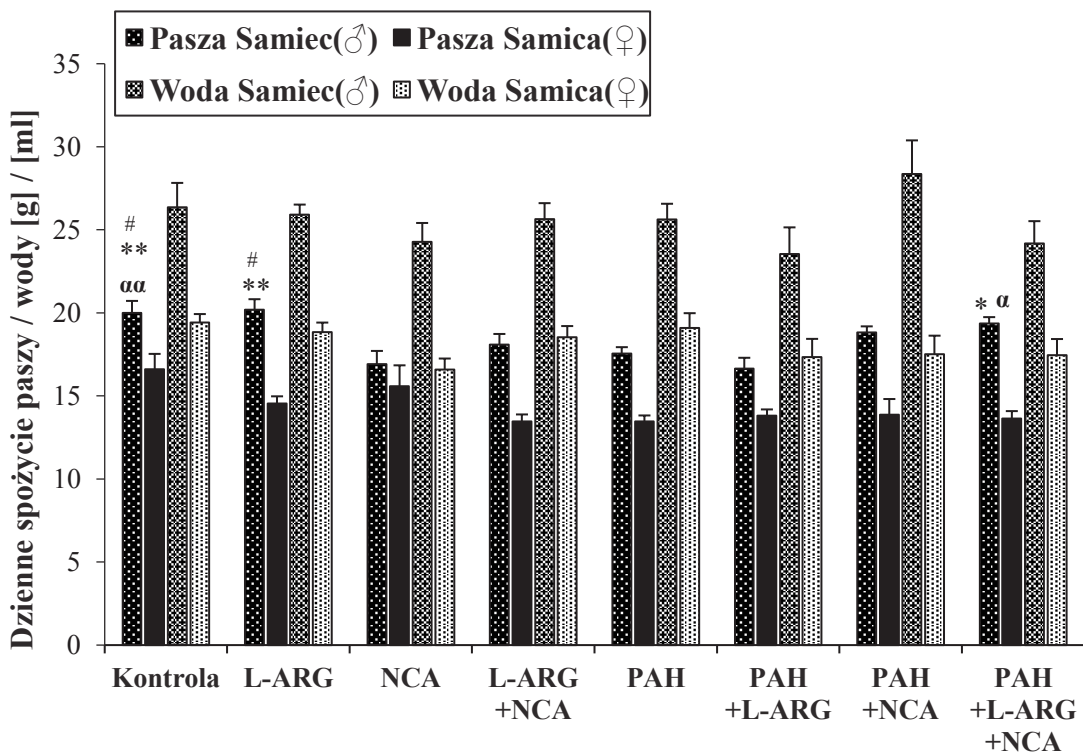
353. Yuan J.X., Rubin L.J.: Pathogenesis of pulmonary arterial hypertension: the need for multiple hits. *Circulation* 2005; 111:534 –8.
354. Yuan X.J., Wang J., Juhaszova M., Gaine S.P., Rubin L.J.: Attenuated K⁺ channel gene transcription in primary pulmonary hypertension. *Lancet*, 1998; 351:726-7.
355. Zanjani K.S.: Platelets in Pulmonary Hypertension: a Causative Role or a Simple Association? *Iranian Journal of Pediatrics* 2012; 22:145-157.
356. Zhang S., Yang T., Xu X., Wang M., Zhong L., Yang Y., Zhai Z., Xiao F., Wang C.: Oxidative stress and nitric oxide signaling related biomarkers in patients with pulmonary hypertension: a case control study. *BMC Pulm. Med.* 2015; 15: 50.
357. Zhao L.: Chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in rat: the best animal model for studying pulmonary vasoconstriction and vascular medial hypertrophy. *Drug Discov. Today Dis. Models* 2010;7:83–88.
358. Zopf D.A., das Neves L.A., Nikula K.J., Huang J., Senese P.B., Gralinski M.R.: C-122, a novel antagonist of serotonin receptor 5-HT_{2B}, prevents monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2011; 670:195-203.

10. ZAŁĄCZNIK

Wykres 1. Dzielne średnie spożycie paszy (g) i wody (ml) po stosowaniu L-argininy (L-ARG) i/lub nikotynamidu (NCA) u samców(♂) i samic(♀) szczura bez lub z indukowanym tętniczym nadciśnieniem płucnym(PAH); ANOVA+ test Newman-Keuls; wartości przedstawiono, jako średnia ± SEM.

(♂) Samiec – ** - $P < 0,01$ lub * - $P < 0,05$ vs. NCA; # - $P < 0,05$ vs. PAH; $\alpha\alpha$ – $P < 0,01$ lub α – $P < 0,05$ vs. PAH+L-ARG;

(♀) Samica – NS.

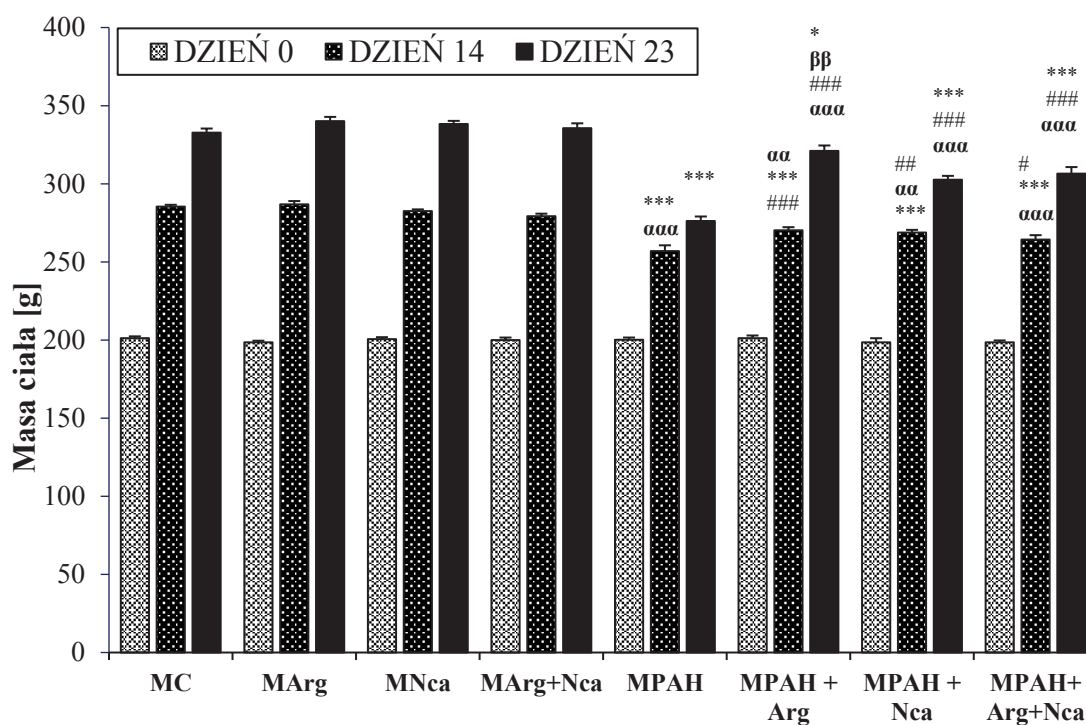


Wykres 3. Masa ciała (BW) po stosowaniu L-argininy (L-ARG) i/lub nikotynamidu (NCA) u samców (♂) szczura bez lub z indukowanym tętnicznym nadciśnieniem płucnym (PAH); ANOVA + test Newman-Keuls; wartości przedstawiono, jako średnia ± SEM.

Dzień 0 – NS;

Dzień 14 - *** - P<0,001 vs. MC, MArg lub MNca; ### - P<0,001 lub ## - P<0,01 lub # - P<0,05 vs. MPAH; aaa – P<0,001 lub aa – P<0,01 vs. MArg+Nca;

Dzień 23 - *** - P<0,001 vs. MC, MArg lub MNca; * – P<0,05 vs. MC ### - P<0,001 vs. MPAH; aaa – P<0,001 MArg+MNca; ββ – P<0,01 vs. MNca.

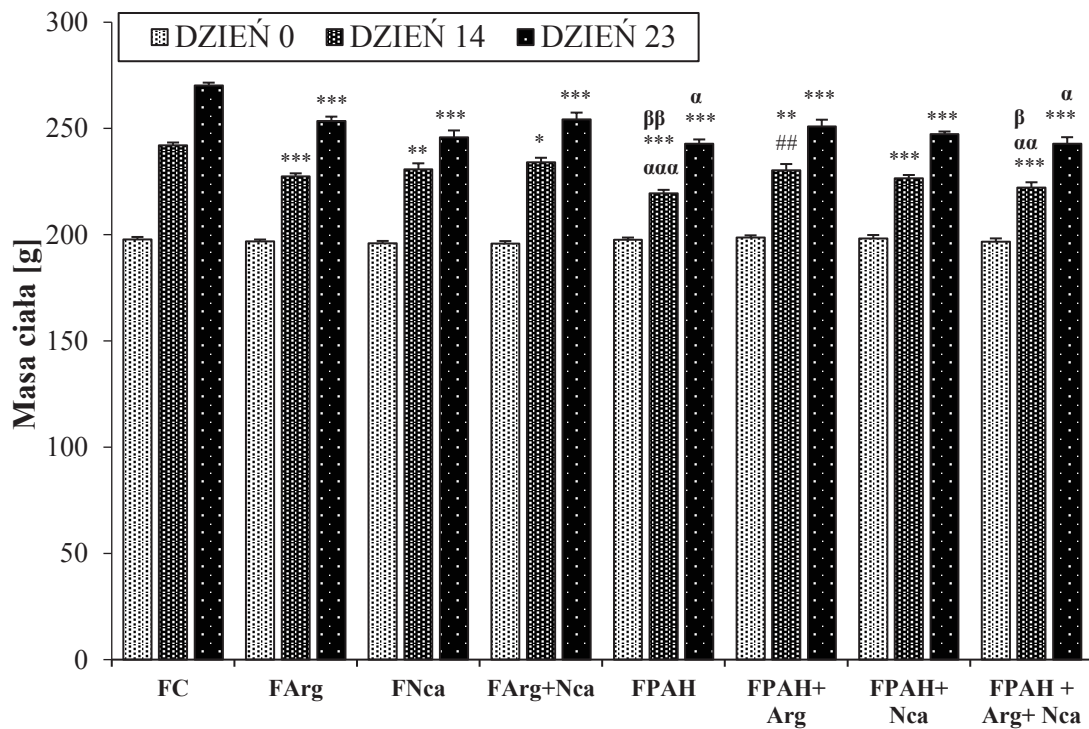


Wykres 4. Masa ciała (BW) po stosowaniu L-argininy (L-ARG) i/lub nikotynamidu (NCA) u samic (♀) szczura bez lub z indukowanym tętniczym nadciśnieniem płucnym (PAH); ANOVA + test Newman-Keuls; wartości przedstawiono, jako średnia ± SEM.

Dzień 0 – NS;

Dzień 14 - *** - $P < 0,001$ lub ** - $P < 0,01$ lub * - $P < 0,05$ vs. FC; ## - $P < 0,01$ vs. FPAH; $\beta\beta$ – $P < 0,01$ lub β – $P < 0,05$ vs. FNca; $\alpha\alpha\alpha$ – $P < 0,001$ lub $\alpha\alpha$ – $P < 0,01$ vs. FArg+Nca;

Dzień 23 - *** - $P < 0,001$ vs. FC; α – $P < 0,05$ vs. FArg+Nca.



Wykres 8. Stosunek masy lewej komory serca wraz z przedsionkiem do końcowej masy ciała (LV+S/FBW) po zastosowaniu L-argininy (L-ARG) i nikotynamidu (NCA) u samców (♂) i samic (♀) szczura bez lub z tętnicznym nadciśnieniem płucnym; ANOVA + test Newman-Keuls; wartości przedstawione, jako średnia ± SEM.

(♂) Samiec: * - $P < 0,05$ vs. Kontrola, NCA lub PAH; # - $P < 0,05$ vs. Kontrola, L-ARG+NCA lub PAH;

(♀) Samica: *** - $P < 0,001$ lub ** - $P < 0,01$ lub * - $P < 0,05$ vs. PAH; #### - $P < 0,001$ lub # - $P < 0,05$ vs. PAH+NCA.

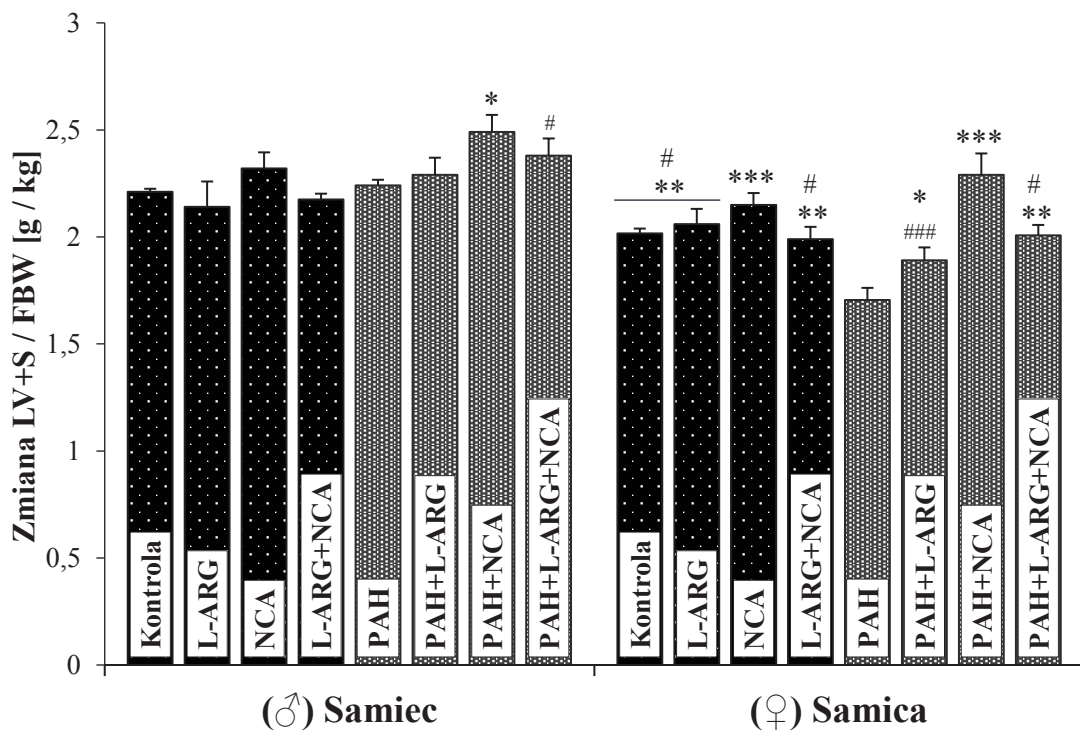


Tabela 4. Stężenie metabolitów nikotynamidu Met-Na (N-metylonikotynamid), Met-2PY (N-metylo-2-pirydono-5-karboksyamid), Met-4PY (N-metylo-4-pirydono-3-karboksyamid) oraz 4-PYR (1-β-D-rybonukleozydo-4-pirydono-3-karboksyamid) w osoczu u samców i samic szczura bez lub z indukowanym tętnicznym nadciśnieniem płucnym po zastosowaniu diety bogatej w nikotynamid (NCA); ANOVA+ test Neuman-Keules; wartości przedstawiono, jako średnia ± SEM.

(♂) Samiec – ***-P<0,001 lub ** - P<0,01 lub * - P<0,05 vs. NCA; ### - P<0,001 lub ## - P<0,01 lub # - P<0,05 vs. PAH+NCA;

(♀) Samica – ***-P<0,001 lub ** - P<0,01 lub * - P<0,05 vs. NCA; ### - P<0,001 lub ## - P<0,01 lub # - P<0,05 vs. PAH+NCA.

| μmol/L | | | | | | | | |
|-----------------|-----------------------|--------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-----------------|---------------|---------------|
| Nazwa Grupy | Met-NA | | Met-2PY | | Met-4PY | | 4-PYR | |
| | (♂) Samiec | (♀) Samica | (♂) Samiec | (♀) Samica | (♂) Samiec | (♀) Samica | (♂) Samiec | (♀) Samica |
| Kontrola | 29,13* # ±10,59 | 23,6*** ### ±4,49 | 0,26*** ### ±0,12 | 0,58** ## ±0,11 | 3,14** ## ±0,61 | 1,62* ±0,041 | 1,68 ±0,87 | 1,04 ±0,33 |
| NCA | 570,85 ±78,63 | 476,07 ±66,13 | 13,29 ±1,61 | 7,21 ±1,7 | 7,68 ±0,85 | 4,53 ±1,22 | 1,1 ±0,32 | 1,02 ±0,18 |
| PAH | 12,945* # ±0,22 | 17,64*** ### ±2,78 | 0,31*** ### ±0,14 | 0,19*** ## ±0,01 | 2,42** ## ±0,027 | 1,665 ±0,35 | 0,95 ±0,09 | 1,23 ±0,28 |
| PAH+NCA | 599,59 ±168,03 | 363,42 ±41,66 | 15,72 ±2,69 | 4,8* ±0,37 | 7,55 ±1,24 | 3,64 ±0,91 | 1,92 ±0,67 | 1,14 ±0,2 |

Tabela 5. Stosunek masy serca do końcowej masy ciała (HW/FBW), masa serca (HW) oraz masa lewej komory z przegrodą serca (LV+S) po zastosowaniu L-argininy (L-ARG) i nikotynamidu (NCA) u samców (♂) i samic (♀) szczura bez lub z tętnicznym nadciśnieniem płucnym; ANOVA + test Newman-Keuls; wartości przedstawiono, jako średnia ± SEM.

(♂) **Samiec:**

- **Wskaźnik HW/FBW** - ** - P<0,01 lub * - P<0,05 vs. Kontrola lub L-ARG+NCA; ### - P<0,001 lub # - P<0,05 vs. L-ARG; α - P<0,05 vs. NCA;
- **Wskaźnik HW** – NS;
- **Wskaźnik LV+S** - *** - P<0,001 vs. NCA; ## - P<0,01 vs. L-ARG lub L-ARG+NCA; α - P<0,05 vs. Kontrola; ββ - P<0,01 lub β - P<0,05 vs. PAH.

(♀) **Samica:**

- **Wskaźnik HW/FBW** - ** - P<0,01 vs. PAH+NCA;
- **Wskaźnik HW** - *** - P<0,001 lub ** - P<0,01 lub * - P<0,05 vs. PAH+NCA;
- **Wskaźnik LV+S** - *** - P<0,001 lub ** - P<0,01 lub * - P<0,05 vs. PAH+NCA; ### - P<0,001 lub # - P<0,05 vs. Kontrola; ααα - P<0,001 vs. L-ARG lub NCA lub L-ARG+NCA; ββ - P<0,01 vs. PAH.

| NAZWA GRUPY | HW/FBW [g / kg] | | HW [g] | | LV+S [g] | |
|-------------------|---------------------------------|------------------------|-----------------|--------------------------|----------------------------------|--|
| | (♂) Samiec | (♀) Samica | (♂) Samiec | (♀) Samica | (♂) Samiec | (♀) Samica |
| Kontrola | 2,74 ±0,02 | 2,48** ±0,03 | 0,91 ±0,0048 | 0,67* ±0,005 | 0,74 ±0,005 | 0,54 ±0,004 |
| L-ARG | 2,75 ±0,15 | 2,56** ±0,07 | 0,93 ±0,048 | 0,65* ±0,014 | 0,73 ±0,04 | 0,52* ±0,015 |
| NCA | 2,91 ±0,08 | 2,73 ±0,06 | 0,98 ±0,026 | 0,67* ±0,015 | 0,78 ±0,025 | 0,53 ±0,014 |
| L-ARG + NCA | 2,74 ±0,03 | 2,52** ±0,06 | 0,92 ±0,015 | 0,64** ±0,02 | 0,73 ±0,012 | 0,51* ±0,018 |
| PAH | 3,28### ** α ±0,05 | 2,78 ±0,11 | 0,90 ±0,006 | 0,67** ±0,026 | 0,62*** ## α ±0,004 | 0,41*** ### ααα ±0,014 |
| PAH + L-ARG | 3,05* # ±0,08 | 2,5** ±0,13 | 0,98 ±0,022 | 0,63** ±0,028 | 0,73 ββ ±0,026 | 0,47*** # ββ ±0,015 |
| PAH + NCA | 3,16 ±0,08 | 3,08 ±0,19 | 0,96 ±0,026 | 0,76 ±0,043 | 0,75 ββ ±0,026 | 0,58 ±0,02 |
| PAH + L-ARG + NCA | 3,08 ±0,11 | 2,49** ±0,07 | 0,94 ±0,026 | 0,60*** ±0,013 | 0,73 β ±0,018 | 0,49** ββ ±0,02 |

