

Lek. Katarzyna Podgórska-Gumulák

**WPLYW REGULARNEJ AKTYWNOŚCI FIZYCZNEJ
NA FUNKCJĘ ŚRÓDBŁONKA I WYBRANE
PARAMETRY AKTYWNOŚCI PŁYTEK KRWI**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

**Promotor – dr hab. n. med. Arkadiusz Derkacz
Promotor pomocniczy – dr n. med. Adrian Doroszko**

Wrocław 2014

**Wrovasc – Zintegrowane Centrum Medycyny Sercowo–Naczyniowej
Projekt współfinansowany przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu
Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka
na lata 2007-2013 POIG.01.01.02-02-001/08**

Serdeczne podziękowania składam:

- **Promotorowi dr hab. n. med. Arkadiuszowi Derkaczowi**
- **Promotorowi dr n. med. Adrianowi Doroszko**
- **Pani mgr Ewie Szahidewicz-Krupskiej**
- **Mojej rodzinie**

SPIS TREŚCI

Wykaz stosowanych skrótów	4
1.Wstęp	6
1.1.Śródbłonek	6
1.2.Płytki krwi	18
1.3.Wpływ wysiłku na funkcję śródbłonka i płytek krwi	27
2.Założenia i cel pracy	36
3.Materiał i metody	37
3.1.Badana grupa	37
3.2.Protokół badania	38
3.3.Badania biochemiczne	38
3.4.Ocena funkcji śródbłonka	44
3.5.Ocena funkcji płytek krwi	45
3.6.Analiza statystyczna	46
4.Wyniki	47
4.1.Dane demograficzne i parametry biochemiczne	47
4.2.Fenotyp funkcji śródbłonka w ujęciu biodostępności tlenu azotu	51
4.3.Markery stresu oksydacyjnego	53
4.4.Charakterystyka funkcji śródbłonka w aspekcie aktywności prozapalnej i angiogennej	57
4.5.Charakterystyka wybranych parametrów czynności płytek krwi	63
5.Omówienie wyników i dyskusja	66
6.Wnioski	74
7.Streszczenie	75
8.Summary (streszczenie w języku angielskim)	77
9.Piśmiennictwo	79

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- ACAT – acetylotransferaza acetylocholinowa
- ADMA – asymetryczna dimetyloarginina (ang. asymmetric dimethylarginine)
- ASA – kwas acetylosalicylowy (ang. Acetylsalicylic acid)
- COX – cyklooksyzgenaza (ang. cyclooxygenase)
- DBP – rozkurczowe ciśnienie tętnicze (ang. diastolic blood pressure)
- DDAH – dimetyloaminohydroksylaza dimetyloargininy (ang. dimethylarginine dimethylaminohydrolase)
- EDCF – śródbłonkowy czynnik powodujący skurcz naczyń (ang. endothelium-derived contracting factors)
- EDHF – śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzujący (ang. endothelium derived hyperpolarising factor)
- EDRF – śródbłonkowy czynnik rozszerzający naczyń (ang. endothelium-derived relaxing factor)
- EPC – komórki progenitorowe śródbłonka (ang. endothelial progenitor cells)
- ET – endotelina
- FMD – dylatacja zależna od przepływu (ang. flow mediated dilatation)
- GFR – wielkość filtracji kłębuszkowej (ang. glomerular filtration rate)
- GLUT 4 – transporter glukozy izoforma 4 (ang. glucose transporter isoform 4)
- hs CRP białko C-reaktywne o wysokiej czułości (ang. c-reactive protein)
- IL-1B – interleukina 1B
- LPS – lipo polisacharyd
- MAP – średnie ciśnienie tętnicze (ang. mean arterial pressure)
- MDA – dialdehyd malonowy (ang. malondialdehyde)
- NADP – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy
- NF-kB – czynnik jądrowy kappa aktywowanych komórek B (ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
- NO – tlenek azotu (ang. nitric oxide)
- NOS – syntaza tlenku azotu (ang. nitric oxide synthase)
- PAI-1 – inhibitor aktywacji plazminogenu (ang. plasminogen activator inhibitor-1)
- PAR – receptor aktywowany białkiem (ang. protease-activated receptor)
- PAT – obwodowa tonometria tętnicza (ang. peripheral arterial tonometry)
- PGH₂, PGE₂ – prostaglandyna H₂, prostaglandyna E₂
- PGI₂ – prostacyklina

PP – ciśnienie tętna (ang. pulse pressure)

PWV C-D – szybkość propagacji fali tętna między tętnicami szyjną i grzbietową stopy (ang. pulse wave velocity)

PWV C-F – szybkość propagacji fali tętna między tętnicami szyjną i udową (ang. pulse wave velocity)

PWV C-R – szybkość propagacji fali tętna między tętnicami szyjną i promieniową (ang. pulse wave velocity)

RAAS – układ renina-angiotensyna-aldosteron (ang. renin-angiotensin-aldosterone system)

RONs – reaktywne cząsteczki tlenu i azotu (ang. reactive oxygen and nitrogen species)

SBP – skurczowe ciśnienie tętnicze (ang. systolic blood pressure)

SDMA – symetryczna dimetyloarginina (ang. symmetric dimethylarginine)

TNF α – czynnik martwicy guza (ang. tumor necrosis factor)

TXA – tromboksan

VASP – fosfoproteina stymulująca wazodylatację (ang. vasodilator-stimulated phosphoprotein)

VCAM-1 – cząsteczka adhezyjna komórek naczynia (ang. vascular cell adhesion molecule 1)

VEGF – czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. vascular endothelial growth Factor)

vWF – czynnik von Willebranda (von Willebrand factor)

WHR – wskaźnik talia-biodra (ang. waist-hip ratio)

1. WSTĘP

1.1. ŚRÓDBŁONEK

Śródbłonek naczyniowy stanowi cienką pojedynczą warstwę komórek tapetujących światło naczyń krwionośnych. Poza funkcją barierową cechuje się on bardzo wysoką aktywnością metaboliczną, co w połączeniu z jego krytyczną lokalizacją pomiędzy płynącą krwią a pozostałymi elementami ściany naczynia determinuje niezwykle ważną rolę w utrzymywaniu homeostazy układu sercowo–naczyniowego. Z tego powodu, wszelkie procesy patologiczne obejmujące właśnie te komórki mogą w sposób znaczący przyczyniać się do szybkiego rozwoju chorób układu sercowo–naczyniowego, zaś celowane w nie interwencje terapeutyczne mogą mieć istotne znaczenie kliniczne.

1.1.1. Funkcja śródbłonka

Regulacja wazokonstrykcji i wazodylatacji

Komórki śródbłonka odgrywają podstawową rolę w utrzymywaniu prawidłowej struktury ściany naczynia poprzez produkcję mediatorów odpowiedzialnych za wazodylatację (czynnik rozkurczowy pochodzenia śródbłonkowego; ang. endothelium-derived relaxing factor – EDRF) oraz wazokonstrykcję (czynnik skurczowy pochodzenia śródbłonkowego; ang. endothelium-derived contracting factors – EDCF). Za najważniejsze wazodylatatory uznano tlenek azotu (NO) i EDHF (czynnik hiperpolaryzujący pochodzenia śródbłonkowego; ang. endothelium derived hyperpolarising factor). Do grupy wazokonstryktorów zaliczamy m.in. endotelinę, prostanoidy i tromboksan^{1,2}.

Poza substancjami produkowanymi przez komórki śródbłonka, znanych jest wiele mediatorów o działaniu parakrynnym, zarówno modulujących jego aktywność naczynioskurczową jak i naczyniorozkurczową.

Wazodylatacja

a) EDHF

Termin EDHF powstał celem określenia odrębnego od tlenku azotu i prostacykliny czynnika powodującego hiperpolaryzację miocytów.

Opisuje się obecnie dwa sposoby odpowiedzi na EDHF. W pierwszym EDHF

wpływa na relaksację komórek mięśni gładkich naczyń poprzez ich hiperpolaryzację. Drugi sposób działania obserwowany jest w mniejszych naczyniach, gdzie EDHF nie wymaga hiperpolaryzacji komórek śródbłonka. EDHF działa w połączeniu z NO, nadtlenkiem wodoru (H_2O_2) i peptydami wazoaktywnymi oraz prostacykliną i kwasami epoksyeikozatrienowymi. EDHF otwiera kanały potasowo zależne, hiperpolaryzacja powoduje zamknięcie kanałów wapniowo zależnych, a w konsekwencji rozszerzenie naczyń krwionośnych^{3,4}.

b) Tlenek azotu – szlak metaboliczny

Jedną z najistotniejszych cząsteczek o właściwościach rozszerzających naczynie jest tlenek azotu. Powstaje on w reakcji przekształcenia L-argininy do NO i L-cytruliny przy udziale śródbłonkowej syntazy tlenu azotu⁵. Wyniki wielu badań klinicznych potwierdziły istotny wpływ zmian metabolizmu tlenu azotu na prawidłową funkcję układu sercowo-naczyniowego i rozwój miażdżycy. Źródłem zaburzeń może być niedostateczna produkcja tlenu azotu, co udowodniono na przykładzie pacjentów z przewlekłą chorobą nerek, w badaniach przeprowadzonych przez Wevera i wsp. oraz pacjentów z cukrzycą typu II w analizie Schaeffera i wsp.^{6,7}. Także stres oksydacyjny, nasilając degradację NO, prowadzi do jego niedoboru skutkując nasilaniem dysfunkcji śródbłonka. Udowodniono możliwość odwrócenia powyższego procesu poprzez zastosowanie antyoksydantów, jednakże praktyczne znaczenie takiej interwencji terapeutycznej wciąż pozostaje przedmiotem dyskusji⁸.

Z produkcją tlenu azotu związany jest endogeny inhibitor syntazy NO – asymetryczna dimetyloarginina (ADMA). Jest to kompetycyjny inhibitor syntazy tlenu azotu (NOS)⁹. ADMA jest metabolizowana przez degradację do cytruliny i dimetylaminy przy udziale enzymu DDAH. Jego zmniejszona aktywność, skutkująca zmniejszeniem metabolizowania ADMA, może wobec tego być związana z patogenezą dysfunkcji śródbłonka w stanach chorobowych. SDMA nie wykazuje właściwości inhibitora kompetycyjnego dla NOS, natomiast jest ona uznawana za wczesny marker dysfunkcji nerek. Podwyższone stężenie samej ADMA można obserwować w hipercholesterolemii, miażdżycy, nadciśnieniu, przewlekłej chorobie nerek czy niewydolności serca^{10,11,12}.

c) Pozostałe mediatory o działaniu rozszerzającym naczynia

Prostacyklina (PGI₂) syntetyzowana z kwasu arachidonowego przez syntazę (PGIS), uwalniana przez komórki śródbłonka i mięśni gładkich jest jednym z najważniejszych prostanoidów. Regulacja uwalniania odbywa się m.in. przez bradykininę i

nukleotydy adenylowe. Jej rolą, obok oddziaływania na napięcie ściany naczyń, jest wpływ antyagregacyjny, zahamowanie adhezji leukocytów i nadmiernej proliferacji mięśni gładkich ściany naczynia ¹³.

Kolejną cząsteczką odpowiedzialną za rozszerzenie naczynia jest **acetylocholina**, powstająca przy udziale acetylotransferazy cholinowej (ACAT) z choliny i uwalniana z zakończeń nerwów cholinergicznym oraz prawdopodobnie z komórek śródbłonka. Obecnie znane są trzy mechanizmy rozszerzającego działania acetylocholino: zahamowanie uwalniania adrenaliny z zakończeń nerwów współczulnych, uwalnianie NO z komórek śródbłonka oraz stymulacja produkcji prostacykliny ^{14,15,16}.

Bradykinina jest peptydowym hormonem tkankowym powstającym z wielkocząsteczkowego kinonigenu występującego w osoczu w wyniku kolejnych reakcji pod wpływem kalikreiny tkankowej i enzymu konwertującego w aktywną bradykininę. W wyniku pobudzenia przez bradykininę jej receptora B₂ następuje biosynteza i uwalnianie EDHF, NO i PGI₂ oraz VASP – fosfoproteiny stymulującej wazodylatację (ang. vasodilator-stimulated phosphoprotein) ¹⁷. Poza relaksacją komórek mięśni gładkich naczyń pełni także istotną rolę w hamowaniu czynności płytek, zwiększaniu przepuszczalności naczyń z aktywacją plazminogenu i tworzeniem trombomoduliny ¹⁸. Degradowana jest głównie w krążeniu płucnym przez konwertazę angiotensyny, co ma implikacje kliniczne w subpopulacji osób ze zwiększoną aktywnością kalikreiny, leczonych lekami z grupy inhibitorów konwertazy angiotensyny, gdzie nadmiar bradykininy jest mechanizmem generującym napady suchego kaszlu i nadreaktywności oskrzeli jako efektów ubocznych terapii.

d) Insulina

Związek insuliny z komórkami śródbłonka zachodzi na drodze dwóch mechanizmów: sama cząsteczka insuliny oddziałuje na komórki śródbłonka i bierze udział w reakcji rozszerzenia naczynia. Z drugiej zaś strony komórki śródbłonka odgrywają ważną rolę w transporcie insuliny do tkanki docelowej. Rozszerzenie naczynia zależne od insuliny ściśle związane jest z poborem glukozy, który to mechanizm ulega blokadzie przy zahamowaniu syntazy tlenku azotu (eNOS). U osób otyłych lub z rozpoznaniem cukrzycy typu II potwierdzono występowanie tej blokady. W metabolizmie glukozy efekt działania insuliny jest związany z poprawą całkowitego przepływu krwi oraz wzrostem perfuzji tkanek. Powoduje też zwiększenie powierzchni śródbłonka odpowiedzialnej za transport insuliny zwiększając wtórnie jej stężenie między innymi w mięśniach ^{19,20,21}. Insulinooporność wydaje się być jedną ze składowych wazodylatacyjnej dysfunkcji

śródbłonka. Brak aktywności fizycznej w znacznym stopniu przyczynia się do jej rozwoju. W wyniku oporności na działanie insuliny upośledzony zostaje dokomórkowy transport glukozy wskutek zmniejszenia ekspresji jej transporterów. Ponadto ulega zmniejszeniu biosynteza NO oraz nasila się nieenzymatyczna glikacja białek. Zmiany te indukują proces zapalny, podobny pod względem profilu immunologicznego do kaskady zdarzeń inicjujących proces miażdżycowy.

Poza wymienionym działaniem insuliny na komórki śródbłonka poprzez regulację przepływu krwi czy rekrutację kapilarną udowodniono na modelu zwierzęcym, że brak działania receptorów insulinowych na komórkach śródbłonka skutkuje znacznym przyspieszeniem rozwoju miażdżycy. Nie towarzyszy temu zmiana wrażliwości na insulinę, tolerancji glukozy, wartości ciśnienia tętniczego czy lipidogramu, co udowadnia występowanie zmian jedynie w odpowiedzi na brak receptora, niezależnie od zmian systemowych. Proces ten poprzedzony jest natomiast wzrostem rolowania i adhezji leukocytów do śródbłonka oraz wzrostem ekspresji VCAM-1 – cząsteczki adhezyjnej komórek naczynia. Pomimo zmniejszenia wazodylatacji zależnej od tlenu azotu nie zaobserwowano blokowania przez syntazę NO regulacji w dół VCAM-1 zależnej od insuliny. W tym modelu potwierdza to mechanizm zależny nie od tlenu azotu, ale od insuliny^{22,23}.

Wazokonstrykcja

W komórkach śródbłonka powstają także substancje powodujące skurcz naczyń: EDCF, prostanoidy (tromboksan A2 i prostaglandyna H2), wolne rodniki, endotelina, angiotensyna II (poprzez tkankowe układy konwertazy i szlak chymazowy)²⁴.

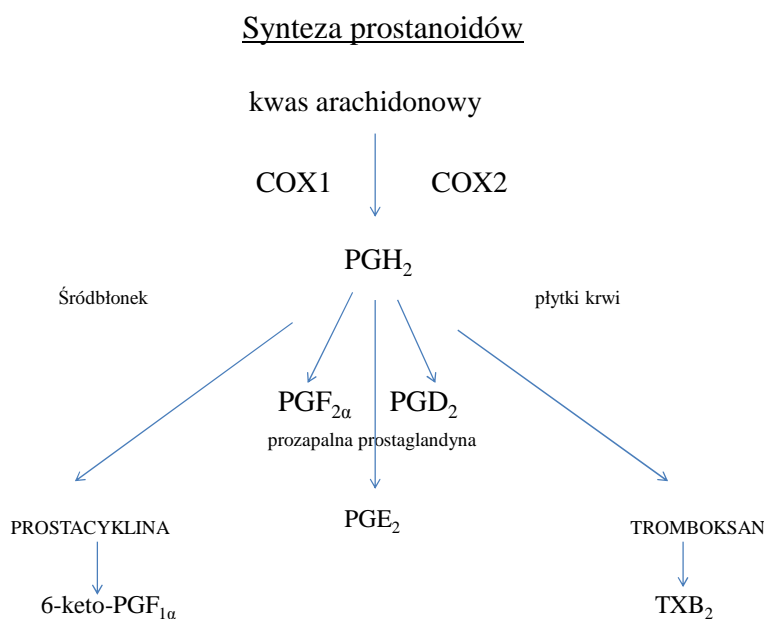
a) Endotelina

Endotelina (ET) jest peptydem uwalnianym przez komórki śródbłonka, w których jest on przekształcany przy udziale enzymu konwertującego (ECE) z nieaktywnej biologicznie cząsteczki²⁵. Powstaje zarówno w warunkach fizjologii, jak i w stanach patologicznych. Wśród izopeptydów endoteliny wyróżniono dotychczas ET-1, ET-2 i ET-3, z których za najsilniejszy w aspekcie wazokonstrykcji uznaje się ET-1. Ma on także właściwości inotropowe i mitogenne, aktywuje układ współczulny oraz układ renina-angiotensyna-aldosteron²⁶. Izoforma ta łączy się z dwoma podtypami receptorów komórek mięśni gładkich odpowiedzialnych za skurcz: ETa i ETb, z których ostatni można znaleźć także na komórkach śródbłonka, gdzie pobudza produkcję substancji odpowiedzialnych za

wazodylatację, takich jak NO (poprzez pętlę ujemnego sprzężenia zwrotnego). W warunkach patologicznych, jak nadciśnienie tętnicze, wazokonstrykcyjna aktywność ET-1 różni się od tej fizjologicznej w zakresie mediatorów. Prawdopodobnym jest, że część z nich stanowią prostanoidy powstałe poprzez aktywność cyklooksygenazy z kwasu arachidonowego ²⁷.

b) Prostanoidy

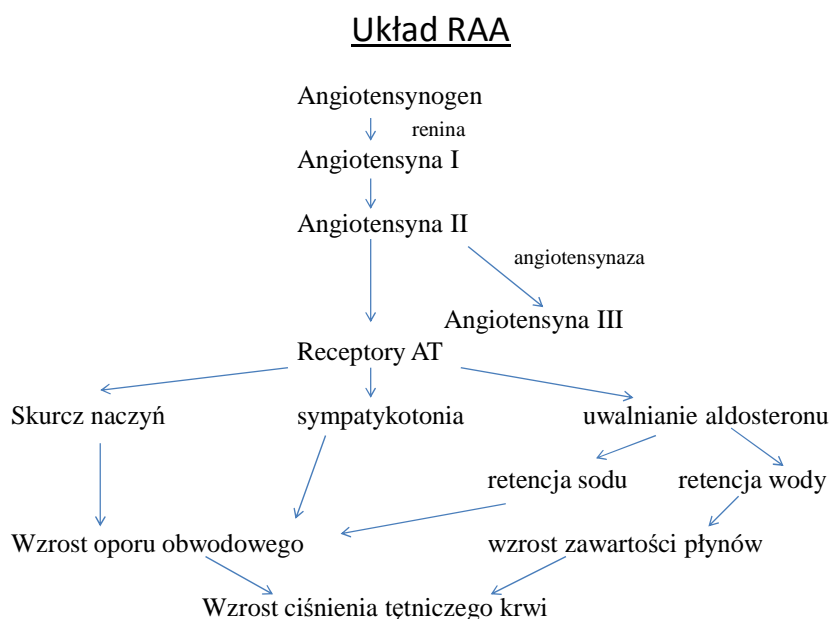
Równie istotną rolę w wazokonstrykcji pełni układ cyklooksygenazy i niektóre prostanoidy. Produkty szlaku metabolicznego prostanoidów wpływają na napięcie ściany naczyń, aktywność prozapalną i agregacyjną naczyń, a także wydzielanie jonów sodu w nerkach. Odgrywają istotną rolę zarówno w stanach patologii jak i w fizjologii. Wśród czynników naczynioskurczowych komórek śródbłonna (EDCF), obok prostaglandyny (PGH_2) i tromboksanu (TXA_2), istotnym prostanoidem jest syntetyzowana wyłącznie w komórkach mięśni gładkich prostaglandyna PGE_2 ²⁸. Proces syntezy prostanoidów rozpoczyna przekształcenie kwasu arachidonowego do PGH_2 przy pomocy syntazy PGH_2 (cyklooksygenazy). COX (cyklooksygenaza) tworzy dwie izoformy COX-1 i COX-2, którą aktywizują czynniki zapalne i mitogenne ²⁹. Heparyna i ECGF zmniejsza ekspresję COX, TNF-alfa (czynnik martwicy guza; ang. tumor necrosis factor), natomiast LPS (lipopolisacharyd) i IL-1 β (interleukina 1 β) są czynnikami ją zwiększającymi ^{30,31}. PGH_2 przekształcana jest następnie do PGI lub, jedynie w komórkach mięśni gładkich, izomeryzowana do PGE_2 ³². PGH_2 działa przeciwnie do prostacykliny ³³.



Rycina 1. Synteza prostanoidów

c) Układ RAA

Układ złożony z reniny, angiotensyny i aldosteronu jest hormonalno–enzymatycznym układem regulującym objętość krwi krążącej oraz stężenia jonów sodu i potasu³⁴. Jak wynika z wielu badań aldosteron pełni ważną funkcję w rozwoju dysfunkcji śródbłonka i procesów zapalnych^{35,36}. Potwierdzono jego pozanerkowe działanie, w tym na układ sercowo–naczyniowy³⁷, które niezależne jest od ciśnienia tętniczego. Zablokowanie receptora aldosteronu nawet bez zmiany wartości ciśnienia zachowuje działanie protekcyjne na ten układ^{38,39}.



Rycina 2. Układ renina-angiotensyna-aldosteron

Rozwój dysfunkcji śródbłonka, jak pokazują wyniki badań, możliwy jest niezależnie od wartości ciśnienia tętniczego, hamują go natomiast blokada receptora aldosteronu, jak również zahamowanie aktywności COX^{40,41,42}. W świetle dowodów na związek tromboksanu z dysfunkcją śródbłonka indukowaną aldosteronem wydawać by się mogło, że TXA₂ jest głównym mediatorem rozwoju tej nieprawidłowości. Jednakże fakt braku hamowania dysfunkcji przez inhibitory syntezy tromboksanu (m. in dazoksiben) sugeruje, że inne prostanoidy działając na receptor TX pełnią istotną rolę w patogenezie upośledzonej funkcji śródbłonka^{43,44,45}.

Działanie mineralokortykoidów na komórki śródbłonka różni się w zależności od czasu jego trwania. W przypadku krótkotrwałej ekspozycji następuje rozkurcz naczyń, podczas gdy rozwój procesów zapalnych w przypadku długotrwałego działania nasila skurcz

naczyń⁴⁶. W warunkach fizjologii między wymienionymi mechanizmami obserwujemy stan równowagi, który ulega zaburzeniu w procesach patologicznych.

1.1.2. Krzepnięcie i fibrynoliza

Nie mniej istotną rolą komórek śródbłonka jest utrzymywanie równowagi między procesami krzepnięcia i fibrynolizy oraz aktywacją i zahamowaniem czynności płytek krwi. Brak adhezji monocytów i płytek do ścian naczyń krwionośnych oraz utrzymywanie stanu rozkurczu komórek mięśni gładkich jest zasługą tych właściwości komórek endotelium⁴⁷.

W stanie fizjologii metabolity śródbłonkowe, jak prostacyklina i NO wspomagają dezaktywację płytek. Związane z proteoglikanami błony komórek śródbłonka antytrombina i TFPI (inhibitor zależnej od czynnika tkankowego drogi krzepnięcia; ang. tissue factor pathway inhibitor) uniemożliwiają aktywację czynników prozakrzepowych (poprzez blokadę kompleksów enzymatycznych tenazy i protrombinazy). Trombina związana z trombomoduliną aktywuje białko C, które łącznie z białkiem S połączonym z endotelium unieczynnia czynniki Va i VIII. Zaburzenia tego szlaku przeciwzakrzepowego spowodowane endotoksynami (LPS), cytokinami (IL-1, TNF-alfa) a także czynnikami ryzyka miażdżycy (lipoproteiny), skutkują zakrzepicą i następczym rozwojem miażdżycy⁴⁸. Struktury podśródbłonkowe natychmiast aktywują procesy koagulacji, tak więc utrzymanie spójności komórek śródbłonka jest niezbędne do utrzymania prawidłowego przepływu krwi i ograniczenia koagulacji do niezbędnej w utrzymaniu ciągłości tkanek. Zachwianie równowagi, z powodu zaburzeń genetycznych czy nabytych, może skutkować krwawieniami lub incydentami zakrzepowo–zatorowymi^{49,50}.

1.1.3. Modulacja odpowiedzi zapalnej

Zmiany funkcji śródbłonka prowadzące do torowania ich aktywności prozapalnej nazywane są "aktywacją śródbłonka". Składają się na nie: wzrost interakcji między komórkami endotelium a leukocytami, nasilenie ekspresji komórkowych cząsteczek adhezyjnych oraz zmiany w wydzielaniu auto- i parakrynnym. Wiele dowodów wskazuje, że ważną rolę w zapalnych zmianach komórek śródbłonka w wielu stanach patologii odgrywa aktywacja kompleksu białkowego działającego jako czynnik transkrypcyjny: NF-kB (czynnik jądrowy kappa aktywowanych komórek B; ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)^{51,52}. Zdolność aktywacji szlaku NF-kB prawdopodobnie jest odpowiedzialna za wzrost ekspresji cząsteczek adhezyjnych i indukowalnej izoformy syntazy NO, może także powodować transkrypcję wielu genów, których produkty uczestniczą w zapaleniu naczyń (cytokiny, chemokiny)⁵³.

Czynniki ryzyka sercowo–naczyniowego powodują aktywację komórek śródbłonka. Prowadzi to ostatecznie do utrwalenia zaburzonego wzorca ekspresji fenotypu śródbłonka, co określane jest mianem jego dysfunkcji. Odległym tego skutkiem jest przyspieszenie procesu miażdżycowego, pogrubienie kompleksu błony środkowej naczynia i tworzenie blaszki miażdżycowej⁵⁴. Proces rozwoju miażdżycy zachodzi w wyniku interakcji limfocytów, płytek i monocytów z komórkami śródbłonka i mięśni gładkich. Migracja komórek zapalnych z krążenia przez warstwę śródbłonka do przestrzeni podśródbłonkowej stanowi pierwszą fazę miażdżycy^{55,56}.

1.1.4. Dysfunkcja śródbłonka jako patologia towarzysząca chorobom układu sercowo–naczyniowego

Upośledzenie naczyniorozkurczowej funkcji komórek śródbłonka, które można zaobserwować w większości chorób naczyniowych, wynika ze zmniejszenia produkcji mediatorów wazodylatacyjnych (prostacyklina, tlenek azotu, peptyd C natiuretyczny) lub zmniejszonej wrażliwości komórek mięśni gładkich na tlenek azotu, prostacykliny czy EDHF, przy wzroście stężenia substancji odpowiedzialnych za skurcz naczyń i procesy zapalne, jak izoprostanoidy, endotelina I, angiotensyna II. Rozwój miażdżycy i niedokrwienia zależny jest w dużej mierze od zachwiania tej równowagi oraz zmniejszenia perfuzji narządowej^{24,57}.

a) nadciśnienie tętnicze

Zmniejszenie wydzielania tlenu azotu i pozostałych wazodylatorów będąc przyczyną obniżenia relaksacji naczynia łączy się z większością przypadków nadciśnienia tętniczego. W badaniach przeprowadzonych przez Rizzoni i wsp. oceniano funkcję śródbłonka na podstawie reakcji wazodylatacyjnej na podaną acetylocholinę, gdyż stymulacja receptora muskarynowego powoduje uwalnianie EDRF, a dokładnie tlenu azotu, co powinno skutkować rozszerzeniem naczynia. Uszkodzenie funkcji komórek śródbłonka, określane przez brak prawidłowej odpowiedzi wazodylatacyjnej drobnych tętniczek na podaną acetylocholinę obserwowano zarówno w nadciśnieniu o etiologii pierwotnej, jak i wtórnej, a także wśród pacjentów predysponowanych do rozwoju nadciśnienia tętniczego^{58,59}. Na obecnym etapie badań nie określono czy dysfunkcja śródbłonka jest pierwotnym zaburzeniem czy konsekwencją podwyższonych wartości ciśnienia tętniczego. Wyniki innych badań jednoznacznie wskazują na fakt pogorszenia rokowania przez zwiększone ryzyko wystąpienia incydentów sercowo–naczyniowych u chorych z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym z towarzyszącą dysfunkcją śródbłonka⁶⁰.

W pierwotnej chorobie nadciśnieniowej wazokonstrykcja związana jest ze wzrostem wydzielania prostanoidów (endoperoksydazy i tromboksanu A₂). Prostanoidy te mogą jednakże być produkowane w komórkach gładkich mięśni naczyń, a nie w komórkach śródbłonna. Ta dysfunkcja śródbłonna jest w tym przypadku konsekwencją wysokiego ciśnienia tętniczego, nie łączy się z jego etiologią, jednakże w późniejszych stadiach choroby ułatwia utrzymanie zwiększonego oporu obwodowego i prowadzi do dalszych komplikacji^{61,62,63}.

b) cukrzyca

Zarówno modele zwierzęce, jak i ludzkie cukrzycy typu I i II są dalszym przykładem upośledzonej funkcji wazodylatacyjnej śródbłonna. Dowiedziono tu współlistnienia wielu modeli uszkodzenia śródbłonna: zmniejszenie wydzielania EDRF, nasilony ich rozkład lub obniżona wrażliwość mięśni gładkich ściany naczyń na czynniki dylatacyjne, wzrost stężenia mediatorów wazokonstrykcyjnych, a także upośledzona biodostępność substratów^{64,65}. Zmiany zapalne jak produkcja cytokin, cząsteczek adhezyjnych czy reaktywnych form tlenu powstających w cukrzycy, a szczególnie cukrzycy z towarzyszącą otyłością i hiperglikemią powodują uszkodzenie komórek śródbłonna. Działanie insuliny pozwala częściowo modyfikować ten efekt bezpośrednio zmniejszając stężenie glukozy we krwi lub pośrednio poprzez wpływ na produkcję cząsteczek adhezyjnych w komórkach śródbłonna. Oporność na działanie insuliny zaburza ten proces⁶⁶. Dysfunkcja śródbłonna poprzedza wystąpienie cukrzycy typu II i występuje już w stanie oporności na insulinę⁶⁷. Pojawia się w związku ze zmniejszeniem uwalniania adiponektyny z tkanki tłuszczowej, wzrostem cytokin prozapalnych i krążących wolnych kwasów tłuszczowych oraz hiperglikemii poposiłkowej, co zmienia szlaki sygnałowe i ekspresję genów komórek endotelium, a także uwalnianie czynników śródbłonkowych. W wyniku stałej hiperglikemii w cukrzycy obserwowany jest także stały wzrost metabolitów glukozy w komórkach endotelium. W zaawansowanych stadiach choroby zmiany funkcji śródbłonna pojawiają się także w cukrzycy typu I. Hiperglikemia przyspiesza także sztywnienie tętniczek poprzez wzrost tworzenia uszkodzających strukturę ściany naczyń końcowych produktów glikacji oraz aktywację szlaku polioliowego. Dyslipidemia u diabetyków charakteryzuje się zwiększoną ilością triglicerydów i małych gęstych LDL z towarzyszącym obniżeniem stężenia HDL, co dodatkowo powoduje zwiększony stres oksydacyjny i bezpośrednio może blokować aktywność syntazy NO⁶⁵. Podstawowym mechanizmem metabolicznego działania insuliny na tkanki jest jej wpływ na komórki śródbłonna, poprzez zwiększenie dostępu insuliny do tkanek insulinowrażliwych. W zmniejszonej wrażliwości na insulinę, otyłości

lub cukrzycy dysfunkcja endotelium powoduje zmniejszoną dostępność insuliny do tkanek. Wobec powyższego śródbłonek wydaje się być dobrym celem terapeutycznym zarówno w zaburzeniach metabolizmu węglowodanów jak i powikłań naczyniowych cukrzycy ⁶⁸.

Regularna aktywność fizyczna modyfikuje tolerancję glukozy i funkcję insuliny zarówno w stwierdzonych zaburzeniach metabolizmu węglowodanów czy otyłości jak i u osób zdrowych. Podstawą tego mechanizmu jest wzrost ekspresji i aktywności białek sygnałowych i enzymów metabolizmu glukozy i tłuszczu w mięśniach szkieletowych. Skutkiem regularnego treningu jest istotny wzrost wytwarzania w mitochondriach izoformy 4 transportera glukozy (GLUT4), który jest kluczowym enzymem wspomnianej reakcji ⁶⁹.

1.1.5. Modyfikacje funkcji śródbłonka

Poprawa funkcji wazodylatacyjnej śródbłonka możliwa jest poprzez zwiększenie stężenia NO, a więc nasilenie jego produkcji przez zwiększenie dostępności substratu – L-argininy lub poprzez zmniejszenie nasilenia jego degradacji. Badania Chu i wsp. opierały się na fakcie istotnego zmniejszenia produkcji tlenu azotu w wyniku niedokrwienia. Udowodniono, że suplementacja L-argininy poprawia zależną od śródbłonka relaksację naczyń płucnych ⁷⁰. Zwiększona podaż L-argininy może skutkować odwróceniem zaburzeń relaksacji naczyń także u chorych z cukrzycą. Dietetyczna suplementacja poprawiła odpowiedź wazodylatacyjną na acetylocholinę bez zmian pod wpływem zastosowania nitrogliceryny oraz wpłynęła pozytywnie na defekt produkcji stymulowanego acetylocholiną cGMP. Dane te, uzyskane w badaniach Piepera i wsp. potwierdzają zmniejszenie u diabetyków podaży substratu do śródbłonkowej syntezy NO oraz poprawę wyników po dietetycznej suplementacji L-argininy ⁷¹. Także w przypadku zaburzeń gospodarki lipidowej podaż L-argininy istotnie poprawia zależną od komórek śródbłonka wazodylatację, co ma pozytywny wpływ na rozwój procesów miażdżycowych ⁷². Inne badania dotyczyły możliwości zastosowania L-argininy pacjentów z chorobą drobnych naczyń. Po dowieńcowym podaniu dowiedziono poprawy dylatacji drobnych naczyń wieńcowych ⁷³. Efekt wzrostu przepływu krwi po l-argininie wykorzystano także w badaniach pacjentów z niewydolnością serca, u których obserwuje się zmniejszony przepływ obwodowy w spoczynku, podczas wysiłku, a także w odpowiedzi na czynniki wazodylatacyjne zależne od śródbłonka. W porównaniu z placebo zastosowanie L-argininy w tych przypadkach pozwoliło na zwiększenie przepływu obwodowego ⁷⁴. Badano także wpływ suplementacji L-argininy u osób zdrowych. Możliwa dylatacja naczyń np. w czasie wysiłku fizycznego mogłaby zwiększyć wydolność wysiłkową. Część wyników badań oceniających efekt zastosowania L-argininy u osób zdrowych przed wysiłkiem fizycznym potwierdza ten fakt

niezależnie od rodzaju wysiłku fizycznego. Jednakże ilość przeprowadzonych badań jest w chwili obecnej niewystarczająca, aby można było rekomendować stosowanie L-argininy jako suplementu diety⁷⁵.

Modyfikacja funkcji śródbłonna u osób ze stwierdzoną jej dysfunkcją wiąże się z istotnym zmniejszeniem ryzyka sercowo–naczyniowego. Wiele badań klinicznych koncentruje się wobec tego na badaniach leków mogących poprawiać tę funkcję.

Dostępne wyniki badań dotyczące zależności stosowania estrogenów i funkcji śródbłonna są niespójne. Pozytywny efekt potwierdzono w badaniu kobiet po okresie menopauzy stosujących hormonalną terapię zastępczą, jednakże na podstawie innych doniesień prawdopodobna jest poprawa funkcji śródbłonna przy jednoczesnym utrzymaniu stosunku L-argininy/ADMA^{76,77}. U pacjentek z rozpoznaniem zespołu policystycznych jajników badano wpływ stosowania terapii etynyloestradiol/+cyproteron oraz metforminy na funkcję śródbłonna. Po 3 miesiącach terapii stężenie uzyskano znacząco poprawę jego funkcji⁷⁸. Sama metformina zastosowana w innym badaniu klinicznym wydała się pozytywnie łączyć z poprawą funkcji śródbłonna⁷⁹.

Grupą leków będącą w centrum zainteresowania terapii poprawiających funkcji śródbłonna bez wątplenia są substancje wpływające na układ renina-angiotensyna-aldosteron. Badaniom poddawane były inhibitory konwertazy angiotensyny (ACE), blokery receptora angiotensyny II (ARB) oraz antagoniści aldosteronu. Poprzez wzrost biodostępności NO wszystkie powyższe istotnie poprawiały funkcję śródbłonna⁸⁰.

Statyny wpływają na poprawę funkcji śródbłonna nie tylko poprzez redukcję stężenia cholesterolu LDL, ale także poprawiają dostępność NO dzięki redukcji stężeń izoprenoidów. Innym mechanizmem wpływu na NO jest stymulacja syntezy mRNA syntazy NO i hamowanie inaktywacji NO przez cząsteczki reaktywnego tlenu (ROS)⁸¹.

Do innych leków o pozytywnym oddziaływaniu na funkcję śródbłonna zaliczają się allopurynol, pochodne sulfonilomocznika⁸², trimetazydyna⁸³ czy antyoksydanty^{84,85}.

Istotne miejsce w modyfikacji funkcji śródbłonna zajmują metody nefarmakologiczne. Wyniki wielu badań klinicznych potwierdziły jej poprawę po zastosowaniu diety śródziemnomorskiej lub diety z obniżoną zawartością tłuszczu⁸⁶. Bardzo ważną rolę odgrywa także regularny wysiłek fizyczny⁵⁷.

1.1.6. Metody badań śródbłonna

Do oceny funkcji śródbłonna stosuje się techniki inwazyjne i nieinwazyjne. Najlepsze do oceny, ze względu na łatwy dostęp, wydają się być tętnice obwodowe. Najczęściej stosowanym testem jest ocena wazodylatacji indukowanej przepływem FMD

(ang. flow mediated dilatation) opracowany przez Celermajera, w którym dokonywany jest pomiar wazomotorycznej odpowiedzi na reaktywne przekrwienie. Oparta jest ona na pomiarze zmian średnicy naczynia w warunkach spoczynku i po indukcji reaktywnego wzrostu przepływu w wyniku reperfuzji poprzedzonej krótkotrwałym niedokrwieniem, po zaciśnięciu sfingomanometrem. Wadą tej metody jest brak oceny kontroli napięcia tętnicy w spoczynku. Nowszą techniką jest L-FMC (ang. low flow mediated constriction), metoda pozwalająca na uzupełnienie danych uzyskanych w FMD oceniając ilościowo zmniejszenie średnicy naczynia w odpowiedzi na zmniejszony przepływ naczyniowy. W badaniu L-FMC odpowiedź wazodylatacyjna zależy od innych niż NO substancji, niezależnie od jego biodostępności. Wobec powyższego najlepszymi wynikami oceniającymi kompleksowo homeostazę naczynia dysponujemy przy ocenie opartej na obu metodach.

PAT (tonometria obwodowych naczyń tętniczych; ang. peripheral arterial tonometry) ocenia powiązaną z funkcją śródbłonna amplitudę fali tętna. Także wyniki PAT okazują się obniżone przy obecności czynników ryzyka chorób sercowo-naczyniowych oraz u pacjentów ze stwierdzoną miażdżycą. Działanie jest oparte o reakcje tętnicze wywołane za pośrednictwem śródbłonna na dystalnym paliczku ręki w odpowiedzi na pięciominutowe zamknięcie tętnicy ramiennej. PAT opiera się na pomiarach przepływu w odpowiedzi na przekrwienie związane z funkcją śródbłonna naczyń mikrokrążenia, wobec czego technika ta stosowana jest głównie do oceny funkcji mikrokrążenia⁸⁷.

Ocena funkcji śródbłonna na podstawie oceny mikrokrążenia skórniego możliwa jest także dzięki metodzie laserowego pomiaru przepływu wykorzystując metodę Dopplera. Ta nieinwazyjna metoda opiera się na pomiarach wzrostu przepływu w naczyniach mikrokrążenia po reaktywnym przekrwieniu, ogrzaniu lub przezskórnej aplikacji za pomocą jonoforezy acetylocholiny. Odpowiedź niezależna od funkcji śródbłonna zapewnia jonoforeza nitroprusydku sodu⁸⁸. Technika ta korzysta ze światła o niskiej mocy i długości fali 780 nm, emitowanego przez diody laserowe. Sonda zawiera włókno oświetlające przewodzące promieniowanie do tkanki oraz włókno wykrywające przewodzące światło do odbiornika, gdzie następuje transformacja do sygnału analogowego. Ocena oparta jest o wskaźnik przepływu (tzw. przepływ skórny), który jest stosunkiem zmierzonych wartości przepływu i średniego ciśnienia tętniczego⁸⁹.

1.2. PŁYTKI KRWI

1.2.1. Morfologia funkcjonalna

Płytki krwi są wyspecjalizowanymi bezjądrzastymi elementami morfotycznymi powstającymi w procesie megakariopoezy. Odgrywają one zasadniczą rolę w fizjologicznych i patologicznych procesach hemostazy, zapalenia, rozsiewu nowotworów, gojeniu ran oraz regulacji mechanizmów odpowiedzi immunologicznej^{90,91,92}. Na powierzchni płytki można stwierdzić obecność glikoprotein, glikolipidów, mukopolisacharydów i białek zabsorbowanych z osocza. Dzięki ujemnemu ładunkowi błony płytki poruszają się w polu elektrycznym. Ładunek ten powoduje także odpychanie krążących płytek od siebie i komórek śródbłonna, co zapobiega nadmiernej agregacji. Błona komórkowa płytek składa się z podwójnej warstwy fosfolipidów z cholesterolem, glikolipidami i glikoproteinami^{93,94,95}. W procesie aktywacji płytek, w wyniku reorganizacji cytoszkieletu, dochodzi do zmiany dyskoidalnego kształtu komórek na sferyczny^{93,96}. Cytoplazma płytek zawiera kilka mitochondriów, które odpowiadają za metabolizm tlenowy^{97,98}.

Mitochondria płytkowe mają także zdolność oksydacji kwasów tłuszczowych, jednak nie jest poznany ich wkład w produkcję energii^{99,100,101}.

Płytki, mimo że są komórkami pozbawionymi jądra, mają zdolność ekspresji informacji genetycznej dzięki obecności niewielkich ilości mRNA¹⁰². Ta zdolność płytek do syntezy białek pozwala im na interakcje w procesy hemostazy, zapalenia i odporności wrodzonej. Po aktywacji płytkowej translacja mRNA zachodzi na drodze kilku mechanizmów¹⁰³.

Płytki krwi zawierają trzy rodzaje biologicznie aktywnych ziarnistości podzielonych według ich zawartości, gęstości i struktury wewnętrznej. W ziarnistościach gęstych stwierdzono obecność serotoniny, ADP i ATP¹⁰⁰. Transport i sekrecja płytkowej serotoniny, która może być wymieniana z serotoniną zewnątrzpochodną, wpływa na wiele mechanizmów w tym skurcz naczyń czy aktywność koagulacyjną płytek^{104,105,106}. Substancje gromadzone w ziarnistościach uwalniane są w procesie aktywacji płytek w miejscu uszkodzenia ściany naczynia i odgrywają istotną rolę w procesach hemostazy, zapalenia, gojenia ran i patogenezie miażdżycy¹⁰⁷.

1.2.2 Hemostaza płytkowa

Aktywacja

Fizjologiczną funkcję płytek można podzielić na cztery fazy: adhezja, agregacja, sekrecja i ekspresja aktywności prokoagulacyjnej. W kilka sekund po przerwaniu ciągłości ściany naczynia adhezja płytek do tkanki łącznej na brzegach rany rozpoczyna tworzenie czopu hemostatycznego^{108,109}. Aktywacja jest podstawowym procesem pierwotnej i wtórnej hemostazy (adhezja płytek, sekrecja mediatorów z ziarnistości, agregacja płytek i stabilizacja lub rozpuszczanie skrzepu), który powodując ekspozycję aminofosfolipidów na powierzchni płytek rozpoczyna proces krzepnięcia^{110,111,112}. Zaktywowane płytki wykazują także liczne interakcje z pozostałymi komórkami krwi krążącej oraz ścian naczynia. Umożliwiają migrację leukocytów w miejsce uszkodzenia ściany naczynia, pobudzają leukocyty i komórki endotelium na drodze auto- i parakrynych mechanizmów inicjowanych pierwotnie poprzez liczne cząsteczki uwalniane zarówno z płytek, jak i komórek śródbłonna¹¹³.

Poza tworzeniem czopu hemostatycznego w czasie procesu hamowania krwawienia płytki tworzą powierzchnię gromadzenia kompleksów białek koagulacyjnych, są miejscem tworzenia czopów fibryny oraz wydzielają czynniki uczestniczące w gojeniu rany¹¹⁴.

Odpowiedź płytek na przerwanie ciągłości ściany naczynia zależy od kilku parametrów¹¹⁵. Pierwszym jest głębokość uszkodzenia – im głębsze, tym większa powierzchnia reakcji płytkowych, następnie podłoże – hemostaza obszaru błon śluzowych czy skóry zależy głównie od płytek, mięśni i ścięgien od białek osoczowych kaskady krzepnięcia, kolejnym czynnikiem są zmiany struktury naczynia zależne od wieku oraz hematokryt, gdyż większa liczba erytrocytów zwiększa interakcje płytek ze ścianą naczynia spychając płytki krążące na obwód strumienia krwi. Ostatnim czynnikiem wydaje się być szybkość przepływu krwi oraz rozmiar naczynia i zależna od tego ilość płytek mogąca oddziaływać ze sobą i ścianą naczynia^{116,117,118}. Płytki poprzez sekrecję tromboksanu i serotoniny przyczyniają się także do reakcji skurczu naczynia w odpowiedzi na przerwanie ciągłości ściany, co w oczywisty sposób zmniejsza krwawienie i ułatwia umiejscowienie płytek i fibryny^{119,120,121}. W mechanizmie aktywacji płytek potwierdzona jest też rola oksydacji. Głównym źródłem reaktywnych form tlenu, w tym isoprostanów jest płytkowa oksydaza NADPH^{122,123}.

Na etapie aktywacji możliwe jest jej zahamowanie służące zmniejszeniu patologicznego tworzenia zakrzepów w procesach chorobowych. Takie działania mają leki przeciwplatekcyjne, jak kwas acetylosalicylowy, które blokują syntezę tromboksanu przez nieodwracalną acetylację Ser-529 i Ser-516 w cyklooksygenazie COX1 i COX2. Brak jądra

komórkowego w płytkach uniemożliwia tworzenie nowych COX co wyjaśnia trwały efekt po zastosowaniu aspiryny (do końca życia płytki – 8-10 dni) mimo jej krótkiego czasu półtrwania (5-20min). Nie zbadano możliwości syntezy COX *de novo* na preformowanym mRNA.

Adhezja

Uszkodzenie naczynia w rejonie wolnego przepływu krwi skutkuje adhezją płytek do podśródbłonkowego kolagenu, fibronektyny i lamininy. W miejscach o przepływie szybkim adhezja wymaga dodatkowej obecności podśródbłonkowego czynnika von Willebranda i odpowiednich receptorów płytkowych – kompleksu glikoproteiny Ib/IX/V (GPIb/IX/V)¹²¹. Współdziałanie kompleksu glikoproteinowego (GP) Ib-V-IX z czynnikiem von Willebranda (vWF) na powierzchni odsłoniętego kolagenu zapoczątkowuje wychwytywanie płytek.¹²⁴

W miejscu przerwania ciągłości naczynia stwierdza się także podwyższone stężenie tymozyny $\beta 4$ (T $\beta 4$), co sugeruje istotną rolę tej cząsteczki w procesie zakrzepicy i agregacji płytek. Jest to biopeptyd uwalniany przez płytki po ich aktywacji. Potwierdzony jest także jego udział w migracji komórek endotelium, angiogenezie, różnicowaniu komórek pnia i gojeniu ran¹²⁵.

Niektóre płytki wykazują adhezję do kolagenu, inne tylko do powierzchni innych płytek, które uległy już adhezji¹²⁶.

Agregacja

Dzięki badaniom pozwalającym na ocenę płytek *in vivo* w czasie rzeczywistym proces agregacji płytek okazał się znacznie bardziej skomplikowany niż sądzono. Wyniki szczegółowych badań ujawniły całą złożoność wieloetapowej adhezji angażującej receptory i ligandy adhezyjne, ze szczególnym uwzględnieniem interakcji indywidualnych między receptorem a ligandem w procesie agregacji zależnym od warunków przepływu krwi¹²⁷. Stymulacja płytek powoduje sekrecję płytkową i uaktywnienie aktywności prokoagulacyjnej płytek. Substancje wydzielane w czasie sekrecji nasilają odpowiedź agregacyjną i gojenie rany. Nasilenie aktywności prokoagulacyjnej powoduje tworzenie trombiny w miejscu uszkodzenia ściany naczynia¹²¹. Aktywująca płytki trombina działa poprzez proteolizę aktywowaną proteazą receptorów PARs. Wiąże ona także glikoproteinę Ib(alfa) wzmacniającą aktywację płytek przyspieszając aktywację PAR-1. Glikoproteina Ib(alfa) może być także wykorzystana jako przekaźnik bezpośredni. Po związaniu glikoproteiny Ib(alfa) specyficzność trombiny toruje zmiany innych substratów. Poprzez wiązanie integrzyn alfaIIb beta3 końcowe produkty kaskady koagulacji, fibrynogen i fibryna, także biorą udział

w procesie agregacji ¹²⁸. Proces agregacji płytek jest modulowany przez zmiany potencjału międzybłonowego, które wpływają na uwolnienie jonów wapnia z płytek ¹²⁹. Fibryna i przesłane sygnały międzypłytkowe w tym między receptorami płytek stabilizują nowo utworzone agregaty płytkowe ¹³⁰.

Agregację płytek można podzielić na homotypową i heterotypową, czyli odpowiednio łączenie płytek z innymi płytkami oraz łączenie płytek z krążącymi leukocytami. Oba mechanizmy są aktywowane w różnych procesach patofizjologicznych. Mogą pojawiać się niezależnie w stanach klinicznych, w których zaobserwowano nieprawidłową agregację heterotypową przy braku zakrzepicy wewnątrznacyniowej, zwykle jednak jako część odpowiedzi prozapalno/prozakrzepowej zachodzą równolegle. W obecnie stosowanej terapii antyzakrzepowej wykorzystywany jest wpływ na poszczególne szlaki sygnałowe formowania skrzepu, jednak jej skuteczność ograniczona jest niewielką liczbą znanych reakcji biorących udział agregacji homotypowej. Wobec tego uzyskanie wpływu na procesy agregacji heterotypowej, związanej silnie z ostrymi incydentami zakrzepowymi mogłoby znacznie zwiększyć efektywność leczenia ¹³¹.

Postulowano wpływ tlenu azotu na parametry agregometryczne płytek. Tlenek azotu przy udziale syntazy płytkowej NO może być syntetyzowany w płytkach krwi ¹³². Jego działanie miałoby być zgodne z tym produkowanym przez komórki śródbłonka tzn. hamowanie aktywacji płytek oraz heterotypowej agregacji płytek z monocytami powodujące zmniejszenie ilości kompleksów monocytów i płytek pełniących istotną rolę w zapoczątkowaniu rozwoju miażdżycy ¹³³. Część autorów podważa jednak jego jakikolwiek wpływ na agregację płytek ^{134,135}. Jednocześnie potwierdzony jest silnie hamujący wpływ śródbłonkowego NO na agregację płytek w pobliżu i w samym miejscu uszkodzenia naczynia. Nie jest jednak znana wielkość przepływu i stężenie tlenu azotu niezbędne do zahamowania agregacji płytek w procesach fizjologii ¹³⁶.

W utrzymaniu hemostazy ważną funkcję pełni współdziałanie płytek z komórkami prekursorowymi śródbłonka. W sferze badań pozostaje wpływ na funkcję płytek inicjowania migracji komórek prekursorowych do miejsc uszkodzenia ściany naczynia oraz ich różnicowania do komórek śródbłonka. Udowodniono, że obwodowe komórki prekursorowe śródbłonka wiążą płytki za pomocą receptora CD62P i za pomocą regulacji w górę cyklooksygenazy-2 i sekrecji prostacykliny hamują ich aktywację, agregację, adhezję do kolagenu i formowanie skrzepu ¹³⁷.

1.2.3. Pozahemostatyczna rola płytek krwi

Płytki krwi pełnią także bardzo istotną rolę w procesach zapalnych oraz immunoregulacyjnych.

Immunoregulacyjne działanie płytek opiera się na interakcji z komórkami śródbłonna i komórkami immunokompetentnymi, w tym w procesie naciekania leukocytów w zapalnych lub podlegających reakcji alergicznej tkankach. Niewiele jest natomiast doniesień na temat regulacji funkcji płytek przez system immunologiczny. Jest to kolejny dowód na ścisły związek procesów odpornościowych i procesów krzepnięcia. Biorąc pod uwagę jakąkolwiek terapię, której celem są płytki krwi należy uwzględnić fakt jej możliwych implikacji sięgających znacznie poza działanie przeciwagregacyjne. Także interwencje skierowane w procesy odpornościowe mogą wpływać na proces krzepnięcia¹³⁸.

Interakcje adhezyjne płytek z leukocytami i komórkami śródbłonna poprzez P-selektynę prowadzą do kolejnych faz procesu zapalnego jak rolowanie leukocytów, kaskada cytokin i rekrutacja leukocytów w miejsca uszkodzeń tkankowych. Poza tym udowodniono, że płytkowa ekspresja molekuł związanych z procesami immunologii jak CD40L i receptorów TOLL-like reguluje procesy zależne od odporności wrodzonej. Co więcej, same płytki mogą wchodzić w interakcje z mikroorganizmami. Potwierdzono istnienie kilku typów wirusów zdolnych do interakcji z antygenami płytkowymi¹³⁹.

Jak wspomniano powyżej, obecnie terapie przeciwplatek, które mają za zadanie wpływać na aktywację i agregację płytek, w związku z nierozzerwalną funkcją płytek w procesach immunologicznych modulują także ich współdziałanie w odporności, redukując interakcje międzykomórkowe płytek z innymi składnikami procesów immunologicznych oraz wydzielanie protein zapalnych. Znaczenie kliniczne tych modyfikacji nadal jest nie w pełni poznane¹⁴⁰.

1.2.4. Patofizjologia

Te same mechanizmy, które odgrywają istotną rolę w procesach fizjologicznych umożliwiają udział płytek w patologicznych reakcjach zapalnych, a także procesach onkogenezy i reakcjach immunologicznych. Płytkowe receptory GPIb/IX/V, P-selektyna, ligand glikoproteinowy 1 P-selektyny, CD40 oraz alfaIIb beta3 integryna – niezbędne w procesie hemostazy mają potwierdzony udział w progresji takich procesów zapalnych jak miażdżyca, reumatoidalne zapalenie stawów czy choroby zapalne jelit, rozsiew nowotworowy i odpowiedź zapalna na infekcje bakteryjne. Uwalniane zawartości ziarnistości płytek, w skład których wchodzi białka adhezyjne, czynniki wzrostu i chemokiny/cytokiny w procesach fizjologicznych niezbędne do hemostazy i gojenia ran, w

niektórych przypadkach są również modulatorami ostrego i przewlekłego procesu zapalnego oraz aktywacji komórek nowotworowych i rozrostu nowotworu ¹⁴¹.

Aktywacja płytek poprzedzona stymulacją zapalną prowadzi do ekspresji powierzchniowych receptorów płytkowych (GPIIb/IX/V, P-selektyna, CD40) i dalszej produkcji cząsteczek o działaniu prozapalnym. Aktywowane płytki i produkowane przez nie modulatory odgrywają kluczową rolę w zapoczątkowaniu procesu miażdżycy poprzez nasilenie migracji i przylegania leukocytów do ściany naczynia. Pojawiające się w początkowym procesie powstawania zmian miażdżycowych upośledzenie funkcji śródbłonna jest nierozdzielnie związane z niewielkim stopniem zapalenia toczącym się w ścianie naczynia. Prowadzi to do zmniejszenia biodostępności tlenu azotu. Uszkodzone komórki śródbłonna wydzielają substancje prozapalne zwrotnie aktywujące płytki krwi i nasilające ich adhezję do ściany naczynia ¹⁴². Poprzez zapoczątkowanie migracji leukocytów w miejsce uszkodzenia ściany naczynia, formowanie komórek piankowatych i proliferację komórek mięśni gładkich, płytki krwi biorą udział we wczesnych stadiach rozwoju miażdżycy. Proces ten zależny jest od sekrecji substancji prozapalnych i czynników wzrostu, jak również interakcji między płytkowych ¹⁴³. Poprzez współdziałanie komórek prowadzi to do powstania blaszki miażdżycowej ^{144,145}.

W świetle przeprowadzonych dotychczas badań, stwierdzono, że patomechanizmy aktywacji płytek krwi w różnych postaciach incydentów sercowo-naczyniowych, jak również w naturalnym przebiegu miażdżycy bez ostrych powikłań różnią się na poziomie molekularnym, co ma istotne implikacje praktyczne w terapii. Jest to także głównym powodem projektowania badań klinicznych dedykowanych optymalizacji terapii przeciwpłytkowej w odmiennych klinicznie manifestacjach miażdżycy i jej powikłań. Ze względu na rosnące znaczenie płytek krwi w świetle przeprowadzanych ostatnio badań nad patomechanizmami aterogenezy i onkogenezy, interwencje farmakologiczne w ich mechanizmy aktywacji stają się atrakcyjnym celem terapeutycznym nie tylko w ostrych incydentach sercowo-naczyniowych, wskazując tym samym na istnienie plejotropowego działania terapii przeciwpłytkowej ^{146,147,148}.

Ponieważ płytki mogą także utworzyć cienką warstwę w obszarach uszkodzonych komórek śródbłonna zaburzając pierwotną hemostazę, terapie przeciwpłytkowe łączą się nierozdzielnie z ryzykiem krwawień, co znacząco ogranicza możliwości stosowania terapii agresywnej (polipragmazja) ^{149,150}. W badaniach nad lekami przeciwpłytkowymi dąży się do zminimalizowanego ryzyka krwawień przy oczywistym wystarczającym efekcie antyagregacyjnym pozwalającym na istotne zmniejszenie ryzyka zdarzeń niedokrwiennych.

W zawale serca utworzenie zamykającego światła zakrzepu jest podstawą procesów

patologicznych. Optymalnie prowadzona terapia przeciwplatekowa powinna zapewnić hemostazę z jednej strony zapobiegającą okluzji zmienionego miażdżycowo naczynia, a z drugiej poprzez aktywowane plejotropowe mechanizmy działania płytek, zmniejszać nasilenie uszkodzenia niedokrwienno–reperfuzyjnego i być może także modulować procesy neowaskularyzacji niedokrwionego miokardium ^{151,152}. Pomimo stosowanych obecnie łączonych terapii antyplatekowych (m.in. aspiryna, tienopirydyny) zachorowalność i śmiertelność spowodowana ostrymi zespołami wieńcowymi pozostaje znacząca wskazując tym samym na dalekie od optymalnych efekty terapii przeciwplatekowej zarówno w pierwotnej, jak i wtórnej profilaktyce ¹⁵³.

Wiele badań poświęcono optymalizacji leczenia przeciwplatekowego w terapii i profilaktyce wtórnej udaru niedokrwienno mózgu ^{153,154,155}. W udarze mózgu mimo podtrzymanej wczesnej reperfuzyji pierwotnie zamkniętego naczynia, proces niedokrwienno nadal postępuje. Liczne wyniki badań wskazują, że w tym przypadku wczesna adhezja i aktywacja płytek uruchamia kaskadę zakrzepowo-zapalną nie wymagającą dalszej agregacji i tworzenia zakrzepów ¹³². Brakuje badań oceniających rolę poszczególnych leków przeciwplatekowych w modyfikacji wielkości obszaru penumbru ischemicznego oraz hamujących jego przejście w obszar martwicy. Biorąc pod uwagę wykazaną dotychczas w badaniach eksperymentalnych istotną modulującą rolę dostępnych leków przeciwplatekowych na profil i dynamikę uwalniania z płytek czynników modyfikujących procesy zapalne i angiogenezy ¹⁵⁶, koniecznym wydaje się zaprojektowanie badań mających na celu optymalizację terapii w ostrej fazie udaru niedokrwienno.

Kolejną przyczyną śmiertelności i chorobowości jest zależna od płytek zakrzepica żył głębokich, jej powikłania i nawroty. Nie ustalono jednoznacznie mechanizmów molekularnych formowania zakrzepów w żyłach głębokich ^{157,158,159}. Co ciekawe w badaniach przeprowadzonych na myszach, mimo braku fibrynogenu i vWF nadal stwierdza się obecność procesów adhezji i agregacji, co potwierdza niebagatelną rolę jaką w tych procesach pełnią inne cząsteczki. Odkrycie i scharakteryzowanie tych cząsteczek może prowadzić do rozwoju nowych terapii leczenia zaburzeń zakrzepowych i nadmiernych krwawień ¹⁶¹.

W cukrzycy płytki krwi charakteryzują się zwiększoną aktywnością podstawową, jak również w odpowiedzi na agonistów, co skutkuje wzmożoną tendencją do agregacji. Potwierdzona jest zwiększona ekspresja molekuł i receptorów adhezyjnych na powierzchni płytek, zaburzenia stężenia wapnia wewnątrzplatekowego oraz zwiększona produkcja tromboksanu i trombin. Podstawowy lek w terapii antyplatekowej – aspiryna okazuje się mieć ograniczoną skuteczność u diabetyków. Lepszym wyborem wydaje się być stosowanie

inhibitorów P2Y₁₂.¹⁶⁰.

Agregacja płytek pełni też istotną rolę w procesach rozsiewu nowotworowego. Agregacja płytek indukowana działaniem komórek nowotworowych ułatwia proces zatrzymywania ich w naczyniach włosowatych. Jest również wielce prawdopodobne, że ochrania ona te komórki przed obroną immunologiczną organizmu, sprzyjając tym samym rozrostowi^{161,162,163}.

1.2.5. Ocena funkcji płytek

Zróznicowana odpowiedź na terapię antypłytkową wymaga oceny reakcji płytek na stosowane leczenie. Oczywistym celem jest ustalenie optymalnej dawki jednocześnie wystarczającej do prewencji lub leczenia zakrzepicy i nie wywołującej zwiększonego ryzyka krwawienia. Z powodu braku swoistości i braku korelacji klinicznych ocena czasu krwawienia jako metoda badawcza nie jest obecnie już stosowana. Standardem jest płytkowa agregometria turbidymetryczna. Metoda ta jest skuteczna w pomiarze agregacji płytek zależnej od glikoproteiny GPIIb/IIIa (integryny alphaIIb beta3), jej ograniczeniem jest jednak mierna powtarzalność, utrudnione przygotowanie próbki, długi czas analizy, koszt i objętość wymaganej próbki¹⁶⁴.

Testy służące ocenie funkcji płytek nie opierają się już na ocenie czasu krwawienia, lecz ewoluowały w kierunku zaawansowanych metod oceny aktywności płytek. Mimo to, wciąż problemem jest słaba standaryzacja metod oraz brak wystarczającej swoistości i czułości testów. Starsze testy umożliwiają ocenę szlaków sygnałowych, mechanizmów uwalniania cząsteczek z ziarnistości oraz wgląd w funkcję receptorów. Cytometria przepływowa umożliwia ilościową i jakościową ocenę niektórych funkcji płytek, jednakże koszt jest tu znacznym ograniczeniem szerszego zastosowania. Do badań przesiewowych pacjentów z możliwymi zaburzeniami krwawienia stosuje się analizator płytkowy PFA-100¹⁶⁵. Jest to dość szybka i prosta metoda o wysokiej czułości służąca ocenie pierwotnej hemostazy *in vitro*. Metoda ta pozwala na monitorowanie efektów leczenia przeciwplatekowego, ocenę różnych zaburzeń funkcji płytek, obecności choroby von Willebranda, a także ocenę skuteczności terapii z zastosowaniem desmopresyny. Ograniczeniem PFA-100 jest brak swoistości oraz możliwości zastosowania w profilaktyce określonego zaburzenia funkcji płytek. Jednak przy odpowiednim zastosowaniu jest to metoda użyteczna w identyfikacji i monitorowaniu terapii zaburzeń hemostazy¹⁶⁶.

Innymi testami są testy agregometryczne: pomiary agregacji płytek w bogatopłytkowym osoczu z cytrynianem przez ocenę zmian w transmisji światła lub w całej krwi z dodatkiem cytrynianu przez agregometrię impedancyjną. Agregometria optyczna jest

obecnie najlepszym testem *in vitro*, "złotym standardem" w wykrywaniu zaburzeń płytkowych i ich bardziej szczegółowej charakterystyki. Wykorzystywana w monitorowaniu skuteczności terapii antypłytkowej ¹⁶⁷. Ograniczeniem metody jest wysoki koszt wykonywanych oznaczeń oraz złożoność procedury uniemożliwiającej szybkie przyłóżkowe wykonanie badania w dynamicznie zmieniających się parametrach hemostazy.

1.2.6. Interakcje płytek i śródbłónka

Procesy krzepnięcia i reaktywności naczyniowej są wynikiem ciągłych interakcji komórek śródbłónka oraz płytek krwi, jak np adhezji płytek do ściany naczynia czy uwalnianiu z komórek śródbłónka inhibitorów płytkowych ¹⁶⁸. Opisane jest także działanie płytek na komórki śródbłónka poprzez uwalnianie dwu i trójfosforanu adenozyliny czy serotoniny, dzięki czemu mogą one stymulować tworzenie tlenku azotu i prostacykliny w komórkach śródbłónka. Interakcja ta w warunkach fizjologii zapewnia inhibicję płytek i zwiększony przepływ krwi w miejscach aktywacji płytek. Uwalniany w komórek śródbłónka NO jest nie tylko wazodylatatorem, ale powoduje także zahamowanie aktywacji płytek krwi przez c-GMP-zależne osłabienie wzrostu stężenia wewnątrzkomórkowych jonów Ca^{2+} ^{169,170}. Płytki zwiększają także produkcję w komórkach śródbłónka endoteliny, a substancje z nich uwalniane jak tromboksan i serotonina wpływają na wazokonstrykcję także przez aktywację komórek mięśni gładkich ściany naczynia. W warunkach fizjologii oddziaływanie płytek ze ścianą naczynia dzięki różnorodnym mechanizmom protekcyjnym pozostają bardzo nieznaczne, jednak w stanach chorobowych dysfunkcja komórek śródbłónka nasila interakcje z płytkami ¹⁷¹.

Aktywacja płytek w sąsiedztwie śródbłónka może następnie upośledzać funkcję komórek endotelium prowadząc dalej do zaburzeń kontroli napięcia ściany naczynia. Efektem powstania tych zmian w mikrokrążeniu może być tworzenie rozsianych mikrozakrzepów, zwiększona przepuszczalność włośniczkowa, obrzęki i cytotoksyczne oddziaływanie substancji uwolnionych z komórek na otaczające tkanki. Taki mechanizm zaburzonej interakcji między płytkami krwi a śródbłónkiem w mikrokrążeniu leży u podstaw np. niedokrwiennego uszkodzenia mózgu ¹⁷².

1.3. WPŁYW WYSIŁKU NA FUNKCJĘ ŚRÓDBŁONKA I PŁYTEK KRWI

1.3.1. Wysiłek fizyczny a standardy postępowania w medycynie klinicznej

Wpływ aktywności fizycznej na zdrowie poddawany jest ciągłej dyskusji. Brytyjskie Towarzystwo Nauk o Sporcie (ang. The British Association of Sport and Exercise Sciences) w 2010 r. w oparciu o opinie ekspertów opracowało wytyczne kierowane do trzech grup pacjentów nazwane ABC Aktywności Fizycznej dla Zdrowia.

A oznacza tu wszystkich zdrowych dorosłych w wieku od 18 – 65 lat (All healthy adults),

B początkujących (Beginners),

C zaawansowanych (Conditioned individuals).

Dla grupy oznaczonej jako A celem powinno być wykonywanie co najmniej 150 min. średnio nasilonego wysiłku aerobowego na tydzień lub minimum 75 min. wysiłku o wysokiej intensywności lub równoważnych kombinacji obu wymienionych. Średnio nasilony wysiłek oznacza podwyższone tętno i przyspieszenie oddechu w granicach, w których możliwa jest normalna rozmowa. Wysoka intensywność oznacza podwyższenie obu parametrów w znacznym stopniu utrudniające rozmowę. Aktywność aerobowa powinna być podejmowana w interwałach co najmniej 10 min. przez minimum 5 lub najlepiej 7 dni w tygodniu. Wszyscy zdrowi dorośli powinni ponadto wzmacniać siłę mięśniową w cyklach treningów anaerobowych co najmniej 2 razy w tygodniu. Po osiągnięciu podanego celu i trwaniu w wykonywaniu zaleceń przez minimalnie 6 miesięcy można zwiększyć korzyści treningu przez dwukrotne zwiększenie czasu trwania wysiłku (300 min./tydzień aerobowego o średniej intensywności, 150 min. wysokiej intensywności lub kombinację w/w). Dążenie do zwiększania czasu treningu jest zalecane zwłaszcza dla osób z trudnościami w utrzymaniu prawidłowej masy ciała, pacjentów z podwyższonym ryzykiem chorób sercowo-naczyniowych lub rozpoznaną cukrzycą typu II.

Dla dzieci i młodzieży w wieku od 5–16 r.ż. wytyczne określają korzystne dążenie do spędzania co najmniej 60 min. średniej do wysokiej intensywności wysiłku na dzień włączając w to aktywność aerobową o wysokiej intensywności, która przyczynia się do poprawy gęstości kości i zwiększenia siły mięśniowej¹⁷³.

1.3.2. Molekularne podstawy wpływu wysiłku fizycznego na układ sercowo–naczyniowy

Działanie wazodylatacyjne

Regularny wysiłek fizyczny poprzez wiele mechanizmów wpływa korzystnie na funkcję śródbłonka. Powoduje on zwiększenie przepływu krwi i liniowych sił ścinania skutkując wzrostem biodostępności i tworzenia tlenku azotu, co wiąże się z pozytywnym oddziaływaniem na funkcję śródbłonka, poprzez syntezę mediatorów molekularnych działających rozszerzająco na naczynia, zmiany w uwalnianiu neurohormonalnym i równowadze czynników oksydacyjnych i antyoksydacyjnych¹⁷⁴.

Podczas wysiłku wzrasta produkcja reaktywnych cząstek tlenu i azotanów. Wzrost wytwarzania tlenku azotu jest skutkiem przyspieszonego podczas treningu przepływu krwi, który powoduje ekspozycję komórek śródbłonka na siły ścinające. Zwiększone zapotrzebowanie na tlen i hipoksja zwiększają produkcję anionu nadtlenu O_2^- . W badaniach przeprowadzonych przez Djordjevica i wsp. udowodniono zwiększenie biodostępności NO oraz pozytywną jej korelację z maksymalnym poborem tlenu VO_2max ¹⁷⁵. Potwierdzono zwiększenie biodostępności NO w związku z regularną, powtarzalną przez tygodnie lub miesiące aktywnością fizyczną. Jego związek z krótkotrwałym znacznym wysiłkiem fizycznym pozostaje w sferze badań. Poprawa rozszerzenia naczyń zależnego od funkcji komórek śródbłonka obserwowana jest na modelach zwierzęcych już po 7 dniach ćwiczeń. Zmiany te utrzymują się nawet do kilku tygodni. Z długofalowym treningiem tempo ich powstawania, prawdopodobnie zależnie od adaptacji strukturalnej może jednak ulec regresowi. Obserwowany w czasie wysiłku wzrost szybkości przepływu krwi i zmiany hemodynamiczne zdają się być odpowiedzialne za ostre i przewlekłe modyfikacje funkcji naczyniowej. Wysiłek fizyczny zwiększa zależne od komórek śródbłonka rozszerzenie naczyń krwionośnych, nie tylko lokalnie w grupie mięśni aktywnych, ale także ogólnoustrojowo pod warunkiem zaangażowania w regularnym treningu wystarczająco dużej grupy mięśniowej¹⁷⁶.

Wskutek stosowania aerobowego wysiłku fizycznego, poza zwiększeniem stężenia śródbłonkowego tlenku azotu, całkowita ilość NO wzrasta także poprzez uwolnienie pozakomórkowej dysmutazy nadtlenukowej¹⁷⁷. Badania przeprowadzone na zwierzętach wykazały zwiększoną odpowiedź wazodylatacyjną na zależną od śródbłonka acetylocholinę u osobników poddawanych regularnemu wysiłkowi fizycznemu. Poza wzrostem wrażliwości obserwowano także zwiększenie maksymalnej odpowiedzi na acetylocholinę. W toku badań potwierdzono związek między zwiększeniem relaksacji zależnie od Ach a wzrostem produkcji NO przez komórki śródbłonka, co z kolei poprzedzone było zwiększoną

aktywnością śródbłonkowej syntetazy tlenku azotu ¹⁷⁸.

Rozszerzenie naczyń jako efekt aktywności fizycznej zależy także od innych substancji poza tlenkiem azotu. W wyniku kurczenia się włókien mięśniowych w czasie wysiłku następuje uwolnienie jonów potasu. Ich działanie połączone z oddziaływaniem wysiłku bezpośrednio na naczynia włosowate powoduje przekrwienie oraz hyperpolaryzację mięśni gładkich naczyń i komórek śródbłonka. Hyperpolaryzacja ta zwrótnie podtrzymuje powyższy proces. ATP uwalniane przez komórki kurczących się mięśni jest następnie metabolizowane przez ektonukleotyduazy do adenozyliny, która powoduje rozszerzenie włosniczek przez receptor A_{2A} w mechanizmie zależnym od tlenku azotu. Podczas wysiłku obserwowano także wzrost stężeń prostaglandyn PGE₂ i PGI₂. Niewielkie zwiększenie zawartości tlenu w mieszaninie oddechowej zmniejsza przekrwienie wywołane wysiłkiem ograniczając uwolnienie adenozyliny i PG, jednak znacząca hiperoksja (100% O₂) może nieść efekt odwrotny ze względu na tworzenie jonów O₂ (anionorodników ponadtlenkowych) -inaktywujących NO i zmniejszających syntezę prostaglandyn ¹⁷⁹.

Jednym z prawdopodobnych mechanizmów poprawiających funkcję komórek śródbłonka w wyniku aktywności fizycznej wydaje się być regeneracja uszkodzonego endotelium przez krążące komórki prekursorowe (EPC). Zadaniem tej podgrupy monocytów jest naprawa uszkodzeń śródbłonka oraz neowaskularyzacja obszarów niedokrwienych. Wyniki badań klinicznych potwierdzają pozytywny wpływ długotrwałej i regularnej aktywności fizycznej na liczbę krążących komórek EPC oraz ich zwiększoną mobilizację ze szpiku, co skutkuje poprawą funkcji śródbłonka zaburzonej naturalnie w wyniku procesów starzenia oraz dodatkowo pogarszanej przez czynniki ryzyka sercowo-naczyniowego. Dalszych badań wymaga ustalenie optymalnego planu treningowego oraz dobór rodzaju aktywności w zależności od rozpoznanego schorzenia ¹⁸⁰.

Działanie przeciwzapalne

Poza działaniem wazodylatacyjnym trening fizyczny może wpływać na szlaki sygnałowe związane z angiogenezą i przewlekłym działaniem przeciwzapalnym z następczymi modyfikacjami funkcji komórek śródbłonka ¹⁸⁶. Efektem regularnej aktywności fizycznej o średniej intensywności jest zmniejszenie stężenia markerów zapalnych, w tym cytokin prozapalnych i CRP także poprzez ich zmniejszoną produkcję przez tkankę tłuszczową, mięśniową, komórki śródbłonka i jednojądrzaste komórki krwi ¹⁸¹.

Działanie wysiłku fizycznego na odpowiedź immunologiczną jest złożone i zależne od jego intensywności i czasu trwania. Ostry wysiłek o dużej intensywności powoduje początkowo znaczną neutrofilię utrzymującą się następnie przez kilka godzin, lecz już w

mniejszym nasileniu zależnie od intensywności i czasu trwania aktywności. Ten początkowy wzrost wydaje się być skutkiem mobilizacji puli marginalnej w wyniku działania katecholamin i sił ścinania, podczas gdy podtrzymanie neutrofilii zależne jest od uwolnienia ich ze szpiku pod wpływem kortyzolu. Trening o wysokiej intensywności zwiększa degranulację neutrofilową, fagocytozę i aktywność oksydacyjną, jednak zmniejszają się one w odpowiedzi na stymulację bakteryjną przez następujące po treningu kilka godzin. Potwierdza to fakt szybkiej krótkotrwałej mobilizacji neutrofilii w efekcie treningu o wysokiej intensywności, jednocześnie ich zdolność reagowania na stymulację zewnętrzną jest zmniejszona. W odniesieniu do monocytów, makrofagów, komórek CD14/CD16+ czy NK działanie wysiłku jest podobne. Następuje wzrost ich zawartości we krwi w wyniku działania na śródbłonek kortyzolu i katecholamin. Obserwuje się także redukcję liczby tych komórek w czasie odpoczynku. Możliwy jest także wpływ na fenotyp monocytów, ekspresję cytokin i białek powierzchniowych. W odniesieniu do cytokin obserwowano redukcję IL-6, IL-1-alfa i TNF-alfa. Natomiast niezależnie od intensywności potwierdzono zależną od wysiłku stymulację fagocytozy, metabolizm tlenowy i azotowy (reactive oxygen i nitrogen met.), chemotaksję i aktywności antynowotworową. Regularna aktywność skutkowała także redukcją ekspresji MHCII monocytów i tym samym zdolności prezentacji antygenów¹⁸².

Efekt zmniejszenia stężeń białek ostrej fazy obserwowany był w odniesieniu do wysiłku o średniej intensywności (znaczne obniżenie haptoglobiny, niewielkie ceruloplazminy i transferyny). Długotrwały nadmierny wysiłek, mimo redukcji stężeń transferyny, ceruloplazminy i haptoglobiny, skutkowało istotnym wzrostem stężenia CRP. Zmiany te potwierdzają korzystne działanie wysiłku o średniej intensywności¹⁸³.

W badaniach przeprowadzonych u sportowców zawodowych przy obciążeniu dużym wysiłkiem fizycznym potwierdzono zwiększone powstawanie reaktywnych cząsteczek tlenu i azotu (RONS – ang. reactive nitrogen species) w przebiegu stresu oksydacyjnego. Dynamika tego procesu wydaje się jednak zależeć od rodzaju i intensywności wysiłku. Stężenia azotanów okazały się najniższe u osób obciążonych wysiłkiem anaerobowym odwrotnie niż przy wysiłku aerobowym, gdzie oznaczenia wykazały stężenia wysokie. Stężenia mleczanów były podobne, wzrastały niezależnie od rodzaju aktywności i utrzymywały się na podobnym poziomie w czasie odpoczynku. Nie stwierdzano istotnych różnic także w zakresie stężeń azotanów i TBARS (pochodne kwasu tiobarbiturowego) co wydaje się potwierdzać zależność utrzymujących się w spoczynku stężeń azotanów i peroksydacji lipidów od rodzaju wybranej aktywności fizycznej (aerobowej, anaerobowej). Jednakże wzrost intensywności wydaje się nie wykazywać dalszego wpływu na te parametry¹⁸⁴.

Wpływ na hemostazę

Układ hemostazy w istotnej mierze podlega wpływowi wysiłku. Opierając się na wynikach badań można stwierdzić, że ostry wyczerpujący wysiłek powoduje stan hiperkoagulacji, szczególnie u osób nie trenujących regularnie. Spowodowany jest on nadmiernym wytwarzaniem trombiny, zwiększoną agregacją płytek w wyniku aktywacji szlaku metabolicznego kwasu arachidonowego i zwiększonej produkcji tromboksanu TXA₂¹⁸⁵ oraz wzrostem aktywności czynników krzepnięcia, zwłaszcza czynnika VIII i von Willebranda. Po wysiłku obserwowano zwiększoną aktywność fibrynolityczną. Powyższe zmiany są jednak odwracalne. W czasie spoczynku parametry te wracają do normy lub nawet obniżają się w porównaniu do mierzonych u osób niewytrenowanych. Biorąc pod uwagę długoterminowy regularny wysiłek powyższe zmiany adaptacyjne mogą zmniejszać ryzyko wystąpienia incydentów sercowo–naczyniowych i zakrzepicy¹⁸⁶.

Obserwowana aktywacja płytek, biorąc pod uwagę niektóre dyscypliny sportu, zwłaszcza przy zbyt dużym wysiłku, może być nadmierna zwiększając niebezpiecznie agregację, a tym samym ryzyko wystąpienia incydentów zakrzepowych. Wyniki badań wskazywały na maraton i triathlon jako dyscypliny szczególnie narażające na zwiększone ryzyko incydentów zakrzepowych¹⁸⁷. Fizjologiczne procesy agregacji płytek nasilają się rano, tak więc ciekawą wydała się być zależność modyfikacji funkcji płytek od pory dnia uprawianej aktywności fizycznej. Pomiar agregacji płytek po wysiłku w godzinach porannych i wieczornych nie różniły się od wyników obserwowanych w spoczynku. Jak udowodniono w badaniach prowadzonych przez Ahmadizada i wsp. pora dnia treningu pozostaje bez wpływu na funkcję płytek¹⁸⁸.

Krótkotrwały wysiłek fizyczny skutkuje przejściowym wzrostem zdolności koagulacyjnych. Wyrazem tego jest skrócenie czasu częściowej tromboplastyny po aktywacji APTT i wzrost stężenia czynnika krzepnięcia VIII, a także wzrost stężenia kompleksów trombina-antytrombina i fragmentów 1+2 protrombiny. Zależy to od intensywności wysiłku i utrzymuje się po zaprzestaniu aktywności. Wysiłek miernej intensywności powoduje jedynie zwiększenie fibrynolizy bez współistnienia procesów krzepnięcia. W przypadku wysiłku o nadmiernej intensywności obserwowana jest wyżej wymieniona aktywacja krzepnięcia w połączeniu z fibrynolizą. Za nasilenie procesów fibrynolizy odpowiada wzrost stężeń tkankowego aktywatora plazminogenu (tPA) i obniżenie stężenia inhibitora 1 aktywacji plazminogenu (PAI-1). Dokładna zależność fibrynolizy od wysiłku wymaga jednak szczegółowych badań¹⁸⁹.

Wciąż w sferze badań pozostaje wpływ wieku, kondycji i aktywności fizycznej na funkcję płytek, jednak dotychczasowe wyniki wydają się potwierdzać zróżnicowanie ich liczby i

funkcji w odpowiedzi na trening i odpoczynek ¹⁹⁰.

1.3.3. Wysiłek fizyczny w wybranych schorzeniach układu sercowo–naczyniowego

Korzyści odnoszone z wysiłku fizycznego zależą od jego typu i intensywności wciąż pozostają przedmiotem dyskusji i wielu kontrowersji. Regularna aktywność o średniej intensywności utrzymuje prawidłową funkcję komórek śródbłonna i wspomaga działanie antyoksydacyjne, może więc pozytywnie oddziaływać na rozwój chorób sercowo–naczyniowych. Należy pamiętać jednak, że wyczerpujący wysiłek zwiększa metabolizm oksydacyjny ¹⁸⁶.

Pacjenci ze stwierdzonym upośledzeniem funkcji endotelium odnoszą relatywnie większą korzyść z wprowadzenia aktywności fizycznej. Należy jednak uwzględnić fakt trudności w dowiedzeniu poprawy czynności wyjściowo prawidłowej u osób zdrowych. Poprawa funkcji komórek śródbłonna wyraża się w zwiększonej biodostępności NO, jednak mechanizmy tej reakcji pozostają wciąż nieznanne. Podobnie dalszych badań wymaga opracowanie szczegółów optymalnego planu treningu oraz ocena czasu trwania korzystnych zmian zależnie od rodzaju treningu i warunków wyjściowych ¹⁸⁴.

Poza wymienianym wpływem na endotelium wspomnieć należy także o uwalnianych przez komórki mięśniowe miokinach wspomagających wzrost masy mięśniowej, angiogenezę i poprawiających metabolizm. Całość tych zmian funkcjonalnych i strukturalnych prowadzi do przebudowy i wzrostu masy mięśnia serca, przyspieszenia tętna, centralizacji krążenia, a także modulacji systemu immunologicznego i mechanizmów neurohormonalnych ¹⁹¹.

Krążenie wieńcowe

Wysiłek fizyczny zwiększa zapotrzebowanie na tlen. Podczas znacznej aktywności 6-krotny wzrost zapotrzebowania lewej komory serca skutkuje 5-krotnym wzrostem przepływu wieńcowego przy relatywnie niewielkim wzroście hemoglobiny u osób zdrowych. Zależność przepływu wieńcowego od zapotrzebowania mięśnia serca na tlen związana jest z wpływem neurohormonalnym, przekaźnictwem komórek endotelium i kardiomiocytów oraz okołonaczyniowej prężności tlenu, jak również czynnościowej rezerwy wieńcowej wynikającej ze stopnia zajęcia łożyska naczyniowego przez proces miażdżycowy ¹⁹².

Wysiłek fizyczny odpowiedzialny jest za wzrost przepływu wieńcowego także na drodze adaptacji mikrokrążenia poprzez zwiększenie średnicy włóscinek lub ich zagęszczenia oraz zmian reaktywności wazomotorycznej. Zmiana objętości tego przepływu

dokonywana jest przy udziale angiogenezy łącznie z przerostem mięśnia serca, tak więc zagęszczenie kapilarne pozostaje w granicach normy. Jednak po wysiłku obszar wymiany wieńcowej jest większy ze względu na zmiany w oporze naczyniowym oraz zmiany powierzchni wymiany i dystrybucji przepływu krwi. Jest to wynikiem zmian strukturalnych i zmian wazoreaktywności naczyń wieńcowych. Regularny trening zwiększa także reaktywność receptorów adrenergicznych, co potwierdza brak zmian w napięciu α - i β -adrenergicznym mięśniówki przy relatywnie niższych stężeniach krążących katecholamin. W odpowiedzi na rozciąganie następuje zmiana aktywności zależnych od potencjału kanałów wapniowych, co powoduje wzrost napięcia komórek mięśniowych ścian naczyń wieńcowych przy jednoczesnym wpływie wysiłku na rozszerzenie naczyń za pomocą zwiększania biodostępności tlenu azotu i zmniejszaniu stresu oksydacyjnego. Zatrzymanie progresji zmian miażdżycowych lub nawet ich częściowej regresji nie można na podstawie dotychczasowych badań wiązać jedynie z wprowadzeniem regularnej aktywności fizycznej, gdyż do protokołu zazwyczaj włączane są także inne zmiany trybu życia lub, w razie konieczności leczenie. Także modele zwierzęce nie przedstawiają jednoznacznych dowodów na wpływ wysiłku fizycznego na zmiany miażdżycowe. Możliwe jest, że korzystny wpływ aktywności fizycznej nie jest skutkiem bezpośredniego oddziaływania na ściany naczyń wieńcowych¹⁹³. Zwiększenie przepływu krwi spowodowane wysiłkiem może także zmniejszyć poziom lepkości, co przy udziale zwiększonych sił ścinających powoduje uwolnienie substancji wazodylatacyjnych (NO, PGI), a następnie zmniejsza przepuszczalność dla lipoprotein oraz adhezję leukocytów. W chwili obecnej nie ustalono optymalnej zmiany przepływu, która odpowiadałaby by nasileniu procesów pro- lub antymiażdżycowych. Potwierdzono ponadto zróżnicowany efekt powyższych zmian hemodynamicznych zależnie od rozmiaru naczynia oraz rodzaju tkanki¹⁹⁴.

Niewydolność serca

Niewydolność serca skutkuje pogorszeniem wytrzymałości mięśniowej i przesunięciem równowagi homeostatycznej w kierunku procesów katabolicznych. Jedną z przyczyn może być zaobserwowana u tych chorych zwiększona apoptoza komórek mięśni szkieletowych^{195 196}, a zmiany strukturalne w oczywisty sposób przekładają się na zmiany czynnościowe takie jak siła mięśniowa, wytrzymałość i aktywność ergoreceptorów. Ergoreceptory są to wolne zakończenia nerwowe w mięśniach wrażliwe na obserwowane podczas wysiłku podwyższenie stężeń kwasu mlekowego, potasu i prostaglandyn z towarzyszącym obniżeniem pH. Odpowiedzialne są one za hemodynamiczną, wentylacyjną i autonomiczną reakcję i utrzymanie równowagi między zapotrzebowaniem pracujących

mięśni a ilością dostarczanej krwi i wentylacją. W niewydolności serca zaburzenia metaboliczne i szybkie zmniejszenie pH powodują nadmierną aktywację ergoreceptorów prowadząc do wzmożonej odpowiedzi hemodynamicznej, autonomicznej i wentylacji limitujących wysiłek^{197,198,199}. Dotychczas zależność ta skutkowałą zaleceniem ograniczenia wysiłku u tych chorych. Wymienione zmiany i dalsze ograniczanie wysiłku skutkowałą obniżoną wytrzymałością, której efektem była zwiększona męczliwość i stopniowe ograniczanie samodzielnie wykonywanych podstawowych czynności istotnie pogarszające jakość życia chorych. Wyniki kolejnych badań klinicznych potwierdziły korzystny efekt dobrze dobranego treningu fizycznego, zarówno aerobowego jak i oporowego u osób z rozpoznaniem niewydolności serca^{200,201,202}.

Cukrzyca

Choroby związane z brakiem aktywności fizycznej, jak otyłość, insulinooporność oraz cukrzyca typu II, w ostatnich dziesięcioleciach osiągnęły stadium globalnej epidemii. W wielu badaniach klinicznych dowiedziono, że dobrze dobrany trening fizyczny jest najlepszą metodą pozwalającą na opóźnienie wystąpienia lub zapobieganie powikłaniom związanym z tymi zaburzeniami²⁰³. Zarówno krótkotrwałe jak i uprawiane regularnie ćwiczenia fizyczne pozwalają na obniżenie stężenia glukozy we krwi zwiększając insulinowrażliwość, zmniejszają ilość tkanki tłuszczowej oraz tym samym poprawiają funkcję układu sercowo–naczyniowego. Wobec poprawy stężeń glikemii wpisują się one w terapię pacjenta z zaburzeniami gospodarki węglowodanowej. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt możliwego wystąpienia hipoglikemii powysiłkowej w związku ze zwiększonym zużyciem glukozy w mięśniach poprzez regulację w górę jej transportu do pracujących komórek mięśniowych. Wobec powyższego należy dostosować dietę i stosowaną farmakoterapię do planowanych treningów²⁰⁴.

Z rozpoznaniem cukrzycy wiąże się także proces przewlekłego zapalenia oraz stresu oksydacyjnego modyfikowane przez prozapalne cytokiny jak białko C-reaktywne (CRP), TNFalfa czy interleukiny (6, 1beta)^{205,206}. Wpływ wysiłku fizycznego na stres oksydacyjny i procesy zapalne był przedmiotem wielu badań^{207,208}. Według ich wyników nagły ostry wysiłek przyczynia się do wzrostu stresu oksydacyjnego i nasilenia procesu zapalnego podobnie do przebiegu infekcji, podczas gdy podejmowanie regularnej aktywności skutkuje ich zmniejszeniem^{209,210}. Kolejnym mechanizmem zmniejszenia insulinooporności jest wzrost detoksykacji reaktywnych cząsteczek tlenu, ROS i zmniejszenie ich wytwarzania w wyniku regularnego uprawiania sportu^{211,212}.

Postulowano także pozytywny wpływ aktywności fizycznej w ciąży zmniejszający

insulinooporność i tym samym ryzyko rozwoju cukrzycy ciążowej. W chwili obecnej dane jednak są jeszcze niewystarczające, aby mogły być wprowadzone jako standardy kliniczne. Obecnie w toku jest kilka badań klinicznych ukierunkowanych na tę zależność²¹³.

Na podstawie powyższych danych można jednoznacznie stwierdzić, że żadna ze znanych interwencji terapeutycznych nie ma podobnej wysiłkowi fizycznemu skuteczności w redukcji ryzyka tak wielu chorób jednocześnie.

2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Według raportu WHO choroby niezakaźne są obecnie najczęstszą przyczyną zgonów na świecie. Choroby sercowo–naczyniowe w 2008 r. stanowiły 48% tej grupy, co oznacza ponad 36 milionów zgonów. Ponad 9 milionów chorych zmarło przed 60 r.ż., czyli w okresie największej aktywności życiowej i w większości przypadków zgonom tym można było zapobiec poprzez odpowiednią profilaktykę²¹⁴. U podstaw większości chorób sercowo–naczyniowych leży dysfunkcja śródbłonna, a także zaburzenia funkcji płytek krwi prowadzące do nadmiernej ich agregacji.

Wysiłek fizyczny jest jedyną, z założenia nie niosącą za sobą żadnych działań niepożądanych, formą profilaktyki zarówno pierwotnej, jak i wtórnej przeciwdziałającą równocześnie wystąpieniu tak wielu chorób jednocześnie. Jednakże w toku badań przeprowadzonych na grupach sportowców zawodowych udowodniono, że wysiłek nadmierny, zwłaszcza przekraczający intensywność wysoką, może istotnie zmniejszać korzyści płynące z regularnie uprawianego sportu, a niejednokrotnie przyczynia się do wzrostu ryzyka zachorowania.

Cele pracy:

1. Weryfikacja roli wysiłku fizycznego w sporcie uprawianym zawodowo w modyfikacji czynników ryzyka wystąpienia chorób sercowo–naczyniowych.
2. Ocena wpływu wysiłku fizycznego w sporcie uprawianym zawodowo na fenotyp wazodylatacyjnej funkcji śródbłonna
3. Ocena wpływu wysiłku fizycznego w sporcie uprawianym zawodowo na funkcję przeciwzapalną i antyagregacyjną śródbłonna
4. Ocena wpływu wysiłku fizycznego w sporcie uprawianym zawodowo na wybrane parametry aktywacji i agregacji płytek krwi
5. Weryfikacja hipotezy o braku wpływu wysiłku fizycznego na efekty działania kwasu acetylosalicylowego zarówno w kontekście aktywności przeciwplatekowej, jak i wpływu na fenotyp funkcji śródbłonna

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. BADANA GRUPA

Do badania włączono 79 zdrowych mężczyzn w wieku 18–40 lat (średnia wieku wynosiła 26,72 lat), których podzielono na dwie grupy:

1-osoby regularnie, zawodowo uprawiające sport o średniej i wysokiej intensywności; n=25 osób

2-osoby bez żadnej regularnej aktywności fizycznej; n=54 osoby

Badania przeprowadzono w Katedrze i Klinice Chorób Wewnętrznych, Zawodowych i Nadciśnienia Tętniczego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu w ramach projektu Wrovasc po uzyskaniu zgody komisji bioetycznej.

Grupę badaną stanowili zawodnicy wrocławskiej drużyny futbolu amerykańskiego "The Crew" oraz zawodnicy grupy seniorów zespołu ekstraklasy drużyny piłki ręcznej "Asbau Śląsk Wrocław", którzy codziennie przez około 90 min. wykonywali trening o średniej i wysokiej intensywności. Treningi składały się z ćwiczeń aerobowych średniej do wysokiej intensywności, jak i oporowych angażujących wszystkie główne grupy mięśniowe. Celem treningu było kształtowanie szybkości, refleksu, siły i wytrzymałości. Dodatkową aktywnością fizyczną o średniej i wysokiej intensywności były rozgrywki meczowe. Wszyscy sportowcy byli zdrowi, bez istotnej przeszłości chorobowej oraz obecnych schorzeń przewlekłych, nie stosujący przewlekłe żadnych leków, co mogłoby mieć istotny wpływ na wyniki wykonywanych badań.

Grupę kontrolną stanowili mężczyźni nie uprawiający żadnej dyscypliny sportu. Celem zebrania odpowiedniej liczby ochotników informacja o przeprowadzanych badaniach rozpowszechniana była w formie pisemnej na wrocławskich wyższych uczelniach. Warunkiem włączenia do badania był brak rozpoznanych chorób przewlekłych oraz niestosowanie żadnych leków przewlekłe. Dane powyższe były zobiektywizowane szczegółowym wywiadem oceniającym między innymi aktywność fizyczną, badaniem fizykalnym i wynikami badań dodatkowych wchodzących w skład protokołu badawczego. Szczególną uwagę zwrócono na wykluczenie osób z rozpoznaną cukrzycą, nadciśnieniem tętniczym, chorobami przebiegającymi z towarzyszącym przewlekłym procesem zapalnym oraz stosujących przewlekłe niesteroidowe leki przeciwzapalne bądź na nie uczulonych.

W przypadku obecności kryteriów wykluczających, osoba była poddawana szczegółowemu badaniu fizykalnemu z uwzględnieniem czynników ryzyka sercowo-naczyniowego, wykonywano także panel podstawowych badań biochemicznych z protokołu

badawczego. W dalszych analizach nie brano pod uwagę uzyskanych wyników. W przypadku ujawnienia odchyleń od normy proponowano badanemu dalszą diagnostykę i ewentualnie leczenie w klinice lub poradni przyklinicznej.

W przypadku ujawnienia czynników wykluczających w toku przeprowadzonych badań, uzyskane wyniki także były wyłączone z dalszych analiz *ex post*.

3.2. PROTOKÓŁ BADANIA

Po przeprowadzeniu badania przedmiotowego i podmiotowego od osób uczestniczących pobierano krew, następnie przeprowadzono badanie FMD i badanie propagacji fali tętna. Po zakończeniu badania uczestnik otrzymywał 4 tabletki kwasu acetylosalicylowego po 75,0 mg, z zaleceniem przyjmowania codziennie jednej tabletki wieczorem w odstępach 24 godzin przez kolejne 4 dni. W piątej dobie badany zgłaszał się ponownie do kliniki celem kontynuacji badań.

Drugie badanie rozpoczynało się od atraumatycznego (tzn. po jednokrotnym nakłuciu żyły przedramienia, bez użycia stazy) pobrania krwi na czczo, a następnie analogicznie wykonywano badanie FMD w warunkach wyjściowych i po dożylniej infuzji 16 g L-argininy. Podstawowe parametry biochemiczne nie były oznaczane ponownie.

3.3. BADANIA BIOCHEMICZNE

Po przeprowadzeniu badania podmiotowego i przedmiotowego od osób uczestniczących na czczo pobierano atraumatycznie krew do probówek Sarstedt S-Monovette®:

- 2,7 ml EDTA -do oznaczeń ADMA, SDMA i L-argininy
- 2,7 ml EDTA -do oznaczeń markerów stresu oksydacyjnego i metabolitów szlaku NO
- 2,7 ml (układ podciśnieniowy Monovette firmy Sarstedt z dodanym *ex tempore* cytrynianem sodu i 0,5 ml roztworu ASA (kwas acetylosalicylowy w postaci krystalicznej (Sigma-Aldrich) rozpuszczony w 0,9 % NaCl) do oznaczeń TXB2 i 6-keto-PGF-1 alfa
- 2,7 ml z dodanym cytrynianem sodu do oznaczenia prostanoidów
- 5 ml na skrzep do oznaczeń podstawowego panelu badań biochemicznych
- 7,5 ml do oznaczenia selektyny E, sVCAM1, sICAM1, VEGF, aldosteronu, insuliny.
- 9,0 ml EDTA do oznaczenia ADMA, selektyny P, PAI-1.
- krew pełną pobrano do probówki 2,7 ml i dodano antykoagulant hirudynę. Po dokładnym wymieszaniu przeprowadzano testy agregacji płytek krwi: ASPI test, ADP test, RISTO test. Zablockowanie aktywacji płytek krwi *ex vivo* możliwe było dzięki dodaniu do probówek *ex tempore* 500 µl 5 mM roztworu kwasu acetylosalicylowego w 0,9 % NaCl.

Wirowanie prowadzono przez 10 min., 1000 x g, a uzyskane osocza rozpipetowano do próbek typu eppendorf -1,5 ml, w objętościach odpowiednich do przeprowadzenia analiz.

Krew celem oznaczenia podstawowych parametrów biochemicznych zabezpieczona była w próbkach 5 ml na koagulant. Pobrana krew w ciągu maksymalnie 30 min była odwirowywana (10 minut, 1000 x g), a następnie supernatant był zamrażany w próbkach eppendorf w temp. -80 °C.

Do oznaczenia współczynnika tiolowego używano krwi pełnej z próbki EDTA przed odwirowaniem i zamrożeniem, według instrukcji producenta zestawu.

Kolejnymi krokami było:

1. oznaczenie metabolitów:

a) szlaku cyklooksygenazy: TXB2, 6-keto-PGF1alfa (testy immunoenzymatyczne fazy stałej ELISA firmy Assay Designs

b) szlaku tlenu azotu: ADMA, SDMA, L-argininy (metoda wysokorozdzielczej chromatografii cieczowej HPLC o progu wykrywalności na poziomie 0,05 µmol/l)

2. oznaczenie podstawowych parametrów biochemicznych: lipidogramu, stężenia kreatyniny, glukozy, mocznika, kwasu moczowego, sodu, potasu, hsCRP, GFR wielkość filtracji kłębuszkowej obliczano na podstawie reguły Cockrofta-Gaulta ($GFR \text{ ml/min} = (140 - \text{wiek}) * \text{masa ciała} / (72 * \text{stężenie kreatyniny [mg\%]})$)

3. oznaczenie markerów steru oksydacyjnego: dialdehydu malonowego MDA, kompleksów tiolowych (glutation w formie utlenionej i zredukowanej GSH, GSSG) oraz oznaczenie współczynnika GSH/GSSG (testy kolorymetryczne firmy BIOXYTECH).

Następnie porównano wszystkie parametry pomiędzy grupami w warunkach wyjściowych i po zastosowaniu kwasu acetylosalicylowego i L-argininy.

ADMA, SDMA, L-arginina

Stężenie L-argininy i jej metylowych pochodnych ADMA i SDMA w próbkach osocza oznaczono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem spektrofluorescencyjnym.

Badane próbki i roztwory wzorcowe po dodaniu 10 µmol/l L- homoargininy (standard wewnętrzny) a następnie po rozcieńczeniu, odbiałczaniu i odwirowaniu – oczyszczono techniką SPE (Solid Phase - Extraction) – na kationicie. Zastosowano kolumnienki SCX – 50 (Varian Inc., Palo Alto, USA). Otrzymane anality, przed zadozowaniem na kolumnę chromatograficzną poddano reakcji derywatyzacji z odczynnikiem OPA (o – ftaldialdehyd – 5,4 mg/ml w buforze boranowym o pH 8,4 i 0,4% v/v 2-merkaptioetanol).

Do rozdzielania chromatograficznego użyto kolumny Symmetry C- 18, 150 x 4,6 mm, 5µ

(Waters Co., Milford USA). Próbkę i standardy eluowano mieszaniną roztworu: bufor K - fosforanowy (50 mM; pH 6,6) i 12% acetonitrylu v/v. Przepływ eluentu ustalono na 1,1 ml/min. Temperatura kolumny wynosiła 35°C. Detekcję fluorescencyjną rejestrowano przy długości fal wzbudzenia 340 nm i emisji 450 nm.

Stężenia oznaczanych parametrów wyliczono przez porównanie współczynników L-argininy/L-homoargininy, ADMA/L-homoargininy i SDMA/L-homoargininy ze standardami o znanych stężeniach.

Analiza HPLC odbywała się na chromatografii firmy Varian, w skład którego wchodziły następujące moduły:

- pompa Pro Star 240,
- automatyczny podajnik próbek z funkcją mieszania reagentów Pro Star 410,
- detektor spektrofluorescencyjny Pro Star 363.

Pracą urządzeń i przebiegiem analizy chromatograficznej sterowano komputerowo z oprogramowania Star Chromatography Workstation ver. 6.3 ^{215,216}.

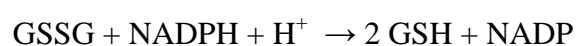
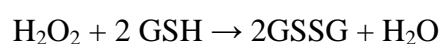
Markery stresu oksydacyjnego

Dialdehyd malonowy (MDA)

Jest to marker stresu oksydacyjnego w płynach ustrojowych, tkankach i komórkach, jeden z produktów peroksydacji lipidów. Bardzo niestabilne nadtlenki lipidów szybko biodegradują między innymi do 4-hydroksyaldehydów (HAE) i MDA. Te parametry peroksydacji oznaczono w osoczu EDTA (zastosowanie wersenianu sodowo-potasowego jako antykoagulantu) uzyskanym po wirowaniu krwi pełnej przez 15 min. przy 1000 x g, wykorzystując zestaw komercyjny Bioxytech LPO-586, 21012 Oxis Research, o czułości 0,5 nmol/ml próbki, zgodnie z protokołem producenta. Metoda oparta jest o reakcję kolorymetryczną, polega na wykorzystaniu reakcji chromogennej N-metylo-2-fenylindolizyny z MDA i HAE z wytworzeniem związku o maksimum absorpcji przy $\lambda = 586$ nm. Dodatek HCl blokuje chromogenną reakcję dla HAE, dając przy tym ekstynkcję odpowiadającą stężeniu MDA.

Współczynnik tiolowy (GSH/GSSG)

Stężenie zredukowanego glutationu może być zastosowane w ocenie poziomu stresu oksydacyjnego. Należy on do grupy najważniejszych antyoksydantów ustroju.



Iloraz stężeń glutationu zredukowanego (GSH) i glutationu utlenionego (GSSG) nazywamy współczynnikiem tiolowym. Jest to wskaźnik nasilenia stresu oksydacyjnego, służy także do oceny jego zmian w wyniku interwencji terapeutycznych.

Oznaczeń GSH/GSSH dokonano w krwi pełnej, pobranej na EDTA, wykorzystując komercyjny zestaw firmy Bioxytech GSH/GSSG-412, 21040 Oxis Reseach o czułości LLD w μM mieszaniny reakcyjnej oparty na teście kolorymetrycznym. Niestabilność zredukowanej formy glutationu powoduje jego szybkie utlenienie *ex vivo*. Aby wyodrębnić z próbki glutation utleniony pochodzący z tej reakcji używa się metody Guntherberga-Rosta celem eliminacji GSH. Tworzy on stabilne kompleksy z N-metylomaleinimidem. Ze względu na jednoczasową blokadę GR zmodyfikowano powyższą metodę stosując trifluorometylosulfonian 1-metylo-2-winylopirydyny (M2VP), który pozwala na szybką stabilizację GSH bez równoczesnego zablokowania GR.

Do oznaczeń pozostałych parametrów: lipidogramu, stężenia kreatyniny, glukozy, mocznika, kwasu moczowego, sodu, potasu, hsCRP, zastosowano standardowe metody laboratoryjne.

Prostacyklina i Tromboksan

Cząsteczka PGI_2 jest wysoce labilna (średni okres półtrwania *in vivo* 60 min, *in vitro* 3 min), wobec czego jej ilość ocenia się na oznaczając 6-keto-PGF-1-alfa, jej trwały metabolit który powstaje na drodze nieenzymatycznej hydratacji bezpośrednio z PGI_2 . Do oznaczenia stężenia 6-keto-PGF-1-alfa w osoczu, uzyskanym po odwirowaniu przy 1000 x g przez 15 min. krwi pobranej na 3,2% cytrynianu sodu w stosunku 1:10 i dodaniu 5mM roztworu kwasu acetylosalicylowego w 0,9% NaCl, wykorzystano komercyjny test firmy Assay Designs.

6-keto-Prostaglandin F1alfa. EIA o numerze katalogowym 900-004 oparty o immunoenzymatyczny test konkurencyjny. Intensywność reakcji barwnej mierzono w czytniku mikroplitek przy 405 nm z zastosowaniem filtra korekcyjnego 570 nm.

Podobnie do oszacowania produkcji tromboksanu TXA_2 ze względu na jego bardzo krótki okres półtrwania (37 s *in vivo*), wykorzystano stabilny metabolit: TXB_2 i 2,3-dinor TXB_2 . Do oznaczenia stężenia TXB_2 w osoczu cytrynianowym, pozyskanym jak wyżej, wykorzystano komercyjny test firmy Assay Design Thromboxane B_2 EIA o numerze katalogowym 900-002 oparty o immunoenzymatyczny test konkurencyjny. Intensywność reakcji barwnej mierzono w czytniku mikroplitek przy 405 nm z zastosowaniem filtra korekcyjnego 570 nm.

W testach konkurencyjnych czynnikiem detekcyjnym jest znakowany antygen,

konkurujący z próbą biologiczną o miejsca wiążące immobilizowanych przeciwciał.

E-selektyna i P-selektyna

Selektyny występujące na powierzchni leukocytów, płytek krwi i aktywowanych komórek śródbłonna, biorą zasadniczy udział w reakcji zapalnej. Na komórkach śródbłonna w wyniku aktywacji przez cytokiny IL-6 i TNF-alfa stwierdzono zwiększoną ekspresję E-selektyny odpowiedzialnej za przejście leukocytów z etapu toczenia się do ścisłej adhezji po aktywacji komórki.

P-selektyna, największa z selektyn występuje w ziarnistościach alfa płytek i w komórkach śródbłonna (ciałka Weibla-Pallade'a). Jej ekspresja indukowana jest cytokinami prozapalnymi przy aktywacji komórki (IL-1).

Stężenie E-selektyny w surowicy, uzyskanej po wirowaniu przez 15 min. przy 1000 x g krwi pobranej do probówek z aktywatorem krzepnięcia, oznaczano z wykorzystaniem komercyjnego zestawu ELISA: sESelectin/CD62E firmy R&D, DSLE00 o czułości <0,027ng/ml, opartego na immunoenzymatycznym teście kanapkowym, zgodnie z zaleceniami producenta. Intensywność reakcji barwnej mierzono w czytniku mikroplętek przy 450 nm z zastosowaniem filtra korekcyjnego 570 nm.

Stężenie P-selektyny w osoczu EDTA uzyskanym po wirowaniu krwi pełnej przez 15 min. przy 1000 x g oznaczano wykorzystując komercyjny zestaw ELISA: sPSelectin/CD62P firmy R&D, BBE6 o czułości <0,5ng/ml, opartego na immunoenzymatycznym teście kanapkowym, zgodnie z zaleceniami producenta. Intensywność reakcji barwnej mierzono w czytniku mikroplętek przy 450 nm z zastosowaniem filtra korekcyjnego 620 nm.

PAI-1

Inhibitor aktywatora plazminogenu 1 – PAI-1 jest silnym inhibitorem fibrynolizy, hamując przejście plazminogenu w plazminę. Uwalniany do osocza w postaci aktywnej, tworzy nieaktywne kompleksy z t-PA (tkankowym aktywatorem plazminogenu) i u-PA (urokinazowym aktywatorem plazminogenu)²¹⁷. Gra on istotną rolę w chorobach sercowo-naczyniowych (głównie przez inhibicję t-PA) oraz w migracji komórkowej i procesach związanych ze wzrostem i progresją nowotworu (głównie przez interakcję z vitronektyną i inhibicję u-PA)²¹⁸. Produkcję i uwalnianie PAI-1 modulują m.in. prozapalne cytokiny (IL-1, IL-6), endotoksyny, czynniki wzrostu. Aktywowane płytki krwi (w miejscach zakrzepu lub toczących się procesach zapalnych) wydzielają TGFbeta, co powoduje wzrost ekspresji PAI-1 w komórkach śródbłonna. Wysokie stężenia PAI współistnieją także z miażdżycą, nadciśnieniem tętniczym, zaburzeniami gospodarki węglowodanowej czy chorobą

niedokrwinną serca ^{219,220,221}. Inhibitor aktywacji plazminogenu (PAI-1) odgrywa także znaczącą rolę w stanach nadkrzepliwości i zakrzepicy wywołanej stresem oksydacyjnym.

Do pomiaru stężenia PAI-1 w osoczu EDTA uzyskanym po wirowaniu krwi pełnej przez 15 min. przy 1000 x g wykorzystano komercyjny zestaw ELISA: SerpinE1/PAI-1 firmy R&D, DSE100 o czułości <0,142ng/ml, oparty na immunoenzymatycznym teście kanapkowym, zgodnie z zaleceniami producenta. Intensywność reakcji barwnej mierzono w czytniku mikroplitek przy 450 nm z zastosowaniem filtra korekcyjnego 540 nm.

s-ICAM-1 i s-VCAM -1

ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1 – CD56) oraz VCAM-1 (vascular adhesion molecule-1 – CD106) są to immunoglobuliny należące do cząsteczek adhezyjnych. Stężenia ich rozpuszczalnej frakcji wzrastają w procesach zapalnych poprzedzonych aktywacją cytokinami (IL-1 beta, TNF-alfa, INF-gamma).

Do oznaczenia stężenia sICAM-1 w surowicy, uzyskanej po wirowaniu przez 15 min. przy 1000 x g krwi pobranej do probówek z aktywatorem krzepnięcia, użyto komercyjnego zestawu ELISA: sICAM/CD54 firmy R&D, DCD540 o czułości <0,254ng/ml, opartego na immunoenzymatycznym teście kanapkowym. Analizy wykonano zgodnie z zaleceniami producenta, mierząc intensywność reakcji barwnej w czytniku mikroplitek przy 450 nm z zastosowaniem filtra korekcyjnego 540 nm.

Stężenie sVCAM-1 w surowicy, uzyskanej po wirowaniu przez 15 min. przy 1000 x g krwi pobranej do probówek z aktywatorem krzepnięcia, oznaczano z wykorzystaniem komercyjnego zestawu ELISA: sVCAM-1 firmy R&D, DVC00 o czułości <1,26 ng/ml, opartego na immunoenzymatycznym teście kanapkowym, zgodnie z zaleceniami producenta. Intensywność reakcji barwnej mierzono w czytniku mikroplitek przy 450 nm z zastosowaniem filtra korekcyjnego 540 nm.

VEGF

Czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego – VEGF (ang. vascular endothelial growth factor) jest glikoproteiną specyficzną dla komórek śródbłonna biorącą udział w tworzeniu sieci naczyń krwionośnych embrionu, w czasie wzrostu, a także w angiogenezie po urazie oraz w tworzeniu krążenia obocznego. Ma on też właściwości zwiększające przepuszczalność naczyń. Funkcja nowotworzenia naczyń związana jest także z rozrostem nowotworowym, retinopatią cukrzycową czy zwyrodnieniem plamki żółtej związanym z wiekiem, a także w chorobach przebiegających z przewlekłym zapaleniem jak np. reumatoidalne zapalenie stawów.

Działanie VEGF następuje przez wiązanie receptorów kinaz tyrozynowych (RTKs): VEGFR-1 i VEGFR-2. Ze względu na swój udział w progresji nowotworu VEGF i jego receptory wydają się być dobrym celem terapeutycznym w terapii antynowotworowej²²².

Do oznaczenia stężenia VEGF w surowicy, uzyskanej po wirowaniu przez 15 min. przy 1000 x g krwi pobranej do probówek z aktywatorem krzepnięcia, użyto komercyjnego zestawu ELISA: VEGF firmy R&D, DVE00 o czułości <9 pg/ml, opartego na immunoenzymatycznym teście kanapkowym. Analizy wykonano zgodnie z zaleceniami producenta, mierząc intensywność reakcji barwnej w czytniku mikroplacytek przy 450 nm z zastosowaniem filtra korekcyjnego 570 nm.

3.4. OCENA FUNKCJI ŚRÓDBŁONKA:

Kolejnym krokiem było wykonanie badania FMD metodą ultrasonograficzną w warunkach spoczynku, po czym podawano wlew dożylny 16g L-argininy (roztwór w ampułkach 4g/20ml firmy Brown Chemical Co, Inc) – 4 ampułki w 100ml 0,9 % NaCl. Kolejne badanie FMD wykonywano po 15 minutach od zakończenia infuzji.

Rozkurcz naczyń indukowany przepływem – FMD (ang. flow mediated vasodilatation)

Ocena funkcji śródbłonna metodą FMD opiera się na ultrasonograficznym pomiarze zmian średnicy naczyń w warunkach spoczynku i po indukcji reaktywnego wzrostu przepływu w wyniku krótkotrwałego niedokrwienia po zacieśnieniu sfingomanometrem. Standardowa ocena opiera się na pomiarze średnicy tętnicy ramiennej w warunkach wyjściowych, a następnie po zadziałaniu bodźca indukującego reaktywne przekrwienie. Pomiarzy prowadzone są trzykrotnie w odstępach jednonminutowych. W opisywanych tu badaniach bodźcem było niedokrwienie ręki po zaciśnięciu mankietem sfingomanometru na wysokości przedramienia na czas pięciu minut. Średnicę naczyń oceniono ultrasonograficznie w prezentacji B i częstotści ultradźwięków przekraczającej 7 MHz. Badanie wykonuje się na czczo. Badania zostały wykonane przy użyciu aparatu usg SSD 500 marki ALOKA.

Każdy pomiar powtarzano czterokrotnie, po czym liczono średnią arytmetyczną każdej serii (pomiarów wyjściowych i trzech kolejnych w odstępach jednonminutowych). Celem było zminimalizowanie błędów pomiaru jednokrotnego. Wartości FMD w kolejnych trzech minutach były następnie przeliczane jako odsetek wartości średnicy tętnicy w pomiarze w warunkach wyjściowych.

$$\text{FMD \%} = [(A-B) / B] \times 100\%$$

A – średnica naczynia po przekrwieniu

B – średnica naczynia w warunkach wyjściowych

Wyniki badań doświadczalnych potwierdzają całkowitą zależność indukowanej zwiększonym przepływem rozszerzalności tętnicy ramiennej od śródbłonkowej produkcji tlenu azotu.

Szybkość propagacji fali tętna – PWV – pulse wave velocity

Następnie wykonywano pomiar szybkości propagacji fali tętna. Pomiar wykonywany był między dwoma z czterech punktów wyznaczonych nad tętnicą szyjną wspólną, tętnicą promieniową, tętnicą udową lub odpiszczelową.

Szybkość propagacji fali tętna określa stopień sztywności ściany naczyń tętniczych. Pomiar jest prosty i cechuje go duża powtarzalność. Wartości powyżej 10m/s uznaje się za wskaźnik obecności subklinicznych powikłań narządowych chorób sercowo–naczyniowych.

Do pomiaru prędkości rozchodzenia się fali tętna w układzie tętniczym wykorzystano aparat Complior. Pomiar wykonywany był między dwoma z czterech punktów wyznaczonych nad tętnicą szyjną wspólną, tętnicą promieniową, tętnicą udową lub odpiszczelową. Po zarejestrowaniu najlepszego sygnału aparat automatycznie oblicza prędkość fali tętna z zastosowaniem wzoru:

$$PWV = L / dt,$$

gdzie L oznacza znaną odległość między dwoma punktami pomiaru

dt - opóźnienie czasowe między początkiem rejestracji fali tętna tych dwóch punktach

Z modułem Younga (E) PWV wiąże równanie: $PWV = Eh/2rR$, gdzie h to grubość ściany tętnicy, R — promień wewnętrzny, a r — gęstość krwi.

Przed badaniem dla każdego pacjenta istnieje możliwość obliczenia wartości referencyjnych.

3.5 OCENA FUNKCJI PŁYTEK

Do badania funkcji płytek zastosowano wielokanałowy analizator typu Multiplate (firmy Dynabyte), który wykorzystuje metodę agregometrii impedancyjnej we krwi pełnej (MEA) bazując na tzw. wielokrotnej agregacji elektrodowej (podczas każdego pomiaru oznaczenie wykonywane jest podwójnie). W czasie procesu agregacji płytki krwi gromadzą się na dwóch elektrodach zanurzonych w próbce krwi, czego efektem jest zmiana impedancji (oporu elektrycznego). Ocena funkcji płytek krwi możliwa jest przy zastosowaniu odpowiednich agonistów płytkowych:

- agregacja zależna od cyklooksygenazy z wykorzystaniem kwasu arachidonowego –

ASPI test,

- aktywacja płytek przez ADP – ADP test,
- diagnostyka płytek z wykorzystaniem kolagenu COL test,
- TRAP test agregacja płytek krwi poprzez receptor trombiny z wykorzystaniem białka aktywującego receptor trombiny – TRAP-6),
- RISTO test (agregacja zależna od czynnika von Willebrandta, z wykorzystaniem ristocetyny jako aktywatora)

W pracy wykorzystano testy agregacji ASPI i ADP.

Wykonanie testów:

Inkubowano przez 3 min. 300 µl 0,9% NaCl ogrzanego wstępnie do 37°C oraz 300 µl próbki krwi pełnej o temperaturze 18-25°C. Czas mierzenia agregacji wynosił 6 min.

-ASPI test: (20ul agonisty-kwasu arachidonowego; Stężenie końcowe kwasu arachidonowego 0,5 mM)

-ADP test (20ul agonisty – ADP; Stężenie końcowe ADP 6,5 µM)

3.6. ANALIZA STATYSTYCZNA

Uzyskane wyniki badań poddano opracowaniu statystycznemu. We wszystkich grupach wyliczono wartości średnie (\bar{x}), odchylenia standardowe (SD) i standardowe błędy średniej (SEM). Po odrzuceniu hipotez o jednorodności wariancji i normalności rozkładu testami Shapiro Wilka i Levene; a stosowano testy nieparametryczne, U-Manna Whitney'a, natomiast po potwierdzeniu normalności rozkładu i jednorodności wariancji, statystyki parametryczne (test T-studenta). Badania w szeregach czasowych wykonywano zgodnie z zasadami wykorzystując nieparametryczne lub parametryczne testy analizy wariancji dla zmiennych powiązanych, z następczą analizą post-hoc testem Newman-Kaulsa, Korelacje obliczano analizując współczynnik Pearsona lub Spearmana, zależnie od charakteru analizowanych zmiennych.

Wartości $p < 0,05$ uznawano za znaczące statystycznie.

Do obliczeń wykorzystano program Statistica 10.0 StatSoft®.

4. WYNIKI

Do badań zgłosiło się 86 osób, jednak 7 z nich zostało wykluczonych ze względu na niespełnienie kryteriów włączających. Przyczyną niezakwalifikowania do badań było rozpoznanie nadciśnienia tętniczego, brak satysfakcjonującej współpracy ze strony badanego, a także rozpoznanie nowotworu nerki u jednego z badanych. W sumie do badań włączono 79 ochotników, z czego grupa zawodowo uprawiających sport liczyła 25 osób, natomiast nie uprawiających regularnie żadnej aktywności fizycznej składała się z 54 osób.

4.1. DANE DEMOGRAFICZNE I PARAMETRY BIOCHEMICZNE

Obie grupy były zbliżone pod względem charakterystyki demograficznej. Nie wykazano statystycznie istotnych różnic dotyczących wieku, częstości akcji serca, wartości ciśnienia tętniczego skurczowego, rozkurczowego i średniego a także wskaźnika masy ciała – BMI i wskaźnika talia-biodro – WHR.

Istotnie statystycznie grupy między sobą różniły się w zakresie ciśnienia tętna (w grupie niećwiczących średnio $46,40 \pm 2,03$ mmHg, u sportowców $41,45 \pm 1,89$ mmHg, $p=0,04$), stężenia CRP (średnia wyższa w grupie sportowców $3,52 \pm 0,23$ mg/l vs $2,40 \pm 0,37$ mg/l w grupie niećwiczących, $p=0,003$). Różnice odnotowano także w zakresie stężenia cholesterolu całkowitego, LDL i HDL (odpowiednio $161,04 \pm 5,93$ mg/dl u sportowców i $182,25 \pm 6,95$ mg/dl u niećwiczących dla $p=0,01$ oraz LDL: $82,28 \pm 5,25$ mg/dl u sportowców i $105,2 \pm 5,70$ mg/dl u niećwiczących $p=0,006$ i HDL $55,7 \pm 2,83$ mg/dl u sportowców i $48,73 \pm 1,58$ mg/dl u niećwiczących $p=0,003$). Profil lipidowy korzystniejszy był u sportowców – średnia stężenie cholesterolu całkowitego w tej grupie wynosiła $161,04 \pm 5,93$ mg/dl przy $182,25 \pm 6,95$ mg/dl w grupie niećwiczących, średnia stężenie LDL $82,28 \pm 5,25$ mg/dl vs $105,2 \pm 5,70$ mg/dl dla grupy niećwiczących, średnia stężenie HDL $55,7 \pm 2,83$ mg/dl vs $48,73 \pm 1,58$ mg/dl dla niećwiczących.

Istotna statystycznie różnica pojawiła się także w zakresie stężeń mocznika i jonów sodu, jakkolwiek różnice pomiędzy wartościami średnimi tych parametrów w obu podgrupach były niewielkie i mieściły się z zakresie referencyjnym normy.

Uzyskane ze stratyfikacji ryzyka dane przedstawia tabela 1.

Tabela 1.

Podstawowa charakterystyka demograficzna pacjentów uprawiających aktywność fizyczną i grupy kontrolnej włączonych do badania

Parametr (średnia±SEM)	Sportowcy N=25	niećwiczący N=54	p
wiek [lata]	23,52±0,37	24,58±0,55	0,07
HR [bpm]	69,00±2,43	72,08±1,94	0,21
SBP [mmHg]	122,91±1,94	126,78±2,57	0,07
DBP [mmHg]	81,45±1,84	81,21±1,89	1,00
MAP [mmHg]	95,27±1,65	96,12±1,96	0,55
PP [mmHg]	41,45±1,89	46,40±2,03	0,04
BMI [kg/m ²]	25,82±0,58	26,41±0,66	0,57
WHR [1]	0,95±0,0	0,938±0,01	0,29
TCh [mg/dl]	161,04±5,93	182,25±6,95	0,01
HDL [mg/dl]	55,7±2,83	48,73±1,58	0,03
LDL [mg/dl]	82,28±5,25	105,2±5,70	0,006
TG [mg/dl]	112,36±14,54	147,85±12,46	0,07
hsCRP [mg/l]	3,52±0,23	2,40±0,37	0,003
glukoza [mg/dl]	84,66±2,17	84,53±1,81	0,68
kreatynina [mg/dl]	0,96±0,02	0,96±0,02	0,70
GFR [ml/(min x 1,73m ²)]	147,48±4,98	130,44±8,19	0,07
Kwas moczowy [mg/dl]	6,15±0,26	6,18±0,23	0,98
Potas [mmol/l]	3,98±0,05	5,03±0,05	0,10
sód [mmol/l]	142,65±0,22	141,42±0,32	0,02
mocznik [mg/dl]	36,62±1,41	31,4±1,35	0,003

W grupie osób uprawiających sport zawodowo stwierdzono przeciętną dodatnią korelację między wartością skurczowego ciśnienia tętniczego, a BMI oraz stężeniami cholesterolu całkowitego i CRP ($R=0,4$, $p<0,05$) Wysoką korelację natomiast odnotowano między współczynnikiem WHR, a stężeniem triglicerydów ($R=0,7$ $p<0,05$).

Wśród badanych nie uprawiających aktywności fizycznej wykazano związek wartości skurczowego ciśnienia tętniczego ze współczynnikiem WHR i stężeniem triglicerydów ($R=0,4$) oraz stężeniem sICAM ($R=0,5$). WHR u tych osób okazał się także wysoko ujemnie korelować z VEGF ($R= -0,6$). U wszystkich badanych wykazano przeciętną ujemną korelację CRP i E selektyny ($R= -0,3$), dodatnią korelację stężeń PAI-1 ze stężeniami cholesterolu całkowitego, triglicerydów i LDL ($R= 0,38$) oraz ujemną przeciętną korelację ze stężeniem HDL ($R= -0,4$). Podobnie ujemną korelację HDL zanotowano w powiązaniu ze stężeniem P-selektyny u sportowców ($R= -0,4$).

Średnia szybkość propagacji fali tętna różniła się istotnie w pomiarach między tętnicami szyjną i promieniową ($p=0,04$ i średnia w grupie sportowców $9,61\pm 0,36$ m/s przy średniej grupy niećwiczących równej $10,6993\pm 0,34$ m/s) oraz szyjną i grzbietową stopy ($p=0,01$, średnia grupy sportowców była nieznacznie niższa i wynosiła $8,15\pm 0,19$ m/s, przy średniej grupy niećwiczących $8,91\pm 0,24$ m/s). Jednakże ocena szybkości fali tętna na odcinku szyjno-udowym, uznana za referencyjną w ocenie sztywności nie wykazała znaczących różnic pomiędzy analizowanymi podgrupami.

Tabela 2.

Propagacja fali tętna u pacjentów uprawiających aktywność fizyczną i grupy kontrolnej

Parametr (średnia±SEM)	Sportowcy N=25	niećwiczący N=54	p
PWV C-R [m/s]	9,61±0,36	10,69±0,34	0,04
PWV C-F [m/s]	9,51±0,24	9,90±0,32	0,67
PWV C-D [m/s]	8,15±0,19	8,91±0,24	0,01

U wszystkich badanych stwierdzono istnienie ujemnej przeciętnej korelacji między wyjściowymi stężeniami ADMA i SDMA, a szybkością fali tętna na odcinku szyjno-udowym ($R = -0,34$ i $R = -0,42$)

Ponadto u osób niećwiczących odnotowano ujemną korelację między stężeniem SDMA po zastosowaniu ASA, a szybkością propagacji fali tętna mierzonymi między tętnicami szyjną i promieniową ($R = -0,5$). U tych osób szybkość fali tętna na odcinku szyjno-udowym pozostawała w wysokiej dodatniej korelacji ze stężeniem VEGF przed jak i po stosowaniu ASA ($R = 0,6$). U sportowców natomiast wykazano jej przeciętną korelację ze stężeniem E-selektyny przed stosowaniem ASA ($R = 0,4$) i wysoką korelację po terapii ($R = 0,6$).

4.2. FENOTYP FUNKCJI ŚRÓDBŁONKA W UJĘCIU BIODOSTĘPNOŚCI TLENKU AZOTU

4.2.1. FMD

Wykazano istotną statystycznie różnicę porównując ze sobą obie grupy w warunkach wyjściowych zarówno przed terapią z zastosowaniem argininy ($p=0,049$) jak i po infuzji dożylniej ($p=0,01$). Po terapii ASA nie wykazano różnic istotnych statystycznie.

Nie wykazano także różnic istotnych statystycznie w obrębie badanych grup.

Ocena FMD w obu grupach przedstawiona została w tabeli 3.

Tabela 3. FMD w grupie sportowców i niećwiczących

FMD (średnia±SEM)	Sportowcy N=25	niećwiczący N=54	p
wyjściowo	9,62±0,70	8,05±0,59	0,049
wyjściowo + L-Arg	11,74±0,60	8,93±0,67	0,01
	p ns	p ns	
ASA	9,20±0,70	7,77±0,82	0,12
ASA+L-Arg	8,94±0,56	7,86±0,85	0,36
	p ns	p ns	

U wszystkich badanych wykazano przeciętną korelację ujemną pomiędzy stężeniem P-selektyny po zastosowaniu ASA, a reaktywnością tętnicy ramiennej w badaniu FMD ($R= -0,34$). Ponadto wykazano istnienie korelacji dodatniej między FMD po L-argininie, a stężeniem MDA ($R=0,37$), u osób niećwiczących współczynnik tej korelacji był wyższy i wynosił 0,47.

4.2.2. L-arginina, ADMA, SDMA

Nie występowały istotne statystycznie różnice w zakresie stężeń L-argininy, ADMA i SDMA zarówno w obrębie danej grupy w zależności od przyjmowania ASA, jak i pomiędzy badanymi grupami porównanymi ze sobą w warunkach wyjściowych i po stosowaniu ASA.

Tabela nr 4.

L-arginina, ADMA i SDMA w warunkach wyjściowych oraz po zastosowaniu ASA.

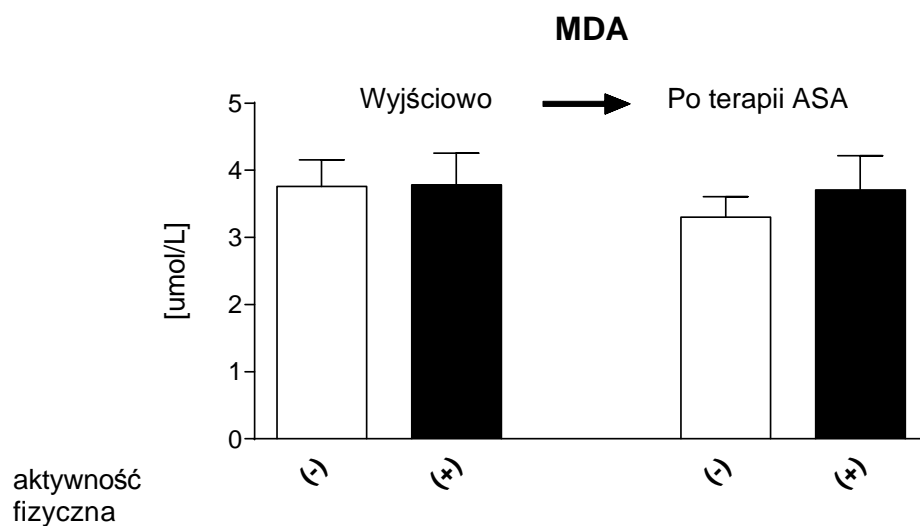
Parametry w obu grupach	Sportowcy	niećwiczący	p
Wyjściowo i po zastosowaniu ASA	N=25	N=54	
L-arginina (μmol/l)			
Wyjściowo	60,33±3,83	65,07±2,47	ns
Po ASA	68,37±5,37	63,73±2,73	ns
	p=0,16	p=0,87	
ADMA (μmol/l)			
Wyjściowo	0,42±0,016	0,42±0,01	ns
Po ASA	0,42±0,02	0,41±0,01	ns
	p=0,35	p=0,33	
SDMA (μmol/l)			
Wyjściowo	0,46±0,016	0,47±0,02	ns
Po ASA	0,47±0,018	0,51±0,03	ns
	p=0,81	p=0,1	

U wszystkich badanych odnotowano przeciętną ujemną korelację po zastosowaniu ASA pomiędzy dialdehydem malonowym (MDA) a L-argininą (R= -0,3), MDA a SDMA (R= -0,38) oraz SDMA, a E-selektyną (R= -0,3). Ujemna korelacja między SDMA i MDA po zastosowaniu ASA pojawiła się w większym stopniu u osób niećwiczących z R=-0,57. U tych osób stwierdzono także występowanie związku między stężeniami L-argininy i P-selektyny przed terapią (R=0,5) i ADMA po stosowaniu ASA i agregacji na kwas arachidonowy (R=0,5).

U sportowców stężenie L-argininy korelowało przeciętnie ujemnie z wartością współczynnika tiolowego (R= -0,4), w warunkach wyjściowych stężenie E-selektyny przeciętnie ujemnie z ADMA (R= -0,33), a z SDMA zarówno przed, jak i po ASA (R= -0,41 i R= -0,34). Ponadto u sportowców odnotowano zależność stężeń ADMA w warunkach wyjściowych i kwasu moczowego (R=0,34).

4.3. MARKERY STRESU OKSYDACYJNEGO

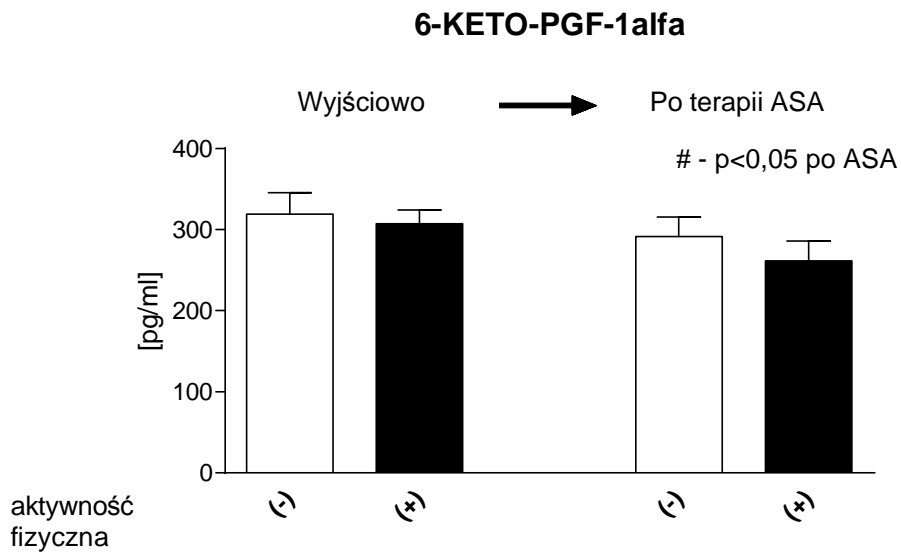
4.3.1. MDA



Rycina nr 3. Porównanie stężeń MDA w warunkach wyjściowych i po zastosowaniu ASA w obu grupach

Nie odnotowano istotnych różnic w stężeniach malonyldilaldehydu MDA w obu grupach w warunkach wyjściowych i po zastosowaniu ASA. Średnia dla grupy sportowców przed zastosowaniem ASA wynosiła $3,78 \pm 0,46 \mu\text{mol/L}$, po ASA $3,70 \pm 0,51 \mu\text{mol/L}$, a dla grupy niećwiczących odpowiednio $3,75 \pm 0,39 \mu\text{mol/L}$ i $3,30 \pm 0,30 \mu\text{mol/L}$.

4.3.2 6-keto-PGF-1alfa



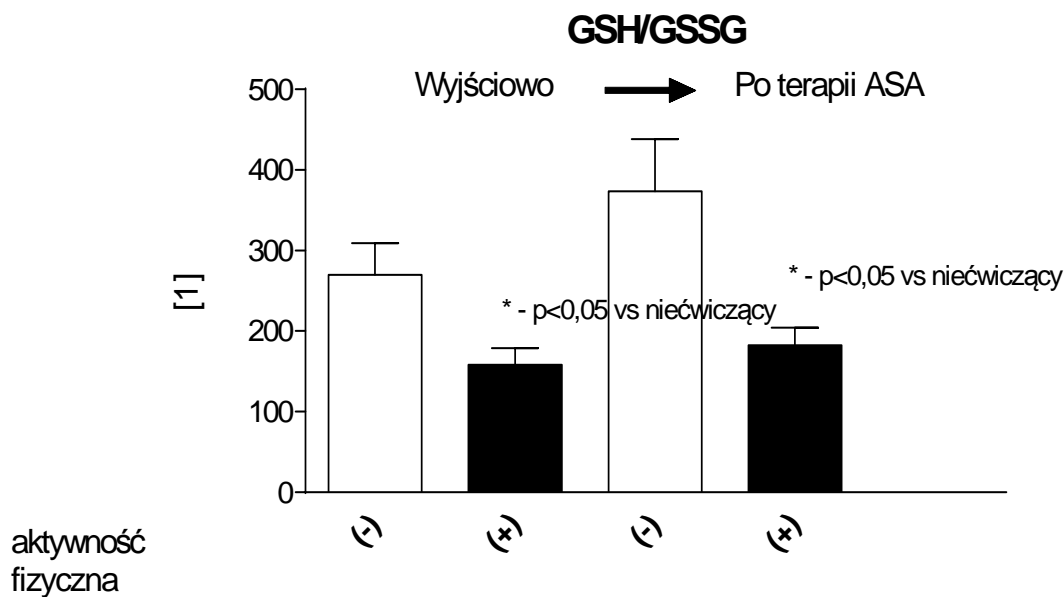
Rycina nr 4. Porównanie stężeń 6-keto-PGF-1alfa w warunkach wyjściowych i po zastosowaniu ASA w obu grupach

W zakresie stężeń 6-keto-PGF-1alfa stwierdzono istotne statystycznie różnice w grupie niećwiczących w warunkach wyjściowych w porównaniu do wartości odnotowanych po stosowaniu ASA. Wartości średnie wynosiły odpowiednio $319,26 \pm 26,49$ pg/ml przed stosowaniem ASA i $291,58 \pm 24,02$ pg/ml po przyjęciu ASA, $p = 0,04$.

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w stężeniach 6-keto-PGF-1alfa w grupie sportowców w warunkach wyjściowych (średnia równa $307,09 \pm 17,34$ pg/ml) i po zastosowaniu ASA (średnia równa $261,33 \pm 24,99$ pg/ml).

W zakresie stężeń 6-keto-PGF-1alfa grupy sportowców porównywanych z grupą niećwiczących w warunkach wyjściowych i po zastosowaniu kwasu acetylosalicylowego nie odnotowano istotnych statystycznie różnic.

4.3.3 współczynnik tiolowy

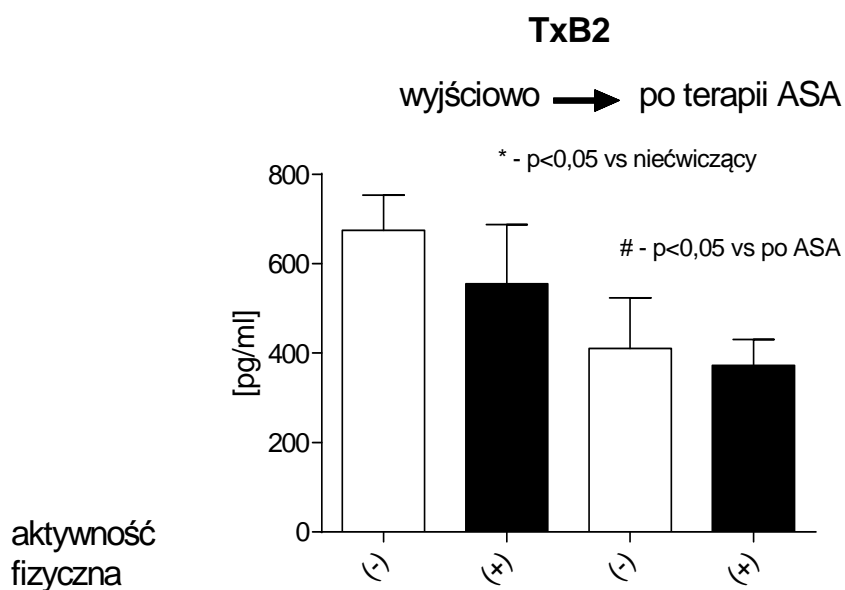


Rycina nr 5. Porównanie stężeń GSH/GSSG w warunkach wyjściowych i po zastosowaniu ASA w obu grupach

Między obiema grupami w warunkach wyjściowych i po zastosowaniu ASA stwierdzono występowanie istotnych statystycznie różnic w wartościach współczynnika tiolowego. W warunkach wyjściowych średnia w grupie sportowców wynosiła $158,03 \pm 20,74$ vs $269,68 \pm 39,72$ w grupie niećwiczących przy $p=0,04$, natomiast po zastosowaniu ASA w grupie sportowców średnia wynosiła $182,32 \pm 21,94$ vs $373,73 \pm 64,95$ dla niećwiczących przy $p=0,02$.

Nie stwierdzono znamienych różnic w wartościach współczynnika tiolowego porównując między sobą wartości mierzone w poszczególnych grupach przed i po zastosowaniu ASA.

4.3.4. TXB2



Rycina nr 6. Porównanie stężeń TXB2 w warunkach wyjściowych i po zastosowaniu ASA w obu grupach

Wykazano istotną statystycznie różnicę w zakresie stężeń TXB2 w obu grupach przed zastosowaniem kwasu acetylosalicylowego, odpowiednio średnie wynosiły dla grupy sportowców $555,67 \pm 131,73$ pg/ml, a dla grupy niećwiczących $675,28 \pm 78,36$ pg/ml; $p=0,02$.

Porównując wyniki po terapii ASA nie potwierdzono istnienia istotnych różnic (średnia grupy sportowców po ASA wynosiła $373,21 \pm 57,48$ pg/ml).

W grupie niećwiczących istotna była różnica stężeń TXB2 między stężeniem mierzonym w warunkach wyjściowych, a pomiarem po stosowaniu ASA. Średnie wynosiły $675,28 \pm 78,36$ pg/ml i $410,36 \pm 113,56$ pg/ml ($p=0,00003$)

W zakresie stężeń parametrów stresu oksydacyjnego stwierdzono następujące korelacje:

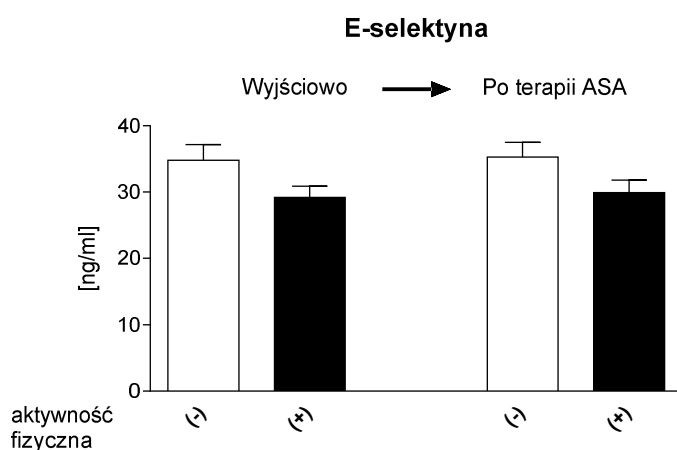
W obu grupach przed zastosowaniem ASA występowała przeciętna dodatnia korelacja między wartością współczynnika tiolowego, a stężeniami cytokin sICAM i sVCAM (odpowiednio $R=0,4$ i $R=0,3$), a także przeciętna dodatnia korelacja między sICAM a stężeniem TXB2 ($R=0,4$) stwierdzona także w grupie sportowców ($R=0,35$).

W grupie niećwiczących zanotowano ujemną przeciętną korelację między współczynnikiem tiolowym, a PAI-1 ($R= -0,49$).

W grupie sportowców ujawniono wysoką dodatnią korelację między stężeniem MDA a E-selektyny po terapii ASA.

4.4.CHARAKTERYSTYKA FUNKCJI ŚRÓDBŁONKA W ASPEKCIE AKTYWNOŚCI PROZAPALNEJ I ANGIOGENNEJ

4.4.1. E-selektyna



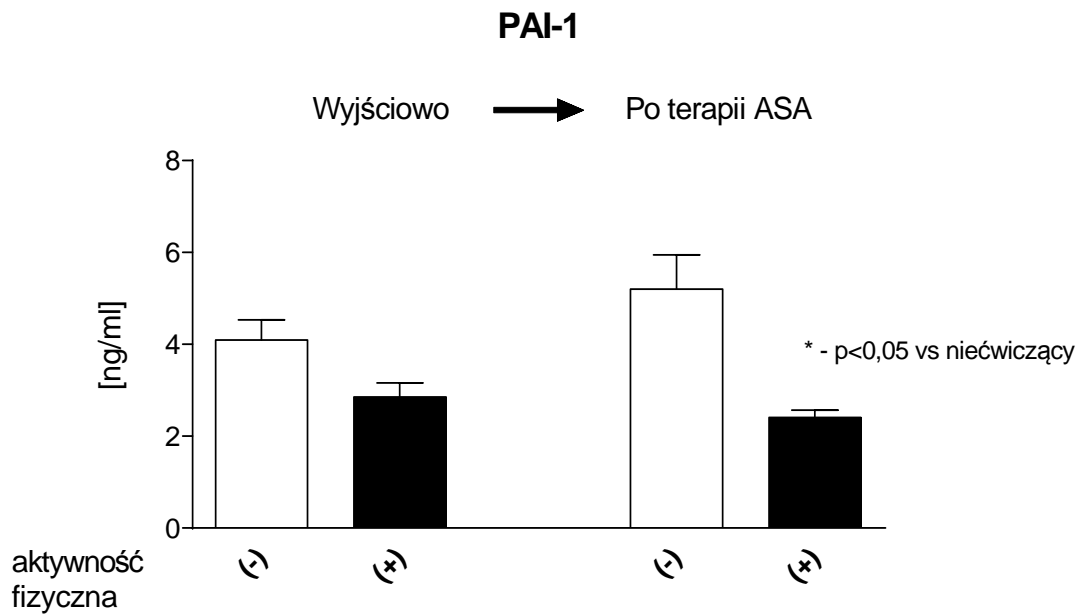
Rycina nr 7. Porównanie stężeń E-selektyny w warunkach wyjściowych i po zastosowaniu ASA w obu grupach

Nie odnotowano istotnych statystycznie różnic w stężeniach E-selektyny w obu grupach w warunkach wyjściowych i po stosowaniu ASA.

W grupie sportowców średnie przedstawiały się następująco: $29,22 \pm 1,66$ ng/ml vs $29,92 \pm 1,89$ ng/ml.

W grupie niećwiczących średnie przedstawiały się następująco: w warunkach wyjściowych $34,82 \pm 2,24$ ng/ml vs $35,28 \pm 2,21$ ng/ml.

4.4.2 PAI-1



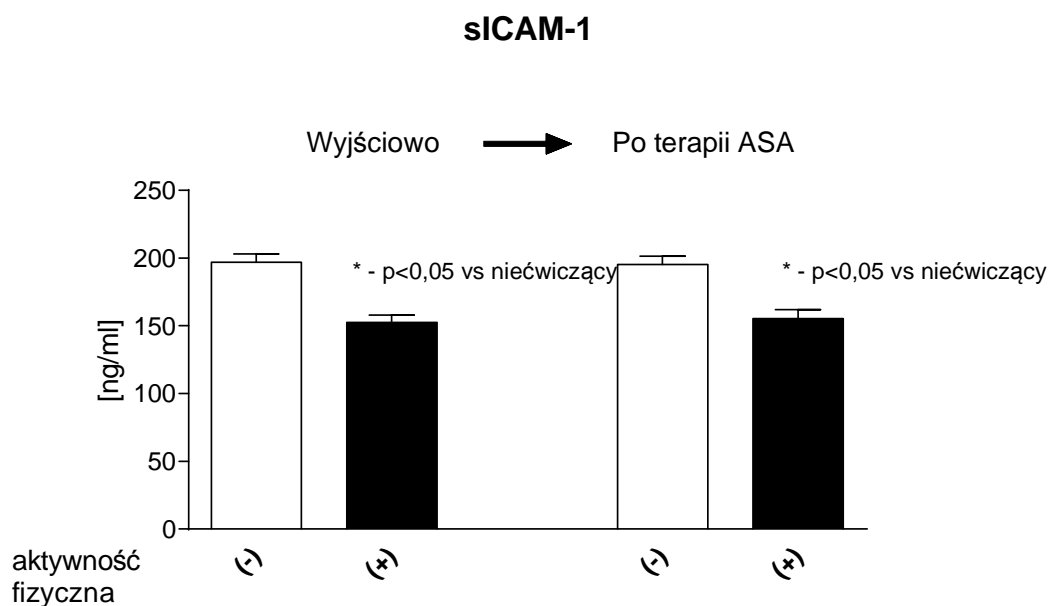
Rycina nr 8. Porównanie stężeń PAI-1 w warunkach wyjściowych i po zastosowaniu ASA w obu grupach

W zakresie stężeń PAI-1 między obiema grupami w warunkach wyjściowych nie stwierdzono różnic statystycznie istotnych. Nie odnotowano ich także w odniesieniu do wartości porównywanych przed i po stosowaniem ASA w poszczególnych grupach.

Średnie w warunkach wyjściowych przedstawiały się następująco: w grupie sportowców $2,84 \pm 0,3$ ng/ml vs $4,09 \pm 0,43$ ng/ml w grupie niećwiczących.

Porównując stężenia między grupami po zastosowaniu ASA różnice okazały się istotne. Średnia w grupie sportowców wynosiła $2,40 \pm 0,16$ ng/ml, a w grupie niećwiczących $5,20 \pm 0,74$ ng/ml. $p=0,0004$

4.4.3 s-ICAM -1

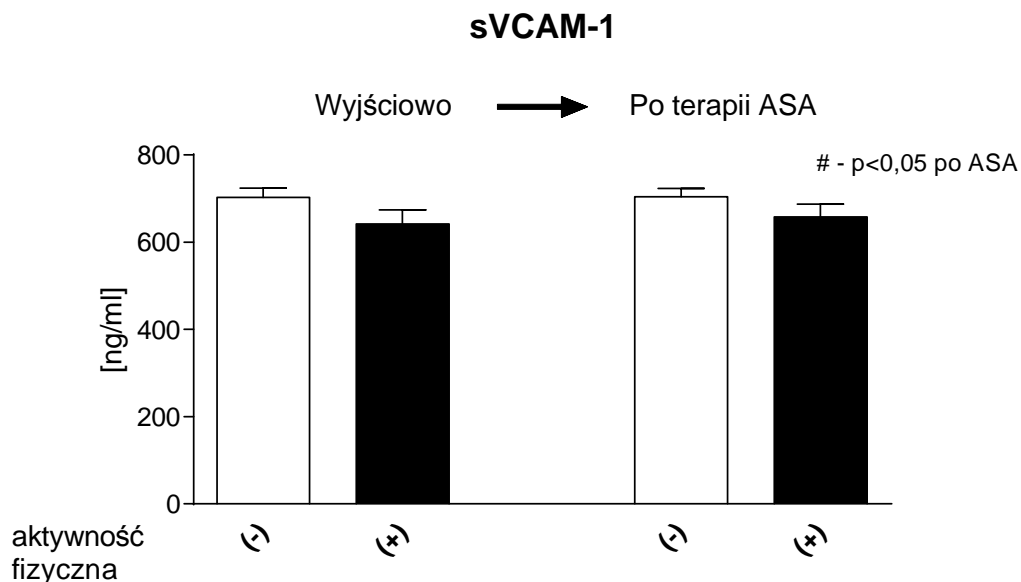


Rycina nr 9. Porównanie stężeń sICAM-1 w warunkach wyjściowych i po zastosowaniu ASA w obu grupach

Stężenie sICAM-1 porównywane w poszczególnych grupach przed i po terapii ASA nie różniło się statystycznie.

W zakresie stężeń porównywanych pomiędzy grupą sportowców i niećwiczących było ono istotnie wyższe w grupie niećwiczących. W warunkach wyjściowych $p=0,000011$, po zastosowaniu ASA $p=0,000117$, a średnia wynosiła odpowiednio $152,68 \pm 5,34$ ng/ml i $155,61 \pm 6,39$ ng/ml dla grupy sportowców i $197,03 \pm 6,24$ ng/ml i $195,38 \pm 6,12$ ng/ml w grupie niećwiczących.

4.4.4. sVCAM-1



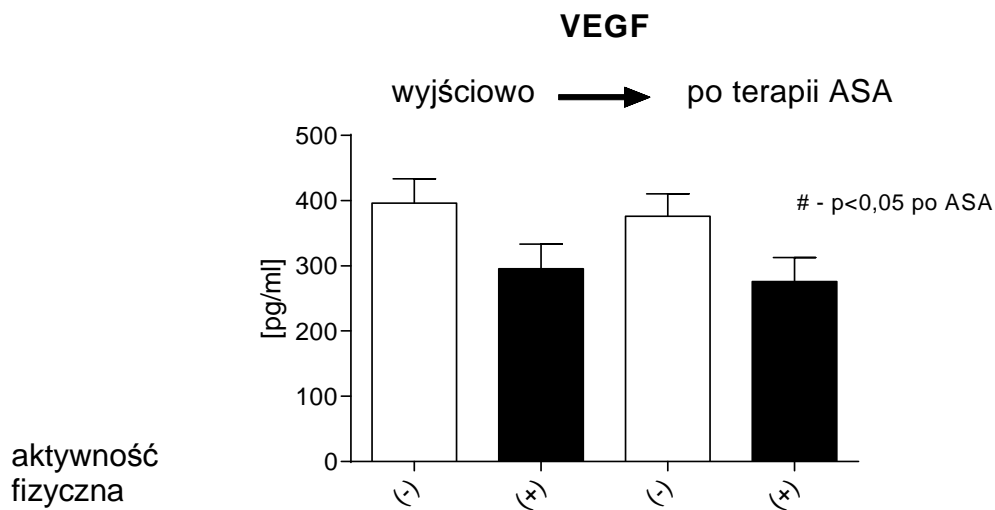
Rycina nr 10. Porównanie stężeń sVCAM-1 w warunkach wyjściowych i po zastosowaniu ASA w obu grupach

Porównanie stężeń sVCAM-1 między obiema grupami w obu przypadkach nie wykazało istotnych różnic.

Odnotowano je w przypadku porównania stężeń sVCAM-1 w grupie sportowców przed stosowaniem kwasu acetylosalicylowego i po terapii; średnie wynosiły: $641,62 \pm 33,05$ ng/ml w warunkach wyjściowych i $657,89 \pm 29,74$ ng/ml po ASA ($p=0,02$)

W grupie niećwiczących średnie wynosiły odpowiednio $703,16 \pm 21,02$ ng/ml w warunkach wyjściowych oraz $704,35 \pm 19,57$ ng/ml po zastosowaniu ASA.

4.4.5. VEGF



Rycina nr 11. Porównanie stężeń VEGF w warunkach wyjściowych i po zastosowaniu ASA w obu grupach

Stężenia VEGF porównywane o obrębie obu grup nie różniły się istotnie.

Różnica taka pojawiła się przy porównaniu ze sobą stężeń VEGF w obrębie grupy sportowców. Średnia przed stosowaniem ASA wynosiła $295,69 \pm 37,87$ pg/ml i $275,85 \pm 36,82$ pg/ml po, $p=0,02$

W grupie niećwiczących wartości średnich przedstawiały się następująco $395,88 \pm 37,49$ pg/ml w warunkach wyjściowych i $376,14 \pm 34,52$ pg/ml po ASA.

U wszystkich badanych w warunkach wyjściowych zaobserwowano przeciętną dodatnią korelację E-selektyny z:

-P-selektyną ($R=0,34$),

-PAI-1 ($R=0,4$)

-sICAM ($R=0,39$)

Oraz ujemną z VEGF ($R=-0,27$). A także PAI z sICAM przy $R=0,3$

Podobne korelacje także w warunkach wyjściowych odnotowano w grupie sportowców:

-E-selektyna z P-selektyną ($R=0,5$),

-E-selektyna z PAI-1 ($R=0,55$)

-E-selektyna z sICAM ($R=0,4$)

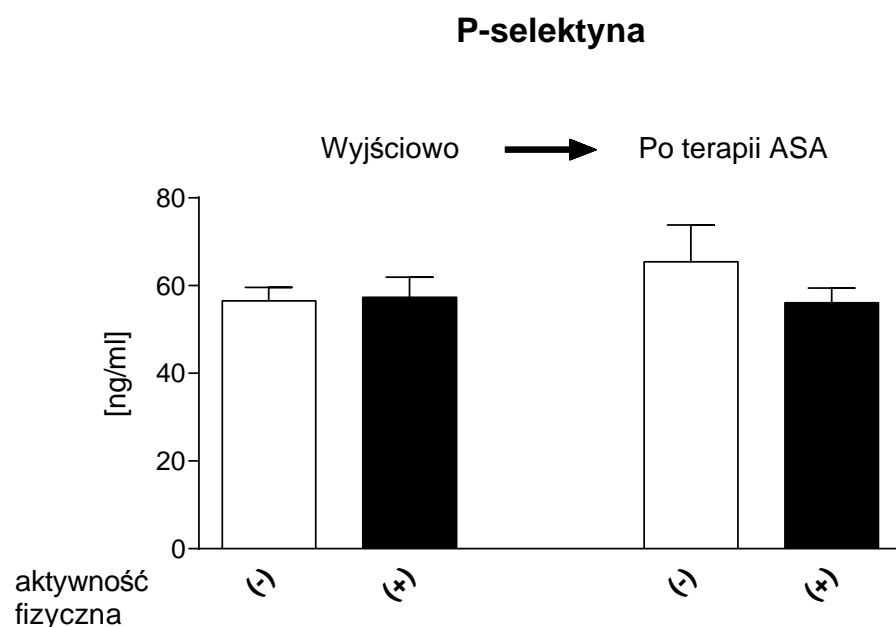
-E-selektyna z VEGF ($R=-0,4$).

-PAI z sICAM ($R=0,4$)

Po terapii ASA u wszystkich badanych powtórnie stwierdzono korelacje E-selektyny z sICAM ($R=0,49$) i PAI-1 z sICAM ($R=0,48$), które odnotowano także w grupie sportowców (E-selektyny z sICAM ($R=0,63$), PAI-1 z sICAM ($R=0,4$)). Ponadto u wszystkich badanych oraz w grupie sportowców stwierdzono istnienie korelacji przeciętnych dodatnich P-selektyny i PAI (odpowiednio $R=0,46$ i $R=0,5$) oraz sICAM i sVCAM (odpowiednio $R=0,4$ i $R=0,39$)

4.5.CHARAKTERYSTYKA WYBRANYCH PARAMETRÓW CZYNNOŚCI PŁYTEK KRWI

4.5.1 P-selektyna



Rycina nr 12. Porównanie stężeń P-selektyny w warunkach wyjściowych i po zastosowaniu ASA w obu grupach

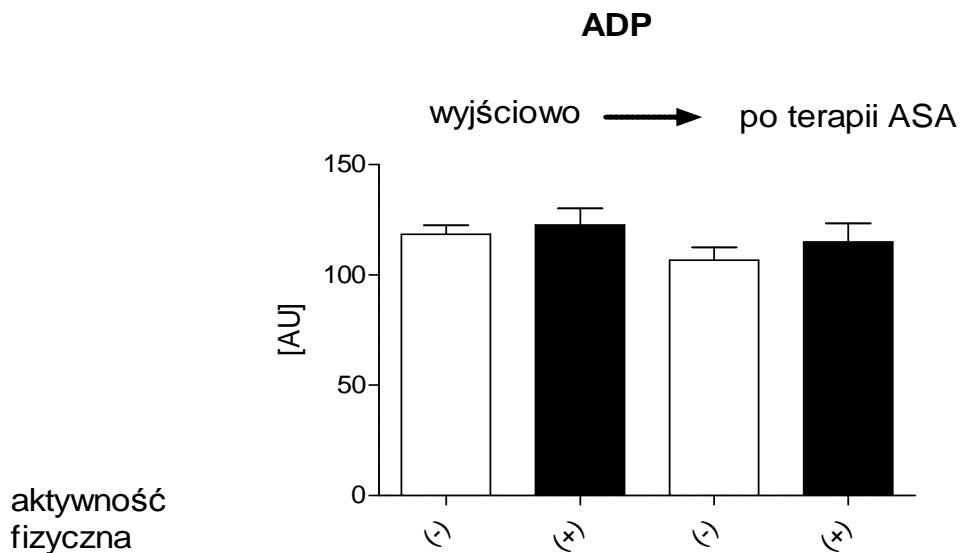
Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w stężeniach P-selektyny w obu grupach w warunkach wyjściowych i po zastosowaniu ASA.

Średnia przed stosowaniem ASA w grupie sportowców wynosiła $57,29 \pm 4,60$ ng/ml i $56,13 \pm 3,30$ ng/ml po terapii

W grupie niećwiczących średnie przedstawiały się następująco $50,56 \pm 3,06$ ng/ml (warunki wyjściowe) i $65,42 \pm 8,41$ ng/ml (po ASA)

4.5.2 Parametry agregacji indukowanej przez ADP

W grupie niećwiczących wykazano istnienie przeciętnych dodatnich korelacji w zakresie stężeń P-sektyny i PAI-1 ($R=0,47$) oraz P-sektyny i sICAM ($r=0,49$).



Rycina nr 13. Porównanie agregacji ADP w warunkach wyjściowych i po zastosowaniu ASA w obu grupach

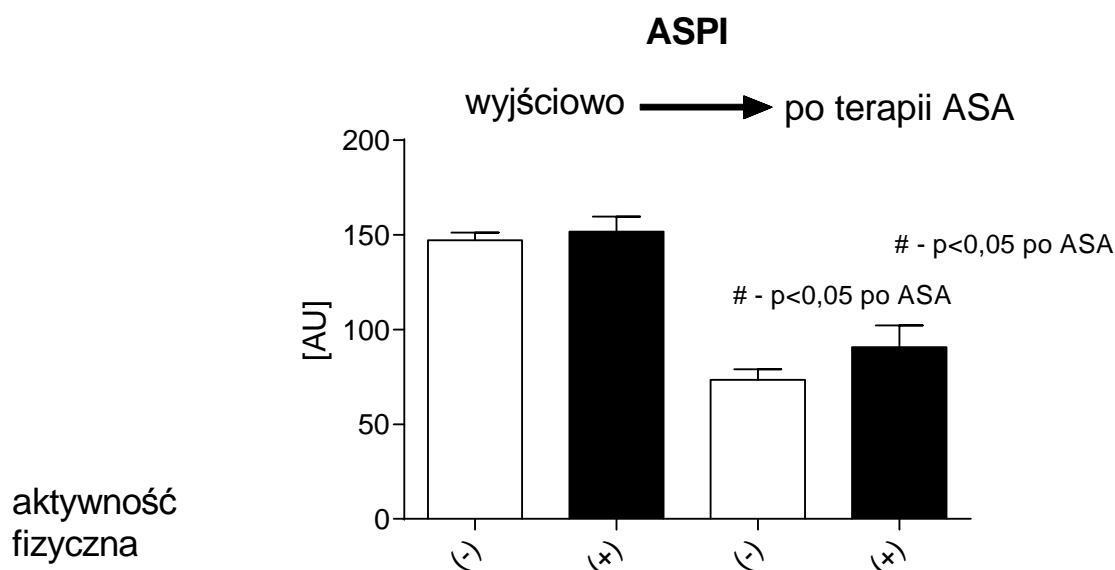
Nie stwierdzono różnic w wynikach pomiarów agregacji ADP w obu grupach przed stosowaniem ASA i po, a także między poszczególnymi grupami.

Średnie przedstawiały się następująco:

Grupa sportowców: $122,73 \pm 7,39$ AU wyjściowo vs $114,88 \pm 8,48$ AU po ASA

Grupa niećwiczących : wyjściowo $118,39 \pm 4,07$ AU vs $106,63 \pm 5,79$ AU

4.5.3 parametry agregacji indukowanej kwasem arachidonowym (ASPI test)



Rycina nr 14. Porównanie agregacji ASPI w warunkach wyjściowych i po zastosowaniu ASA w obu grupach

Porównanie ze sobą grup w obu punktach badania nie wykazało istnienia istotnych różnic. Różnice takie odnotowano w zakresie średnich w grupie niećwiczących przed stosowaniem ASA ($p=0,0000$ $147,11 \pm 4,08$ AU) i po zastosowaniu kwasu acetylosalicylowego ($73,37 \pm 5,69$ AU).

Podobna zależność wystąpiła w grupie sportowców. W tej grupie średnia w warunkach wyjściowych wynosiła $151,81 \pm 7,72$ AU, po ASA $90,8 \pm 11,47$ AU, $p=0,002$

Parametry agregacji korelowały dodatnio ze stężeniem VEGF: w stopniu przeciętnym z ASPI ($R=0,4$), wysokim z ADP ($R=0,5$).

We wszystkich przypadkach zależność dotyczyła grupy po zastosowaniu ASA.

5. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

W niniejszej pracy badano wpływ regularnej aktywności fizycznej uprawianej zawodowo na funkcję śródbłónka i wybrane parametry płytek krwi. W ocenie pominięto funkcję komórek śródbłónka jako bariery mechanicznej koncentrując się na ich funkcji wydzielniczej. Uzyskane wyniki pozwoliły na potwierdzenie korzystnego wpływu regularnego wysiłku fizycznego na czynniki mające znaczenie w ocenie ryzyka sercowo-naczyniowego zarówno w ujęciu biochemicznym, jak i czynnościowym. Nie wykazano natomiast, postulowanej w dostępnej literaturze zwiększonej agregacji płytek krwi wywołanej nadmiernym wysiłkiem fizycznym. Jednakże jednoznaczna ocena agregacji wymagałaby przeprowadzenia testów agregacji indukowanej kolagenem i zależnej od trombiny.

Brak stwierdzonych różnic w zakresie charakterystyki demograficznej świadczy o jednorodności porównywanych grup. Odnotowywane różnice w zakresie parametrów biochemicznych stosowanych do oceny ryzyka sercowo-naczyniowego, funkcji śródbłónka oraz płytek krwi mogą zatem być uznane za wtórne do działania wysiłku fizycznego będącego czynnikiem różnicującym obie grupy.

Interesującą obserwacją są wyższe wartości ciśnienia tętna odnotowane w grupie osób niećwiczących w porównaniu do sportowców, przy jednoczesnym braku różnic w zakresie ciśnienia skurczowego i rozkurczowego. Ciśnienie tętna, zgodnie z wytycznymi ESC/ESH²²³ jest uznawane za jeden z ważniejszych czynników przepowiadających wystąpienie incydentu sercowo-naczyniowego u osób bezobjawowych, w prospektywnej obserwacji, przy czym znaczenie tego czynnika ryzyka wydaje się wzrastać wraz z wiekiem. Podobne zmniejszenie wartości średnich ciśnienia tętna otrzymano w innych badaniach wiążących wysiłek fizyczny z oceną ciśnienia tętna^{224,225}. Odnotowane różnice świadczą mogą pośrednio o mniejszym oporze obwodowym łożyska naczyniowego sportowców, przy zachowanej dużej pojemności minutowej serca. Ciekawym zatem jest, czy odnotowana w niniejszej pracy różnica wskazywać będzie na wyższe ryzyko u osób niećwiczących, co wymaga jednak prospektywnej obserwacji. W wielu badaniach wykazano, że ciśnienie tętna jest czynnikiem predykcyjnym incydentów sercowo-naczyniowych. Dotyczy to głównie populacji osób starszych niż analizowana w niniejszym badaniu. Z drugiej strony wiadomym jest, że podobne zmiany hemodynamiki zachodzą krótkotrwale po intensywnym wysiłku fizycznym u osób zdrowych i ustępują powoli w ciągu pierwszej godziny odpoczynku. Jak dotąd nie wiadomo, jakie znaczenie może mieć utrwalenie takich zmian w przebadanej grupie sportowców. Rutynowo wykonywane pomiary ciśnienia tętniczego praktycznie nie

uwzględniają tego parametru, choć jest on łatwy do obliczenia. Wykazanie znaczenia tego parametru w ocenie ryzyka sercowo–naczyniowego u ludzi młodych mogłoby dostarczyć łatwego narzędzia umożliwiającego pełniejszą jego stratyfikację w tej subpopulacji.

U sportowców wykazano związek wartości skurczowego ciśnienia tętniczego z BMI, podczas gdy u osób niećwiczących zależność podobną odnotowano w związku z WHR, co wskazywać może na większą rolę dystrybucji tkanki tłuszczowej u niećwiczących, potwierdzając tym samym postulowaną w wielu pracach większą wartość prognostyczną WHR w prognozowaniu rozwoju zespołu metabolicznego niż samej wartości BMI, mogącej wzrastać wraz z przyrostem masy mięśniowej.

W obu grupach wartości skurczowego ciśnienia tętniczego rosły razem ze wzrostem wartości cholesterolu całkowitego w grupie sportowców i triglicerydów w grupie niećwiczących. Aterogenna dyslipidemia jest typowa dla zespołu metabolicznego, który jest nierozdzielnie związany z mniejszą aktywnością fizyczną, co potwierdzają wyniki niniejszej pracy, a także stwierdzany związek ciśnienia skurczowego z wskaźnikiem talia-biodro w tej grupie badanych ochotników. Regularnie uprawiany wysiłek fizyczny poprawia klirens trójglicerydów poprzez nasilenie beta-oksydacji wolnych kwasów tłuszczowych, a także prowadzi do zwiększenia syntezy frakcji HDL cholesterolu. W mniejszym natomiast stopniu prowadzi do redukcji cholesterolu LDL, co potwierdzają wyniki tej pracy wskazujące na utrzymanie zależności pomiędzy wartościami ciśnienia i stężenia LDL, pomimo stosowania regularnego wysiłku fizycznego. Korzystny profil lipidowy u osób uprawiających sport odnotowywano już w dostępnej literaturze ²²⁶, jednakże mechanizmy za pośrednictwem których wysiłek fizyczny prowadzi do przeniesienia równowagi pomiędzy syntezą a degradacją poszczególnych frakcji lipidów wciąż pozostaje przedmiotem dyskusji ^{227,228}. Wyniki niniejszej pracy nie wskazują na nasiloną peroksydację lipidów jako czynnika mogącego powodować wystąpienie opisanej zależności. Wydaje się to być zjawiskiem korzystnym, bowiem lipoperoksydacja jako źródło reaktywnych form tlenu wpływa negatywnie na funkcję śródbłonna, mogąc zmniejszyć dostępność biologiczną tlenu azotu i prowadzić w efekcie do upośledzenia jego funkcji naczyniorozkurczowej, a także nasilenia stresu nitrozacyjnego, który poprzez modyfikacje post-translacyjne wielu białek może doprowadzać do szybszego rozwoju miażdżycy. Nasilona peroksydacja lipidów sprzyja ponadto przekształceniu makrofagów w komórki piankowate, utrudniając w efekcie klirens depozytów lipidowych ze ściany naczynia i indukując stan zapalny, co prowadzi do tworzenia się blaszek miażdżycowych. Z drugiej jednak strony, sportowcy badani w niniejszej pracy wykazywali niższe wartości współczynnika tiolowego. Świadczy to o zmniejszonym potencjale antyoksydacyjnym tej podgrupy. Nasilona peroksydacja lipidowa

nie wyjaśnia tego zjawiska. Wprawdzie wyższe wartości CRP mogłyby wskazywać na nasiloną reakcję zapalną, mogącą na drodze innych patomechanizmów nasilać stres oksydacyjny, co potwierdzać może wyżej wymieniony niższy współczynnik tiolowy u sportowców, jednakże inne parametry reakcji zapalnej (sICAM1, sVCAM1, E-selektyna i PAI-1) niższe były wyjściowo w grupie sportowców, w porównaniu do niećwiczących. Istotnym jest jednak fakt zmniejszenia stężenia zredukowanego glutationu, wyrażonego przez wartość współczynnika tiolowego w grupie sportowców. Wskazywałoby to na wyczerpywanie się potencjału antyoksydacyjnego spowodowane zbyt wysoką intensywnością treningu oraz brakiem wystarczających przerw między kolejnymi treningami pozwalających na regenerację. Mimo innych wyników przemawiających jednak za zmniejszeniem nasilenia procesów zapalnych, zmniejszenie współczynnika tiolowego w badanej grupie może być dowodem wyczerpania rezerw antyoksydacyjnych. Fakt ten stanowi kolejny dowód na zależność korzyści osiąganych w wyniku uprawiania sportu od rodzaju treningu.

Wyniki badań klinicznych nie są jednoznaczne, co do zależności wysiłku fizycznego i procesów zapalnych. Niektóre wskazują na nasilenie procesu zapalenia, wyrażane przez stężenie cytokin, w tym CRP, przy zbyt intensywnym wysiłku fizycznym. Wyniki badań prowadzonych przez Kazeem i wsp. udowodniły istotny wzrost stężenia CRP przy jednoczesnym zmniejszeniu stężenia innych markerów zapalenia, jak haptoglobiny czy transferyny (nie badanych w niniejszej pracy). Badania dotyczyły grupy osób uprawiających regularną aktywność fizyczną w porównaniu do osób nieaktywnych. Na uwagę zasługuje także fakt istotnego statystycznie wzrostu stężenia CRP u ujętych w badaniu zawodników drużyny futbolowej w porównaniu do osób regularnie uprawiających aktywność fizyczną, jednak o mniejszej częstotliwości i intensywności^{191,229}. Zawodowe uprawianie sportu w większości przypadków nierozdzielnie łączy się z treningami skutkującymi niewielkimi uszkodzeniami włókien mięśniowych. Wyniki badań oceniających stężenie markerów zapalenia, w tym CRP, potwierdzają ich wzrost w wyniku uszkodzenia mięśni po treningu^{230,231}. Wobec tego w ocenie stężeń tych markerów u osób uprawiających aktywność fizyczną o długim czasie trwania lub wysokiej intensywności, należy brać pod uwagę możliwe powiązanie z kontuzjami. Możliwym wytłumaczeniem obserwowanego wzrostu średnich wartości CRP jest także wysoka intensywność treningów osób z grupy badanej. Wyżej cytowane badania¹⁸³ jednoznacznie wskazują na wzrost części markerów, w tym CRP w wyniku treningów o bardzo wysokiej intensywności. Jednocześnie w cytowanym badaniu ten sam trening powodował zmniejszenie stężenia innych wykładników zapalenia, nie można więc mówić o jednoznacznym nasileniu procesów zapalnych w wyniku

treningu o wysokiej intensywności. Część badaczy podkreśla pozytywne działanie wysiłku zmniejszające stężenie cytokin prozapalnych, a tym samym zmniejszenie intensywności procesu zapalenia. Petersen w opracowaniu dotyczącym oceny procesów zapalenia w odpowiedzi na ostry i przewlekły wysiłek fizyczny podkreśla antyzapalne działanie regularnego wysiłku fizycznego. Efekt ten, biorąc pod uwagę zapalną etiologię procesu miażdżycowego, można by wiązać ze spowolnieniem rozwoju miażdżycy w wyniku regularnego uprawiania sportu²³².

W powyższej pracy odnotowano niższy potencjał antyoksydacyjny u sportowców. Może to potwierdzać założenie nasilenia procesów zapalnych w wyniku powtarzalnych wysiłków o nadmiernej intensywności. Intensywność wysiłku fizycznego i jego powtarzalność wydają się, odgrywać kluczową rolę w redukcji procesów zapalenia²³³. Jednakże mechanizmy według których zachodzą powyższe procesy wymagają dalszych badań. Jedną z hipotez jest wpływ uwalnianej z komórek mięśniowych interleukiny 6 (IL-6), która nie tylko nasila produkcję przeciwzapalnych IL-1 (interleukiny 1) i IL-10 (interleukiny 10), ale także hamuje produkcję prozapalnego czynnika TNF- α . IL-6 nasila także lipolizę oraz oksydację lipidów²³⁸. Hipotezę tą zdaje się potwierdzać odnotowane w grupie sportowców wyższe stężenie CRP, będącego głównym induktorem syntezy IL-6. Wykazane różnice w stężeniach sodu i mocznika, przy średnich wyższych w grupie sportowców, mieszczą się w zakresie normy fizjologicznej i prawdopodobnie wiążą się ze stopniem nawodnienia, który w grupie sportowców może wykazywać znaczne różnice w zależności od intensywności wysiłku i suplementacji płynowej w dniu poprzedzającym badanie.

U sportowców odnotowywano wyższe wartości FMD zarówno w warunkach wyjściowych, jak i po zastosowaniu dożylniej podaży substratu dla tlenu azotu. Świadczy to o wyższej biodostępności tlenu azotu u sportowców, która nie wynika z większych ilości substratu dla jego syntezy. Ponadto brak istotnych różnic w zakresie wartości ADMA będącej kompetencyjnym inhibitorem syntazy tlenu azotu wskazuje, że analizowane grupy nie różnią się między sobą poziomem syntezy NO. Obserwowane różnice w wartościach FMD wynikać mogą zatem z jego nasilonej degradacji u osób niećwiczących. Degradacja ta jednak nie wynika z nasilonej peroksydacji lipidów u osób niećwiczących, jak było to już odnotowywane w innych pracach porównujących osoby zdrowe z pacjentami z nadciśnieniem tętniczym²³⁴. Wynikać może ona jednak ze zmiatania tlenu azotu na drodze mechanizmów związanych z reaktywnymi formami tlenu powstającymi na drodze mechanizmów innych niż peroksydacja lipidów, na co wskazywać mogą odnotowane różnice w zakresie współczynnika tiolowego pomiędzy podgrupami.

Uzyskanie kinetyki zerowego rzędu poprzez podanie „uderzeniowej dawki” L-

Argininy w obu grupach zwiększa jedynie nieistotnie syntezę tlenku azotu, co znajduje odzwierciedlenie w tendencji wzrostowej FMD w obu grupach, jakkolwiek nadal w grupie sportowców funkcja wazodylatacyjna śródbłonna wykazywała wartości znamienne wyższe w porównaniu do niećwiczących. U wszystkich badanych wraz ze wzrostem L-argininy potwierdzono zmniejszanie się stresu oksydacyjnego wyrażonego w stężeniu MDA, co potwierdzać może istotne działanie przeciwzapalne tlenku azotu, postulowane przez innych autorów^{235,236}. Jednakże znaczenie tego zjawiska, w kontekście braku odnotowywanych istotnych różnic w zakresie lipoperoksydacji wymaga dalszych szczegółowych badań.

W obu grupach w warunkach wyjściowych prowadzone badania wykazały związek stresu oksydacyjnego, w tym wypadku wyrażonego wartością współczynnika tiolowego, a nasileniem procesów zapalnych wyrażonych przez stężenia cytokin ICAM-1 i VCAM-1.

Proces zapalny leżący u podstaw patofizjologii miażdżycy charakteryzuje się między innymi naciekiem monocytów na ścianę naczynia. Wyniki badań klinicznych potwierdziły następczą zwiększoną ekspresję P-selektyny i cząsteczek adhezyjnych ściany naczynia VCAM-1 i cząsteczki adhezyjnej wewnątrzkomórkowej ICAM-1. Tę zwiększoną ekspresję wykazują także komórki śródbłonna w naczyniach bez potwierdzonej obecności blaszek miażdżycowych. U osób z rozpoznaną miażdżycą obserwowano także wzrost stężeń rozpuszczalnych P-selektyny, sICAM-1 i sVCAM-1²³⁷. Wobec powyższego większe średnie wartości stężeń sICAM-1 u osób niećwiczących można powiązać nie tylko ze wzrostem nasilenia procesów zapalnych, ale także z możliwym przyspieszeniem rozwoju zmian miażdżycowych.

Obserwowane różnice w zakresie potencjału oksydacyjnego pomiędzy grupami, a także w szeregach czasowych w poszczególnych grupach, wynikać mogą z różnego nasilenia reakcji zapalnej niezwiązanej bezpośrednio z peroksydacją lipidów. Potwierdzać to może odnotowana ujemna korelacja między współczynnikiem tiolowym a PAI-1 w grupie osób niećwiczących. Wzrost stężenia inhibitora aktywatora plazminogenu PAI-1 nie tylko wiąże się ze zwiększonym nasileniem procesów zapalnych, ale także powoduje zmniejszenie procesów fibrylizacji. W wyniku tego obserwujemy wzrost kumulacji fibryny w naczyniach prowadzący do rozwoju zmian miażdżycowych²³⁸.

Farmakologiczna blokada cyklooksigenazy przez kwas acetylosalicylowy powodowała, że obserwowane wyjściowo różnice w zakresie wartości FMD traciły istotność statystyczną, w obu grupach odnotowano nieistotny spadek FMD. Wobec obecnego w obu grupach spadku stężenia tromboksanu i prostacykliny w odpowiedzi na ASA. U sportowców mimo zauważalnej różnicy, nie wykazano jej istotności statystycznej prawdopodobnie ze względu na mniejszą liczebność grupy. Nie należy wiązać zmian wartości FMD z

nadekspresją szlaku cyklooksygenazy, ulega on bowiem zahamowaniu w podobnym stopniu w obu grupach. W wyniku zablokowania syntezy tromboksanu i prostacykliny przez hamowanie obu izoform cyklooksygenazy (COX-1 i COX-2) nastąpiło zmniejszenie stężenia NO, czym tłumaczymy spadek wartości FMD w obu grupach²³⁹. Również profil ekspresji i kierunek zmian obu markerów tego szlaku zachowuje się podobnie w obu grupach, przez co nie może być on uznany za czynnik wyjaśniający odnotowywane różnice w FMD.

Wyższa biodostępność tlenu azotu u sportowców wynikać może z mniej nasilonej aktywacji prozapalnej śródbłonna, o czym świadczy profil markerów jego aktywacji (sICAM1, sVCAM1, PAI1). Godnym uwagi jest fakt, że terapia ASA nie wywierała działania przeciwzapalnego, większość obserwowanych różnic w warunkach wyjściowych, obecnych było bowiem nadal po zastosowaniu ASA. Może to wynikać zarówno z faktu zaangażowania COX-niezależnych mechanizmów promujących reakcję zapalną, ale także ze zbyt krótkotrwałej terapii ASA, która wystarczyła do zahamowania agregacji płytek, ale czasowo lub ilościowo (dawka kardioprotekcyjna, nie przeciwzapalna, o rząd wielkości większa) była niewystarczająca do wywołania COX-zależnej modulacji reakcji zapalnych. U osób niećwiczących wartość skurczowego ciśnienia tętniczego rosła ze wzrostem sICAM i PAI-1 i zależność ta występowała w obu grupach, co potwierdza poruszaną w piśmiennictwie ostatnich lat rolę procesów immunologicznych w patogenezie nadciśnienia tętniczego i zespołu metabolicznego. Wykazywano rolę przewlekłego procesu zapalnego niewielkiego stopnia jako jednej z potencjalnych przyczyn rozwoju dysfunkcji śródbłonna, a w jej następstwie rozwoju chorób sercowo–naczyniowych^{240,241}.

Wyniki badań wykazały niższe, choć nieistotnie statystycznie, stężenie VEGF u sportowców, wykazujący dalszą tendencję spadkową po ASA. W dostępnej literaturze istnieją dane wskazujące na zależność stężenia VEGF od wysiłku fizycznego. Wahl i wsp. udowodnili zależność stężenia VEGF, a tym samym zdolności do angiogenezy, od intensywności treningu. U badanych po treningu o średniej intensywności nie wykazano tendencji wzrostowej, natomiast wysoka intensywność ćwiczeń skutkowała wzrostem stężenia VEGF²⁴². Według wyników badań przeprowadzonych przez Czarkowską i wsp. zależny od rodzaju wysiłku wzrost stężenia VEGF był wynikiem odpowiedzi zapalnej wywołanej przez uszkodzenie włókien mięśniowych w wyniku nadmiernego wysiłku fizycznego²⁴³. Porównanie stężenia VEGF w odpowiedzi na trening o podobnej intensywności u osób niećwiczących i sportowców pozwoliło Jensenowi i wsp. zaobserwować większą odpowiedź u osób nietreningujących oraz jej zmniejszanie wraz z powtarzalnością treningu²⁴⁴. Richardson i wsp. uzyskali podobny efekt zmniejszenia stężenia VEGF wraz z adaptacją do wysiłku

fizycznego²⁴⁵.

W grupie badanej w niniejszej pracy trening o wysokiej intensywności może być przyczyną przejściowych epizodów hipoksji tkankowej, co jest silnym czynnikiem indukującym angiogenezę. W przypadku powtarzalnych epizodów niedokrwienia odpowiedzią miejscową będzie wytworzenie krążenia obocznego. Jako rezultat obserwujemy lepsze ukrwienie mięśni poddawanych regularnemu treningowi fizycznemu, adaptację do hipoksji i następczą mniejszą zdolność do angiogenezy. Powyższe dane w odniesieniu do niniejszej pracy wydają się tłumaczyć zmniejszone stężenie VEGF u sportowców jako wynik adaptacji do wysiłku fizycznego.

Nasilenie procesów angiogenezy łączyć się może z procesem rozwoju choroby nowotworowej, w tym z jej rozsiewem. Obecnie wiele badań klinicznych rozważa hamowanie angiogenezy jako jedną z metod terapii w chorobie nowotworowej²⁴⁶. W tym kontekście zmniejszona zdolność do powstawania nowych naczyń oznacza również mniejsze ryzyko promocji onkogenezy. Zależność ta wymaga jednak dalszych badań.

Chcąc ocenić różnice w aktywacji płytek, a także w ich zdolności do agregacji, nie stwierdzono istotnych różnic w zakresie stężeń P-selektyny wykazującej aktywację płytek, a także w wyjściowej agregacji płytek indukowanej kwasem arachidonowym i ADP. Terapia ASA skutkowała podobnym spadkiem agregacji zależnej od kwasu arachidonowego w obu grupach, wskazując na podobną wrażliwość płytek na ASA obu badanych podgrup. Biorąc zatem pod uwagę mechanizmy aktywacji hemostazy płytkowej, nie wydaje się, aby wysiłek fizyczny w formie badanej w niniejszej rozprawie był czynnikiem modulującym reaktywność płytek ani też ich wrażliwość na kwas acetylosalicylowy. Godnym uwagi wydaje się jednak fakt, że w grupie niećwiczących wykazano istnienie dodatniej zależności liniowej między stężeniem P-selektyny, a parametrami procesów zapalnych PAI-1 i sICAM-1, co potwierdza stwierdzaną w wielu sytuacjach zależność pomiędzy reakcją zapalną i aktywacją płytek. Podane wyniki mogą być dowodem na działanie wysiłku fizycznego na płytki krwi może przebiegać na drodze mechanizmów pozapłytkowych. Badane elementy hemostazy płytkowej nie wykazywały różnic między grupą sportowców, a osób niećwiczących. Przy wykazanym wpływie wysiłku fizycznego na funkcję śródbłonna można założyć, że trening moduluje interakcje płytek krwi i śródbłonna na poziomie fenotypu czynnościowego komórek śródbłonna.

Brak różnic między grupą sportowców, a grupą osób niećwiczących w zakresie agregacji i reaktywności płytek w odpowiedzi na ASA przeczy tezie o wzroście tendencji do agregacji jako wyniku nadmiernego intensywnego wysiłku fizycznego. Należy pamiętać, że postulowany w części badań wzrost agregacji płytek może być w części skutkiem

mikrourazów wywołanych przez nadmierną aktywność bez odpowiedniego czasu odpoczynku²⁴⁷. Udowodniono zależność nasilenia procesów krzepnięcia od intensywności uprawianego sportu. W wyniku wysiłku fizycznego o nadmiernej wysokiej intensywności zaobserwowano wzrost aktywacji krzepnięcia w połączeniu z procesem fibrynolizy, niewielka intensywność skutkuje jedynie zwiększeniem fibrynolizy bez udziału procesów krzepnięcia²⁰⁰. Zawodnicy badani w niniejszej pracy poddawani byli działaniu długotrwałych, choć powtarzalnych wysiłków o bardzo wysokiej intensywności. Nie potwierdzono jednak wzrostu potencjału trombogenicznego.

Wyniki niniejszej pracy jednoznacznie potwierdziły istnienie modulującego wpływu regularnej aktywności fizycznej na funkcję komórek śródbłonka. Poprawę tę wykazano zarówno w ujęciu biochemicznym, jak i w badaniach czynnościowych wykazując różnicę w zakresie wyników badania FMD. Wykazano korzystny wpływ treningu na parametry procesów zapalnych, związanych także z rozwojem miażdżycy.

OGRANICZENIA PRACY

Ograniczeniem pracy jest stosunkowo niewielka liczebność grupy badanej, jednakże w świetle wyników można stwierdzić, że uzyskane dane były zgodne z opisywanymi dotychczas mechanizmami i dość dobrze określają wpływ aktywności fizycznej o wysokiej i bardzo wysokiej intensywności na opisywane parametry. Rodzaj treningów i ich intensywność można w grupie sportowców uznać za podobne, odpowiadające takiej wymaganej w badaniu aktywności, mimo braku jednorodności grupy sportowców.

Ciekawym mogłaby być dokładna ocena składu ciała w obu grupach (np. metodą densytometrii). Po części o różnej dystrybucji tkanki tłuszczowej w obu badanych grupach może świadczyć zależność wartości ciśnienia tętniczego skurczowego od BMI w grupie sportowców i WHR w grupie nieaktywnych.

Opisane w pracy parametry, służące ocenie zmiennych mających wpływ na funkcję komórek śródbłonka i czynność płytek krwi, stanowią jedynie część możliwych do oceny czynników ryzyka wystąpienia chorób sercowo–naczyniowych. Stanowią one jednak solidną podstawę do oszacowania wpływu aktywności fizycznej na wybrane funkcje komórek śródbłonka. W pracy nie badano także całokształtu procesów hemostazy, jak kaskada krzepnięcia czy nasilenie fibrynolizy, które mogłyby być podstawą bardziej szczegółowej analizy wpływu aktywności fizycznej na czynność płytek krwi. Cennym uzupełnieniem przeprowadzonej oceny agregacji płytek mógłby być test agregacji indukowanej kolagenem i trombiną. Dokładna analiza wpływu treningu fizycznego na czynniki ryzyka wystąpienia chorób sercowo–naczyniowych wymagałaby obserwacji prospektywnej.

6. WNIOSKI

1. Regularna aktywność fizyczna odgrywa istotną rolę w zmniejszeniu ryzyka wystąpienia chorób sercowo–naczyniowych.
2. Wykazano istnienie korzystniejszej wazodylatacyjnej funkcji śródbłonka w wyniku intensywnego uprawiania sportu.
3. Dowiedziono istnienia mniejszego nasilenia procesów zapalnych oraz modyfikację profilu lipidowego w wyniku intensywnego uprawiania sportu.
4. Nie potwierdzono wpływu intensywnego wysiłku fizycznego na wybrane parametry czynności płytek, zwłaszcza w odniesieniu do agregacji ADP.
5. Nie wykazano wpływu wysiłku fizycznego na efekty działania kwasu acetylosalicylowego w kontekście aktywności przeciwplatek, jak i wpływu na fenotyp funkcji śródbłonka

7. STRESZCZENIE

Wstęp Lokalizacja śródbłonna naczyniowego pomiędzy ścianą naczynia a płynącą krwią oraz jego bardzo wysoka aktywność metaboliczna określa niezwykle ważną rolę komórek śródbłonna w utrzymywaniu homeostazy układu sercowo–naczyniowego. Upośledzenie funkcji tych komórek prowadzi do zwiększenia aktywności prozapalnej i proagregacyjnej oraz zmniejszenia potencjału wazodylatacyjnego i jest uznane obecnie za ważne ogniwo w procesach patologicznych prowadzących do rozwoju chorób układu krążenia. Każda interwencja terapeutyczna celowana w komórki śródbłonna może więc mieć istotne znaczenie, ponieważ wiąże się z istotną modyfikacją ryzyka wystąpienia chorób sercowo–naczyniowych. Obserwowana reaktywność naczyń, a także procesy krzepnięcia i fibrynolizy są wynikiem ciągłych interakcji komórek śródbłonna z płytkami krwi. Przykładem jest uwalnianie inhibitorów aktywacji płytek przez komórki śródbłonna czy też proces adhezji płytek do ściany naczynia.

Płytki krwi pełnią ważną rolę w procesach hemostazy, ale także w rozwoju reakcji zapalnych, w gojeniu ran, procesach onkogenezy oraz modulacji odpowiedzi immunologicznej. Wysiłek fizyczny wydaje się być najlepszym rodzajem interwencji terapeutycznej modulującej między innymi funkcję komórek śródbłonna i płytek krwi. Odpowiedni rodzaj treningu nie niesie także za sobą żadnych powikłań. Pozytywne działanie regularnie uprawianej aktywności fizycznej na funkcję śródbłonna opiera się na modyfikacji uwalniania neurohormonalnego i wpływie na równowagę czynników oksydacyjnych i antyoksydacyjnych, a także na wzroście potencjału wazodylatacyjnego. Poza tym działaniem istotny jest również odnotowywany wpływ wysiłku na procesy zapalenia i szlaki sygnałowe związane z angiogenezą. Korzyści odnoszone z wysiłku wciąż znajdują się w sferze wielu badań i pozostają przedmiotem dyskusji, zwłaszcza w odniesieniu do zależności rodzaju aktywności fizycznej i jej intensywności.

Cel pracy Celem pracy jest potwierdzenie roli wysiłku fizycznego w sporcie uprawianym zawodowo w modyfikacji czynników ryzyka wystąpienia chorób sercowo–naczyniowych oraz ocena jego wpływu na wybrane funkcje śródbłonna, w tym funkcję przeciwzapalną i antyagregacyjną oraz potencjał wazodylatacyjny. Oceniono także wpływ regularnej aktywności fizycznej o wysokiej intensywności na wybrane parametry funkcji płytek krwi.

Materiał i metody Do badania włączono 79 zdrowych mężczyzn w wieku 18–40 lat, których podzielono na dwie grupy:

- 1-osoby regularnie uprawiające sport o średniej i wysokiej intensywności
- 2-osoby bez żadnej regularnej aktywności fizycznej.

Wykluczono osoby z rozpoznaną cukrzycą, nadciśnieniem tętniczym, chorobami przebiegającymi z towarzyszącym przewlekłym procesem zapalnym oraz stosujących przewlekle niesteroidowe leki przeciwzapalne bądź na nie uczulonych. Po badaniu przedmiotowym i podmiotowym porównano wyjściowe stężenia podstawowych parametrów biochemicznych, parametrów szlaku tlenu azotu, markerów stresu oksydacyjnego, aktywności prozapalnej i angiogennej. Porównano także wybrane parametry funkcji płytek krwi. Jednocześnie porównano zdolność rozkurczową tętnicy ramiennej po bodźcu niedokrwinnym (FMD) w warunkach wyjściowych i po infuzji L-argininy jako donora tlenu azotu. Wykonano także pomiary propagacji fali tętna (PWV). Wszystkie parametry, poza biochemicznymi i PWV, porównano po raz kolejny po 4-dniowej terapii 75mg kwasu acetylosalicylowego.

Uzyskane wyniki poddano opracowaniu statystycznemu. Do obliczeń wykorzystano program Statistica 10.0 StatSoft®.

Wyniki Obie grupy były zbliżone pod względem danych demograficznych. Badanie przedmiotowe wykazało istotne różnice w zakresie wartości ciśnienia tętna na korzyść grupy sportowców oraz korzystniejszy profil lipidowy u osób uprawiających sport. W wyniku regularnego uprawiania sportu odnotowano poprawę funkcji śródbłonna w ujęciu biodostępności tlenu azotu. Wyniki badań wykazały zmniejszenie współczynnika tciolowego i wzrost stężenia CRP w grupie sportowców, jednak pozostałe parametry aktywności prozapalnej były mniejsze u osób regularnie poddawanych wysiłkowi fizycznemu. Także aktywność angiogenna okazała się niższa u sportowców, choć nie była ona istotna statystycznie. Parametry określające funkcję płytek krwi nie różniły się w porównaniu obu badanych grup.

Wnioski Regularna aktywność fizyczna poprzez modyfikację czynników mających potwierdzony wpływ na ryzyko wystąpienia chorób sercowo–naczyniowych odgrywać może istotną rolę w zmniejszeniu ryzyka wystąpienia chorób sercowo–naczyniowych. Regularny wysiłek fizyczny okazał się poprawiać wazodylatacyjną funkcję śródbłonna oraz zmniejszać nasilenie procesów zapalnych. Wykazano także poprawę profilu lipidowego, co bezpośrednio łączy się ze zmniejszeniem ryzyka wystąpienia chorób układu krążenia. Nie potwierdzono wpływu intensywnego wysiłku fizycznego na wybrane parametry czynności płytek, zwłaszcza w odniesieniu do agregacji.

8. SUMMARY

Background Very active endothelial cells are localized between vascular wall and the streaming blood, thus they are currently considered to play a crucial role in the maintenance of cardiovascular homeostasis. Endothelial dysfunction results in higher inflammatory and aggregatory activity and impaired vascular tone regulation. It is considered to be an important step that leads to development of cardiovascular disorders. Each therapy aimed at endothelium might be crucial for cardiovascular risk modification.

The process of coagulation and fibrinolysis as well as vascular activity are the effect of interactions between endothelial cells and platelets (e.g. endothelium release platelets activation inhibitors, or platelets adhesion to vascular wall).

Platelets play an important role in hemostasis, but also in inflammation, wound healing, oncogenesis and immunological processes.

Physical activity seems to be the best therapeutic intervention that influences endothelium and platelets. Properly composed training system has no side effects.

Physical activity modifies neurohormonal release, influences oxidation-antioxidation balance, inflammation and angiogenesis as well as improves vasodilatation.

The benefits of physical activity are still under consideration, especially concerning its rate and type.

Aim The aim of the study was to confirm the role of physical activity regarding cardiovascular risk modification and to evaluate its effect on selected parameters of endothelial function, including vasodilatation, anti-inflammatory function and its role in coagulation. The aim was also to evaluate the influence of high intensive regular physical activity on chosen platelets function parameters.

Material and methods 79 healthy men aged 18–40 years were recruited into the one of two groups:

1-Regular physical activity of average and high rate

2-No physical activity

Exclusion criteria was diabetes, hypertension, chronic inflammation or usage of chronic nonsteroid anti-inflammatory drugs . After physical examination initial concentration of basic biochemical parameters, metabolites of the nitric oxide pathway, oxidative stress, inflammatory and angiogenic activity parameters and also selected parameters of platelet activity was measured. A flow mediated vasodilatation of brachial artery after ischemia was evaluated twice: at baseline and after L-arginine (a substrate for NO syntase) infusion. Pulse wave velocity (PWV) was evaluated. All these parameters, except biochemical and PWV,

were evaluated twice: at baseline and after oral administration of 75mg of acetylosalic acid for 4 days.

Statistical analysis was performed using Statistica 10.0 StatSoft®.

Results Both groups were similar regarding demography. Sportsmen group had better blood pressure and lipid concentration. Regular activity resulted in improved endothelium function concerning nitric oxide pathway. The players had higher concentration of CRP and lower thiol index, but the other inflammatory parameters were lower in this group. Angiogenic activity was also lower in the players group.

Platelets activity did not differ between both groups.

Conclusions Regular physical activity plays an important role in cardiovascular risk modification. It lowers inflammation and improves vasodilatation as well as lipid profile, which limits the overall cardiovascular risk. There was no influence of high intense physical training on platelets activity parameters, inc. ADP aggregation.

9. PIŚMIENICTWO

1. Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EH, Feletou M: Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol (Oxf)*. 2009;196(2):193-222
2. Lüscher TF, Barton M: Biology of the endothelium. *Clin Cardiol*. 1997;20(11 Suppl 2):II-3-10.
3. Nagao T: Endothelium-derived hyperpolarizing factor and endothelium-dependent relaxations. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1993;8(1):1-6.
4. Edwards G, Félétou M, Weston AH: Endothelium-derived hyperpolarising factors and associated pathways: a synopsis. *Pflugers Arch*. 2010;459(6):863-79.
5. Bryan NS, Bian K, Murad F: Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009;14:1-18.
6. Wever R, Boer P, Hijmering M, Stroes E et al.: Nitric oxide production is reduced in patients with chronic renal failure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 ;19(5):1168-72.
7. Schaeffer G, Wascher TC, Kostner GM, Graier WF: Alterations in platelet Ca²⁺ signalling in diabetic patients is due to increased formation of superoxide anions and reduced nitric oxide production. *Diabetologia*. 1999;42(2):167-76.
8. Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Magagna A, Salvetti A: Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. *Circulation*. 1998;97(22):2222-9.
9. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S: Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet*. 1992;339(8793):572-5.
10. Asif M, Soiza RL, McEvoy M, Mangoni AA: Asymmetric dimethylarginine: a possible link between vascular disease and dementia. *Curr Alzheimer Res*. 2013;10(4):347-56.
11. Mangoni AA: The emerging role of symmetric dimethylarginine in vascular disease. *Adv Clin Chem*. 2009;48:73-94.
12. Schwedhelm E, Böger RH: The role of asymmetric and symmetric dimethylarginines in renal disease. *Nat Rev Nephrol*. 2011;7(5):275-85
13. Marcus AJ, Weksler BB, Jaffe EA: Enzymatic conversion of prostaglandin endoperoxide H₂ and arachidonic acid to prostacyclin by cultured human endothelial cells. *J Biol Chem*. 1978;253(20):7138-41.
14. Linder L, Kiowski W, Bühler FR, Lüscher TF: Indirect evidence for release of endothelium-derived relaxing factor in human forearm circulation in vivo. Blunted response in essential hypertension. *Circulation*. 1990;81(6):1762-7.

-
15. Holowatz LA, Thompson CS, Minson CT, Kenney WL: Mechanisms of acetylcholine-mediated vasodilatation in young and aged human skin. *J Physiol.* 2005;563(Pt 3):965-73.
 16. Rand JB: Acetylcholine. *WormBook.* 2007:1-21
 17. Busse R, Edwards G, Feletou M i wsp.: EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2002, Vol.23 No.8: 375-80
 18. Wnuczko K, Szczepański M: Endothelium--characteristics and functions. *Pol Merkur Lekarski.* 2007;23(133):60-5.
 19. Laakso M, Edelman SV, Brechtel G, Baron AD: Decreased effect of insulin to stimulate skeletal muscle blood flow in obese man. A novel mechanism for insulin resistance. *J Clin Invest.* 1990; 85(6):1844-52.
 20. Clark MG, Wallis MG, Barrett EJ, Vincent MA et al: Review Blood flow and muscle metabolism: a focus on insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003; 284(2):E241-58.
 21. Barrett EJ, Wang H, Upchurch CT, Liu Z: Review Insulin regulates its own delivery to skeletal muscle by feed-forward actions on the vasculature. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011; 301(2):E252-63.
 22. Rask-Madsen C, Li Q, Freund B, Feather D et al: Loss of insulin signaling in vascular endothelial cells accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E null mice. *Cell Metab.* 2010;11(5):379-89
 23. Rask-Madsen C, Kahn CR: Tissue-specific insulin signaling, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(9):2052-9.
 24. Mombouli JV, Vanhoutte PM: Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *J Mol Cell Cardiol.* 1999;31(1):61-74
 25. Kedzierski RM, Yanagisawa M: Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41:851-76
 26. Gray GA, Webb DJ: The endothelin system and its potential as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Pharmacol Ther.* 1996;72(2):109-48.
 27. Kawanabe Y, Nauli SM: Endothelin. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(2):195-203
 28. Soler M, Camacho M, Escudero J, Miguel A: Human Vascular Smooth Muscle Cells but Not Endothelial Cells Express Prostaglandin E Synthase. *Circ. Res.* 2000;87;504-507.
 29. Hla T, Ristimaki A, Appleby S, Barriocanal JG: Cyclooxygenase gene expression in inflammation and angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 1993; 696:197–204.

-
30. Hla T, Maciag T: Cyclooxygenase gene expression is down-regulated by heparin-binding (acidic fibroblast) growth factor-1 in human endothelial cells. *J Biol Chem.* 1991;266:24059–63.
 31. Ristimaki A, Ylikorkala O, Viinikka L: Effect of growth factors on human vascular endothelial cell prostacyclin production. *Arteriosclerosis.* 1990; 10:653– 657.
 32. Jakobsson P-J, Thore´n S, Morgenstern R, Samuelsson B: Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:7220 –7225
 33. Camacho M, Lo´pez-Belmonte J, Vila L: Rate of vasoconstrictor prostanoids released by endothelial cells depends on cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin I synthase activity. *Circ Res.* 1998;83: 353–365
 34. Herichova I, Szantoova K: Renin-angiotensin system: upgrade of recent knowledge and perspectives. *Endocr Regul.* 2013;47(1):39-52.
 35. Stier CT Jr, Chander PN, Rocha R: Aldosterone as a mediator of cardiovascular injury. *Cardiol Rev.* 2002;10:97–107.
 36. Gomez-Sanchez EP: Brain mineralocorticoid receptors orchestrators of hypertension and end-organ disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2004; 13:191–196.
 37. Gomez-Sanchez EP, Gomez-Sanchez CE : Is aldosterone synthesized in the CNS regulated and functional? *Trends Endocrinol Metab.* 2003;14:444–446.
 38. Rocha R, Chander PN, Khanna K, Zuckerman A, Stier CT Jr: Mineralocorticoid receptor blockade reduces vascular injury in stroke-prone hypertensive rats. *Hypertension.* 1998;31:451– 458.
 39. Stier CT Jr, Koenig S, Lee DY, Chawla M, Frishman WH: Aldosterone and aldosterone antagonism in cardiovascular disease: focus on eplerenone (Inspra). *Heart Dis.* 2003;5:102–118.
 40. Blanco-Rivero J, Cachofeiro V, Lahera V, Aras-Lopez R: Participation of prostacyclin in endothelial dysfunction induced by aldosterone in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension.* 2005;46:107–112.
 41. Blanco-Rivero J, Cachofeiro V, Lahera V, Aras-Lopez R: Participation of Prostacyclin in Endothelial Dysfunction Induced by Aldosterone in Normotensive and Hypertensive Rats. *Hypertension.* 2005;46:107-112
 42. Yang D, Fe´le´tou M, Boulanger CM, Wu HF: Oxygen-derived free radicals mediate endotheliumdependent contractions to acetylcholine in aortas from spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 2002;136: 104–110.

-
43. Yang D, Fe'le'tou M, Levens N, Zhang JN and Vanhoutte PM: A diffusible substance(s) mediates endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 2003;41: 143–148.
 44. Gluais P, Lonchamp M, Morrow JD, Vanhoutte PM, and Fe'le'tou M: Acetylcholine-induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta: the Janus face of prostacyclin. *Br J Pharmacol* 2005;146: 834–845.
 45. Yang D, Zhang JN, Vanhoutte PM, and Fe'le'tou M: NO and Inactivation of the endothelium-dependent contracting factor released by acetylcholine in SHR. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 43: 815–820.
 46. Oida H et al: In situ hybridization studies of prostacyclin receptor mRNA expression in various mouse organs. *Br. J. Pharmacol.* 1995; 116:2828–2837
 47. Chesterman CN: Vascular endothelium, haemostasis and thrombosis. *Blood Rev.* 1988;2(2):88-94.
 48. Takeya H, Suzuki K: Anticoagulant and fibrinolytic systems of the injured vascular endothelial cells. *Rinsho Byori.* 1994;42(4):333-9.
 49. Verhamme P, Hoylaerts MF: The pivotal role of the endothelium in haemostasis and thrombosis. *Acta Clin Belg.* 2006;61(5):213-9.
 50. Mackie IJ, Bull HA: Normal haemostasis and its regulation. *Blood Rev.* 1989;3(4):237-50.
 51. Sprague AH, Khalil RA: Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol.* 2009;78(6):539-52.
 52. van Hinsbergh VW: Endothelium--role in regulation of coagulation and inflammation. *Semin Immunopathol.* 2012;34(1):93-106.
 53. Baker RG, Hayden MS, Ghosh S: NF- κ B, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metab.* 2011;13(1):11-22.
 54. Brasier AR: The nuclear factor-kappaB-interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation. *Cardiovasc Res.* 2010;86(2):211-8.
 55. Sitia S, Tomasoni L, Atzeni F, Ambrosio G et al: From endothelial dysfunction to atherosclerosis. *Autoimmun Rev.* 2010;9(12):830-4.
 56. Mudau M, Genis A, Lochner A, Strijdom H: Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis. *Cardiovasc J Afr.* 2012;23(4):222-31.
 57. Drexler H, Hornig B: Endothelial dysfunction in human disease. *J Mol Cell Cardiol.* 1999;31(1):51-60.

-
58. Deng LY, Li JS, Schliffrn EL: Endothelium-dependent relaxation of small arteries from essential hypertensive paths mechanisms and comparison with normotensive subjects and with responses of vessels from spontaneously hypertensive rats. *Cirr Scr* 1995;88: 611-622.
 59. Klzzom D, Porten E, Cast&no M, Bettom G et al:Vascular hypertrophy and remodeling in secondary hypertension. *Hypertension*. 1996;28(5):785-90.
 60. Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G, et al: Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation*. 2001;104(2):191-6
 61. Shimokawa H: Endothelial dysfunction in hypertension. *J Atheroscler Thromb*. 1998;4(3):118-27.
 62. Puddu P, Puddu GM, Zaca F, Muscari A: Endothelial dysfunction in hypertension.*Acta Cardiol*. 2000;55(4):221-32.
 63. Boulanger CM: Secondary endothelial dysfunction: hypertension and heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 1999;31(1):39-49.
 64. De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van de Voorde J, Lameire NH, Vanhoutte PM: Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol*. 2000;130(5):963-74.
 65. Woodman RJ, Chew GT, Watts GF: Mechanisms, significance and treatment of vascular dysfunction in type 2 diabetes mellitus: focus on lipid-regulating therapy. *Drugs*. 2005;65(1):31-74.
 66. Fonseca VA: The effects of insulin on the endothelium. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2007;36 Suppl 2:20-6.
 67. Del Turco S, Gaggini M, Daniele G, Basta G, Folli F, Sicari R, Gastaldelli A:Insulin resistance and endothelial dysfunction: a mutual relationship in cardiometabolic risk. *Curr Pharm Des*. 2013;19(13):2420-31
 68. Kolka CM, Bergman R. The endothelium in diabetes: its role in insulin access and diabetic complications. *Rev Endocr Metab Disord*. 2013;14(1):13-9.
 69. Pitsavos Ch, Panagiotakos D, Weinem M, Stefanadis Ch: Diet, Exercise and the Metabolic Syndrome. *Rev Diabet Stud*. 2006; 3(3): 118–126
 70. Chu Y, Wu YC, Chou YC, Chueh HY: Endothelium-dependent relaxation of canine pulmonary artery after prolonged lung graft preservation in University of Wisconsin solution: role of L-arginine supplementation. *J Heart Lung Transplant*. 2004;23(5):592-8

-
71. Pieper GM, Siebeneich W, Dondlinger LA: Short-term oral administration of L-arginine reverses defective endothelium-dependent relaxation and cGMP generation in diabetes. *Eur J Pharmacol.* 1996;317(2-3):317-20.
 72. Clarkson P, Adams MR, Powe AJ, Donald AE et al: Oral L-arginine improves endothelium-dependent dilation in hypercholesterolemic young adults. *J Clin Invest.* 1996;97(8):1989-94
 73. Egashira K, Hirooka Y, Kuga T, Mohri M, Takeshita A: Effects of L-arginine supplementation on endothelium-dependent coronary vasodilation in patients with angina pectoris and normal coronary arteriograms. *Circulation.* 1996;94(2):130-4.
 74. Rector TS, Bank AJ, Mullen KA, Tschumperlin LK et al: Randomized, double-blind, placebo-controlled study of supplemental oral L-arginine in patients with heart failure. *Circulation.* 1996;93(12):2135-41.
 75. Álvares TS, Meirelles CM, Bhambhani YN, Paschoalin VM, Gomes PS: L-Arginine as a potential ergogenic aid in healthy subjects. *Sports Med.* 2011;41(3):233-48.
 76. Post MS, Verhoeven MO, van der Mooren MJ et al: Effect of hormone replacement therapy on plasma levels of the cardiovascular risk factor asymmetric dimethylarginine: a randomized, placebo-controlled 12-week study in healthy early postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:4221–26.
 77. Verhoeven MO, Hemelaar M, van der Mooren MJ, Kenemans P, Teerlink T: Oral, more than transdermal, oestrogen therapy lowers asymmetric dimethylarginine in healthy postmenopausal women: a randomized, placebo-controlled study. *J Intern Med.* 2006;259:199–208.
 78. Ozgurtas T, Oktenli C, Dede M, Tapan S: Metformin and oral contraceptive treatments reduced circulating asymmetric dimethylarginine (ADMA) levels in patients with polycystic ovary syndrome (PCOS). *Atherosclerosis.* 2008;200(2):336-44.
 79. de Jager J, Kooy A, Schalkwijk C, van der Kolk J et al: Long-term effects of metformin on endothelial function in type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *J Intern Med.* 2014 Jan;275(1):59-70
 80. Ruilope LM, Redón J, Schmieder R: Cardiovascular risk reduction by reversing endothelial dysfunction: ARBs, ACE inhibitors, or both? Expectations from the ONTARGET Trial Programme. *Health Risk Manag.* 2007;3(1):1-9.
 81. Martínez-González J, Badimon L: Influence of statin use on endothelial function: from bench to clinics. *Curr Pharm Des.* 2007;13(17):1771-86.

-
82. Chen LL, Yu F, Zeng TS, Liao YF, Li YM, Ding HC: Effects of gliclazide on endothelial function in patients with newly diagnosed type 2 diabetes. *Eur J Pharmacol.* 2011;659(2-3):296-301.
 83. Fragasso G, Piatti Md PM, Monti L, Palloshi A: Short- and long-term beneficial effects of trimetazidine in patients with diabetes and ischemic cardiomyopathy. *Am Heart J.* 2003;146(5):E18.
 84. Meléndez-Ramírez G, Pérez-Méndez O, López-Osorio C, Kuri-Alfaro J, Espinola-Zavaleta N: Effect of the treatment with allopurinol on the endothelial function in patients with hyperuricemia. *Endocr Res.* 2012;37(1):1-6.
 85. Montero D, Walther G, Stehouwer CD, Houben AJ, Beckman JA, Vinet A: Effect of antioxidant vitamin supplementation on endothelial function in type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Obes Rev.* 2014;15(2):107-16.
 86. Esposito K, Marfella R, Ciotola M, Di Palo C: Effect of a mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial. *JAMA.* 2004;292(12):1440-6.
 87. Poredos P, Jezovnik MK: Testing endothelial function and its clinical relevance. *J Atheroscler Thromb.* 2013;20(1):1-8.
 88. Kubli S, Waeber B, Dalle-Ave A, Feihl F: Reproducibility of laser Doppler imaging of skin blood flow as a tool to assess endothelial function. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2000;36(5):640-8.
 89. Cracowski JL, Minson CT, Salvat-Melis M, Halliwill JR: Methodological issues in the assessment of skin microvascular endothelial function in humans. *Trends Pharmacol. Sci.* 2006; 27: 503–508.
 90. Collier BS: Biochemical and electrostatic considerations in primary platelet aggregation. *Ann N Y Acad Sci* 1984;416:693-704.
 91. van Joost T, van Ulsen J, Vuzevski VD et al: Purpuric contact dermatitis to benzoyl peroxide. *J Am Acad Dermatol* 1990;22:359.
 92. Smyth SS, Whiteheart S, Italiano Jr. JE and Collier BS: Platelet morphology, biochemistry and function. *Williams Hematology.*
 93. Fox JE: The platelet cytoskeleton. *Thromb Haemost* 1993;70(6):884-93.
 94. Cramer EM, Norol F, Guichard J et al: Ultrastructure of platelet formation by human megakaryocytes cultured with the Mpl ligand. *Blood* 1997;89(7):2336-46.

-
95. Podor TJ, Singh D, Chindemi P et al: Vimentin exposed on activated platelets and platelet microparticles localizes vitronectin and plasminogen activator inhibitor complexes on their surface. *J Biol Chem* 2002;277(9):7529-39.
 96. Nurden P, Heilmann E, Pannocchia A et al: Two-way trafficking of membrane glycoproteins on thrombin activated human platelets. *Semin Hematol* 1994;31(3):240-50.
 97. Holmsen H: Platelet secretion and energy metabolism, in *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*, 3rd ed, edited by RW Colman, J Hirsh, VJ Marder, EW Salzman, p 524. JB Lippincott, Philadelphia, 1993.
 98. Shuster RC, Rubenstein AJ, Wallace DC: Mitochondrial DNA in anucleate human blood cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;155(3):1360-5
 99. Akkerman JWN, Verhgoeven AJM: Energy metabolism and function, in *Platelet Responses and Metabolism*, 3rd ed, edited by H Holmsen, p 69. CRC Press, Boca Raton, FL, 1987.
 100. Holmsen H, Farstad M: Energy metabolism, in *Platelet Responses and Metabolism*, 2nd ed, edited by H Holmsen, p 245. CRC Press, Boca Raton, FL, 1987.
 101. Guppy M, Abas L, Neylon C, et al: Fuel choices by human platelets in human plasma. *Eur J Biochem.* 1997;244(1):161-7
 102. Gear AR, Camerini D: Platelet chemokines and chemokine receptors: linking hemostasis, inflammation, and host defense. *Microcirculation.* 2003;10(3-4):335-50.
 103. Weyrich AS, Schwertz H, Kraiss LW et al: Protein synthesis by platelets: Historical and new perspectives. *J Thromb Haemost* 2009; 7(2): 241–246.
 104. Lesurtel M, Graf R, Aleil B, et al: Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. *Science.* 2006;312(5770):104-7.
 105. Hayward CP, Furmaniak-Kazmierczak E, Cieutat AM et al: Factor V is complexed with multimerin in resting platelet lysates and colocalizes with multimerin in platelet alpha-granules. *J Biol Chem.* 1995;270(33):19217-24.
 106. Italiano JE Jr, Richardson JL, Patel-Hett S, et al: Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: Pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released. *Blood.* 2008;111(3):1227-33.
 107. Harrison P, Cramer EM. Platelet alpha-granules. *Blood Rev.* 1993;7(1):52-62.
 108. Heemskerk JW, Bevers EM, Lindhout T: Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost.* 2002;88(2):186-93
 109. Solum NO: Procoagulant expression in platelets and defects leading to clinical disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19(12):2841-6

-
- 110.Sims PJ, Faioni EM, Wiedmer T, et al: Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity. *J Biol Chem* 1988;263(34):18205-12.
 - 111.Sims PJ, Wiedmer T, Esmon CT, et al: Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation on the platelet plasma membrane. *Studies in Scott syndrome: An isolated defect in platelet procoagulant activity.* *J Biol Chem* 1989;264(29):17049-57.
 - 112.Ruggeri ZM: Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J Thromb Haemost.* 2003;1(7):1335-42.
 - 113.Jurk K, Kehrel BE: Platelets: physiology and biochemistry. *Semin Thromb Hemost.* 2005;31(4):381-92.
 - 114.Bennett JS, Kolodziej MA: Disorders of platelet function. *Dis Mon.*1992;38(8):577-631.
 - 115.Coller BS: Platelets in cardiovascular thrombosis and thrombolysis, in *The Heart and Cardiovascular System*, 2nd ed, edited by HA Fozzard, RB Jennings, AM Katz, HE Morgan, E Haber, p 219. Raven Press, New York, 1991.
 - 116.Weiss HJ, Turitto VT, Baumgartner HR, et al: Evidence for the presence of tissue factor activity on subendothelium. *Blood.* 1989;73(4):968-75
 - 117.Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM, et al: Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci.* 1989; 86(8): 2839–2843
 - 118.Jackson SP, Nesbitt WS, Westein E: Dynamics of platelet thrombus formation. *J Thromb Haemost.* 2009;7 Suppl 1:17-20.
 - 119.Furie B, Furie BC: Role of platelet P-selectin and microparticle PSGL-1 in thrombus formation. *Trends Mol Med.* 2004;10(4):171-8
 - 120.Steinhubl SR, Moliterno DJ: The role of the platelet in the pathogenesis of atherothrombosis. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2005;5(6):399-408.
 - 121.Zarbock A, Polanowska-Grabowska RK, Ley K. Robert M: Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation. *Blood Rev.* 2007;21(2):99-111.
 - 122.von Hundelshausen P, Weber C: Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circ Res.* 2007;100(1):27-40.
 - 123.Violi F, Pignatelli P: Platelet oxidative stress and thrombosis. *Thromb Res.* 2012;129(3):378-81.
 - 124.Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B: Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(3):403-12.

-
- 125.Kaur H, Mutus B: Platelet function and thymosin β 4. *Biol Chem.* 2012;393(7):595-8.
 - 126.Patel D, Vaananen H, Jirouskova M, et al: The dynamics of GPIIb/IIIa-mediated platelet-platelet interactions in platelet adhesion/thrombus formation on collagen in vitro as revealed by videomicroscopy. *Blood.* 2003;101(3):929-36.
 - 127.Jackson SP: The growing complexity of platelet aggregation. *Blood.* 2007;109(12):5087-95.
 - 128.Lisman T, Weeterings C, de Groot PG: Platelet aggregation: involvement of thrombin and fibrinogen.*Front Biosci.* 2005;10:2504-17.
 - 129.Albarrán L, Dionisio N, López E, Salido GM, Rosado JA: The membrane potential modulates thrombin-stimulated Ca(2+) mobilization and platelet aggregation. *Arch Biochem Biophys.* 2013;538(2):130-7.
 - 130.Nieswandt B, Pleines I, Bender M: Platelet adhesion and activation mechanisms in arterial thrombosis and ischaemic stroke. *J Thromb Haemost.* 2011;9 Suppl 1:92-104.
 - 131.Passacuale G, Ferro A: Current concepts of platelet activation: possibilities for therapeutic modulation of heterotypic vs. homotypic aggregation. *Br J Clin Pharmacol.* 2011;72(4):604-18.
 - 132.Naseem KM, Riba R: Unresolved roles of platelet nitric oxide synthase. *J Thromb Haemost.* 2008;6(1):10-9.
 - 133.Gkaliagkousi E, Ferro A: Nitric oxide signalling in the regulation of cardiovascular and platelet function. *Front Biosci, Landmark Ed.* 2011;16:1873-97.
 - 134.Gambaryan S, Kobsar A, Hartmann S, Birschmann I: NO-synthase-/NO-independent regulation of human and murine platelet soluble guanylyl cyclase activity. *J Thromb Haemost.* 2008;6(8):1376-84
 - 135.Tsikas D: Measurement of nitric oxide synthase activity in vivo and in vitro by gas chromatography-mass spectrometry. *Methods Mol Biol.* 2004;279:81-103.
 - 136.Sylman JL, Lantvit SM, Vedepo MC, Reynolds MM, Neeves KB: Transport limitations of nitric oxide inhibition of platelet aggregation under flow..*Ann Biomed Eng.* 2013;41(10):2193-205.
 - 137.Abou-Saleh H, Yacoub D, Théorêt JF, Gillis MA et al: Endothelial progenitor cells bind and inhibit platelet function and thrombus formation. *Circulation.* 2009;120(22):2230-9
 - 138.Huang HS, Chang HH: Platelets in inflammation and immune modulations: functions beyond hemostasis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2012;60(6):443-51
 - 139.Semple JW, Freedman J.Keenan: Platelets and innate immunity. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67(4):499-511.

-
- 140.Lievens D, von Hundelshausen P: Platelets in atherosclerosis..*Thromb Haemost.* 2011;106(5):827-38.
 - 141.McNicol A, Israels SJ: Beyond hemostasis: the role of platelets in inflammation, malignancy and infection.*Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* 2008;8(2):99-117.
 - 142.Antoniades C, Bakogiannis C, Tousoulis D, Demosthenous M et al: Platelet activation in atherogenesis associated with low-grade inflammation.. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2010;9(5):334-45.
 - 143.Jurk K, Kehrel BE: Pathophysiology and biochemistry of platelets. *Internist (Berl).* 2010;51(9):1086, 1088-92, 1094.
 - 144.Hopkins PN: Molecular biology of atherosclerosis. *Physiol Rev.* 2013;93(3):1317-542
 - 145.Ahrens I, Bode C, Peter K: Inhibition of platelet activation and aggregation. *Handb Exp Pharmacol.* 2005;(170):443-62.
 - 146.Thomson RM, Anderson DC: Aspirin and clopidogrel for prevention of ischemic stroke. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2013;13(2):327
 - 147.Cevik O, Adiguzel Z, Baykal AT, Somay G, Sener A: The apoptotic actions of platelets in acute ischemic stroke. *Mol Biol Rep.* 2013;40(12):6721-7
 - 148.Lavallée PC, Labreuche J, Faille D, Huisse MG et al: Circulating markers of endothelial dysfunction and platelet activation in patients with severe symptomatic cerebral small vessel disease. *Cerebrovasc Dis.* 2013;36(2):131-8.
 - 149.Jennings LK: Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis.*Thromb Haemost.* 2009;102(2):248-57.
 - 150.Stakos DA, Tziakas DN, Stellos K: Mechanisms of platelet activation in acute coronary syndromes. *Curr Vasc Pharmacol.* 2012;10(5):578-88
 - 151.Renda G, de Caterina R: Impact of antiplatelet therapy in heart disease. *Adv Cardiol.* 2012;47:5-19.
 - 152.Jennings LK, Saucedo JF: Antiplatelet and anticoagulant agents: key differences in mechanisms of action, clinical application, and therapeutic benefit in patients with non-ST-segment-elevation acute coronary syndromes. *Curr Opin Cardiol.* 2008;23(4):302-8
 - 153.Malloy RJ, Kanaan AO, Silva MA, Donovan JL: Evaluation of Antiplatelet Agents for Secondary Prevention of Stroke Using Mixed Treatment Comparison Meta-analysis. *Clin Ther.* 2013;35(10):1490-1500
 - 154.Lee M, Saver JL, Hong KS, Rao NM et al: Risk-benefit profile of long-term dual-versus single-antiplatelet therapy among patients with ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med.* 2013;159(7):463-70

-
155. Diener HC, Weimar C: Stroke: a new CHANCE for combination antiplatelet therapy? *Nat Rev Neurol.* 2013;9(10):549-50.
156. Radziwon-Balicka A et al: Temporal and pharmacological characterization of angiostatin release and generation by human platelets: implications for endothelial cell migration.. *PLoS One.* 2013;8(3):e59281.
157. Manly DA, Boles J, Mackman N: Role of tissue factor in venous thrombosis. *Annu Rev Physiol.* 2011;73:515-25.
158. Owens AP 3rd, Mackman N: Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ Res.* 2011;108(10):1284-97.
159. Wang Y, Andrews M, Yang Y, Lang S et al: Platelets in thrombosis and hemostasis: old topic with new mechanisms. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* 2012;12(2):126-132.
160. Natarajan A, Zaman AG, Marshall SM: Platelet hyperactivity in type 2 diabetes: role of antiplatelet agents. *Diab Vasc Dis Res.* 2008;5(2):138-44.
161. Tsuruo T, Fujita N: Platelet aggregation in the formation of tumor metastasis. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2008;84(6):189-98
162. Gil-Bernabé AM, Lucotti S, Muschel RJ: Coagulation and metastasis: what does the experimental literature tell us? *Br J Haematol.* 2013;162(4):433-41.
163. Pilatova K, Zdrzilova-Dubská L, Klement GL: The role of platelets in tumour growth. *Klin Onkol.* 2012;25 Suppl 2:2S50-7.
164. Michelson AD, Frelinger AL 3rd, Furman MI: Current options in platelet function testing. *Am J Cardiol.* 2006;98(10A):4N-10N.
165. Zeidan AM, Kouides PA, Tara MA, Fricke WA: Platelet function testing: state of the art. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2007;5(5):955-67.
166. Favaloro EJ: Clinical utility of the PFA-100. *Semin Thromb Hemost.* 2008; 34(8):709-733.
167. Frontroth JP: Light transmission aggregometry. *Methods Mol Biol.* 2013;992:227-40.
168. Rinsho N: Molecular biology of endothelium-platelet interactions and thrombogenesis. 1993;51(6):1650-5.
169. Pohl U1, Busse R: Endothelium-dependent modulation of vascular tone and platelet function. *Eur Heart J.* 1990;11 Suppl B:35-42
170. Tanner FC, Boulanger CM, Lüscher TF: Endothelium-derived nitric oxide, endothelin, and platelet vessel wall interaction: alterations in hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Semin Thromb Hemost.* 1993;19(2):167-75.

-
171. Lüscher TF: Platelet-vessel wall interaction: role of nitric oxide, prostaglandins and endothelins. *Baillieres Clin Haematol.* 1993;6(3):609-27.
172. Akopov S, Sercombe R, Seylaz J: Cerebrovascular reactivity: role of endothelium/platelet/leukocyte interactions. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* 1996;8(1):11-94.
173. O'Donovan G, Blazeovich AJ, Boreham C, Cooper AR et al. The ABC of Physical Activity for Health: a consensus statement from the British Association of Sport and Exercise Sciences. *J Sports Sci.* 2010;28(6):573-91.
174. Di Francescomarino S, Sciartilli A, Di Valerio V, Di Baldassarre A, Gallina S: The effect of physical exercise on endothelial function. *Sports Med.* 2009;39(10):797-812
175. Djordjevic D, Jakovljevic V, Cubrilo D, Zlatkovic M, Zivkovic V, Djuric D: Coordination between nitric oxide and superoxide anion radical during progressive exercise in elite soccer players. *Open Biochem J.* 2010;4:100-6.
176. Maiorana A, O'Driscoll G, Taylor R, Green D: Exercise and the nitric oxide vasodilator system. *Sports Med.* 2003;33(14):1013-35.
177. Ghisi GL, Durieux A, Pinho R, Benetti M: Physical Exercise and Endothelial Dysfunction. *Arq Bras Cardiol.* 2010;95(5):e130-7
178. McAllister RM, Newcomer SC and Laughlin MH: Vascular nitric oxide: effects of exercise training in animals. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2008; 33(1): 173–178.
179. Marshall JM, Ray CJ: Contribution of non-endothelium-dependent substances to exercise hyperaemia: are they O₂ dependent? *J Physiol.* 2012;590(Pt 24):6307-20.
180. Volaklis KA, Tokmakidis SP, Halle M: Acute and chronic effects of exercise on circulating endothelial progenitor cells in healthy and diseased patients. *Clin Res Cardiol.* 2013;102(4):249-57.
181. Ribeiro F, Alves AJ, Duarte JA, Oliveira J: Is exercise training an effective therapy targeting endothelial dysfunction and vascular wall inflammation? *Int J Cardiol.* 2010;141(3):214-21.
182. Walsh NP, Gleeson M, Shephard RJ, Gleeson M et al: Position Statement Part one: Immune function and exercise. *Exerc Immunol Rev.* 2011;17:6-63.
183. Kazeem A, Olubayo A, Ganiyu A: Plasma Nitric Oxide and Acute Phase Proteins after Moderate and Prolonged exercises. *Iran J Basic Med Sci.* 2012;15(1):602-7
184. Cubrilo D, Djordjevic D, Zivkovic V, Djuric D, Blagojevic D, Spasic M, Jakovljevic V: Oxidative stress and nitrite dynamics under maximal load in elite athletes: relation to sport type. *Mol Cell Biochem.* 2011;355(1-2):273-9.

-
185. Prisco D, Francalanci I, Filippini M, Hagi MI: Physical exercise and hemostasis. *Int J Clin Lab Res.* 1994;24(3):125-31
186. Lippi G, Maffulli N: Biological influence of physical exercise on hemostasis. *Thromb Hemost.* 2009;35(3):269-76.
187. Hanke AA, Staib A, Görlinger K, Perrey M, Dirkmann D, Kienbaum P: Whole blood coagulation and platelet activation in the athlete: a comparison of marathon, triathlon and long distance cycling. *Eur J Med Res.* 2010;15(2):59-65.
188. Ahmadizad S, El-Sayed MS, MacLaren DP: Effects of time of day and acute resistance exercise on platelet activation and function. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2010;45(2-4):391-9.
189. El-Sayed MS, Sale C, Jones PG, Chester M: Blood hemostasis in exercise and training. *Med Sci Sports Exerc.* 2000;32(5):918-25.
190. Gonzales F, Mañas M, Seiquer I, Quiles J et al.: Blood platelet function in healthy individuals of different ages. Effects of exercise and exercise conditioning. *J Sports Med Phys Fitness.* 1996;36(2):112-6.
191. Głowacka P, Mizia-Stec K, Gasior Z: Influence of physical effort on the activity of the endothelium concerning patients with chronic cardiac insufficiency. *Przegl Lek.* 2012;69(1):34-7.
192. Duncker DJ, Bache RJ, Merkus D: Regulation of coronary resistance vessel tone in response to exercise. *J Mol Cell Cardiol.* 2012;52(4):802-13.
193. Laughlin MH, Bowles DK, Duncker DJ: The coronary circulation in exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012;302(1):H10-23.
194. Whyte JJ, Laughlin MH: The effects of acute and chronic exercise on the vasculature. *Acta Physiol (Oxf).* 2010;199(4):441-50.
195. Vescovo G, Volterrani M, Zennaro R, et al: Apoptosis in the skeletal muscle of patients with heart failure: investigation of clinical and biochemical changes. *Heart* 2000; 84: 431-437
196. Adams V, Jiang H, Yu J, et al: Apoptosis in skeletal myocytes of patients with chronic heart failure is associated with exercise intolerance. *Am J Coll Cardiol* 1999; 33: 959-65.
197. Wegrzynowska-Teodorczyk K, Jankowska EA, Banasiak W, Ponikowski P, Woźniowski M: Znaczenie treningu oporowego w redukcji mięśniowych następstw niewydolności serca *Kardiologia Pol.* 2008;66(4):434-42.
198. Crimi E, Ignarro LJ, Cacciatore F, Napoli C: Mechanisms by which exercise training benefits patients with heart failure. *Nat Rev Cardiol.* 2009;6(4):292-300.

-
199. Piepoli M, Clark AL, Coats AJ: Muscle metaboreceptors in hemodynamic, autonomic, and ventilatory responses to exercise in men. *Am J Physiol.* 1995;269(4 Pt 2):H1428-36.
 200. Ponikowski P, Francis DP, Piepoli MF, et al.: Enhanced ventilatory response to exercise in patients with chronic heart failure and preserved exercise tolerance. Marker of abnormal cardiorespiratory reflex control and predictor of poor prognosis. *Circulation.* 2001;103(7):967-72
 201. Coats AJ: Exercise training in heart failure. *Curr Control Trials Cardiovasc Med.* 2000; 1(3): 155–160.
 202. Gunn E, Smith KM, McKelvie RS, et al.: Exercise and the heart failure patient: aerobic vs strength training – is there a need for both? *Prog Cardiovasc Nurs.* 2006;21(3):146-50.
 203. Bird SR, Hawley JA: Exercise and type 2 diabetes: new prescription for an old problem. *Maturitas.* 2012;72(4):311-6.
 204. Zisser H, Gong P, Kelley CM, Seidman JS, Riddell MC: Exercise and diabetes. *Int J Clin Pract Suppl.* 2011;(170):71-5.
 205. Pickup JC: Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2004; 27 no. 3:813–823.
 206. Calder PC, Albers R, Antoine JM, et al.: Inflammatory disease processes and interactions with nutrition. *Br J Nutr.* 2009;101 Suppl 1:S1-45
 207. Caimi G, Canino B, Amodeo G, Montana M, and Presti RL: Lipid peroxidation and total antioxidant status in unprofessional athletes before and after a cardiopulmonary test. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2009;43(3):235-41
 208. Finaud J, Lac G and Filaire E: Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med.* 2006;36(4):327-58.
 209. Pedersen BK and Hoffman-Goetz L: Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiol Rev.* 2000;80(3):1055-81
 210. Timmerman KL, Flynn MG, Coen PM, Markofski MM, and Pence BD: Exercise training-induced lowering of inflammatory (CD14+CD16+) monocytes: a role in the anti-inflammatory influence of exercise? *J Leukoc Biol.* 2008;84(5):1271-8.
 211. Ahmadi N, Eshaghian S, Huizenga R, Sosnin K, Ebrahimi R, and Siegel R: Effects of intense exercise and moderate caloric restriction on cardiovascular risk factors and inflammation. *Am J Med.* 2011;124(10):978-82
 212. Belotto MF, Magdalon J, Rodrigues HG et al.: Moderate exercise improves leucocyte function and decreases inflammation in diabetes. *Clin Exp Immunol.* 2010;162(2):237-43

-
213. Han S, Middleton P, Crowther CA: Exercise for pregnant women for preventing gestational diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012;7:CD009021
214. Alwan A (red): Global status report on noncommunicable diseases 2010. World Health Organization, Geneva 2011.
215. Boger RH, Bode-Boger SM, Szuba A, Tsao PS, et al: Asymmetric Dimethylarginine (ADMA): A Novel Risk Factor for Endothelial Dysfunction: Its Role in Hypercholesterolemia; *Circulation* 1998; 98; 1842 – 1847
216. Teerlink T, Nijvelt J, de Jong S and van Leeuwen P: Determination of Arginine, Asymmetric Dimethylarginine and Symmetric Dimethylarginine in Human Plasma and Other Biological samples by High – Performance Liquid Chromatography; *Analytical Biochemistry* 303, 131 – 137 (2002)
217. Van De Craen B, Declercq PJ, Gils A: The Biochemistry, Physiology and Pathological roles of PAI-1 and the requirements for PAI-1 inhibition in vivo. *Thromb Res.* 2012;130(4):576-85.
218. Gils A: The pathophysiological relevance of PAI-1 in cardiovascular diseases and the development of monoclonal antibodies as PAI-1 inhibitors. *Verh K Acad Geneesk Belg.* 2006;68(3):179-98.
219. Pietrusińska E, Ziólkowska E, Kotschy M: Inhibitor aktywatorów plazminogenu typu 1 (PAI-1) w wyciągach tkankowych raka piersi. *Współcz Onkol* (2004) vol. 8: 4 (219-222)
220. Keeton MR, Curriden SA, van Zonneveld AJ, et al: Identification of regulatory sequences in the type 1 plasminogen activator inhibitor gene response to transforming growth factor b. *J Biol Chem* 1991; 266: 23041-51.
221. Stachowiak G, Stetkiewicz T, Połać I, Sobczuk A, Jędrzejczyk S, Pertyński T: Rola inhibitora aktywatora plazminogenu 1 (PAI-1) po menopauzie – wpływ terapii hormonalnej tego okresu. *Prz Menopauz* 2005; 6: 17-21
222. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J: The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003;9(6):669-76.
223. Mancina G, Fagard R, Narkiewicz K i wsp. 2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension. *European Heart Journal*, 2013; doi: 10.1093/eurheartj/eh151
224. Sikiru L1, Okoye GC: Effect of interval training programme on pulse pressure in the management of hypertension: a randomized controlled trial. *Afr Health Sci.* 2013;13(3):571-8.

-
225. Randall OS1, Kwagyan J, Huang Z, Xu S et al.: Effect of diet and exercise on pulse pressure and cardiac function in morbid obesity: analysis of 24-hour ambulatory blood pressure. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2005;7(8):455-63.
226. Kraus WE, Slentz CA: Exercise training, lipid regulation, and insulin action: a tangled web of cause and effect. *Obesity (Silver Spring)*. 2009;17 Suppl 3:S21-6
227. Coelho DF, Pereira-Lancha LO, Chaves DS, Diwan D et al: Effect of high-fat diets on body composition, lipid metabolism and insulin sensitivity, and the role of exercise on these parameters. *Braz J Med Biol Res*. 2011;44(10):966-72
228. Sahlin K, Sallstedt EK, Bishop D, Tonkonogi M: Turning down lipid oxidation during heavy exercise--what is the mechanism? *J Physiol Pharmacol*. 2008;59 Suppl 7:19-30
229. Andersson J, Jansson JH, Hellsten G, Nilsson TK, Hallmans G, Boman K: Effects of heavy endurance physical exercise on inflammatory markers in non-athletes. *Atherosclerosis*. 2010;209(2):601-5.
230. Peake JI, Nosaka K, Suzuki K: Characterization of inflammatory responses to eccentric exercise in humans. *Exerc Immunol Rev*. 2005;11:64-85.
231. Chen TC1, Hsieh SS: Effects of a 7-day eccentric training period on muscle damage and inflammation. *Med Sci Sports Exerc*. 2001 Oct;33(10):1732-8.
232. Petersen AM, Pedersen BK: The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol (1985)*. 2005;98(4):1154-62.
233. Wilund KR: Is the anti-inflammatory effect of regular exercise responsible for reduced cardiovascular disease? *Clin Sci (Lond)*. 2007;112(11):543-55
234. Doroszko A, Andrzejak R, Szuba A: Role of the nitric oxide metabolic pathway and prostanoids in the pathogenesis of endothelial dysfunction and essential hypertension in young men. *Hypertens Res*. 2011;34(1):79-86.
235. Laskin JD, Heck DE, Laskin DL: Multifunctional role of nitric oxide in inflammation. *Trends Endocrinol Metab*. 1994;5(9):377-82
236. Gad MZ, Khattab M: Modulation of nitric oxide synthesis in inflammation. Relationship to oxygen-derived free radicals and prostaglandin synthesis. *Arzneimittelforschung*. 2000;50(5):449-55
237. Huo Y, Ley K: Adhesion molecules and atherogenesis. *Acta Physiol Scand*. 2001;173(1):35-43.
238. Aso Y: Plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 in vascular inflammation and thrombosis. *Front Biosci*. 2007;12:2957-66.

-
239. Bing RJ, Lomnicka M: Why do cyclo-oxygenase-2 inhibitors cause cardiovascular events? *J Am Coll Cardiol.* 2002;39(3):521-522
240. Verlohren S, Muller DN, Luft FC, Dechend R: Immunology in hypertension, preeclampsia, and target-organ damage. *Hypertension.* 2009;54(3):439-43.
241. Duncan BB, Schmidt MI: Chronic activation of the innate immune system may underlie the metabolic syndrome. *Sao Paulo Med J.* 2001;119(3):122-7.
242. Wahl P, Zinner C, Achtzehn S, Behringer M, Bloch W, Mester J: Effects of acid-base balance and high or low intensity exercise on VEGF and bFGF. *Eur J Appl Physiol.* 2011;111(7):1405-13.
243. Czarkowska-Paczek B, Bartlomiejczyk I, Przybylski J: The serum levels of growth factors: PDGF, TGF-beta and VEGF are increased after strenuous physical exercise. *J Physiol Pharmacol.* 2006;57(2):189-97.
244. Jensen L, Schjerling P, Hellsten Y: Regulation of VEGF and bFGF mRNA expression and other proliferative compounds in skeletal muscle cells. *Angiogenesis.* 2004;7(3):255-67.
245. Richardson RS, Wagner H, Mudaliar SR, Saucedo E et al: Exercise adaptation attenuates VEGF gene expression in human skeletal muscle. *J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;279(2):H772-8.
246. Appelman I, Liersch R, Kessler T, Mesters RM, Berdel WE: Angiogenesis inhibition in cancer therapy: platelet-derived growth factor (PDGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors: biological functions and role in malignancy. *Recent Results Cancer Res.* 2010;180:51-81.
247. Hanke AA, Staib A, Görlinger K, Perrey M et al: Whole blood coagulation and platelet activation in the athlete: a comparison of marathon, triathlon and long distance cycling. *Eur J Med Res.* 2010;15(2):59-65.