

Paulina Walasek

**Ocena gęstości naczyń krwionośnych
mięśnia sercowego
u dzieci z wrodzonymi wadami serca**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor

Prof. dr hab. n. med. Michał Nowicki

Katedra i Zakład Histologii I Embriologii Uniwersytetu Medycznego

im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Klinika Kardiologii i Nefrologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego

im. Karola Marcinkowego w Poznaniu

Poznań 2014

*Składam serdeczne podziękowania
Promotorowi –
Prof. dr hab. Michałowi Nowickiemu,
za ogromne wsparcie, motywację
i poświęcony czas.*

*Dziękuję także **Pani Profesor Aldonie Siwińskiej**
i Panu Profesorowi Waldemarowi Bobkowskiemu,
za inspirację i życzliwość.*

*Szczególne podziękowania dla **Pani Anety Konwerskiej.***

***Wojtkowi i Rodzicom** za wiarę we mnie.*

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów.....	4
1. Wstęp.....	7
1.1. Unaczynienie i budowa mięśnia sercowego	7
1.1.1. Naczynia mikrokrążenia.....	9
1.1.2. Śródbłonek.....	10
1.2. Wrodzona wada serca	16
1.2.1. Embriogeneza	17
1.2.2. Siniczne wady serca.....	19
1.2.3. Późnosiniczne oraz niesiniczne wady serca.....	21
1.2.4. Przyczyny powstawania wrodzonych wad serca.....	25
1.2.5. Rozpoznanie i leczenie wrodzonych wad serca	25
1.2.6. Rokowanie	27
2. Założenia i cele pracy	29
3. Materiał i metody.....	30
3.1. Pacjenci.....	30
3.2. Procedura pobrania materiału tkankowego	31
3.3. Analiza immunohistochemiczna	34
3.4. Analiza morfometryczna i statystyczna.....	35
3.4.1. Analiza gęstości naczyń mikrokrążenia w mięśniu sercowym.....	35
3.4.2. Analiza stopnia ekspresji badanych markerów	36
3.4.3. Analiza kliniczna	37
3.4.4. Analiza statystyczna.....	38
4. Wyniki	39
4.1. Obserwacja kliniczna.....	39
4.2. Ocena gęstości naczyń krwionośnych w mięśniu sercowym.....	41
4.3. Ocena stopnia dojrzałości naczyń krwionośnych	42
4.4. Ocena potencjału angiogenego naczyń krwionośnych mikrokrążenia.....	49
4.5. Ocena przydatności rokowniczej MVD w wadach serca.....	54
5. Omówienie wyników i dyskusja	56
6. Wnioski.....	66

7. Streszczenie	67
8. Summary	70
Załącznik 1.....	82
Załącznik 2.....	83
Załącznik 3.....	84
Załącznik 5.....	86
Załącznik 6.....	87
Załącznik 7.....	88

Wykaz stosowanych skrótów

AS – stenoza aortalna (*ang. aortic stenosis*)

ASD I - ubytek międzyprzedsionkowy typu I (*ang. atrial septal defect type I*)

ASD II - ubytek międzyprzedsionkowy typu II (*ang. atrial septal defect type II*)

AVSD - ubytek przedsionkowo-komorowy (*ang. atrio - ventricular septal defect*)

BMI – wskaźnik masy ciała (*ang. body mass index*)

CoA - koarktacja aorty (*ang. coarctation of aorta*)

CRP - białko ostrej fazy (*ang. C – reactive protein*)

ENG - endoglina (*ang. endoglin*)

e- NOS- syntaza tlenku azotu pochodzenia śródbłonkowego (*ang. endothelial nitric oxide synthase*)

EPCs – komórki progenitorowe śródbłonka (*ang. endothelial progenitor cells*)

GDF-15 – czynnik różnicowania wzrostu (*ang. growth differentiation factor 15*)

HE- barwienie hematoksylina – eozyna

HIF-1 - czynnik transkrypcyjny czuły na stężenie tlenu w środowisku komórkowym (*ang. hypoxia-induced factor 1*)

HLHS - zespół hipoplazji lewego serca (*ang. hypoplastic left heart syndrome*)

IAA –przerwanie ciągłości aorty (*ang. interrupted aortic arch*)

IAS - przegroda międzyprzedsionkowa (*ang. septum interatrial*)

IVS – przegroda międzykomorowa (*ang. septum interventricular*)

LA - lewy przedsionek (*ang. left atrium*)

LV - lewa komora (*ang. left ventricle*)

MVD - gęstość naczyń mikrokrażenia (*ang. microvessel density*)

NO – tlenek azotu (*ang. nitric oxide*)

PA – atrezja zastawki tętnicy płucnej (*ang. pulmonary atresia*)

PAPVR – częściowy nieprawidłowy spływ żył płucnych (*ang. partial anomalous pulmonary venous return*)

PBS – bufor fosforanowy, pH 7,4

PDA – przetrwały przewód tętniczy (*ang. patent ductus arteriosus*)

PDGF- płytkowy czynnik wzrostu (*ang. platelet derived growth factor*)

PECAM - płytkowo - śródbłonkowa cząsteczka adhezji komórkowej (*ang. platelet endothelial cell adhesion molecule*)

RA - prawy przedsionek (*ang. right atrium*)

RV - prawa komora (*ang. right ventricle*)

TA – atrezja zastawki trójdzielnej (*ang. tricuspid atresia*)

TAC – wspólny pień tętniczy (*ang. truncus arteriosus communis*)

TAPVR – całkowity nieprawidłowy spływ żył płucnych (*ang. total anomalous pulmonary venous return*)

ToF - zespół czworaczy Fallota (*ang. Tetralogy of Fallot*)

TGA - przełożenie wielkich pni tętniczych (*ang. transposition of great arteries*)

VEGF – naczyniowy czynnik wzrostu komórek endotelialnych (*ang. vascular endothelial growth factor*)

VEGF-R – receptor dla naczyniowego czynnika wzrostu komórek endotelialnych (*ang. vascular endothelial growth factor receptors*)

VSD - ubytek międzykomorowy (*ang. ventricular septal defect*)

vWF- czynnik von Willebranda (*ang. von Willebrand factor*)

WWS - wrodzona wada serca

1. Wstęp

1.1. Unaczynienie i budowa mięśnia sercowego

Pierwsza praca dotycząca budowy i funkcjonowania układu krążenia została opublikowana prawie 400 lat temu - w roku 1628 przez Wiliama Harveya, który wykazał, że skurcz serca jest pochodzenia mięśniowego i umożliwia tłoczenie krwi z przedsionków, przez komory serca do naczyń krwionośnych tworzących krwioobieg duży (systemowy) oraz mały (płucny).

Ściana niemal każdego naczynia krwionośnego zbudowana jest z trzech warstw: błony wewnętrznej (*tunica intima*), błony środkowej (*tunica media*) oraz błony zewnętrznej (*tunica adventitia*). W skład błony wewnętrznej wchodzi wysoce wyspecjalizowany nabłonek nazywany śródbłonkiem (*endothelium*) (Flig K i wsp. 2000). Szczególne znaczenie oraz wyjątkową architekturę posiada układ naczyń krwionośnych zaopatrujących serce. Ma on kształt wieńca oplatającego zaopatrywany narząd i z tego powodu naczynia go tworzące są określane mianem wieńcowych (Bochenek A i wsp., 1993). Unikalność układu naczyń wieńcowych polega na tym, że tworzące go tętnice nie wytwarzają między sobą połączeń, skutkiem czego poszczególne arterie są traktowane jako tętnice anatomicznie końcowe (Tomanek RJ, 2005). Taka budowa rodzi poważne konsekwencje. Niedokrwienie danego obszaru zaopatrywanego przez jedną z końcowych gałęzi wieńcowych grozi powstaniem martwicy (ognisko zawałowe). Z drugiej strony, taka, a nie inna, topografia naczyń wieńcowych sprawia, że w stosunkowo łatwy sposób można interpretować przewlekłe zmiany zachodzące w mięśniu sercowym, które są pochodną jego niedotlenienia (Ratajska A, 2008).

Z punktu widzenia anatomicznej budowy mięśnia sercowego wyróżnić można jego trzy składowe:

- szkielet serca, zbudowany z tkanki łącznej włóknistej, znajdujący się dookoła ujść przedsionkowo-komorowych, ujścia aorty oraz pnia płucnego, do którego przyczepiają się płatki wszystkich zastawek,
- właściwy mięsień sercowy,
- układ bodźco-przewodzący – odpowiadający za generowanie oraz przewodzenie impulsów elektrycznych w mięśniu sercowym (Bochenek i wsp., 1993; Ciszek B, 2008).

Właściwy mięsień sercowy zbudowany jest z komórek mięśniowych wykazujących poprzeczne prążkowanie. Każda z komórek posiada jedno lub dwa jądra. Komórki mięśnia sercowego wykazują się obecnością licznych połączeń jonowo-metabolicznych (*nexus*), które zapewniają natychmiastowe rozprzestrzenianie się impulsów elektrycznych warunkujących ich skurcz (Ciszek B, 2008). Układ taki nosi nazwę czynnościowego syncytium i jest unikalną strukturą w skali całego organizmu. Podstawowym elementem warunkującym kurczliwość komórek mięśniowych są miofilamenty aktynowe oraz miozynowe, które wytwarzają jednostki morfologiczno-czynnościowe określane mianem sarkomerów. W zależności od pracy wykonywanej przez poszczególne komory serca, odmienna jest grubość mięśniówki. Zarówno prawy (RA, *right atrium*) jak i lewy przedsionek (LA, *left atrium*) tłoczą krew do częściowo opróżnionych komór – charakteryzują się zatem stosunkowo cienką ścianą (1-2 mm), a ich komórki mięśniowe posiadają średnicę od 1 do 2 μm . Praca prawej komory serca (RV, *right ventricle*) polega na tłoczeniu krwi przez zastawkę płucną do tętnicy płucnej, a następnie do naczyń krążenia płucnego odpowiedzialnych za wymianę gazową. Włókna mięśniowe obecne w prawej komorze mają średnicę pośrednią pomiędzy włóknami przedsionków a włóknami komory lewej i wynoszą od 3 do 10 μm . Dominująca komora serca, lewa, (LV, *left ventricle*) tłoczy krew na obwód, do krążenia systemowego. Ze względu na to, że musi przezwyciężyć opór dobrze rozwiniętej sieci obwodowych naczyń krwionośnych, musi wygenerować odpowiednie ciśnienie krwi

osiągające w warunkach fizjologicznych wartość 120 mmHg w chwili skurczu komory. Z tego powodu ściana lewej komory serca u osoby dorosłej ma najlepiej rozwiniętą mięśniówkę (15 mm), a komórki mięśniowe tworzące jej włókna osiągają od 5 do 15 μm średnicy (Bochenek A i wsp. 1993; Konturek S, 2001).

1.1.1. Naczynia mikrokrążenia

Naczynia tworzące mikrokrążenie (zarówno w krążeniu płucnym jak i systemowym) określane są jako struktury, których średnica jest $\leq 100 \mu\text{m}$. Budowa ściany naczyń mikrokrążenia jest uzależniona od funkcji mechanicznych i strukturalnych tkanki, którą zaopatrują. Naczynia włosowate, czyli włosniczki, anatomicznie najmniejsze struktury układu krążenia, o wymiarach $< 7 \mu\text{m}$, pełnią najistotniejszą rolę w dwukierunkowym transporcie tlenu, dwutlenku węgla, składników pokarmowych, metabolitów, jonów oraz wody. Zbudowane są z jednej warstwy - błony wewnętrznej, składającej się z komórek śródbłonna leżących na błonie podstawnej. W naczyniach włosowatych nie wyróżnia się błony środkowej ani zewnętrznej. Sporadycznie, naczynia włosowate mogą być otoczone przez pojedyncze komórki przydanki (pericyty), które, jednakże, nie wytwarzają oddzielnej warstwy (Majewski S, 1995).

Metaarteriole to naczynia mikrokrążenia, których średnica wynosi od 7-30 μm . Są naczyniami pomostowymi między włosniczkami a tętniczkami (arteriolami). Występują w każdym narządzie, ale szczególnie duża ich liczba jest obserwowana w wątrobie, szpiku kostnym oraz śledzionie (Sakai T, Hosoyamasa Y, 2013). Naczynia te zbudowane są z błony wewnętrznej oraz pojedynczej, miejscami nieciągłej, błony środkowej, w której można obserwować pojedyncze komórki mięśniowe ułożone prostopadle do długiej osi naczynia. Największe z naczyń mikrokrążenia to tętniczki. Ich średnica wynosi od 30 do 100 μm , a stosunek grubości ściany do średnicy naczynia wynosi jak 2:1 (Traczyk W, 2005). Tym samym są to naczynia, posiadające najgrubszą ścianę w stosunku do własnej średnicy. Ściana tętniczek składa się z klasycznej błony wewnętrznej, bardzo dobrze rozwiniętej błony środkowej (zbudowanej z 1 do 5 warstw komórek mięśniowych gładkich) oraz błony zewnętrznej (przydanki). Naczynia te pełnią funkcje oporowe - ich rozkurcz umożliwia wypełnienie krwią naczyń obwodowych (przede wszystkim włosniczek) oraz zaopatrywanie w tlen tkanek,

których prawidłowe funkcjonowanie jest w danym momencie kluczowe dla potrzeb organizmu (Traczyk W, 2005).

Gęstość naczyń mikrokrążenia jest odzwierciedleniem zapotrzebowania na tlen zależnych od nich tkanek (Jones AE, Puskarich MA, 2009). Stosunkowo niewiele naczyń mikrokrążenia obserwuje się w tkankach o niskim poziomie metabolizmu, takich jak tkanka łączna włóknista lub tkanka łączna wiotka. Wraz ze wzrostem zapotrzebowania na tlen, liczba jak i gęstość naczyń mikrokrążenia rośnie (Mulvany M i wsp., 1996). Zmiana ta może być podyktowana rosnącym zapotrzebowaniem tkanki w energię lub, przeciwnie, nie zmienionym poziomem metabolizmu tkankowego, a pojawiającym się zjawiskiem niedotlenienia tkanki (Seal J, 2005). W takim przypadku, dochodzi do uwalniania przez komórki tkanek obwodowych czynnika HIF-1 (hypoxia-induced factor 1), który poprzez regulowanie ekspresji około 100 genów (w tym genu dla naczyniowego czynnika wzrostu) inicjuje proces angiogenezy (Carmeliet P i wsp., 1998; Wu Y, 2014). Powszechnie uważa się, że niedotlenienie tkanek jest najsilniejszym czynnikiem pobudzającym wytwarzanie nowych naczyń krwionośnych (Zakrzewicz A, 2002). Jednakże znaczenie tego procesu w aspekcie histofizjologii mięśnia sercowego jest wciąż mało poznane.

1.1.2. Śródbłonek

Śródbłonek jest podstawowym elementem wytwarzającym błonę wewnętrzną naczyń (Majewski S, 2005). W aspekcie unaczynienia mięśnia sercowego, śródbłonek wyściełający naczynia krwionośne w tym narządzie posiada charakter ciągły oraz ma kształt ściśle do siebie przylegających komórek, silnie spłaszczonych, ułożonych swoją długą osią równolegle do osi naczyń. Funkcja śródbłonka opiera się o jego funkcję barierową i wydzielniczą. Funkcja barierowa związana jest z odgraniczeniem przedziału naczyniowego od pozanaczyniowego, co jest kluczowe w utrzymaniu prawidłowego ciśnienia onkotycznego krwi oraz kontrolowanym transporcie składników odżywczych oraz przemieszczaniu się komórek układu immunologicznego (monocytów i limfocytów) (Majewski S, 1995). Gazy oddechowe przemieszczają się przez tę barierę na zasadzie prostej dyfuzji, a kierunek transportu

jest uwarunkowany występującą różnicą stężeń. Funkcja wydzielnicza komórek śródbłonka polega na syntezie oraz uwalnianiu wazoaktywnych peptydów oraz biologicznie aktywnych cząsteczek biorących udział w regulacji napięcia ściany naczyń, przepływu krwi oraz procesu krzepnięcia, a także czynników regulujących przepuszczalność ściany naczyń, czynników wzrostu, prozapalnych cytokin oraz związków odpowiedzialnych za powstawanie nowych naczyń (Wnuczko K, Szczepański M, 2007). Najważniejszym związkiem wydzielanym przez śródbłonek jest tlenek azotu (NO), który jest odpowiedzialny za relaksację ściany naczynia oraz migrację komórek mięśniowych naczynia do błony wewnętrznej (Flig K, 2000).

1.1.2.1. Markery komórek śródbłonka

Jak już wcześniej wspomniano, funkcja komórek śródbłonka może być rozpatrywana w aspekcie pełnienia funkcji barierowej i wydzielniczej. W podobny zatem sposób można również grupować oraz opisywać białka markerowe komórek śródbłonka.

Funkcja barierowa komórek śródbłonka polega na utrzymaniu integralności błony wewnętrznej naczynia i jest definiowana ekspresją antygenów CD34, CD31 oraz czynnika von Willebranda (Flig K, 2000). Na osobną uwagę zasługuje antygen CD105, który jest markerem niedojrzałych (progenitorowych) komórek śródbłonka (Fonsatti E i wsp. 2001). Obecność tego białka w błonie wewnętrznej naczyń jest pośrednim dowodem na zwiększony obrót komórek śródbłonka, a co się z tym wiąże, również na zwiększony potencjał regeneracyjny. Ten, z kolei, może być traktowany jako wykładnik angiogenezy (Torsney E i wsp. 2002).

Podstawowym markerem opisującym funkcje wydzielniczą śródbłonka jest ekspresja śródbłonkowej syntazy tlenku azotu (eNOS, *endothelial nitric oxide synthase*). Natomiast potencjał angiogeny komórek śródbłonka, przekładający się na liczbę i gęstość naczyń krwionośnych, może być definiowany ekspresją antygeny CD44 oraz białka GDF-15.

Antygen CD34 występuje na powierzchni komórek hematopoetycznych szpiku kostnego oraz na komórkach śródbłonka. Jest białkiem transbłonowym o masie

cząsteczkowej 115kD. Gen kodujący CD34 znajduje się na chromosomie 1 (1q32) (Simmonds DL i wsp. 1992). Według niektórych autorów CD34 pełni rolę inhibitora procesów dojrzewania komórek hematopoetycznych (Tada J i wsp., 1999). Pełni również ważną rolę w adhezji limfocytów do węzłów chłonnych (Gołąb J, 2008). Wykazano, że antygen CD34 ułatwia migrację krążących komórek efektorowych układu immunologicznego (monocyty, limfocyty) do pozanaczyniowych tkanek objętych procesem zapalnym (Blanchet MR i wsp. 2007; Maltby S i wsp. 2010). Poza dojrzałymi komórkami śródbłonna, ekspresję CD34 obserwuje się w początkowych stadiach rozwoju progenitorowych komórek śródbłonna oraz we wczesnych etapach tworzenia i różnicowania naczyń krwionośnych (Kuzu I, 1992; Antosz H, 2004).

Ekspresja **antygeny CD31** występuje wyłącznie na ciągłych śródbłonkach naczyń krwionośnych. Jest białkiem przezłonowym o masie cząsteczkowej 130 kD. Gen dla antygeny CD31 znajduje się na chromosomie 17 (Xie Y i wsp. 1996; Newman PJ, 1997; 2003). Obecny jest na powierzchni komórek śródbłonna, płytkach krwi, makrofagach, komórkach Kupffera (Goldberger A i wsp., 1994; Muller WA, 1993), granulocytach, limfocytach, osteoblastach oraz neutrofilach. Pełni rolę w interakcjach adhezyjnych pomiędzy sąsiadującymi komórkami śródbłonna oraz pomiędzy leukocytami a śródbłonkiem (Tanaka Y, 1992; Sun QH, 1996; Sheibani N, 1998). Białko to należy do nadrodziny immunoglobulin – PECAM (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule – płytkowo - śródbłonna cząsteczka adhezji komórkowej). Jego ekspresję można zauważyć w wielu nowotworach, w tym naczyniakach, a także nowotworach histocytnych (Sun QH, 1996). Jest także spotykany w mięsaku Kaposiego (Gurzu S, 2013). Pełni znaczącą rolę w ocenie stopnia angiogenezy guza, może zatem świadczyć o szybkości nowotworzenia i rokowaniu (Newman PJ, 1992; Muller WA, 1995). Komórki nowotworowe wydają się wykorzystywać działanie proangiogenne i antyapoptyczne antygeny CD31 jako swojego źródła przetrwania (Kopeć-Szlęzak J, 2006; Tang DG, 1993). Białko to bierze również udział w procesie gojenia ran (Rossochacka – Rostalska B i wsp., 2007). Wobec powyższego, ze względu na swoje właściwości, jest jednym z najlepszych antygenów oceniających stopień dojrzałości naczyń oraz umożliwia pomiar ich gęstości w tkankach.

Czynnik von Willebranda (*von Willebrand factor*, vWF) to polimeryczna glikoproteina, znajdująca się w osoczu, o masie cząsteczkowej od 500kD do prawie 10000kD, zbudowana z kilku podjednostek o masie 250kD każda. Produkowana jest przez śródbłonek w ciałkach Werbel-Palade'a, megakariocytach (alfa - ziarnistości płytek) oraz w aparacie Golgiego (Calapso P i wsp., 1992). Białko to pełni główną rolę w adhezji trombocytów do uszkodzonego śródbłonka i służy jako transporter czynnika VIII w osoczu chroniąc go tym samym przed wpływem enzymów proteolitycznych (Sadler JE, 1998). Według niektórych autorów bierze czynny udział w tworzeniu przerzutów komórek nowotworowych, stwierdzono jego wysoki poziom w zaawansowanym stadium choroby nowotworowej (Paduch R, 2005). Czynnik vWF jest jednym z zaledwie kilku białek, które transportują antygeny grup krwi ABO (Sadler JE, 1998). Odgrywa ważną rolę w krzepnięciu krwi, w związku z tym, jego niedobór lub zaburzenia funkcji, prowadzą do nadmiernego krwawienia (choroba von Willebranda), co najbardziej jest widoczne w tkankach z wąskimi naczyniami a wysokim ciśnieniem przepływowym krwi (Konkle BA, 2014). Czynnik von Willebranda może być zatem z jednej strony traktowany jako marker dojrzałych komórek śródbłonka, a z drugiej, jako wyznacznik ich funkcji wydzielniczej (Nadar SK, 2004). Pojedyncze prace wskazują, że pomiar osoczowego stężenia propeptydu dla czynnika von Willebranda, jest markerem o wysokiej czułości wczesnego uszkodzenia śródbłonka (Vischer UM, 1997).

Endogлина (ENG/**antygen CD105**) jest transbłonowym białkiem o masie wynoszącej ok. 180kD (Quackenbush E, Letarte M, 1985; Barbara i wsp., 1999). Gen kodujący antygen CD105 znajduje się na chromosomie 9 (9q34) i zawiera 14 egzonów (Fernández-Ruiz i wsp., 1993; Pichuantes S i wsp. 1997). Dotychczas poznane zostały dwie izoformy endogliny: L-CD105 oraz S-CD105 (Bellón T i wsp., 1993). Ekspresja CD105 jest obecna głównie na komórkach śródbłonka, które to powstają w obrębie zmienionych zapalnie tkanek, nowotworów lub tkanek regenerujących się (Buduneli N i wsp., 2001; Dallas NA i wsp., 2008). Jest białkiem zaangażowanym w angiogenezę oraz dojrzewanie naczyń krwionośnych (Torsney E i wsp., 2002; van Laake LW i wsp., 2006). W tkankach ludzkich wykazuje również ekspresję w komórkach syncytiotrofoblastu łożyska (St-Jacques S i wsp., 1994). Co ciekawe, pozytywną ekspresję można zaobserwować w aktywowanych monocytach, makrofagach,

prekursorach erytrocytów, fibroblastach, komórkach mezangium, komórkach dendrytycznych i melanocytach (Fonsatti E i wsp., 2001, Dallas NA i wsp., 2008). Osoczowe stężenie rozpuszczalnej formy białka CD105 pozytywnie koreluje ze stopniem proliferacji ludzkich komórek śródbłonkowych żyły pępowinowej (HUVEC) i wykazuje nadekspresję w komórkach śródbłonka nowo powstałych naczyń guzów nowotworowych (Fonsatti E i wsp., 2000).

W porównaniu do antygenów CD34, CD31 oraz czynnika von Willebranda, antygen CD105 jest markerem progenitorowych komórek śródbłonka, którego ekspresja zanika w komórkach dojrzałych. Oznacza to tym samym, że o ile ekspresja antygeny CD34 może być wykładnikiem zarówno niedojrzałych jak i dojrzałych komórek śródbłonka, o tyle ekspresja CD105 jest ograniczona wyłącznie do puli komórek niedojrzałych.

Jak już wcześniej przytaczano, najbardziej istotnym mediatorem wydzielanym przez śródbłonek jest tlenek azotu (NO) (Radomski MW, 1995). Podstawową funkcją tlenku azotu jest rola wazodylatacyjna - rozszerzanie naczyń krwionośnych poprzez relaksację komórek mięśniowych w obszarze błony środkowej (Flig K, 2000). Kompleksowe działanie tlenku azotu na funkcjonowanie naczyń krwionośnych jest jednak znacznie bardziej złożone. Związek ten, w aspekcie długotrwałego wpływu na stan naczyń krwionośnych, jest najsilniejszym czynnikiem doprowadzającym do migracji komórek mięśniowych gładkich do błony wewnętrznej naczynia (Flig K, 2000).

Może to doprowadzić do przerostu tej błony oraz ograniczania światła naczynia. Przeciwna funkcja NO jest zapewne związana z potrzebą utrzymania lokalnej homeostazy naczyń krwionośnych. W aspekcie przetrwałego niedotlenienia tkanki, bądź zwiększonego zapotrzebowania na tlen, działanie to może mieć jednak wpływ niekorzystny. Sytuację tę pogarsza fakt, że **syntaza tlenku azotu** jest białkiem, którego ekspresja jest stwierdzana w obrębie dojrzałych jak i niedojrzałych komórek śródbłonka (Tomczyk M i wsp., 2013). Z uwagi na ww. charakter ekspresji syntazy tlenku azotu, marker ten wykorzystano jako czynnik umożliwiający oszacowanie całkowitej liczby naczyń krwionośnych w danym obszarze badanej tkanki, co było punktem wyjścia do obliczania liczby naczyń pozytywnych (w zakresie ekspresji CD34, CD31, vW oraz CD105) w poszczególnych rodzajach wad wrodzonych serca.

Antygen CD44 należy do rodziny komórek adhezyjnych receptorów kwasu hialuronowego, zaangażowanych w dystrybucję leukocytów (Aruffo A i wsp., 1990, Goodison S i wsp., 1999). Jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej 44kD, tworzącą receptor dla kwasu hialuronowego (Dimitroff CJ i wsp., 2001). Występuje na powierzchni fibroblastów, limfocytów i komórek śródbłonka (Sackstein R, 2011). Odgrywa znaczącą rolę w mediacjach między-komórkowych, jest zaangażowany w proliferację śródbłonka, migrację i angiogenezę (Goodison S i wsp., 1999). Pełni funkcję mediatora pomiędzy adhezją limfocytów do komórek śródbłonka w miejsca stanu zapalnego u myszy (DeGrendele HC i wsp., 1997) jak i w ludzkich chorobach autoimmunologicznych (Estess P i wsp., 1998). Dowiedziono również, że CD44 jest wskaźnikiem przeżycia u pacjentek z nabłonkowymi nowotworami jajnika (Sillanpaa S i wsp., 2003).

Białko GDF-15 (*growth differentiation factor 15*) jest peptydem o masie cząsteczkowej 40kD. Początkowo był nazywany cytokiną hamującą makrofagi 1. W warunkach fizjologicznych jest obecny w niewielkich ilościach w nerce, trzustce, gruczole krokowym, wątrobie, w większej ilości w łożysku (Strelau J, 2000). Jest produkowany jako propeptyd o masie cząsteczkowej 40kD, a następnie N-końcowy odcinek jest oddzielany. Aktywna forma to dwuczłonowa proteina z mostkiem dwusiarczkowym o masie 30 kD (Ago T, Sadoshima J, 2006). Odpowiada za programowanie śmierci i przeżycia komórki (Strelau J, 2000). Jego ekspresja występuje w czasie angiogenezy na powierzchni śródbłonka naczyń niedojrzałych, uszkodzonych, a także ulegających przebudowie.

Podsumowując dane przedstawione w bieżącym podrozdziale, należy zauważyć, że panel antygenów CD34, CD31, CD105 oraz czynnik von Willebranda jest zestawem umożliwiającym określanie nie tylko liczby (gęstości) naczyń krwionośnych w danej tkance, ale również dostarczeniu wielu wartościowych informacji dotyczących stopnia dojrzałości komórek śródbłonka oraz stopnia ich metabolizmu o ile wartości ekspresji ww. czynników porówna się do stopnia obecności w śródbłonku syntazy tlenu azotu, antygeny CD44 oraz białka GDF-15.

1.1.2.2. Gęstość naczyń krwionośnych

Określanie gęstości naczyń krwionośnych w tkance jest niezwykle przydatnym narzędziem badawczym. Umożliwia ono poznanie metabolizmu tkankowego, a w szczególności zapotrzebowania na tlen w zaopatrywanej tkance (Hoeben A i wsp., 2004). Gęstość naczyń krwionośnych, definiowana liczbą przekrojów przez naczynia mikrokrążenia obecną w preparacie mikroskopowym, jest bardzo zmienna i zależna od charakteru tkanek. W obszarach charakteryzujących się stosunkowo niewielkim metabolizmem, gęstość naczyń krwionośnych nie przekracza 10-20 na 1mm². Z kolei tkanki charakteryzujące się wysokim indeksem metabolicznym posiadają naczynia krwionośne o gęstości od 100-300 na 1mm² (Nowicki M i wsp., 2008). Całkowicie różną gęstość od ww. wartości posiadają tkanki nowotworowe, w których gęstość naczyń krwionośnych wynosi od 400-600/mm² (Felmeden DC, 2003; Hoeben A i wsp., 2003; Nowicki M i wsp., 2008). Gęstość naczyń krwionośnych zwiększa się zatem w dwóch przypadkach: w sytuacji rosnącego metabolizmu tkankowego lub w wyniku niedotlenienia tkanek. O ile zmiana metabolizmu tkankowego jest wypadkową biologii zaopatrywanej tkanki, o tyle niedotlenienie pojawiające się w danym obszarze może być pochodną systemowej niewydolności układu krążenia. A taka pojawia się m.in. w przypadku wrodzonych wad serca.

1.2. Wrodzona wada serca

Według definicji Mitchella i wsp. wrodzona wada serca to strukturalna nieprawidłowość budowy serca lub dużych naczyń w obrębie klatki piersiowej mająca obecne lub potencjalne znaczenie dla funkcji organizmu.

Wrodzone wady serca dzielone są w zależności od kryterium na:

- zespoły (w oparciu o opis zmian anatomicznych),

- wady ze zmniejszonym, zwiększonym lub prawidłowym przepływem płucnym (w zależności od wielkości przepływu płucnego),
- wady sinicze i niesinicze (w zależności od obecności lub braku sinicy),

Z uwagi na charakter oraz zakres prac badawczych prowadzonych w przewodzie doktorskim zdecydowano, aby rezultaty prac badawczych odnosić do podziału wad serca uwzględniających brak lub pojawianie się sinicy.

1.2.1. Embriogeneza

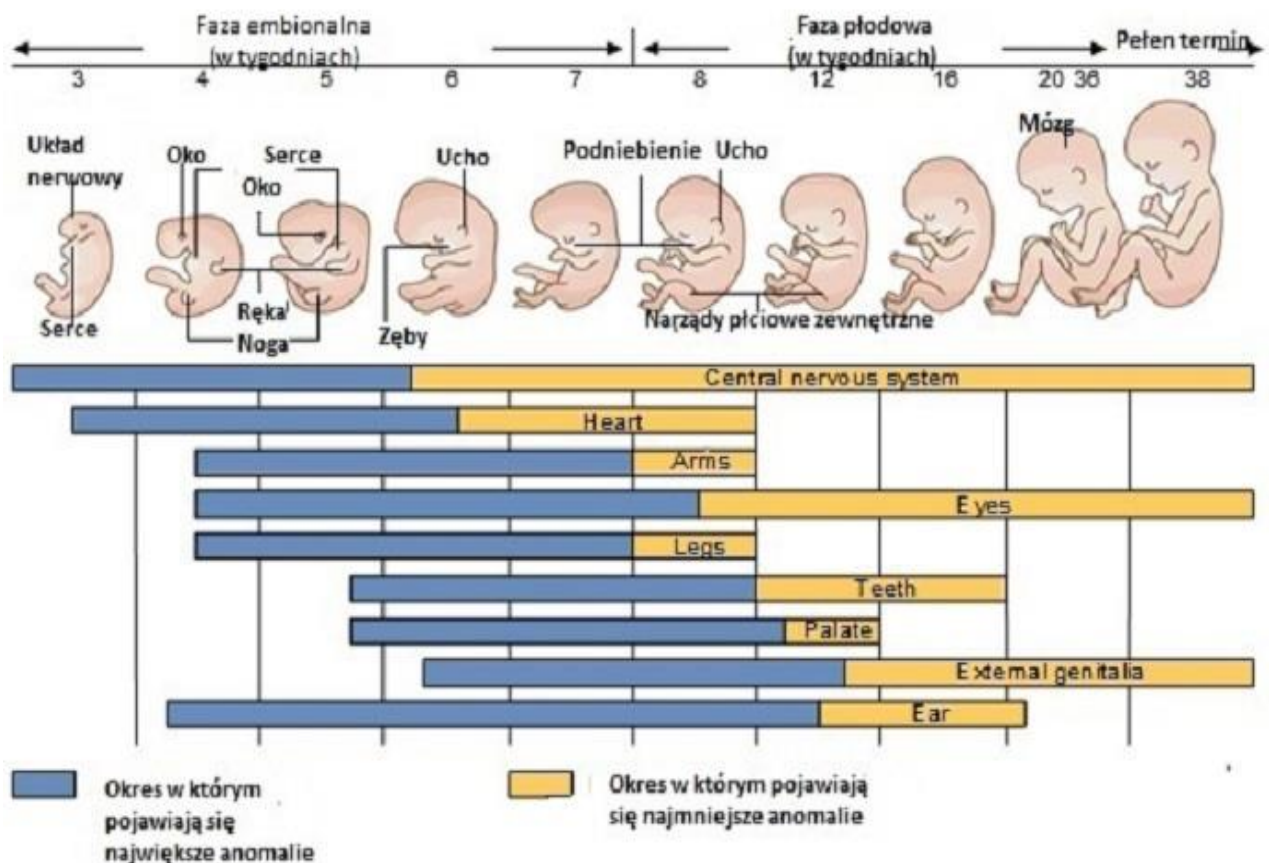
W krajach europejskich wady serca są rozpoznawane u ok. 0,8-1,0% żywo urodzonych noworodków (Dangiel J, 2009). W większości przypadków (70-90%) przyczyna ich powstania jest nieznana. W pozostałych (10-30%) uwzględnia się podłoże genetyczne oraz wpływ czynników teratogennych (Kwiatkowska J i wsp., 2007).

W aspekcie powstawania wrodzonych wad serca dużą rolę odgrywają etapy rozwoju serca. Najistotniejszym etapem dla tego rozwoju jest okres embrionalny (zarodkowy), trwający od 15-60 dnia od zapłodnienia (ryc. 1). Pierwsze pole sercowe, dające początek rozwojowi pierwotnej cewy sercowej, pojawia się w trzecim tygodniu życia zarodkowego. Większość wad serca powstaje między 4. a 8. tygodniem ciąży. Dodatkowym czynnikiem, poza ogólnie znanymi i udowodnionymi jako przyczyny ich powstawania, jest obarczone ryzykiem zachowanie przyszłej matki (palenie tytoniu, spożywanie alkoholu, zażywanie narkotyków oraz teratogennych leków).

Etapy rozwoju serca – okres prenatalny (Ratajska A i wsp., 2010) :

- 15 dzień – powstanie cewy sercowej;
- 20 dzień – skręcanie się cewy wokół własnej osi;
- 22 dzień – pierwsze skurcze cewy sercowej;
- 28-35 dzień – podziały wewnętrzne struktur cewy sercowej;
- 37-44 dzień – zakończenie rozwoju cewy sercowej;

Należy zauważyć, że ryzyko pojawienia się wrodzonych wad serca jest tym większe, im większa jest nieświadomość przyszłej matki o fakcie bycia w ciąży. Jak przytoczono powyżej, kształtowanie się pierwszych struktur embrionalnych w rozwoju serca zachodzi już w pierwszych trzech tygodniach od chwili zapłodnienia. Nie każda kobieta, na tym etapie rozwoju zarodka, zdaje sobie sprawę z tego, że zaszła w ciążę. Tym samym prawdopodobieństwo ryzykownych zachowań przyszłej matki jest stosunkowo duże.



Ryc. 1. Etapy rozwoju serca, zmodyfikowane na podstawie W. J. Larsen Human embryology (["http://www.poldiologia.org/polski/egzamin/streszczenia/2006-jesien/10.07.EMBRIOGENEZA -- WADY SERCA -- SYLABUS.pdf"](http://www.poldiologia.org/polski/egzamin/streszczenia/2006-jesien/10.07.EMBRIOGENEZA--WADY_SERCA--SYLABUS.pdf)) okres z rozwojem dużych zmian wrodzonych. Okres z rozwojem małych zmian wrodzonych

1.2.2. Siniczne wady serca

Sinica jest objawem chorobowym charakteryzującym się sinym (niebieskawym) zabarwieniem powłok ciała i błon śluzowych, spowodowanym obecnością odtlenowanej hemoglobiny lub hemoglobiny patologicznej (methemoglobiny) w naczyniach krwionośnych (Szczeklik A, 2005). Dla jej ujawnienia konieczny jest wzrost stężenia odtlenowanej hemoglobiny przekraczający 5g/100ml krwi (50g/l).

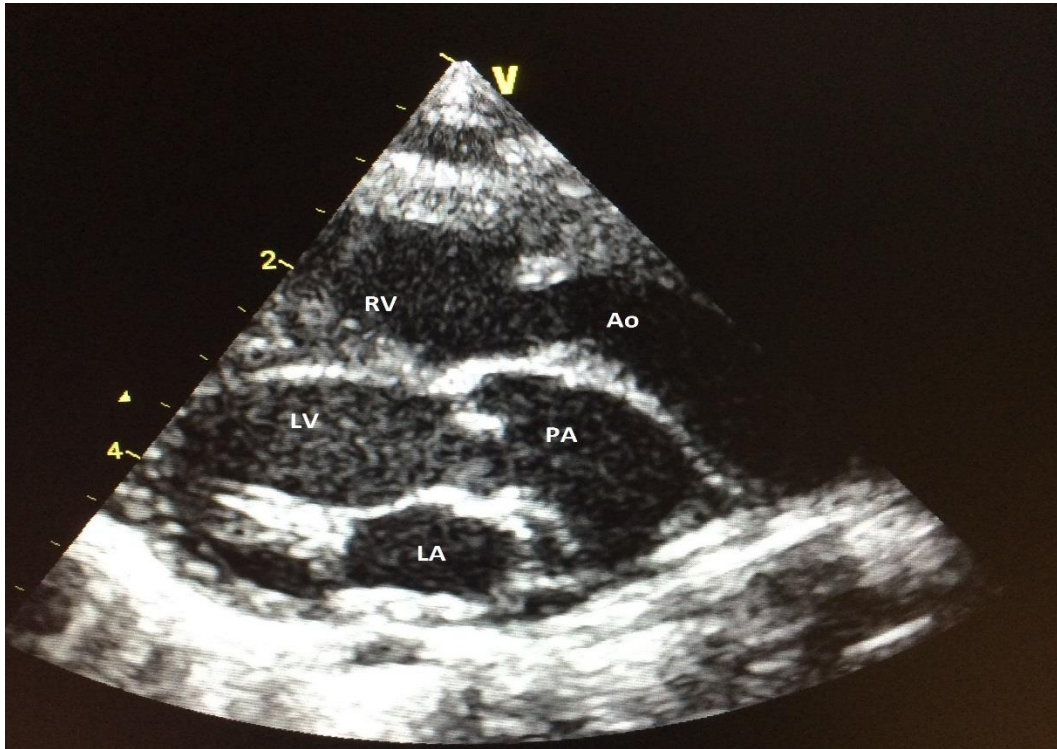
Z punktu widzenia klinicznego wyróżnia się sinicę obwodową i centralną.

Sinica obwodowa dotyczy charakterystycznego zabarwienia wyłącznie dystalnych części ciała. W sytuacji, gdy ciśnienie parcjalne tlenu we krwi tętniczej spada poniżej < 60mmHg, a wysycenie hemoglobiny tlenem < 85% (Szczeklik A, 2005) pojawia się sinica centralna - zlokalizowana w obszarze warg oraz struktur jamy ustnej (język, błona śluzowa).

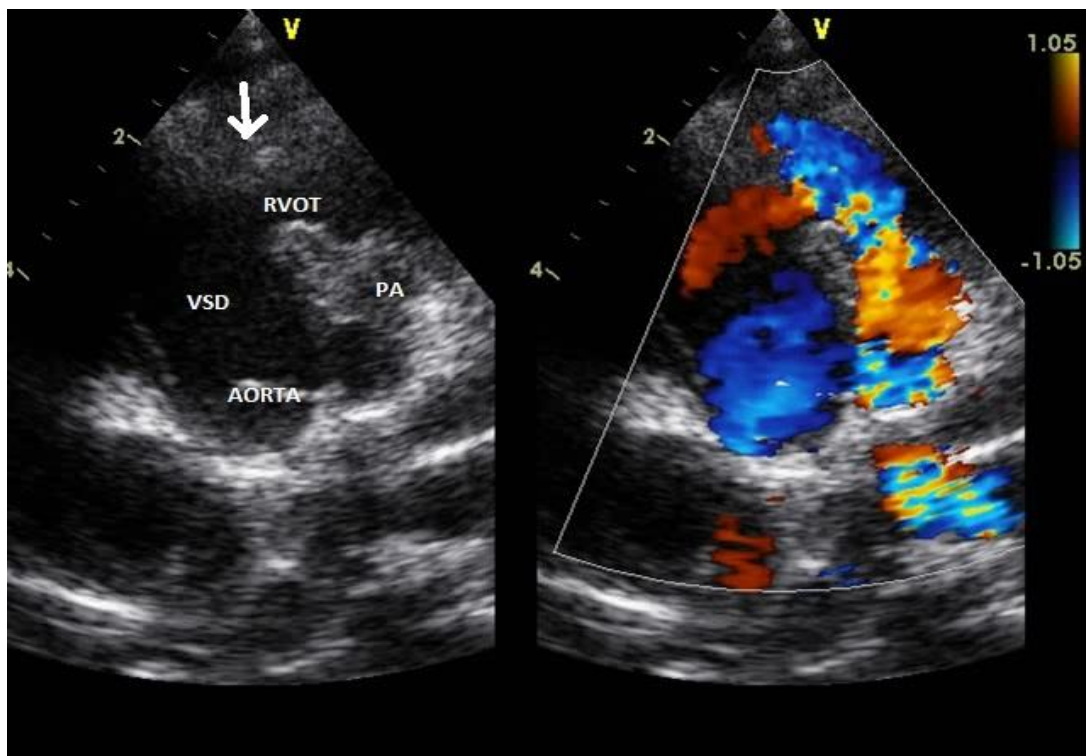
Choć wyróżnia się stosunkowo wiele potencjalnych przyczyn sinicy, to jednymi z najbardziej istotnych są wrodzone wady serca z obecnością przecieku prawo-lewego (Bolger AP, 2003).

Do najczęściej występujących wad serca sinicznych zalicza się:

- przełożenie wielkich pni tętniczych, TGA (*transposition of great arteries*) (ryc. 2),
- zespół czworaczy Fallota, tetralogia Fallota, ToF (*Tetralogy of Fallot*) (ryc. 3),
- anomalię Ebsteina (*Ebstein anomaly*) (ryc. 4),
- atrezię tętnicy płucnej, PA (*Pulmonary atresia*),
- atrezię zastawki trójdzielnej, TA (*Tricuspid atresia*).



Ryc. 2. Badanie echokardiograficzne 4-dniowego noworodka płci męskiej z rozpoznaniem całkowitego przełożenia wielkich pni tętniczych (TGA). Ao- aorta, PA- pulmonary artery (tętnica płucna), RV- right ventricule (prawa komora), LV- left ventricule (lewa komora), LA- left atrium (lewy przedsionek) (materiały własne)



Ryc. 3. Badanie echokardiograficzne wykonane u 13-miesięcznego dziecka płci żeńskiej z rozpoznaniem tetralogii Fallota. Na zdjęciu oznaczono zwężenie odpływu z prawej komory serca (RVOT), ubytek w przegrodzie międzykomorowej (VSD), aortę ("aorta-jeździec") przerost mięśnia prawej komory za pomocą strzałki (materiały własne).



Ryc. 4. Badanie echokardiograficzne wykonane u 10-dniowego noworodka płci żeńskiej z rozpoznaniem anomalii Ebsteina. Strzałką zaznaczono przesunięcie dwóch płatków zastawki trójdzielnej w kierunku prawej komory serca (materiały własne).

1.2.3. Późnosiniczne oraz niesiniczne wady serca

Wadami późnosinicznymi określa się zaburzenia, w których początkowo występuje przeciek lewo-prawy (z "wysokociśnieniowej" komory lewej do "niskociśnieniowego" serca prawego) a następnie – w wyniku przerostu nadmiernie obciążonego mięśnia komory prawej lub podwyższonego ciśnienia w łożysku płucnym, dochodzi do zmiany gradientu ciśnień w jamach serca i odwrócenia przecieku na prawo-lewy. Tym samym sinica, która była nieobecna w okresie niemowlęcym i/lub wczesnego dzieciństwa, pojawia się w okresie późniejszym (zwykle między 1. a 3. rokiem życia).

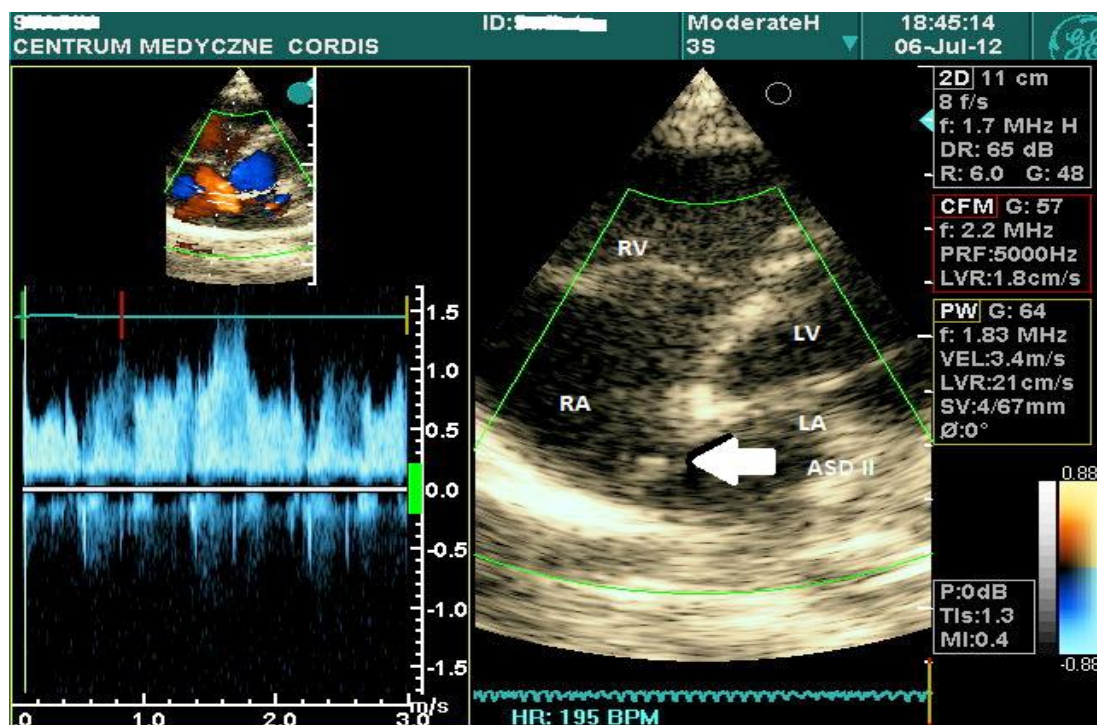
Wadami serca niesinicznymi określa się natomiast zaburzenia hemodynamiczne serca, w patofizjologii których dochodzi do utrudnionego przepływu krwi, ale nie występuje przeciek krwi pomiędzy krążeniem płucnym a systemowym.

Do wad serca późnosinicznych zalicza się

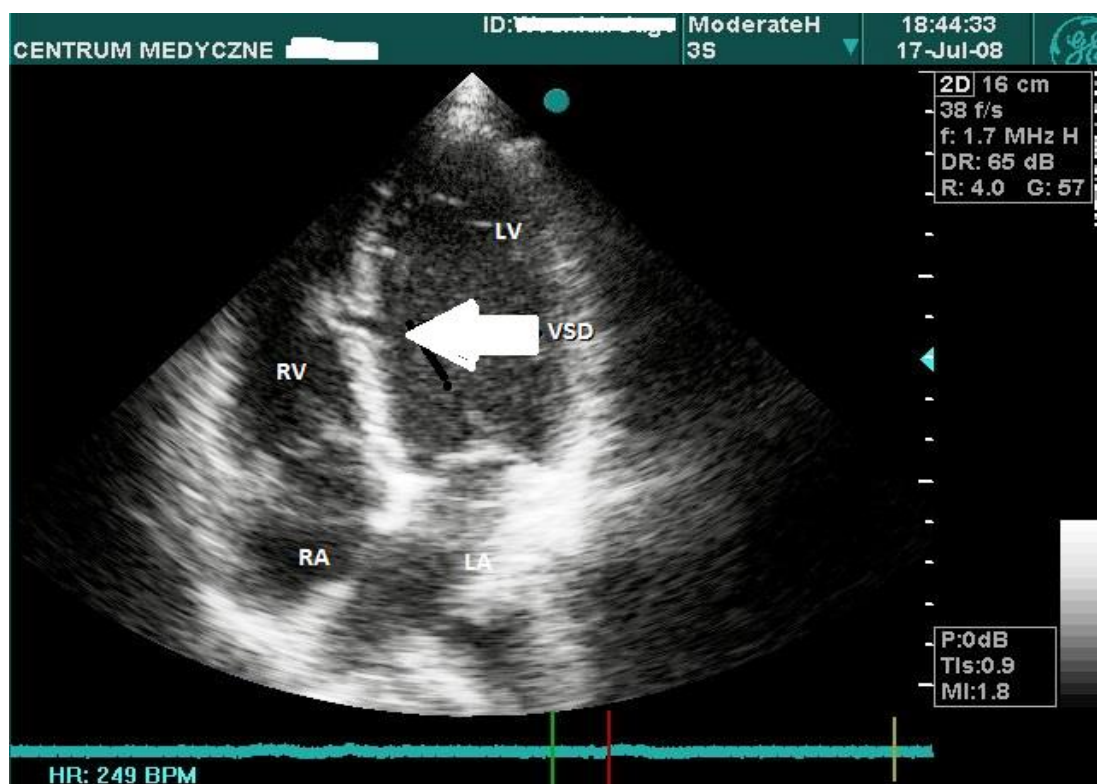
- ubytek w przegrodzie międzyprzedsionkowej, ASD (*atrial septal defect*), w tym:
 - ubytek międzyprzedsionkowy typu ASD I (*ostium primum atrial septal defect*) – ubytek typu otworu pierwotnego;
 - ubytek międzyprzedsionkowy typu ASD II (*ostium secundum atrial septal defect*) (ryc. 5) – ubytek typu otworu wtórnego;
- ubytek w przegrodzie międzykomorowej, VSD (*ventricular septal defect*) (ryc. 6),
- ubytek w przegrodzie przedsionkowo-komorowej, AVSD (*atrio-ventricular septal defect*) (ryc. 7).

Najczęstszym przykładem wady niesinicznej jest natomiast koarktacja aorty, CoA (*coarctation of aorta*), (ryc. 8).

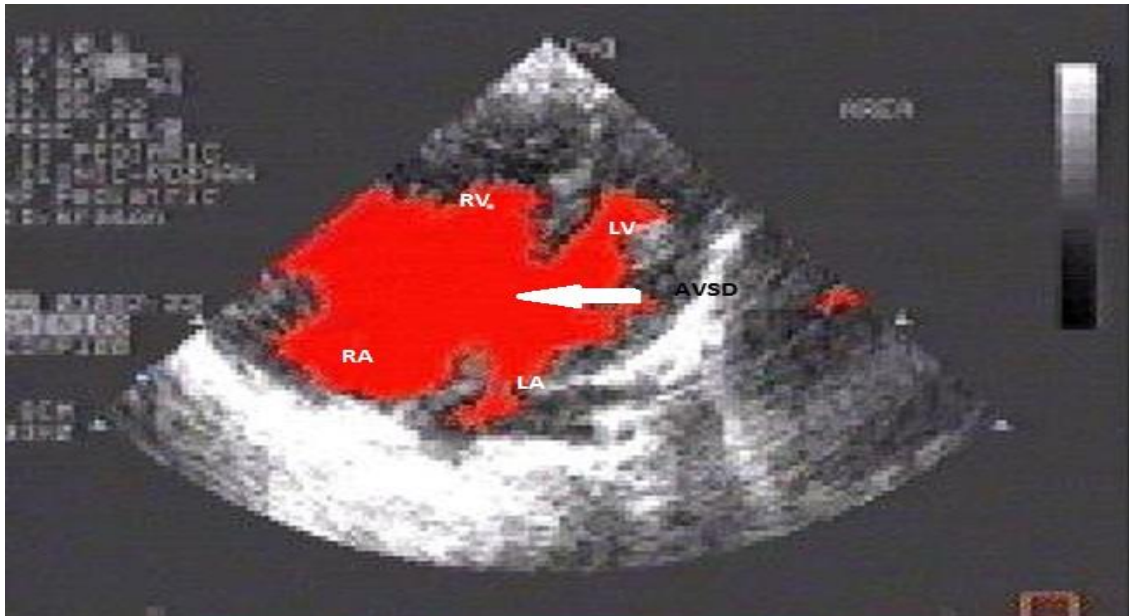
Należy zauważyć, że z punktu widzenia bieżącego opracowania, zarówno wady późnosiniczne jak i niesiniczne można traktować jako wady przebiegające bez objawów sinicy. Dzieci, które były operowane z powodu wad serca późnosinicznych jak i koarktacji aorty, miały wykonywany zabieg operacyjny w pierwszych miesiącach życia, a więc przed pojawieniem się objawów sinicy.



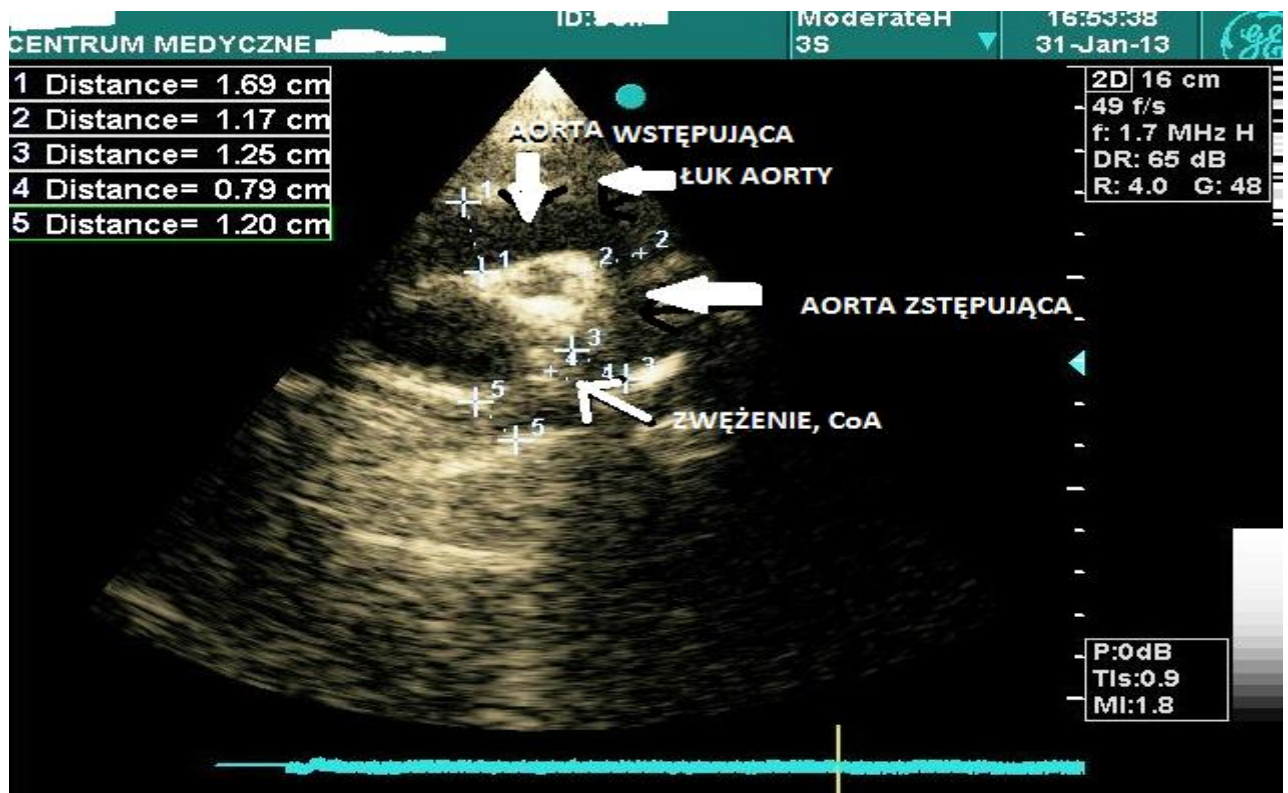
Ryc. 5. Badanie echokardiograficzne wykonane u 6-miesięcznego chłopca z rozpoznaniem ubytku międzyprzedsionkowego typu ASD II. Strzałką zaznaczono ubytek w przegrodzie międzyprzedsionkowej, LV- left ventricle (lewa komora), LA- left atrium (lewy przedsionek), RV - right ventricle (prawa komora), RA- right atrium (prawy przedsionek) (materiał własny).



Ryc. 6 Badanie echokardiograficzne wykonane u 2-miesięcznej dziewczynki z rozpoznaniem ubytku międzykomorowego. Strzałką zaznaczono ubytek w przegrodzie międzykomorowej, LV- left ventricle (lewa komora), LA- left atrium (lewy przedsionek), RV - right ventricle (prawa komora), RA- right atrium (prawy przedsionek) (materiał własny).



Ryc. 7. Badanie echokardiograficzne wykonane u 2-letniego chłopca z rozpoznaniem ubytku przedsionkowo-komorowego (AVSD), LV- left ventricle (lewa komora), LA- left atrium (lewy przedsionek), RV - right ventricle (prawa komora), RA- right atrium (prawy przedsionek). Badanie wykonane metodą acoustic quantification (materiał własny).



Ryc. 8 . Badanie echokardiograficzne wykonane u 4-dniowego noworodka płci żeńskiej z rozpoznaniem koarktacji aorty. Strzałką zaznaczono zwężenie aorty zstępującej. Pomiary wykonywano w miejscach aorty wstępującej, łuku aorty, aorty zstępującej. Po lewej stronie ryciny znajdują się opisane w tabeli wyniki pomiarów morfometrycznych (materiał własny).

1.2.4. Przyczyny powstawania wrodzonych wad serca

Jak wykazują niżej przytoczone dane, u większości chorych dzieci z wrodzonymi wadami serca, przyczyna ich powstania jest nieznana. Na ich rozwój składają się zarówno czynniki egzo- jak i endogenne. Na podstawie doniesień z różnych ośrodków neonatologiczno-pediatrycznych, nie udaje się rozpoznać przyczyny aż w 70% przypadków, a przyczyny genetyczne, w tym jednogenowe oraz aberracje chromosomalne stanowią odpowiednio 15% i 5% (Szczaluba K i wsp., 2010). Czynniki egzogenne (środowiskowe) takie jak choroby matki, leki, infekcje, substancje chemiczne czy też różnorodne czynniki fizyczne mogą stanowić przyczynę aż 10% wszystkich wad serca (Szczaluba K i wsp., 2010). Zespół ten wykazał również, że około 10-15% płodów jest dotkniętych pojedynczą lub mnogą wadą wrodzoną, podczas gdy częstość ich występowania u żywo urodzonych noworodków stanowi 2-3%. Świadczy to o tym, że wiele spośród tych wad ma charakter letalny, a zgon dziecka następuje w okresie prenatalnym, często przed postawieniem rozpoznania. Wiele rodzin ze zwiększonym ryzykiem posiadania dziecka z wadą wrodzoną (wiek matki, wiek ojca, wady u rodzeństwa, wady występujące w rodzinie) nie otrzymuje wystarczającej informacji jak należy postępować i zachowywać się w obliczu coraz to bardziej dostępnych możliwości wczesnej diagnostyki i leczenia. Szczególne znaczenie dla odległego rokowania ma poinformowanie rodziców pacjentów z wrodzoną wadą serca o możliwościach wykorzystania w diagnostyce kardiologicznej metod nieinwazyjnych, w tym badania ultrasonograficznego (pierwszego badania w ciąży), echokardiograficznego, kardiokograficznego i oraz metod inwazyjnych, w tym metod cytogenetyczno-molekularnych.

1.2.5. Rozpoznanie i leczenie wrodzonych wad serca

Nieinwazyjne rozpoznanie wrodzonej wady serca opiera się na podstawie badania klinicznego, elektrokardiograficznego, zdjęcia rentgenowskiego klatki piersiowej oraz badania echokardiograficznego. To ostatnie jest zarazem badaniem rozstrzygającym (Alczewska-Baronowska J, 2000).

Wybór sposobu leczenia wrodzonej wady serca zależy od jej rodzaju, zaburzeń hemodynamicznych w układzie krążenia oraz stanu klinicznego pacjenta (Malec E, 2006). Różnica w wyborze leczenia może dotyczyć tej samej wrodzonej wady serca. Zależy ono bowiem od istotnych objawów, które występują już w okresie noworodkowym lub niemowlęcym, manifestują się później gorszym rozwojem fizycznym dziecka, nawracającymi infekcjami górnych dróg oddechowych, a w skrajnych przypadkach nawet niewydolnością serca, która może prowadzić do rozwoju nadciśnienia płucnego i śmierci pacjenta. Sposób leczenia wady serca opiera się w głównej mierze na kardiochirurgicznej korekcie, w przypadku niektórych wad na kardiologicznym zabiegu interwencyjnym, a także późniejszej stałej opiece kardiologicznej i w niektórych sytuacjach suplementacji leków nasercowych (Malec E, 2006). W przypadku wielu prostych wad serca kwalifikacja do leczenia zabiegowego opiera się na wynikach badań nieinwazyjnych, w tym echokardiografii.

W złożonych wadach serca, a zwłaszcza w wadach leczonych wieloetapowo, konieczne jest poszerzenie diagnostyki o badania inwazyjne, jakimi są cewnikowanie serca (Wojtalik M i wsp., 1995; Szkutnik M i wsp., 1998; Kusa J i wsp., 2003, 2004), rezonans magnetyczny, czy też tomografia komputerowa.

Do najczęściej wykonywanych kardiologicznych zabiegów interwencyjnych u dzieci należą:

- zamknięcie przetrwałego przewodu tętniczego za pomocą wewnątrznaczyniowej sprężynki (ang. *coil*) lub zapinki (zatyczki) Amplatza (ang. *Amplatzer*),
- zamknięcie ubytku międzyprzedsionkowego zapinką Amplatza,
- plastyka balonowa zwężenia prawego i lewego ujścia tętniczego,
- plastyka balonowa i wszczepienie stentu donaczyniowego w koarktacji aorty (Santoro G i wsp., 1998; Białkowski J i wsp., 2002).

Zabiegom kardiochirurgicznym poddawane są dzieci przede wszystkim ze złożonymi wadami serca, takimi jak ToF, HLHS (*hypoplastic left heart syndrome*), anomalia Ebsteina, a także z najczęściej występującą wrodzoną wadą serca, jaką jest VSD (Białkowski J i wsp., 2007; Szkutnik M i wsp., 2007).

Aż 5% wrodzonych wad serca stanowi TGA, które częściej występuje u chłopców. Często pierwszym krokiem w ratowaniu noworodka jest wykonanie atrioseptostomii balonowej metodą Rashkinda, która ma na celu zwiększenie przepływu lewo-prawego

przez przegrodę międzyprzedsionkową i poprawę utlenowania krwi w aorcie (Boehm W i wsp., 2006).

Bez względu na rodzaj stosowanego leczenia zabiegowego, korekcja wady ma na celu przywrócenie prawidłowego przepływu krwi i warunków hemodynamicznych w sercu. Wiąże się ona w sposób nieodłączny z kardiochirurgicznym opracowaniem zaburzenia, w czasie którego zostają usunięte fragmenty mięśniówki serca w bezpośrednim sąsiedztwie wady. Usunięte fragmenty serca noworodka są traktowane jako odpad medyczny i utylizowane. Należy jednak zdawać sobie sprawę z faktu, że usuwany materiał może być źródłem niezwykle cennych informacji o dynamice przebiegu ewentualnego niedotlenienia mięśnia sercowego w okresie pre- jak i postnatalnym. Tym samym materiał ten, odpowiednio opracowany, może być dodatkowym elementem pozwalającym na oszacowanie rokowania we wrodzonych wadach serca u dzieci.

1.2.6. Rokowanie

Co roku około 3000-3500 dzieci i młodzieży operowanych jest w Polsce z powodu wrodzonych wad serca. W 2010 roku ukazały się nowe rekomendacje Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego dotyczące leczenia i postępowania z dorosłymi po operacjach wrodzonych wad serca (Kardiologia Polska, 2010). Do grupy tak zwanych dobrze rokujących wad serca zaliczyć można przetrwały przewód tętniczy, izolowane ubytki przegrody międzyprzedsionkowej oraz międzykomorowej, których zaopatrzenie chirurgiczne odbyło się przed pojawieniem się istotnych zaburzeń hemodynamicznych (Książek K, 2005).

Leczenie wrodzonej wady serca, jaką jest ubytek międzyprzedsionkowy typu ASD II za pomocą metody przezskórnej, czyli zamknięcia ubytku Amplatzerem, jest najkorzystniejsze jeżeli zostanie przeprowadzone przed 25 rokiem życia (Roos-Hesselink JW, 2003). Według Rosas M. i wsp. zamknięcie ubytku po 40 roku życia nie wpływa na częstość występowania zaburzeń rytmu serca. Zatem rokowanie po korekcie przezskórnej tej wady jest korzystne, nie powodujące odległych powikłań takich jak ograniczenie tolerancji wysiłku, duszność wysiłkowa, czy niewydolność prawokomorowa serca.

Najczęstsza sinicza wada serca u niemowląt – Tetralogia Fallota, jest aktualnie korygowana w okresie niemowlęcym, co wiąże się ze zdecydowanie lepszym rokowaniem u tych pacjentów. Według wielu autorów do istotnych statystycznie czynników ryzyka wczesnego zgonu należą wiek poniżej 3 miesiąca w chwili wykonywania operacji oraz masa ciała poniżej 5 kg (Warne CA, 2003).

Mogłoby się wydawać, że chirurgiczna korekcja wady serca całkowicie eliminuje problem zaburzeń hemodynamicznych. Należy jednak zaznaczyć, że, jak dotąd, nie badano zmian obecnych w mięśniu sercowym, które rozwijają się w tym narządzie w okresie przed korekcją wady. Trudno oszacować, czy w obszarze niedotlenionego mięśnia sercowego pojawiają się zmiany, które mogą mieć wpływ na wczesne lub też odległe rokowanie u dzieci z wrodzonymi wadami serca. Nie wiadomo, czy ewentualna przebudowa mięśnia sercowego pojawia się tylko w wadach sinicznych, czy też, być może, również w tych, które w swoim początkowym stadium przebiegają bez sinicy (wady późnosiniczne oraz niesiniczne).

Niewątpliwym postępem w dziedzinie kardiologii dziecięcej i kardiologii jakiegoś dokonał się w ostatnich 30 latach nie przynosi odpowiedzi na te pytania. Zatem wydaje się, że próba oszacowania gęstości naczyń krwionośnych w oparciu o morfologię oraz funkcję komórek śródbłonna może stanowić istotny przyczynek do poszerzenia wiedzy w tym zakresie.

2. Założenia i cele pracy

Pomimo niewątpliwego postępu, jaki dokonał się w ostatnim dziesięcioleciu w aspekcie diagnostyki obrazowej wad serca oraz możliwości chirurgicznej korekcji wad serca, zaburzenia te pozostają największym problemem w kardiologii dziecięcej. Przyczyna tego zjawiska jest dwojaka. Po pierwsze, wrodzone wady serca rozpoznawane są u około 1% żywo urodzonych noworodków. Każdego roku na świat przychodzi w Polsce około 3500 dzieci z rozpoznaniem wrodzonej wady serca. Po drugie, nadal stosunkowo niewiele wiadomo na temat przebudowy mięśnia sercowego, jaka zachodzi w sercu w następstwie pojawienia się wady oraz zaburzonego krążenia krwi. Tym samym, wciąż nie dysponujemy wystarczającymi informacjami do tego, aby można było określić sposób funkcjonowania serca oraz układu krążenia w okresie po chirurgicznym zaopatrzeniu wady.

W bieżącym opracowaniu przyjęto założenie, że mięsień sercowy funkcjonujący w warunkach towarzyszącemu wadzie systemowemu niedotlenieniu, może ulegać przebudowie definiowanej liczbą oraz dojrzałością obecnych w nim naczyń krwionośnych. Przebudowa ta z kolei, może mieć znaczenie w określaniu rokowania po wykonanym zabiegu chirurgicznej korekcji wady.

W związku z powyższym celem pracy doktorskiej była ocena :

1. potencjalnego niedotlenienia mięśnia sercowego towarzyszącego wrodzonym wadom serca poprzez określenie gęstości naczyń mikrokrążenia w wycinkach mięśnia sercowego uzyskanych podczas operacyjnej korekty wady,
2. przydatności oznaczania tkankowej ekspresji antygenów CD31, CD34, CD105, CD44, czynnika von Willebranda, syntazy tlenu azotu oraz białka GDF-15 w określaniu dojrzałości naczyń mikrokrążenia mięśnia sercowego we wrodzonych wadach serca,
3. przydatności oznaczania liczby oraz dojrzałości naczyń mikrokrążenia w określaniu prawdopodobieństwa przywrócenia pełnej wydolności serca po operacyjnej korekcji wady serca.

3. Materiał i metody

3.1. Pacjenci

Grupa badana liczyła 93 dzieci w wieku od 7 dni do 13 lat przyjętych do Kliniki Kardiologii i Nefrologii Dziecięcej lub Kliniki Kardiochirurgii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu z rozpoznaniem wrodzonej wady serca.

Rozpoznanie wrodzonej wady serca opierało się o wykonanie podstawowych badań w tym wywiadu ciężowego, interpretację obrazu klinicznego choroby oraz wykonanie badań dodatkowych: testu hiperoksji (umożliwiającego zróżnicowanie pochodzenia sinicy), badania elektrokardiograficznego, badania echokardiograficznego oraz zdjęcia radiologicznego klatki piersiowej.

Wykonanie ww. badań diagnostycznych było punktem wyjścia do podziału grupy badanej na dwie grupy porównawcze: **A** - grupa z rozpoznaniem sinicznej wady serca (n=47; 26 chłopców oraz 21 dziewczynek; w wieku $2,3 \pm 1,9$ lat), **B** - grupa z rozpoznaniem późnosinicznej lub niesinicznej wady serca (n=46; 25 chłopców i 21 dziewczynek; w wieku $11,2 \pm 5,7$ lat).

Wszyscy ww. pacjenci zostali zakwalifikowani do wykonania chirurgicznej korekcji wady serca w Klinice Kardiochirurgii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Wszystkie zabiegi operacyjne wykonano w latach 2010 - 2012.

Do grupy porównawczej **A** zakwalifikowano pacjentów z następującymi wadami serca: tetralogia Fallota, ToF (n= 8), anomalia Ebsteina (n=2), atrezja zastawki płucnej PA (n=9), atrezja zastawki trójdzielnej TA (n=13), całkowite przełożenie wielkich pni tętniczych TGA (n=10), całkowity nieprawidłowy spływ żył płucnych TAPVR (n=1), zespół hipoplazji lewego serca HLHS (n=3), wspólny pień tętniczy TAC (n=1).

Wśród dzieci z rozpoznaniem późnosinicznej lub niesinicznej wady serca (grupa porównawcza **B**) zdiagnozowano następujące wady:

ubytek w przegrodzie międzyprzedsionkowej, ASD I, ASD II (n=20), ubytek w przegrodzie międzykomorowej, VSD (n=9), ubytek w przegrodzie przedsionkowo-komorowej, AVSD (n=3), przetrwały przewód tętniczy, PDA (n=8), koarktacja aorty, CoA (n=2), przerwanie ciągłości łuku aorty, IAA (n=3), częściowy nieprawidłowy spływ żył płucnych, PAPVR (n=1).

Zastosowano następujące kryteria wyłączenia pacjentów z analizy:

- brak uzyskania zgody rodziców/prawnych opiekunów dziecka do wykorzystania usuwanego materiału tkankowego do badań morfologicznych i histologicznych,
- współistnienie zespołu Pataua, Edwardsa, Turnera, Noonan, Alagille'a, Marfana, Ehlersa-Danlosa, Hurler, Di George'a, *osteogenesis imperfecta*,
- wiek pacjenta w chwili zakwalifikowania do zabiegu operacyjnego > 13 lat
- utrwalone nadciśnienie płucne.

Na prowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu (nr 6017/B/P01/2010/38 z dnia 15 marca 2010 r.), a prawni opiekunowie dzieci wyrazili zgodę na udział podopiecznych w badaniach.

3.2. Procedura pobrania materiału tkankowego

Pacjentów przyjmowano do Kliniki Kardiologii i Nefrologii Dziecięcej (w zależności od ciężkości wady wrodzonej serca i stanu klinicznego dziecka) w 1 dobie życia bezpośrednio po urodzeniu lub w dobie późniejszej, a nawet po kilkuletniej obserwacji rozwoju wady w okresie między 2 – 13 rokiem życia. W tym czasie otrzymywali odpowiednie leki w zależności od charakteru wady – diuretyczne (furosemidum, spironolakton), obniżające ciśnienie tętnicze krwi (captoprilum), poprawiające kurczliwość mięśnia sercowego (digoxinum).

Dzień przed zabiegiem kardiochirurgicznym oznaczano pełną morfologię krwi wraz z wartością białka C-reaktywnego oraz parametrami krzepnięcia krwi, a także stężenie przeciwciał anti-HBS. Wykonywano zdjęcie radiologiczne klatki piersiowej w celu wykluczenia ewentualnych zmian zapalnych w układzie oddechowym oraz w celu oceny narządów śródpiersia. W kolejnym etapie, w trakcie indywidualnej rozmowy z rodzicami/prawnymi opiekunami dziecka, w obecności kardiochirurga i anestezjologa, informowano o planowanym przebiegu zabiegu operacyjnego oraz uzyskiwano pisemną zgodę na jego wykonanie oraz pobranie materiału badawczego. W trakcie rozmowy informowano rodziców, że standardowa operacyjna korekcja wady polega m.in. na takim jej opracowaniu, w czasie którego zostaje usunięty fragment mięśniówki serca. Usunięty fragment, traktowany jako odpad medyczny, może być wykorzystywany do dalszych badań morfologicznych, a tym samym przyczynić się do powiększenia zakresu wiedzy medycznej w zakresie funkcjonowania serca (w tym jego właściwości kurczliwych) w okresie pooperacyjnym. Rodzice/prawni opiekunowie dziecka byli również poinformowani, że w każdej chwili przed rozpoczęciem zabiegu operacyjnego mogą wycofać swoją zgodę na zabezpieczanie materiału tkankowego do dalszych badań histologicznych. W trakcie realizacji prac badawczych nie uzyskano zgody na analizę usuwanego materiału tkankowego od 13 rodziców dzieci z rozpoznaniem sinicznej wady serca oraz 27 rodziców dzieci z rozpoznaniem niesinicznej wady serca.

Po znieczuleniu dziecka na sali operacyjnej i otwarciu w sposób typowy klatki piersiowej zakładano szwy na aortę i prawy przedsionek celem podłączenia do krążenia pozaustrojowego. Wprowadzano kaniulę aortalną, następnie celem włożenia kaniuli do żyły głównej górnej poszerzano jej otwór a uzyskany fragment ściany przedsionka prawego pobierano do badań. Od niektórych pacjentów istniała techniczna możliwość pobrania fragmentu zarówno z przedsionka jak i z komory serca. Taka sposobność była możliwa podczas korekty wady serca pod postacią ASD, VSD, AVSD. W tych sytuacjach kardiochirurg, celem nałożenia łąty korygującej i jej dopasowania do struktur serca, uzyskiwał zbędny fragment tkanki.

Uzyskany fragment mięśnia sercowego utrwalano w płynie Bouine'a (w proporcji 15ml nasyconego kwasu pikrynowego, 5ml formaliny, 1ml kwasu octowego) przez 24 godziny w temperaturze pokojowej, a następnie odwadniano w szeregu alkoholi o wzrastających stężeniach, przenoszono do alkoholu absolutnego i ksylenu, barwiono hematoksyliną aż wreszcie zatapiano w parafinie. Ww. procedura utrwalania oraz zatapiania materiału

tkankowego była wykonywana w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

Szczegółowe dane dotyczące wszystkich pacjentów z obydwu grup porównawczych zostały przedstawione w tabeli nr 1.

Tabela 1. Dane pacjentów przed wykonaniem zabiegu operacyjnej korekcji wady

	Sinicza wada serca (n=47)	Niesinicza wada serca (n=46)	Wartość p
Płeć (chłopcy/dziewczynki)	26/21	25/21	ns
Wiek (lata)	2,3 ± 1,9	11,2 ± 5,7	p < 0,01
Rozpoznanie	ToF (n=8) Anomalia Ebsteina (n=2) PA (n=9) TA (n=13) TGA (n=10) TAPVR (n=1) HLHS (n=3) TAC (n=1)	ASD (n=20) VSD (n=9) AVSD (n=3) PDA (n=8) CoA (n=2) IAA (n=3) PAPVR (n=1)	
BMI (kg/m ²)	17,2 ± 1,8	18,5 ± 2,2	ns
Wartość saturacji (%)	84,6 ± 3,3	96,5 ± 2,8	p < 0,01
Miejsce pobrania tkanki	Przegroda międzyprzedsionkowa (n=9) Przegroda międzykomorowa (n=16) Okolice ujścia tętniczego (n=22)	Przegroda międzyprzedsionkowa (n=10) Przegroda międzykomorowa (n=13) Okolice ujścia tętniczego (n=13)	
Grubość przegrody międzyprzedsionkowej w czasie skurczu	ToF (0,8 ± 0,2) Anomalia Ebsteina (0,7 ± 0,2) PA (0,7 ± 0,2) TA (0,8 ± 0,1) TGA (0,9 ± 0,3) TAPVR (0,8 ± 0,1) HLHS (0,6 ± 0,2) TAC (0,8 ± 0,2)	ASD (0,6 ± 0,2) VSD (0,8 ± 0,2) AVSD (0,8 ± 0,1) PDA (0,7 ± 0,1) CoA (0,8 ± 0,2) IAA (0,9 ± 0,2) PAPVR (0,7 ± 0,3)	ns
Grubość przegrody międzykomorowej w czasie skurczu	ToF (0,9 ± 0,2) Anomalia Ebsteina (1,0 ± 0,2) PA (1,0 ± 0,3) TA (0,9 ± 0,3) TGA (1,3 ± 0,3) TAPVR (1,0 ± 0,2) HLHS (0,8 ± 0,2) TAC (1,1 ± 0,3)	ASD (0,9 ± 0,2) VSD (0,9 ± 0,1) AVSD (1,0 ± 0,2) PDA (1,0 ± 0,2) CoA (1,4 ± 0,4) IAA (1,2 ± 0,3) PAPVR (1,0 ± 0,2)	ns

ns = brak istotności statystycznej; ToF = tetralogia Fallota; PA = atrezja zastawki płucnej; TA = atrezja zastawki trójdzielnej; TGA = całkowite przełożenie wielkich pni tętniczych; TAPVR = całkowity nieprawidłowy spływ żył płucnych; HLHS = zespół hipoplazji lewego serca; TAC = wspólny pień tętniczy; ASD = ubytek w przegrodzie międzyprzedsionkowej; VSD = ubytek w przegrodzie międzykomorowej; AVSD = ubytek w przegrodzie przedsionkowo-komorowej; PDA = przetrzywał

przewód tętniczy Botalla; CoA = koarktacja aorty; IAA = przerwanie ciągłości łuku aorty; PAPVR = częściowy nieprawidłowy spływ żył płucnych; BMI = indeks masy ciała

3.3. Analiza immunohistochemiczna

Z materiału zatopionego w parafinie uzyskiwano seryjne skrawki o grubości 4-5 μm z wykorzystaniem mikrotomu rotacyjnego RM2125RT firmy Leica. Skrawki te umieszczano na szkiełkach podstawowych Superfrost®Plus w warunkach łaźni wodnej, a następnie nawadniano z wykorzystaniem szeregu alkoholi o zmniejszających się stężeniach (od ksylenu i alkoholu absolutnego, poprzez alkohol 96%, 85%, 70% i 50%). W końcowym etapie szkiełko wraz ze skrawkami parafinowymi przenoszono do buforu fosforanowego (PBS; phosphate buffered saline).

W dalszej kolejności, odparafinowane oraz nawodnione skrawki służyły wykonaniu reakcji immunohistochemicznej, której celem było umożliwienie oceny ekspresji oraz lokalizacji badanych białek w tkance. W tym celu, wykonywano pośrednią reakcję immunohistochemiczną z wykorzystaniem biotynylowanej tyraminy (Załącznik 1.) (Zabel M, 1999). W pierwszym etapie tej procedury wykonywano klasyczną reakcję immunohistochemiczną z kompleksem ABC (awidyna – biotynylowana peroksydaza), natomiast w drugim etapie wprowadzano biotynylowaną tyraminę. Do wizualizacji reakcji immunohistochemicznej użyto zestawu Catalyzed Signal Amplification System firmy Dako (kod K1500). (Załącznik 2.)

W ww. opisanej metodzie wykorzystywano następujące przeciwciała pierwszorzędowe:

- anti-CD31 – monoklonalne przeciwciało mysie anti- ludzkie (zastosowane rozcieńczenie 1:400, klon JC70A, Dako, kod M0823),
- anti-CD34 – monoklonalne przeciwciało mysie anti–ludzkie (zastosowane rozcieńczenie 1:400, klon QBEND–10, Dako, kod M7165),
- anti-CD105 - monoklonalne przeciwciało mysie anti-ludzkie (zastosowane rozcieńczenie 1:500, klon MM0049, firmy Novus Biologicals®, kod NB110-93509),
- anti-vWF - monoklonalne przeciwciało mysie anti–ludzkie (zastosowane rozcieńczenie, 1:250, klon F8/86, firmy Dako, kod kod M0616);
- anti-eNOS - poliklonalne przeciwciało królicze anti-ludzkie (zastosowane rozcieńczenie 1:50, firmy Novus Biologicals®, kod NBP1-19824);

- anti-CD44 - monoklonalne przeciwciało mysie anti-ludzkie (zastosowane rozcieńczenie 1:50, klon DF 1485, firmy Dako, kod M7082);
- anti-GDF-15 poliklonalne przeciwciało królicze anti-ludzkie (zastosowane rozcieńczenie 1:100, firmy Novus Biologicals®, kod NBP1-81050);

Reakcje kontrolne negatywne wykonywano, nakrapiając na oczyszczone skrawki mysie IgG1 (Negative Control, Dako, kod X0931) lub PBS, zamiast przeciwciała pierwszorzędowego. Kontrolę pozytywną przeprowadzano na preparatach histologicznych zawierających skrawki prawidłowych naczyń krwionośnych (tętnica promieniowa i żyła odpiszczelowa pobrane w pęczku naczyniowo – nerwowym) uzyskanych, jako odpad medyczny, podczas zabiegów pomostowania aortalno-wieńcowego u chorych z rozpoznaniem choroby wieńcowej.

3.4. Analiza morfometryczna i statystyczna

Seryjne preparaty z oznaczoną obecnością antygenów CD31, CD34, CD105, CD34, czynnika von Willebranda, syntazy tlenku azotu oraz białka GDF-15 skanowano w technice wysokiej rozdzielczości (powiększenie robocze 400x z funkcją autofocus) za pomocą skanera mikroskopowego MiraxMidi (Carl Zeiss Poland, Poznań, Polska), a uzyskany plik graficzny obejmujący całą powierzchnię preparatu poddawano ocenie morfologicznej oraz morfometrycznej w programie MiraxViewer (Carl Zeiss).

3.4.1. Analiza gęstości naczyń mikrokrążenia w mięśniu sercowym

W pierwszym etapie badań, mającym na celu ustalenie gęstości mikrounaczynienia (MVD) wykorzystywano obrazy, na których udokumentowano ekspresję śródbłonkowej syntazy tlenku azotu (eNOS). W tym celu określano średnią liczbę naczyń krwionośnych przypadających na 1mm² w oparciu o analizę minimum 3 mikroskopowych pól widzenia subiektywnie ocenionych jako te, które posiadają największe zagęszczenie naczyń krwionośnych na pole powierzchni (technika 'hot-spots', Owoc-Lempach J i Chybicka J, 2006).

Uzyskane wyniki odnoszono do obecności złożonych i izolowanych wad serca, a także z wadami przebiegających z lub bez sinicy. Do wad sinicznych zaliczono ToF, anomalię Ebsteina, PA, TA, TGA, TAPVR, HLHS oraz obecność TAC.

Do wad niesinicznych zaliczono zarówno wady określane jako późnosiniczne (ASD, VSD, AVSD, PDA, IAA oraz PAPVR) jak i typowo niesiniczne (CoA).

Analizę gęstości naczyń mikrokrążenia wykonywano zarówno w obszarach preparatu najbardziej narażonych na skutki przewlekłego niedotlenienia (fragmenty mięśnia sercowego znajdujące się w bezpośrednim sąsiedztwie światła przedsionków i komór), jak i tych, które znajdowały się w bliższym sąsiedztwie naczyń wieńcowych. Dla potrzeb kolejnych części bieżącego opracowania obszary te określano odpowiednio jako obszar obwodowy i centralny. W pomiarach brane były pod uwagę wszystkie wybarwione komórki bądź ich skupiska tworzące naczynia krwionośne niezależnie od obecności lub braku światła naczynia. Do obliczeń zaliczano zarówno uformowane naczynia jak i pojedyncze komórki śródbłonna, które można było oddzielić od podścieliska lub struktury mięśnia sercowego.

Każdy plik graficzny obrazujący cały preparat histologiczny oglądano pod małym powiększeniem wybierając trzy obszary określane jako 'hot spots', a następnie przekroje naczyń liczono pod powiększeniem 100× na wybranym obszarze o powierzchni ok. 1,5 mm². Następnie, otrzymaną wartość liczby naczyń (NVES – microvessel number) z każdego wybranego miejsca przeliczano na 1 mm². Na koniec obliczano średnią arytmetyczną z trzech „gorących miejsc” w celu wykorzystania jej do dalszej analizy statystycznej.

3.4.2. Analiza stopnia ekspresji badanych markerów

Opisaną w punkcie powyżej metodologię oceny gęstości naczyń krwionośnych mięśnia sercowego w oparciu o ekspresję eNOS wykorzystano jako sposób określenia całkowitej liczby naczyń krwionośnych znajdujących się na danym obszarze tkanki. W ten sposób uzyskano wartość, do której mogły się odnosić wyniki pomiarów gęstości naczyń krwionośnych uwidacznianych na preparacie przy użyciu przeciwciał anti-CD31, anti-CD34, anti-CD105, anti-CD44, anti-vWF oraz anti-GDF-15.

Jak przedstawiono we wstępie, eNOS jest białkiem obecnym w komórkach śródbłonna niezależnie od stopnia ich dojrzałości oraz lokalizacji w tkance. Dzięki temu, porównując na przykład gęstość naczyń krwionośnych CD105-pozytywnych do wartości MVD uzyskanej z pomiaru naczyń eNOS-pozytywnych można uzyskać wiadomości na temat odsetka niedojrzałych naczyń krwionośnych (tzn. CD105-pozytywnych) obecnych w preparacie histologicznym. W podobny sposób analizować można odsetek naczyń dojrzałych (CD31-pozytywnych lub vWF-pozytywnych), czy też tych, które posiadają potencjał angiogeny (CD44-pozytywne lub GDF15-pozytywne).

Należy zaznaczyć, że w wyżej opisanej analizie histologicznej nie badano różnic w ekspresji poszczególnych markerów w zależności od stopnia intensywności reakcji immunohistochemicznej. Zasadniczo, ilościową ocenę reakcji immunohistochemicznych stosować się winno z wykorzystaniem skali Remmele, w której ocenia się intensywność odczynu immunohistochemicznego (skala od 1 do 3) oraz odsetek immunopozytywnych komórek w preparacie (skala od 1 do 4). Wynikiem jest iloczyn podanych wyżej dwóch wartości, który może wynosić od 1 do 12 pkt. W przypadku bieżącego opracowania zdecydowano się, aby każde naczynie mikrokrążenia, które wykazuje dodatni odczyn w części lub na całości śródbłonna, traktować jako naczynie pozytywne. Oczywiście metoda ta posiada swoje ograniczenia. Ale z drugiej strony, takie, a nie inne podejście metodologiczne do oceny i porównania gęstości naczyń krwionośnych w aspekcie ich dojrzałości umożliwiło wykonanie porównań (korelacji) uzyskanych wyników do pooperacyjnego przebiegu choroby.

3.4.3. Analiza kliniczna

Wszystkie dzieci, od których uzyskano wycinki operacyjne w trakcie chirurgicznej korekty wad serca, były obserwowane minimum przez okres kolejnych 18 miesięcy. W tym czasie możliwa była ocena przebiegu leczenia wady oraz stwierdzenie ewentualnych powikłań bądź też rozwoju niewydolności serca.

Analiza kliniczna w okresie pooperacyjnym była oparta o systematyczne wizyty w Poradni Kardiologii Dziecięcej w okresach 3-miesięcznych oraz wykonywane podczas tych wizyt badania elektrokardiograficzne oraz echokardiograficzne. W badaniu

przedmiotowym oceniano harmonijność rozwoju dziecka w oparciu o przyporządkowanie cech dziecka do danych znajdujących się w obowiązujących siatkach centylowych.

3.4.4. Analiza statystyczna

Zmienne ciągłe lub powiązane wyrażono jako wartości średnie rozszerzone o wartość odchylenia standardowego (SD). Porównania zmiennych ciągłych pomiędzy grupami porównawczymi przeprowadzano używając testu t-Studenta. Porównania pomiędzy grupami zmiennych kategoriycznych wykonywano, stosując test Manna-Whitneya. Stwierdzenie dysfunkcji skurczowej komór serca w okresie pooperacyjnym oraz powiązanie tych danych z wiekiem, płcią, wartością MVD lub też stopniem dojrzałości naczyń krwionośnych było określone przy użyciu testu dokładnego Fishera.

Punkty odcięcia dla wieku zostały arbitralnie oszacowane na 21 miesięcy przy stwierdzeniu wad sinicznych oraz 13 lat dla wad niesinicznych. W przypadku MVD, arbitralny punkt odcięcia ustalono na poziomie 100 naczyń mikrokrążenia obecnych na 1 mm². Różnice uznano za istotne statystycznie, gdy poziom istotności p wynosił poniżej 0,05. Analizę statystyczną prowadzono z zastosowaniem programu Statistica 6.1 PL.

4. Wyniki

4.1. Obserwacja kliniczna

Wszyscy pacjenci, którzy zostali poddani badaniom po operacjach kardiochirurgicznych, przebywali w oddziale Intensywnej Opieki Medycznej Kliniki Kardiochirurgii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

W zależności od stopnia złożoności wady, przebieg okresu pooperacyjnego był różny.

Zgodnie z przyjętymi procedurami, dzieci w 10. dobie po zabiegu miały usuwane szwy, wykonywane było kontrolne badanie echokardiograficzne, a w przypadku prawidłowego obrazu struktur zoperowanego serca, pacjenci byli w 14. dobie zwalniani do domu z zaleceniem kontroli w Klinice Kardiologii Dziecięcej w okresie od 1-2 miesięcy.

Dwadzieścioro dziewięcioro dzieci z rozpoznaniem sinicznej wady serca oraz 36 pacjentów z rozpoznaniem wady niesinicznej zostało zwolnionych do domu w 14 dobie po zabiegu chirurgicznej korekcji wady.

U 25 dzieci (15 z grupy A oraz 10 z grupy B, 15/10) doszło do rozwoju powikłań pooperacyjnych, które wymagały dłuższego pobytu w szpitalu. Wśród ww. powikłań znalazły się:

- przejściowa niewydolność lewokomorowa, objawiająca się niskim rzutem serca (<30%), obrzękiem płuc, tachypnoe oraz nawrotem sinicy centralnej, wymagająca reoperacji - 12 dzieci (A-9; B-3)
- zapalenie płuc - 3 dzieci (A-2; B-1)
- ogólnoustrojowe zakażenie - 2 pacjentów (A-1; B-1)
- miejscowe zakażenie rany - 7 dzieci (A-4; B-3)
- porażenie kopuły przepony - 1 dziecko (A-0; B-1)

Troje dzieci (A-2;B-1) zmarło w następstwie niskiego rzutu serca (<30%), zaburzeń rytmu serca oraz niewydolności krążenia. Zgon następował między 1 a 7 dobą po wykonaniu zabiegu operacyjnego.

Szczegółowe dane dotyczące przebiegu pooperacyjnego u dzieci w obydwu grupach porównawczych zebrano w tabeli nr 2.

Tabela 2. Dane kliniczne pacjentów po wykonaniu zabiegu operacyjnej korekcji wady

	Sinicza wada serca (n=47)	Niesinicza wada serca (n=46)	Wartość p
Brak powikłań (chłopcy/dziewczynki)	15/14 (62,0%)	19/17 (78,2%)	ns
Przejściowa niewydolność lewokomorowa (chłopcy/dziewczynki)	6/3 (19,0%)	2/1 (6,5%)	p < 0,01
Zapalenie płuc (chłopcy/dziewczynki)	1/1 (4,2%)	1/0 (2,2%)	ns
Zakażenie ogólnoustrojowe (chłopcy/dziewczynki)	0/1 (2,1%)	0/1 (2,2%)	ns
Ciężkie miejscowe zakażenie rany	2/2 (8,5%)	1/2 (6,5%)	ns
Porażenie kopuły przepony (chłopcy/dziewczynki)	0/0 (0%)	1/0 (2,2%)	ns
Zgon (chłopcy/dziewczynki)	2/0 (4,2%)	1/0 (2,2%)	ns

ns = brak istotności statystycznej

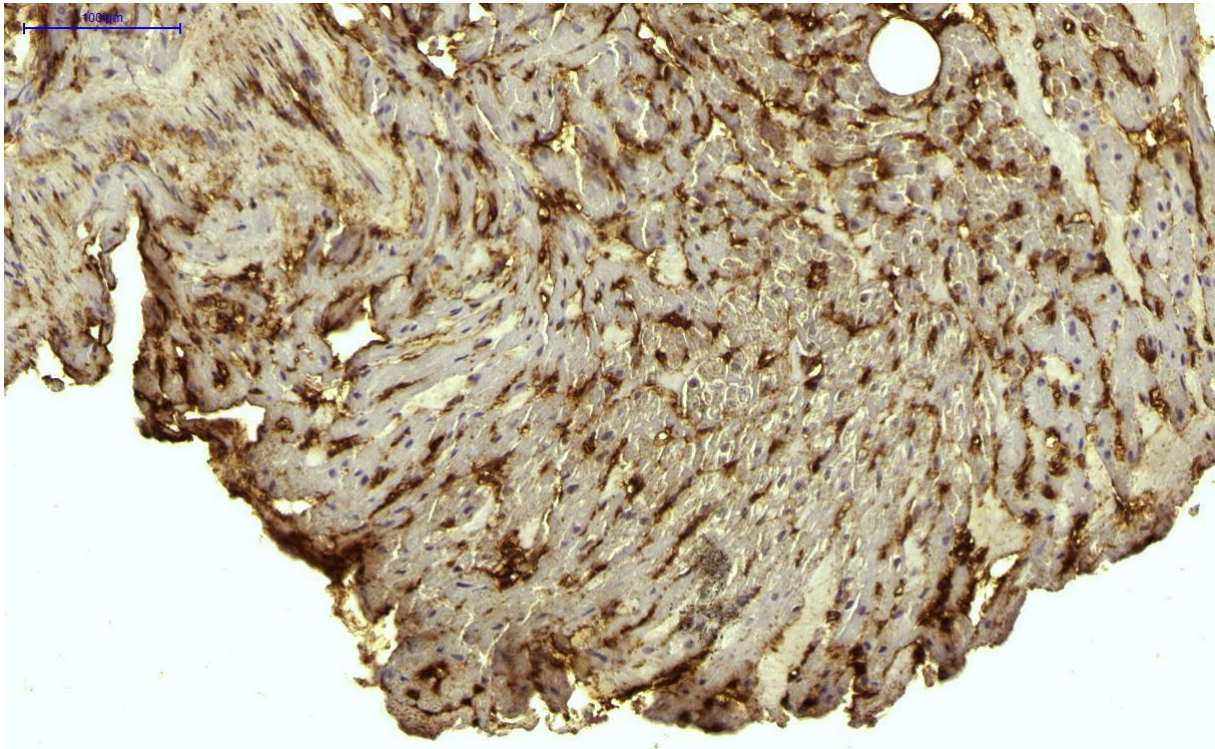
4.2. Ocena gęstości naczyń krwionośnych w mięśniu sercowym

Ocena gęstości naczyń krwionośnych mikrokrążenia w mięśniu sercowym była wykonana w oparciu o obliczenie średniej gęstości ww. naczyń w 3 obszarach określanych jako 'hot-spots' na 5 seryjnych skrawkach tej samej tkanki z wykorzystaniem znakowania śródbłonna naczyń krwionośnych przez przeciwciała anti-eNOS (rycina 9).

W oparciu o tak wykonany pomiar gęstości naczyń krwionośnych uzyskano wartości referencyjne dla poszczególnych wad serca.

W grupie wad sinicznych średnia gęstość naczyń mikrokrążenia wynosiła $578,4 \pm 33,8$ naczyń na 1 mm^2 (zakres wartości od 523,4 do 611,8 naczyń na 1 mm^2). Należy zaznaczyć, że wartości MVD w mięśniu sercowym dla poszczególnych wad serca wchodzących w skład grupy A (siniczne wady serca) nie różniły się istotnie między sobą.

W przypadku niesinicznych wad serca (grupowanych zarówno jako wady późnosiniczne jak i niesiniczne, grupa porównawcza B) średnia gęstość naczyń mikrokrążenia w mięśniu sercowym wynosiła $459,8 \pm 28,7$ naczyń na 1 mm^2 (zakres wartości od 394,7 do 508,1 naczyń na 1 mm^2). Podobnie, jak to miało miejsce w przypadku poszczególnych sinicznych wad serca, wartości MVD w mięśniu sercowym dla wad wchodzących w skład grupy B nie różniły się w sposób statystyczny między sobą. Natomiast średnia gęstość naczyń krwionośnych w sinicznych wadach serca była istotnie wyższa niż w przypadku wad niesinicznych ($p = 0,016$).



Ryc. 9. Przykład referencyjnego wybarwienia śródbłonek naczyń tworzących mikrokrążenie mięśnia sercowego we fragmencie tkanki pobranej z przegrody międzykomorowej od 3-miesięcznego niemowlęcia płci męskiej z rozpoznaniem sinicznej wady serca (zespół czworaczy Fallota). Obecność śródbłonek wykazano ekspresją syntazy tlenku azotu. Obliczona średnia gęstość naczyń krwionośnych w tym przypadku wynosi 548,2 naczyń na 1 mm². Skala = 100 μm

4.3. Ocena stopnia dojrzałości naczyń krwionośnych

Jak już wspomniano wcześniej, ocena dojrzałości naczyń krwionośnych była wykonana w oparciu o analizę ekspresji antygenów CD105, CD34, CD31 oraz czynnika von Willebranda. W przypadku każdego z ww. markerów dokonywano pomiaru MVD, a następnie uzyskany wynik odnoszono do wartości referencyjnych otrzymanych w oparciu o pomiar gęstości naczyń mikrokrążenia z wykorzystaniem oznaczania ekspresji eNOS.

Antygen CD105 był markerem komórek o niskim stopniu dojrzałości, obecnych w śródbłonku naczyń krwionośnych, antygen CD34 oraz CD31 służył oznaczeniu obecności, pośrednich komórek śródbłonka, natomiast czynnik von Willebranda został wykorzystany do demonstracji naczyń mikrokrążenia z obecnością zróżnicowanych o wysokim stopniu dojrzałości komórek śródbłonka.

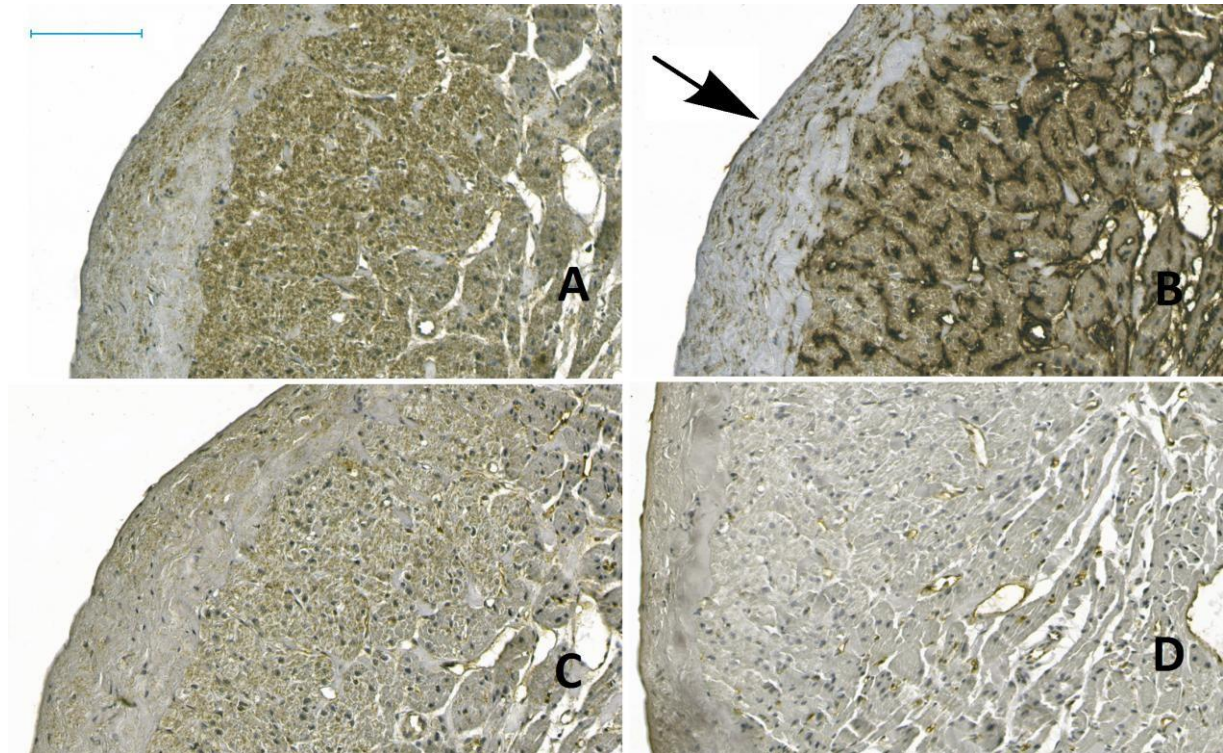
Średnia wartość MVD w mięśniu sercowym wyliczona z wykorzystaniem antygenu **CD105** u pacjentów z rozpoznaniem sinicznej wady serca (rycina 9a) wynosiła $505,3 \pm 32,6$ naczyń krwionośnych na 1 mm^2 (zakres wartości od 483,6 do 529,2 naczyń na 1 mm^2), natomiast u dzieci z rozpoznaniem niesinicznej wady serca (rycina 10a) była istotnie niższa i wynosiła $388,3 \pm 19,2$ naczyń krwionośnych na 1 mm^2 (zakres wartości od 304,8 do 412,9; $p = 0,023$). W przypadku antygenu **CD34**, średnia wartość gęstości naczyń mikrokrażenia w mięśniu sercowym u chorych z rozpoznaniem sinicznej wady serca (rycina 9b) wynosiła $570 \pm 32,6$ naczyń na 1 mm^2 (zakres wartości od 499,7 do 605,1), a u dzieci z rozpoznaniem wady niesinicznej (rycina 10a) mieściła się w zakresie od 393,8 do 506,7 naczyń krwionośnych na 1 mm^2 (średnia $455,9 \pm 34,3$). Wartość obliczona u dzieci z grupy porównawczej B była istotnie niższa ($p = 0,039$).

Wartości gęstości naczyń mikrokrażenia obliczone dla ekspresji antygenu **CD31** mieściły się w następujących zakresach: grupa A ($277,6$ do $403,6$ naczyń na 1 mm^2), grupa B ($269,1$ do $389,9$ naczyń na 1 mm^2). Średnia wartość MVD w grupie A (rycina 9c) wynosiła $388,9 \pm 29,1$ naczyń na 1 mm^2 , a w grupie B - $315,4 \pm 22,8$ (rycina 10c). Różnica ta nie była istotna statystycznie ($p = 0,089$).

Średnia gęstość naczyń krwionośnych oszacowana w oparciu o ekspresję **czynnika von Willebranda** w grupie A (siniczne wady serca, rycina 9d) wynosiła $89,6 \pm 16,2$ naczyń na 1 mm^2 (zakres wartości od 56,3 do 112,1), natomiast w grupie B (wady niesiniczne, rycina 10d) - $278,3 \pm 29,1$ naczyń na 1 mm^2 (zakres wartości: 212,1 do 352,5 naczyń na 1 mm^2). Należy zauważyć, że w tym przypadku, gęstość dojrzałych naczyń krwionośnych była istotnie wyższa w mięśniu sercowym uzyskanym od dzieci z rozpoznaniem niesinicznej wady serca ($p = 0,0112$).

Należy zauważyć, że ekspresja wszystkich ww. markerów była obecna w komórkach śródbłonna wyściełającego wsierdzie, ale wyłącznie w grupie wad niesinicznych (rycina 10). W przypadku antygenu CD105, ekspresja tego białka w grupie wad sinicznych i niesinicznych była obecna nie tylko w przypadku śródbłonna naczyń krwionośnych, ale również w obrębie kardiomiocytów (rycina 9a i 10a). W tym przypadku oszacowanie gęstości naczyń krwionośnych opierało się o zastosowanie specjalnego algorytmu naczyniowego w programie morfometrycznym MiraxViewer polegającego na odseparowaniu uprzednio zdefiniowanego za pomocą

"kroplomierza" sygnału barwnego pochodzącego z kardiomiocytów oraz obliczenie liczby naczyń krwionośnych na zmodyfikowanym cyfrowo obrazie.

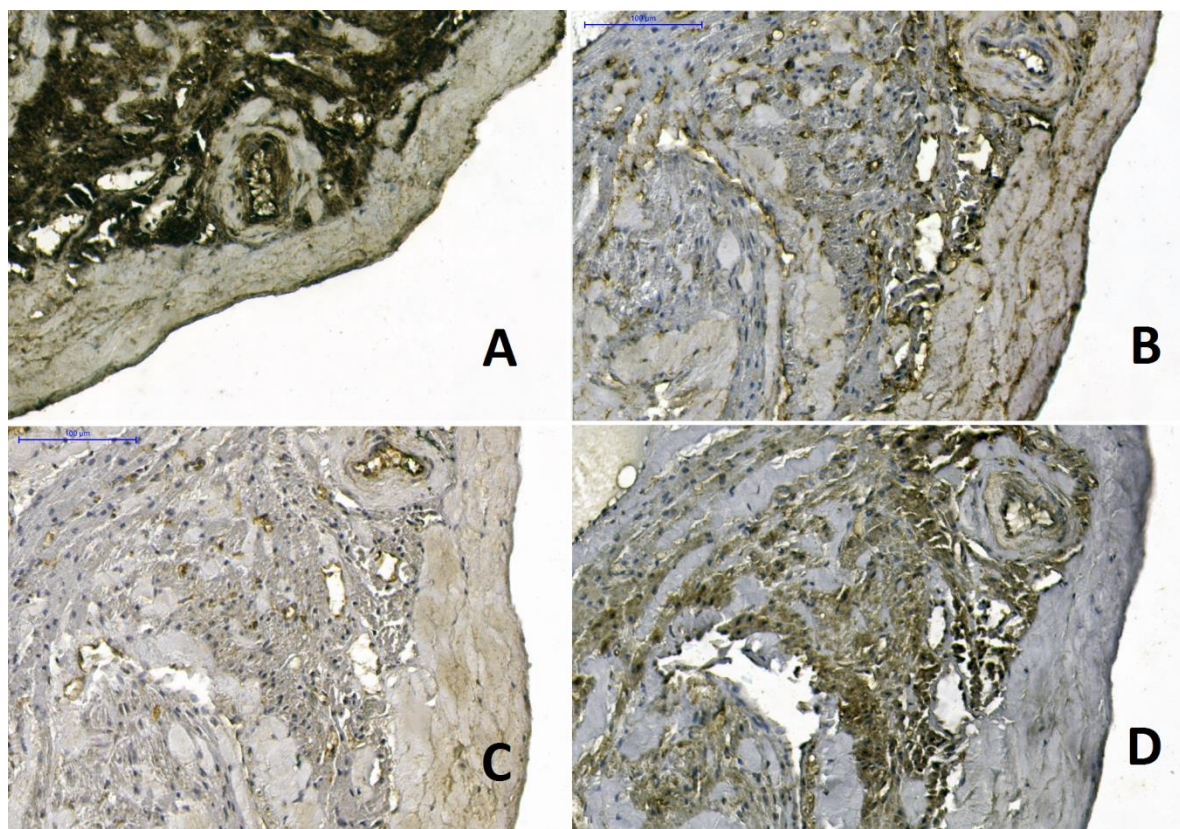


Ryc. 9. Ekspresja antygenu CD105 (a), CD34 (b), CD31 (c) oraz czynnika von Willebranda (d) w mięśniu sercowym u 20-miesięcznego chłopca z grupy porównawczej A operowanego z powodu anomalii Ebsteina (wada serca sinicza). Obecność ww. markerów uwidoczniło na kolejnych skrawkach histologicznych. Uwagę zwraca ekspresja antygenu CD105 w obrębie kardiomiocytów mięśnia sercowego oraz komórek śródbłonna naczyń. Gęstość naczyń krwionośnych obliczona dla antygenu **CD105** wynosi 493,1 naczyń na 1 mm² (po zastosowaniu algorytmu naczyniowego - opis w tekście), dla antygenu **CD34** - 550,6 naczyń na 1 mm², antygenu **CD31** - 315,8 naczyń na 1 mm², a dla **czynnika von Willebranda** - 67,4 naczyń na 1 mm². Skala - 100 μm.

Na przedstawionej powyżej rycinie należy zwrócić również uwagę na fakt wyraźnego zróżnicowania gęstości naczyń krwionośnych w obszarze podwierzwiowym (oznaczony strzałką) oraz w obszarze zajmowanym przez mięsień sercowy. Średnia gęstość naczyń krwionośnych w obszarze podwierzwiowym w grupie porównawczej A, definiowana ekspresją antygenu CD105 wynosiła $112,2 \pm 11,2$ naczyń na 1 mm², a dla ekspresji antygenu CD34 $128,2 \pm 23,4$ naczyń na 1 mm². Średnią wartość MVD mierzoną obecnością antygenu CD31 oszacowano na poziomie $83,2 \pm 9,4$ naczyń na 1 mm², a dla czynnika von Willebranda $52,2 \pm 7,1$ naczyń na 1 mm².

Wartości MVD wyliczone na podstawie ekspresji antygenów CD105, CD34 oraz CD31 nie różniły się w sposób istotny między sobą. Natomiast liczba naczyń

krwionośnych zdefiniowana ekspresją czynnika von Willebranda była istotnie niższa niż w przypadku oszacowania ich liczby z wykorzystaniem ekspresji CD105, CD34 oraz CD31 ($p < 0,05$).



Ryc. 10. Ekspresja antygenu CD105 (a), CD34 (b), CD31 (c) oraz czynnika von Willebranda (d) w mięśniu sercowym u 5-letniej dziewczynki z grupy porównawczej B operowanej z powodu ubytku w przegrodzie międzykomorowej. Obecność ww. markerów uwidoczniło na kolejnych skrawkach histologicznych. Uwagę zwraca ekspresja antygenu CD105 w obrębie kardiomiocytów mięśnia sercowego oraz komórek śródbłonna naczyń. Gęstość naczyń krwionośnych obliczona dla antygenu **CD105** wynosi 312,2 naczyń na 1 mm² (po zastosowaniu algorytmu naczyniowego - opis w tekście), dla antygenu **CD34** - 395,2 naczyń na 1 mm², antygenu **CD31** - 280,1 naczyń na 1 mm², a dla **czynnika von Willebranda** - 342,9 naczyń na 1 mm². Ekspresja ww. markerów jest obecna w komórkach śródbłonna wsierdzia. Skala - 100 µm.

Podobnie jak to miało miejsce w przypadku sinicznych wad serca, także w wycinkach serca uzyskanych podczas korekcji niesinicznych wad serca można było zauważyć zróżnicowanie w zakresie gęstości naczyń krwionośnych obecnych w obszarze zajmowanym przez mięsień sercowy oraz utkanie podwsierdziowe. Gęstość naczyń krwionośnych w okolicy znajdującej się pod wsierdziem przy wykorzystaniu przeciwciał przeciw antygenowi CD105 wynosiła średnio $72,4 \pm 12,8$ naczyń na 1 mm², a w oparciu o analizę odczynu immunohistochemicznego dla

CD34 - $76,2 \pm 10,2$ naczyń na 1 mm^2 . Średnia wartość MVD obliczona na podstawie ekspresji antygenu CD31 wynosiła $62,4 \pm 8,7$ naczyń na 1 mm^2 .

Czynnik von Willebranda został stwierdzony w obrębie $66,4 \pm 10,8$ naczyń na 1 mm^2 . Wyżej wymienione wartości nie różniły się w sposób istotny między sobą. Były one jednak istotnie niższe dla antygenów CD105 oraz CD34 w porównaniu do analizy MVD w analogicznym obszarze w sinicznych wadach serca (odpowiednio $p = 0,029$ i $p = 0,023$).

Szczegółowe zestawienie wyżej przedstawionych danych ujęto w tabeli nr 3.

Tabela 3. Uśrednione wartości gęstości naczyń krwionośnych definiowane ekspresją antygenów CD105, CD34, CD31 oraz czynnika von Willebranda w obrębie mięśnia sercowego oraz obszaru podwosierdziowego

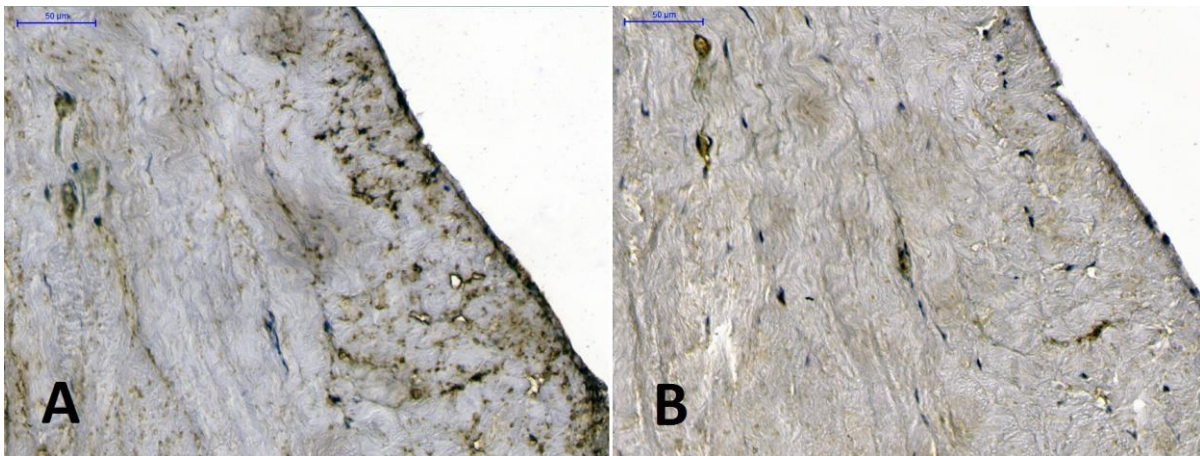
		Sinicza wada serca	Niesinicza wada serca	p
MVD CD105 (liczba naczyń krwionośnych na 1 mm^2)	Mięsień sercowy	$505,3 \pm 32,6$	$388,3 \pm 19,2$	0,023
	Obszar podwosierdziowy	$112,2 \pm 11,2$	$72,4 \pm 12,8$	0,029
MVD CD34 (liczba naczyń krwionośnych na 1 mm^2)	Mięsień sercowy	$570 \pm 32,6$	$455,9 \pm 34,3$	0,039
	Obszar podwosierdziowy	$128,2 \pm 23,4$	$76,2 \pm 10,2$	0,023
MVD CD31 (liczba naczyń krwionośnych na 1 mm^2)	Mięsień sercowy	$388,9 \pm 29,1$	$315,4 \pm 22,8$	ns
	Obszar podwosierdziowy	$83,2 \pm 9,4$	$62,4 \pm 8,7$	ns
MVD vWF (liczba naczyń krwionośnych na 1 mm^2)	Mięsień sercowy	$89,6 \pm 16,2$	$278,3 \pm 29,1$	0,011
	Obszar podwosierdziowy	$52,2 \pm 7,1$	$66,4 \pm 10,8$	ns

MVD = gęstość naczyń mikrokrążenia; vWF = czynnik von Willebranda; ns = brak istotności statystycznej

W kolejnym etapie prac badawczych średnie wartości MVD odniesiono do wartości referencyjnych gęstości naczyń krwionośnych obliczonych na podstawie ekspresji śródbłonkowej syntazy tlenu azotu. Działanie to było wykonane w celu możliwości przeprowadzenia matematycznej analizy stopnia dojrzałości naczyń krwionośnych.

Jednocześnie, zanalizowano stosunek MVD definiowany obecnością antygenów CD34 i CD31. Uzyskaną wartość - iloraz gęstości naczyń krwionośnych wyznaczonych ekspresją antygeny CD34 do wartości gęstości naczyń wyznaczonych obecnością antygeny CD31, posłużył analizie porównawczej dojrzałości naczyń krwionośnych w obszarze podśierdziowym. Wykazano, że w przypadku wrodzonych sinicznych wad serca (grupa porównawcza A) CD34/CD31 indeks wynosił 1,54. W niesinicznych wadach serca (grupa porównawcza B) wskaźnik CD34/CD31 był niższy (1,22), ale różnica ta nie była istotna statystycznie ($p = 0,099$)

Otrzymane wyniki zebrano w tabeli nr 4, a także przedstawiono na rycinach 11 i 12.



Ryc. 11. Porównanie obszaru podśierdziowego w wycinku serca uzyskanym podczas korekcji przełożenia wielkich pni tętniczych u 2-tygodniowego chłopca (grupa porównawcza A). Uwagę zwraca większa czułość przeciwciał przeciwko antygenowi CD34 (**a**) w uwidacznianiu naczyń krwionośnych mikrokrążenia tej okolicy, w porównaniu do przeciwciał skierowanych przeciwko antygenowi CD31 (**b**). Skala = 50 μm

Tabela 4. Porównanie ilorazu wartości gęstości naczyń krwionośnych w wycinkach mięśnia sercowego uzyskanych od dzieci z rozpoznaniem sinicznych i niesinicznych wad serca definiowanych ekspresją antygenów CD105, CD34, CD31 oraz czynnika von Willebranda odniesionych do wartości referencyjnych MVD uzyskanych na podstawie analizy ekspresji śródbłonkowej syntazy tlenu azotu.

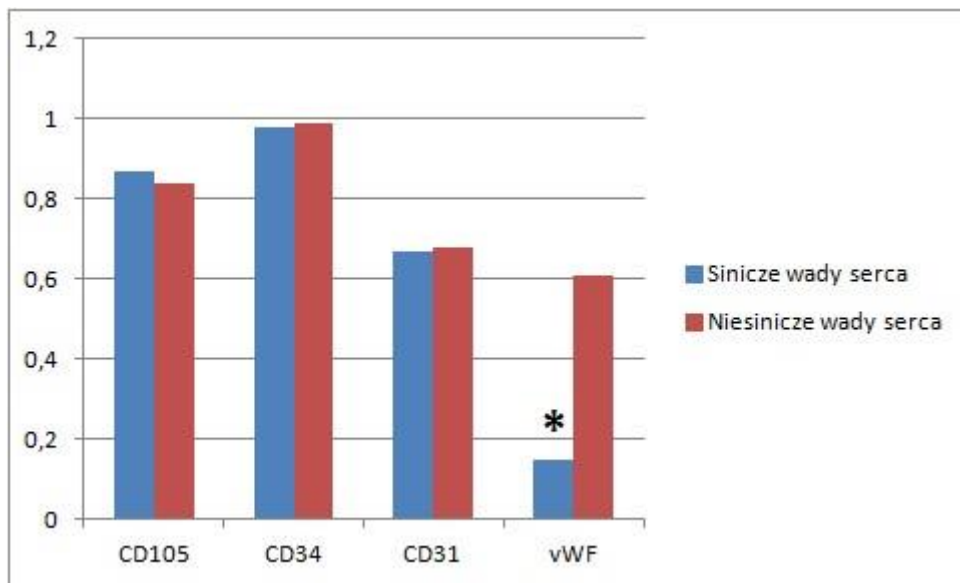
	Sinicza wada serca	Niesinicza wada serca	p
MVD CD105 / MVD eNOS	0,87	0,84	ns
MVD CD34 / MVD eNOS	0,98	0,99	ns
MVD CD31 / MVD eNOS	0,67	0,68	ns
MVD vWF / MVD eNOS	0,15	0,61	0,001

MVD = gęstość naczyń mikrokrążenia; eNOS = śródbłonkowa syntaza tlenu azotu; vWF = czynnik von Willebranda; ns = brak istotności statystycznej

W oparciu o wyżej przedstawioną tabelę oraz znajdującą się poniżej rycinę 11 można ocenić stopień dojrzałości naczyń krwionośnych obecnych w mięśniu sercowym w sinicznych oraz niesinicznych wadach serca. Okazuje się, że niemal wszystkie obecne naczynia krwionośne wykazują ekspresję antygeny CD34, co może czynić ten marker w tego rodzaju zaburzeniach markerem referencyjnym. Ponad 80% naczyń krwionośnych wykazuje ekspresję antygeny CD105, ale tylko nieco powyżej 60% obecność antygeny CD31. Oznacza to, że w przypadku sinicznych jak i niesinicznych wad serca, komórki śródbłonka znajdują się na stosunkowo wczesnych stopniach dojrzewania. Potwierdzić to może również ekspresja czynnika von Willebranda, który w niesinicznych wadach serca uczestniczy w podobny odsetku w komórkach śródbłonka co antygen CD31. Jednakże w sinicznych wadach serca jego ekspresja jest istotnie niższa - udział czynnika von Willebranda w komórkach śródbłonka wykazano zaledwie w 15% wszystkich naczyń krwionośnych ($p = 0,001$).

Obserwacja ta może wskazywać na dwa fakty. Po pierwsze, procentowy udział naczyń krwionośnych wyznaczonych obecnością antygenów CD105, CD34 i CD31 w sinicznych oraz niesinicznych wadach serca jest bardzo zbliżony. Potencjalna przebudowa mięśnia sercowego w zakresie charakteru naczyń krwionośnych w sinicznych i niesinicznych wadach serca nie dotyczy zatem naczyń o niskim i średnim

stopniu zróżnicowania. Po drugie, tylko czynnik von Willebranda występuje w istotnie niższym odsetku komórek śródbłonka tworzących naczynia mikrokrążenia w sinicznych wadach serca. Może to wskazywać na fakt, że w tych wrodzonych wadach serca istotnie niższy jest wyłącznie odsetek naczyń krwionośnych o maksymalnym stopniu zróżnicowania.



Ryc. 12. Procentowy udział naczyń krwionośnych o niskim (antygen CD105), pośrednim (antygeny CD34 i CD31) oraz wysokim (czynnik von Willebranda) stopniu dojrzałości tworzących mikrokrążenie mięśnia sercowego w sinicznych (kolor niebieski) i niesinicznych (kolor czerwony) wadach serca u dzieci.

vWF = czynnik von Willebranda

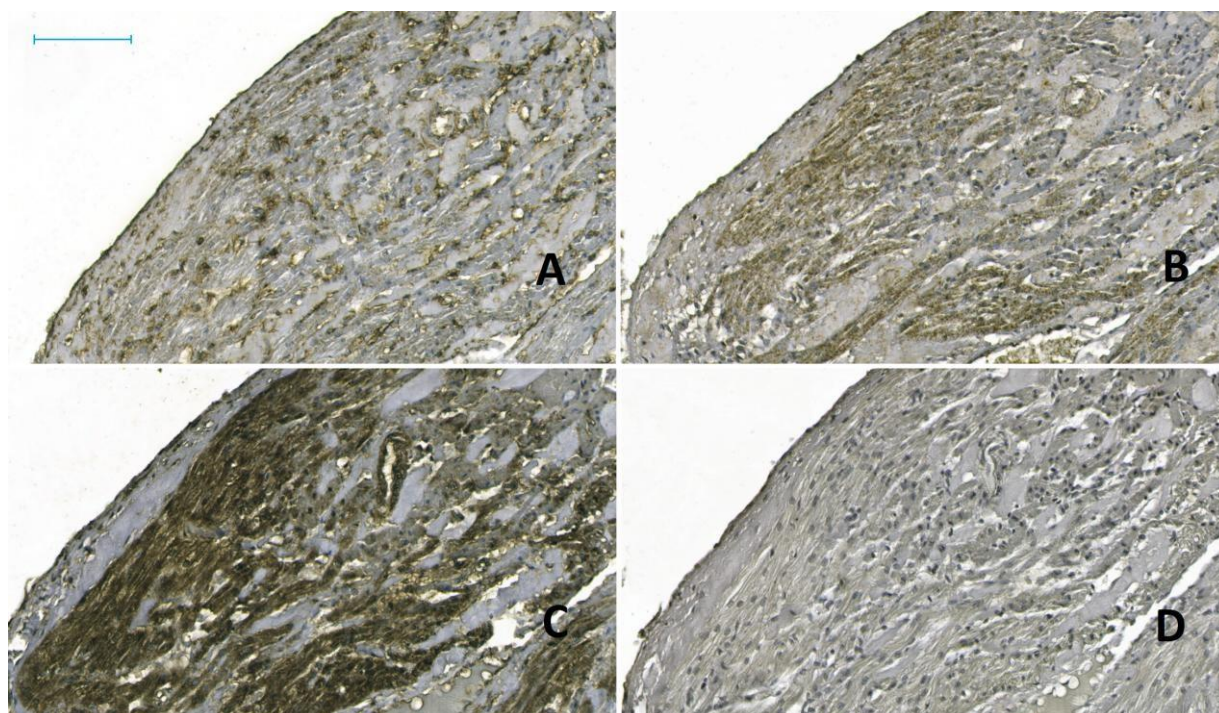
4.4. Ocena potencjału angiogenego naczyń krwionośnych mikrokrążenia

Na rycinie 13 przedstawiono ekspresję antygenu CD44 (rycina 13b) oraz białka GDF-15 (rycina 13c) w obrębie wycinka mięśnia sercowego uzyskanego podczas korekcji sinicznej wady serca. W grupie mikrofotografii umieszczono również referencyjny obraz naczyń mikrokrążenia (wyznaczenie przeciwciałami anti-eNOS, rycina 13a) oraz preparat kontrolny (rycina 13d).

Ekspresja antygenu CD44 pokrywa się z referencyjnym obrazem uzyskanym w wyniku inkubacji immunohistochemicznej z przeciwciałami anti-eNOS. Odczyn obserwowany jest w naczyniach krwionośnych w obrębie mięśnia sercowego oraz

obszaru podwsięrdziowego. Białko GDF-15 ulega ekspresji w obrębie naczyń krwionośnych jak i kardiomiocytów. W obszarze tych ostatnich charakter reakcji jest ziarnisty i ograniczony do komórek bezpośrednio sąsiadujących z naczyniami mikrokrążenia.

Przedstawiony wyżej obraz ekspresji antygenu CD44 oraz białka GDF-15 był podobny we wszystkich sinicznych wadach serca, bez względu na morfologiczny rodzaj uszkodzenia.



Ryc. 13. Ekspresja śródbłonkowej syntazy tlenu azotu (a), antygenu CD44 (b), białka GDF-15 (c) oraz preparat kontrolny (d) w mięśniu sercowym u 9-miesięcznego chłopca z grupy porównawczej B operowanego z powodu zespołu czteroczęściowego Fallota. Obecność ww. markerów uwidoczniła na kolejnych skrawkach histologicznych. Uwagę zwraca ekspresja białka GDF-15 w obrębie kardiomiocytów mięśnia sercowego oraz komórek śródbłonki naczyń. Gęstość naczyń krwionośnych obliczona dla antygenu **GDF-15** wynosi 427,2 naczyń na 1 mm² (po zastosowaniu algorytmu naczyniowego - opis w tekście), dla antygenu **CD44** - 495,2 naczyń na 1 mm². Ekspresja ww. markerów jest obecna w komórkach śródbłonki wsierdzia. Skala - 100 μm.

Średnia gęstość naczyń mikrokrążenia obliczona z wykorzystaniem antygenu CD44 wynosiła $477,9 \pm 55,4$ naczyń na 1 mm² (zakres od 398,5 do 511,5 naczyń na 1 mm²). W przypadku białka GDF-15 ww. gęstość naczyń krwionośnych obliczona po zastosowaniu algorytmu naczyniowego wynosiła $442,8 \pm 35,4$ naczyń na 1 mm² (zakres od 339,4 do 490,1 naczyń na 1 mm²). W obszarze podwsięrdziowym gęstość naczyń krwionośnych z pozytywnym odczynem na antygen CD44 odpowiadała

wartościom referencyjnym obliczonym na podstawie ekspresji antygenu CD34 i wynosiła $125,1 \pm 19,2$ naczyń krwionośnych na 1 mm^2 . Podobna sytuacja miała miejsce w przypadku białka GDF-15. Średnia wartość MVD w obszarze podwierszowym obliczona dla naczyń z komórkami śródbłonka GDF15-pozytywnymi wynosiła $118,2 \pm 17,7$ naczyń krwionośnych na 1 mm^2 .

W przypadku niesinicznych wad serca (grupa porównawcza B), naczynia CD44-pozytywne odpowiadały morfologicznie wyłącznie metaarteriolom (rycina 14a). Naczynia włosowate nie wykazywały odczynu immunohistochemicznego na obecność antygenu CD44. Średnia wartość MVD obliczona dla CD44-dodatnich naczyń mikrokrażenia w niesinicznych wadach serca wynosił $65,4 \pm 12,2$ naczyń krwionośnych na 1 mm^2 . Co ciekawe, ekspresja białka GDF-15 (rycina 14b) była obecna nie tylko w obrębie komórek śródbłonka w naczyniach krwionośnych odpowiadających obrazowi referencyjnemu (z wykorzystaniem znakowania z użyciem przeciwciał anti-eNOS), ale również w obrębie znajdujących się w ich bezpośrednim sąsiedztwie kardiomiocytów. Podobnie, jak to miało miejsce w sinicznych wadach serca, odczyn immunohistochemiczny miał charakter ziarnisty (rycina 14b). Przedstawione wyżej dane zsumowano w tabelach nr 5 i 6 oraz rycinach 14 i 15.

Tabela 5. Uśrednione wartości gęstości naczyń krwionośnych definiowane ekspresją antygenów CD44 oraz białka GDF-15 w obrębie mięśnia sercowego oraz obszaru podwsięrdziowego

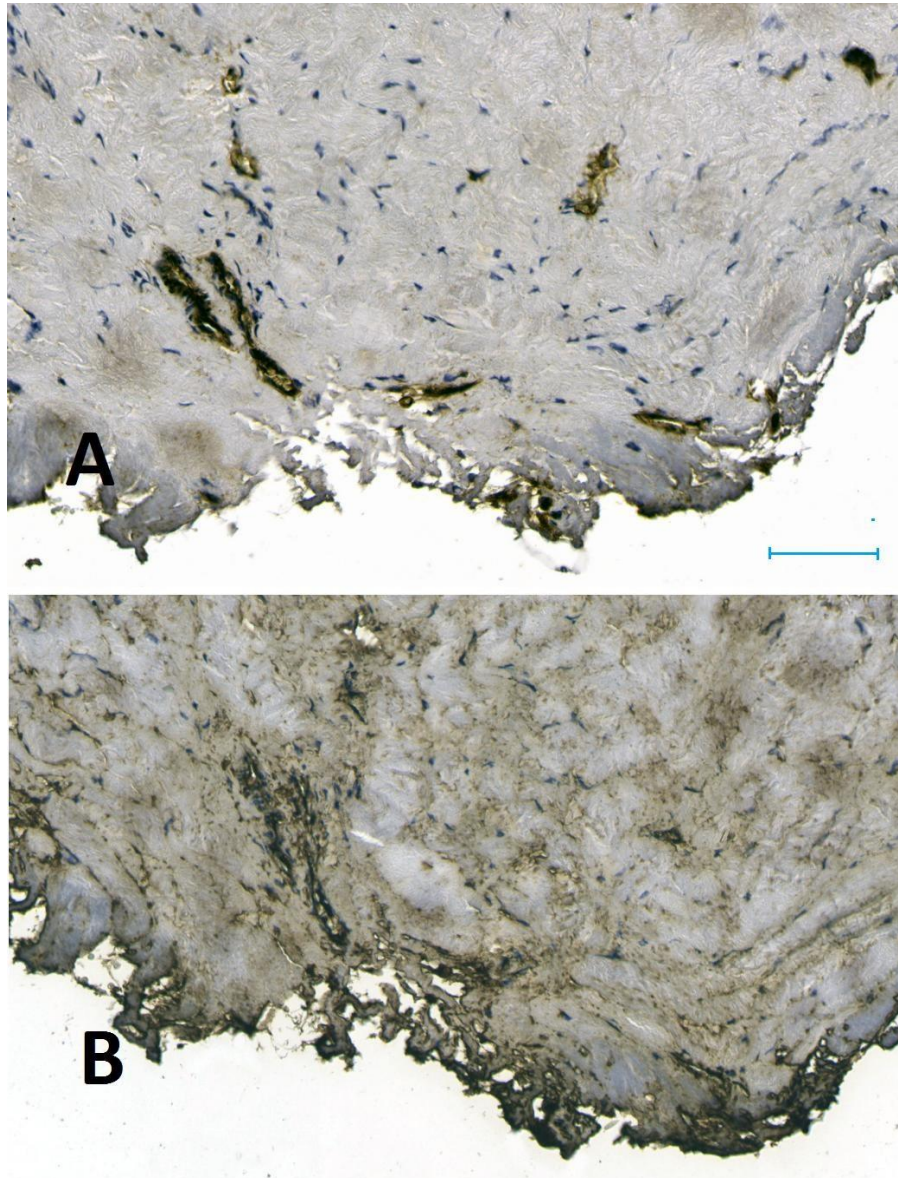
		Sinicza wada serca	Niesinicza wada serca	p
MVD CD44 (liczba naczyń krwionośnych na 1 mm ²)	Mięsień sercowy	477,9 ± 55,4	65,4 ± 12,2	<0,0001
	Obszar podwsięrdziowy	125,1 ± 19,2	brak	-
MVD GDF-15 (liczba naczyń krwionośnych na 1 mm ²)	Mięsień sercowy	442,8 ± 35,4	455,9 ± 34,3	ns
	Obszar podwsięrdziowy	118,2 ± 17,7	66,4 ± 9,3	0,018

MVD = gęstość naczyń mikrokrążenia; ns = brak istotności statystycznej

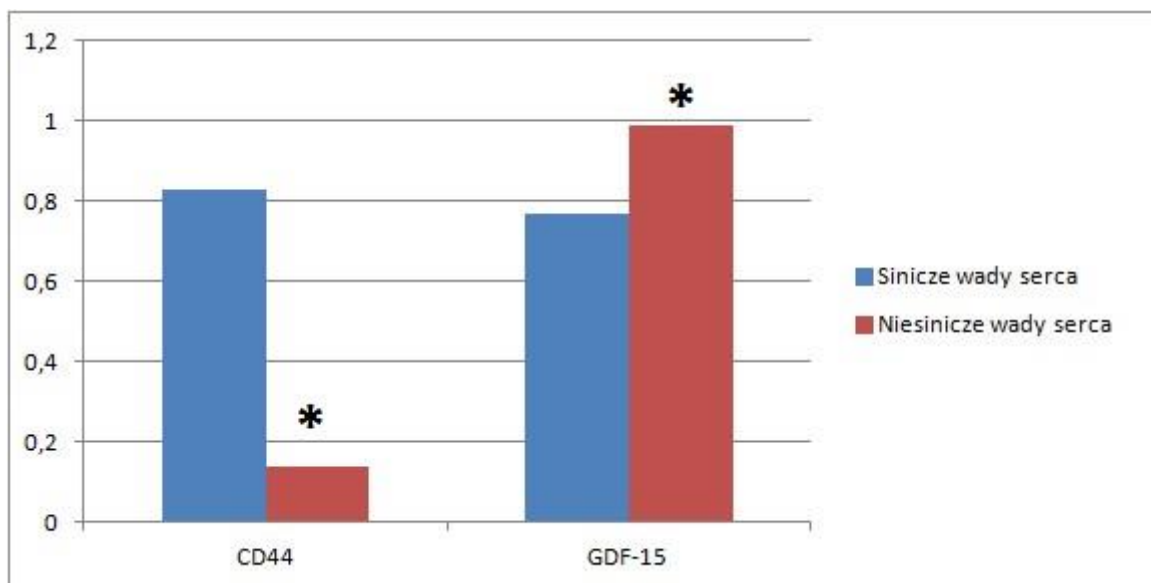
Tabela 6. Porównanie ilorazu wartości gęstości naczyń krwionośnych w wycinkach mięśnia sercowego uzyskanych od dzieci z rozpoznaniem sinicznych i niesinicznych wad serca definiowanych ekspresją antygenów CD44 i białka GDF-15 odniesionych do wartości referencyjnych MVD uzyskanych na podstawie analizy ekspresji śródbłonkowej syntazy tlenu azotu.

	Sinicza wada serca	Niesinicza wada serca	p
MVD CD44 / MVD eNOS	0,83	0,14	<0,0001
MVD GDF-15 / MVD eNOS	0,77	0,99	0,025

MVD = gęstość naczyń mikrokrążenia; eNOS = śródbłonkowa syntaza tlenu azotu



Ryc. 14. Obraz dwóch kolejnych skrawków histologicznych uzyskanych podczas operacji korekcji ubytku w przegrodzie międzyprzedsionkowej u 7-letniego chłopca. Uwagę zwraca ekspresja antygenu CD44 (a) wyłącznie w obrębie metarterioli mikrokrążenia. Białko GDF-15 (b) ulega immunohisto-chemicznej ekspresji w obszarze wszystkich naczyń mikrokrążenia oraz przylegających kardiomiocytów (ziarnisty odczyn). Skala = 50 μ m



Ryc. 15. Procentowy udział naczyń krwionośnych wykazujących ekspresję antygenu CD44 oraz białka GDF-15 tworzących mikrokrążenie mięśnia sercowego w sinicznych (kolor niebieski) i niesinicznych (kolor czerwony) wadach serca u dzieci.

Przedstawione wyżej dane wskazują, że w przypadku sinicznych wad serca antygen CD44 oraz białko GDF-15 ulegają podobnej ekspresji. Natomiast w wadach serca niesinicznych, białko CD44 jest obecne w około 15% naczyń mikrokrążenia, a białko GDF-15 ulega ekspresji we wszystkich naczyniach w obszarze mięśnia sercowego oraz obszaru podwsięrdziowego.

4.5. Ocena przydatności rokowniczej MVD w wadach serca

Zanalizowane różnice w zakresie gęstości naczyń krwionośnych, stopnia dojrzałości naczyń mikrokrążenia w mięśniu sercowym oraz obszarze podwsięrdziowym, a także odmiennego potencjału angiogennego definiowanego ekspresją antygenu CD44 oraz białka GDF-15 nie korelowały z płcią ani wiekiem operowanych dzieci.

Co więcej, wyniki te nie korelowały również z niepomyślnym przebiegiem pooperacyjnym (przejściowa niewydolność lewokomorowa, zgon wynikający z zaburzeń rytmu serca oraz niewydolności krążenia) jaki był obserwowany w grupie pacjentów z siniczną oraz niesiniczną wadą serca.

Przeprowadzone badania opierały się na analizie materiału tkankowego uzyskanego ze ściany przedsionków serca, przegrody międzyprzedsionkowej oraz przegrody

międzykomorowej (szczegółowe dane zestawiono w tabeli nr 1). Wyniki analiz immunohistochemicznych w zakresie gęstości naczyń krwionośnych, stopnia dojrzałości naczyń krwionośnych tworzących mikrokrażenie w sercu jak i potencjału angiogennej tkanki (zarówno w aspekcie mięśniówki serca jak i obszaru podwiesrdziowego) nie wykazywały różnic w zależności od miejsca pobrania tkanki.

Wszystkie operowane dzieci miały wykonywany zabieg kardiochirurgiczny przez ten sam zespół lekarski pracujący w Klinice Kardiochirurgii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Analizy immunohistochemiczne były wykonywane przez jedną doświadczoną osobę zatrudnioną w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Tym samym w zakresie przeprowadzania zabiegów operacyjnych jak i wykonywania analiz laboratoryjnych wykluczono ewentualną krzywą uczenia się lub też niepowtarzalność wyników klinicznych i laboratoryjnych, które mogły mieć miejsce, gdyby czynności te były wykonywane przez zespoły lekarskie / pracowników laboratoryjnych o odmiennym doświadczeniu zawodowym.

5. Omówienie wyników i dyskusja

Cele, które zostały postawione w pracy doktorskiej, miały dwa wymiary. Pierwszy z nich to wymiar poznawczy, który miał przynieść nowe dane dotyczące liczby oraz jakości naczyń krwionośnych tworzących mikrokrążenie mięśnia sercowego u dzieci z rozpoznaniem sinicznych i niesinicznych wad serca. W tym celu wykorzystano panel 6 białek markerów (CD105, CD34, CD31, CD34, czynnik von Willebranda oraz białko GDF-15), których wartość ekspresji odnoszono do uśrednionej gęstości naczyń krwionośnych w ww. wadach serca. W celu obiektywizacji osiągniętych wyników, wartości MVD każdorazowo odnoszono do wartości referencyjnych (całkowita liczba naczyń krwionośnych obecnych w wycinku mięśnia sercowego) uzyskanych w drodze analizy immunohistochemicznej obecności śródbłonkowej syntazy tlenku azotu w komórkach śródbłonka naczyń.

Drugi wymiar miał charakter praktyczny. W oparciu o przytoczone we wstępie dane założono, że wyniki ww. analizy histologicznej mogą mieć znaczenie w określaniu ryzyka pooperacyjnej niewydolności serca oraz/lub zgonu u dzieci, u których zostały przeprowadzone zabiegi kardiochirurgicznej korekcji wad serca.

Podjęte dwa wątki w pracy doktorskiej narzuciły odpowiednią kolejność prowadzenia prac badawczych, a także wymusiły konstrukcję bieżącego rozdziału rozprawy.

Pierwszym spostrzeżeniem, jakie uzyskano w toku prowadzonych prac badawczych było stwierdzenie istotnie wyższej gęstości naczyń krwionośnych w mięśniu sercowym w grupie dzieci z rozpoznaniem sinicznych wad serca. Choć spodziewano się akurat takiego rozkładu wyników, to skala obserwowanego zjawiska przerosła przyjmowane założenia. Okazało się, że uśredniona MVD w wadach serca niesinicznych kształtuje się na poziomie około 460 naczyń na 1 mm². Odpowiada zatem swoją wartością tkankom o bardzo intensywnym metabolizmie (Raica M i wsp., 2009; Verdegem D i wsp., 2014). W przypadku sinicznych wad serca, uśredniona wartość MVD wynosiła niemalże 580 naczyń na 1 mm². Takich wartości MVD nie obserwuje się w warunkach

fizjologicznych. Jak już wspomniano we wstępie, wartości gęstości naczyń krwionośnych w zakresie 500 - 600 naczyń na 1 mm² są obserwowane w tkankach nowotworowych, a więc takich, w których intensywny metabolizm komórek spotyka się z przewlekłym niedotlenieniem (Nico B i wsp., 2008; Nowicki M i wsp., 2008; Raica M i wsp., 2009). Oznaczało to tym samym, że w proces angiogenezy w sinicznych wadach serca muszą być zaangażowane podobne mechanizmy do tych, które zostały opisane w warunkach rozwoju tkanki nowotworowej. Oznaczało to, że przyjęte we wstępie pracy założenie zbadania nie tylko stopnia dojrzałości naczyń krwionośnych (określenie ekspresji antygenów CD105, CD34, CD31 oraz czynnika von Willebranda), ale również ich potencjału angiogenego (antygen CD44 i białko GDF-15) jest jak najbardziej słuszne.

Co ciekawe, jak dotąd nie ma w dostępnej literaturze prac, które podejmowałyby problem wyjaśnienia gęstości naczyń krwionośnych w mięśniu sercowym u dzieci z wrodzonymi wadami serca w sposób nawiązujący do tego, który został przyjęty w bieżącej pracy. Podając w bazie PubMed słowa kluczowe "microvascular density" oraz "heart defect", wyświetlonych zostaje zaledwie 10 prac z lat 1989 - 2010. Dotyczą one jednak przebudowy mięśnia sercowego w modelach doświadczalnych (zwierzęcych) albo analizy MVD w wybiórczych wadach serca związanych z przerostem prawej komory (Rutz T i wsp., 2010). Wśród wymienionych prac znajduje się również doniesienie autora bieżącej rozprawy, które jednakże trudno wykorzystywać jako materiał referencyjny (Jankowska P i wsp., 2013). Niemniej, w oparciu o literaturę bazową można było stwierdzić, jakie wartości MVD w wadach serca niesinicznych uzyskiwali inni autorzy. Wahaly się one w przedziale od 350 do 450 naczyń na 1 mm², co wydaje się być zgodne z wynikami uzyskanymi w bieżącej pracy (Goh KL i wsp., 2001; Rutz T i wsp., 2010).

W dalszej kolejności oceniono stopień dojrzałości naczyń mikrokrążenia w obrębie mięśnia sercowego w sinicznych i niesinicznych wadach serca. W tym celu wykorzystano uznany model badawczy, który został zaproponowany przez Hristova i wsp. w 2004 r. (Hristov M i wsp., 2004). W modelu tym wskazano, że populacja progenitorowych komórek śródbłonka (*endothelial progenitor cells*, EPCs) składa się z trzech rodzajów komórek. Należą do nich wczesne komórki progenitorowe śródbłonka rekrutowane

z macierzystych komórek podścieliska szpiku kostnego oraz wczesne i późne komórki progenitorowe śródbłonka – krążące w łożysku naczyniowym. Rekrutacja wczesnych komórek progenitorowych śródbłonka z komórek macierzystych podścieliska szpiku kostnego zachodzi przede wszystkim pod wpływem różnych form naczyniowego czynnika wzrostu komórek endotelialnych (VEGF). Ponieważ wspólnym receptorem dla wszystkich, jak dotąd opisanych form VEGF, jest VEGFR–2, przypuszczalnie też z tego powodu, na powierzchni wczesnej EPC stwierdza się, obok klasycznych markerów komórek macierzystych – CD34 i CD133, obecność tego właśnie receptora (Hristov M, Weber C, 2008). Warto zauważyć, że ekspresja VEGFR–2 na powierzchni EPC nie zanika wraz z procesem dojrzewania komórki, ale utrzymuje się na jej powierzchni aż do osiągnięcia formy maksymalnie zróżnicowanej – tzn. wykształcenia dojrzałej komórki śródbłonka wchodzącej w skład nabłonka naczyniowego (Civin i wsp., 1989).

W modelu tym udowodniono również, że panel zaledwie 4 białek markerowych pozwala ocenić stopień dojrzałości naczyń mikrokrążenia niezależnie od tkanki, w jakiej się znajdują. Do białek tych należą antygeny CD105, CD34 i CD31, a także czynnik von Willebranda. Pierwszy z nich wskazuje na obecność niskozróżnicowanych (progenitorowych) komórek śródbłonka, które osiadły w obszarze błony wewnętrznej (utraciły status krążących progenitorowych komórek śródbłonka). Antygeny CD34 oraz CD31 wskazują na obecność odpowiednio średniozróżnicowanych komórek śródbłonka. Natomiast czynnik von Willebranda jest markerem "starczych" komórek śródbłonka, które będą systematycznie zastępowane przez komórki CD34+ oraz CD31+. Co ciekawe, ww. markery komórek śródbłonka mogą ulegać koekspresji w obrębie tych samych komórek. Oznacza to, że ocena stopnia dojrzałości naczyń mikrokrążenia jest możliwa wyłącznie poprzez obliczenie stosunku naczyń wykazujących ekspresję CD105, CD34, CD31 lub czynnika von Willebranda do referencyjnej liczby naczyń krwionośnych uzyskanej dzięki analizie ekspresji eNOS (Hristov M, Weber C, 2009).

W wyniku przeprowadzonych analiz wykazano, że pomimo istotnej różnicy w całkowitej liczbie naczyń krwionośnych zaopatrujących mięsień sercowy w sinicznych i niesinicznych wadach serca, to odsetek naczyń CD105+, CD34+ oraz CD31+ w poszczególnych grupach wad jest niemalże identyczny (tabela 4). Tylko w przypadku ekspresji czynnika von Willebranda wykazano, że odsetek naczyń vWF+ jest istotnie

wyższy w niesiniczych wadach serca (odpowiada liczbie naczyń CD31+). Może to wskazywać na istotnie większe tempo przebudowy łożyska naczyniowego w sinicznych wadach serca, co jest zapewne odpowiedzią na pojawiające się warunki niedotlenienia tkanki (Gao XF i wsp., 2009; Bekhite MM i wsp., 2014).

W trakcie prowadzenia prac badawczych na tym etapie zwrócono również uwagę na nietypową architekturę mikrokrążenia w mięśniu sercowym oraz w obszarze podwsierdziowym w sinicznych wadach serca. Zarówno w sinicznych jak i niesiniczych wadach serca, gęstość naczyń mikrokrążenia w obszarze podwsierdziowym była wielokrotnie niższa niż w samym mięśniu sercowym. Ale w wycinkach serca uzyskanych od dzieci w trakcie korekcji sinicznych wad serca zaobserwowano, że w obszarze podwsierdziowym znajduje się istotnie wyższy odsetek naczyń CD34+ (stosunek CD34/CD31 w sinicznych wadach serca w obszarze podwsierdziowym był istotnie wyższy niż w wadach niesiniczych). Obserwacja ta może wskazywać na dwa fakty. Po pierwsze, mimo stosunkowo licznych doniesień (Nico B i wsp., 2008; Kuraitis D i wsp., 2011), antygen CD31 nie wydaje się być wystarczająco dobrym markerem, za pomocą którego można oznaczać MVD w mięśniu sercowym w wadach serca. Najprawdopodobniej, zarówno w grupie sinicznych jak i niesiniczych wad serca pojawia się porównywalny odsetek naczyń krwionośnych zbudowanych z komórek śródbłonna zachowujących cechy komórek progenitorowych. Ale w obwodowych częściach wycinków (sąsiadujących bezpośrednio ze światłem komór i przedsionków serca) pojawia się istotnie większa liczba naczyń CD34-pozytywnych w grupie wad sinicznych w porównaniu do grupy wad niesiniczych. Obserwacja ta jest o tyle zaskakująca, że w przypadku izolowanej analizy ekspresji CD31, różnice w MVD w tej części wycinka i pomiędzy ww. grupami wad serca po prostu nie występują. Takie rozmieszczenie odczynu immunohistochemicznego może być efektem istotnie większego niedotlenienia mięśnia sercowego w grupie wad sinicznych. Oznacza to również, że przebudowa serca w sinicznych wadach serca jest bardziej zaawansowana w obszarze podwsierdziowym niż w samym mięśniu sercowym. W opinii niektórych autorów może to wynikać z większej odległości obszaru podwsierdziowego od dużych naczyń krwionośnych (> 100 μm) i większej hipoksji tkanki (Kwon YH i wsp., 2012).

Dane uzyskane podczas przeprowadzonych oznaczeń MVD na materiale jakim jest fragment serca pobierany podczas operacji kardiologicznych, są jednymi z pierwszych, jakie zostały przeprowadzone dotychczas w tej grupie chorób, a przede

wszystkim w tej grupie wiekowej. Wcześniej wykonywane oznaczenia odwoływały się bowiem w pierwszym rzędzie do zmian obserwowanych w rekonstrukcji mięśnia sercowego podczas zmian przeciążeniowych serca.

Rakusan i wsp. zarejestrowali, że gęstość naczyń kapilarnych w ciśnieniowym przeciążeniu lewej komory serca jest proporcjonalna do ciężkości wady. W przypadku przerostu prawej komory serca, w związku z obniżonym ciśnieniem tętniczym krwi oraz redukcją przeciążenia w sinicznych wadach serca (TGA, ToF), odwołując się do Rutza i wsp., mamy do czynienia z relatywnie obniżoną gęstością naczyń mikrokrążenia oraz redukcją rezerwy perfuzyjnej, co może mieć wpływ na funkcję skurczową prawej komory serca (Rutz T i wsp., 2010).

W trzecim etapie prowadzenia prac badawczych zajęto się próbą zdefiniowania potencjału angiogenego naczyń mikrokrążenia we wrodzonych wadach serca. W tym celu zdecydowano się na analizę dwóch białek - antygeny CD44 oraz białka GDF-15. Oczywiście pytanie, jakie można w tym miejscu postawić, to dlaczego podczas badania potencjału angiogenego nie zdecydowano się na analizę ekspresji naczyniowego czynnika wzrostu śródbłonna (VEGF) oraz jego receptorów?

Po pierwsze, VEGF (jego izoformy A, B, C i D) w warunkach niedotlenienia tkanek (np. w trakcie rozwoju procesu nowotworowego) powstaje w pierwszej kolejności poza układem naczyniowym. Jego źródłem są komórki tkanki łącznej, komórki mięśniowe, komórki nowotworowe, a stosunkowo rzadko - komórki śródbłonna (Dudley AC, 2012). Po drugie, śródbłonkowy receptor dla VEGF (VEGFR-2) jest konstytutywnym markerem komórek śródbłonna niezależnie od stopnia ich dojrzałości (Hristov M i Weber C, 2008). Oznacza to, że VEGF oraz jego receptory mogą być użytecznym mechanizmem badawczym w próbie zrozumienia i interpretacji potencjału angiogenego, o ile to naczynia krwionośne nie znajdują się w centrum zainteresowania badacza. W układzie, który został zaprezentowany w bieżącej pracy, starano się określić potencjał angiogeny naczyń mikrokrążenia, a nie otaczającej je tkanki. Z tego powodu wybór padł na antygen CD44 oraz białko GDF-15.

Najważniejszą poczynioną obserwacją był fakt bardzo zróżnicowanej ekspresji CD44 w naczyniach mikrokrążenia w sinicznych oraz niesinicznych wadach serca. W tych

drugich, udział CD44 w tworzeniu naczyń krwionośnych był kilkakrotnie niższy niż w grupie wad sinicznych. Fakt ten zatem może się pokrywać z uzyskanymi wcześniej danymi, iż znacznie bardziej intensywny poziom przebudowy łożyska naczyniowego zachodzi w mięśniu sercowym w wadach serca sinicznych.

W zakresie analizy ekspresji białka GDF-15 uzyskane dane były jednakże odwrotne. Wykazano, że w niesinicznych wadach serca udział naczyń krwionośnych GDF15-pozytywnych wynosi niemalże 100%, a w grupie wad sinicznych jest on istotnie niższy i oscyluje w granicach 80%. Aby prawidłowo zinterpretować opisane wyżej zależności należy w pełni zrozumieć biologię CD44 oraz białka GDF-15.

Antygen CD44 jest aktywną cząsteczką zaangażowaną w proliferację naczyń krwionośnych (Goodison S i wsp., 1999). W związku z tym jego ekspresja wzrasta proporcjonalnie do stopnia przebudowy łożyska naczyniowego. Białko GDF-15 jest również markerem angiogenezy, ale jego ekspresja zachodzi w pierwszym rzędzie w obrębie komórek śródbłonna naczyń krwionośnych, które uległy procesowi przewlekłego uszkodzenia oraz wymagają naprawy (Strelau J, 2000). Najprawdopodobniej, o odmiennej dystrybucji GDF-15 w sinicznych oraz niesinicznych wadach serca decyduje czas wykonania operacji. W przypadku sinicznych wad serca, okres od chwili urodzenia dziecka do momentu operacji jest stosunkowo krótki. Uniemożliwia on zatem rozwój przewlekłego stanu, w którym przebudowa łożyska naczyniowego odbywałaby się nie w następstwie niedotlenienia, ale w wyniku konieczności zastępowania naczyń uszkodzonych nowymi. Odmienne wygląda sytuacja w niesinicznych wadach serca. Tutaj zabieg operacyjny jest wykonywany u dzieci kilkuletnich lub nawet kilkunastoletniej młodzieży. Mięsień sercowy nie wykazuje oznak niedotlenienia (istotnie niższa ekspresja CD44 oraz wyższa ekspresja vWF), co jednak nie jest dowodem na to, że obecne w mięśniu sercowym naczynia są prawidłowe i nie podlegają uszkodzeniom. Na podstawie zrealizowanych prac badawczych trudno wyrokować, jakiego rodzaju są to uszkodzenia, ale istotnie wyższa ekspresja GDF-15 właśnie w tej grupie chorych musi zwracać uwagę. Wydaje się, że obserwacja ta (nie posiadająca, jak dotąd, swojego odpowiednika w dostępnej literaturze) powinna zostać zinterpretowana na poziomie molekularnym. Może wówczas możliwym stanie się wyselekcjonowanie uniwersalnego czynnika ryzyka niepowodzeń leczenia chirurgicznego u dzieci z wrodzonymi wadami serca.

Należy również pamiętać, że potencjalne znaczenie antygenu CD44 wykazano już wcześniej w patogenezie idiopatycznego nadciśnienia płucnego. W wyniku prac badawczych prowadzonych przez Keiko i wsp. antygen CD44 towarzyszył aktywacji komórek śródbłonna, przez co mógł mieć udział w rozwoju przetrwałego lokalnego stanu zapalnego. Literatura ta opiera się jednak na badaniach wykonanych wśród pacjentach dorosłych. Keiko i wsp. nie zauważyli ekspresji CD44 u dorosłych z rozpoznaniem ASDII oraz rozwiniętym nadciśnieniem płucnym. Zasugerowali wręcz, że jego zwiększona ekspresja występuje głównie u pacjentów z idiopatycznym, o nieznanym przyczynie, nadciśnieniem (prawdopodobnie związanym ze stale przebiegającym stanem zapalnym wokół komórek naczyń płucnych).

Lin i inni zrealizowali badania, dzięki którym uzyskali informację o wpływie podwyższonej ekspresji GDF-15 na ryzyko rozwoju niewydolności serca, a także ryzyko zgonu u pacjentów po zawale serca STEMI. Według autorów, zauważono korelację pomiędzy wysoką ekspresją białka GDF-15 w naczyniach mięśnia sercowego u pacjenta po zawale, a ryzykiem rozwoju niewydolności serca i/lub śmierci u tych pacjentów.

W ostatnim etapie pracy postanowiono oszacować przydatność kliniczną badanej gęstości oraz jakości naczyń krwionośnych w wycinkach mięśnia sercowego (drugi aspekt prac badawczych prowadzonych w ramach niniejszej rozprawy).

Histologiczna ocena mięśnia sercowego pobranego od żywych osób nie jest czymś nowym. Pod koniec XX wieku „złotym standardem” stała się ocena wycinków mięśnia sercowego (biopsji) w monitorowaniu procesu odrzucania serca po jego przeszczepieniu. Aktualnie, dzięki nowoczesnym metodom diagnostycznym zabieg ten nabiera coraz większego znaczenia. W wielu innych zespołach klinicznych na podstawie biopsji można ustalić właściwe rozpoznanie i dzięki temu zastosować odpowiednią terapię. Wykonywanie biopsji serca u dzieci w Polsce ma jednak bardzo ograniczony charakter ze względu na swoją inwazyjność i wciąż mało precyzyjne kryteria diagnostyczne.

Z tego powodu, w ramach realizowanych prac badawczych postanowiono wykonać analizy histologiczne na materiale uzyskiwanym podczas korekcyjnych zabiegów kardiochirurgicznych. Choć materiał ten był traktowany jako "odpad medyczny", to i tak na jego wykorzystanie nie wyrażali zgody wszyscy rodzice.

Dotychczasowe badania dotyczące prognozowania przebiegu wad serca w zależności od ich ciężkości opierają się w głównej mierze na stopniu zaawansowania objawów klinicznych w okresie przed-, około-, i pooperacyjnym. Według ogólnie przyjętych standardów stałym badaniem określającym wydolność serca u dziecka, jego funkcję, kurczliwość i szereg innych parametrów jest badanie echokardiograficzne (Villaraqa H i wsp., 2014). Jest ono badaniem z wyboru, a sposób jego wykonania musi gwarantować możliwość porównywania wyników między różnymi ośrodkami leczniczymi. Dzięki temu możliwym staje się przygotowywanie i wdrażanie algorytmów postępowania medycznych również w tej grupie chorób.

Niestety, przyjęte rozwiązania w dalszym ciągu nie są doskonałe. Świadczyć może o tym stosunkowo duża liczba powikłań po zabiegach kardiochirurgicznych u dzieci, która, również w naszych obserwacjach, waha się w granicach 25% wszystkich pacjentów. Dlatego, w dalszym ciągu, obok poszukiwania nowych sposobów leczenia wad serca, zastosowania odpowiednich leków, innowacyjnych procedur operacyjnych, na transplantacji serca kończąc, badania na poziomie tkankowym (a w przyszłości również na molekularnym) są zupełną nowością, co do których brakuje, jak dotąd, licznych doniesień w literaturze. Zatem warto postawić pytanie czy badania na tym poziomie, wniosą cokolwiek do diagnostyki, czy analiza materiału histologicznego pochodzącego od małych pacjentów umożliwiłyby przewidzenie dalszego przebiegu choroby u nastolatka lub dorosłego już pacjenta, po operacji kardiochirurgicznej, a co się z tym wiąże, czy istnieje możliwość wybrania odpowiednio wcześniej konkretnej dalszej terapii i postępowania?

Mimo wykorzystania materiału tkankowego od stosunkowo licznej grupy dzieci (93 dzieci) oraz obecności różnorodnych powikłań u 25 z nich, żadna z zastosowanych analiz statystycznych oraz żaden z przyjętych modeli uwarunkowań nie przyniósł odpowiedzi na pytanie, czy uzyskane wyniki badań mają znaczenie rokownicze.

Okazało się, że oznaczenie gęstości oraz jakości naczyń krwionośnych (zarówno w aspekcie ich dojrzałości jak i potencjału angiogenego) nie przekładają się na obecność pojawiania się powikłań w okresie pooperacyjnym. Na podstawie własnych obserwacji wiemy, że częstsze powikłania są obserwowane w przypadku ciężkich, złożonych wad serca. Tym samym, żadne z opracowanych narzędzi nie może być wykorzystane do przewidywania wczesnych niepowodzeń leczenia. W tym miejscu należy zaznaczyć, że przyczyną takiego stanu rzeczy może być stosunkowo krótki okres czasu, w jakim zoperowane dzieci pozostawały pod kontrolą poradni. Przypomnijmy, że w przypadku braku powikłań hemodynamicznych lub zapalnych, dzieci były wypisywane w 14. dobie po zabiegu.

A okres obserwacji w leczeniu ambulatoryjnym nie przekraczał dwóch lat. Może to oznaczać, że większość z pojawiających się w tym czasie powikłań, była związana ze sposobem i okolicznościami towarzyszącymi wykonanemu zabiegowi operacyjnemu, a nie wiązała się ze statusem morfologiczno-czynnościowym tkanki mięśnia sercowego w chwili operacji. Być może należałoby opieką objąć wszystkich pacjentów aż do okresu dorosłości i monitorować pojawianie się jakichkolwiek zaburzeń w tym czasie?

Z pewnością bieżące opracowanie nie może przyczynić się do zmiany w sposobie leczenia pacjentów. Na potwierdzenie tych słów warto zwrócić uwagę na ograniczenia pracy. Należy pamiętać, że analizowany materiał jest zdecydowanie niewystarczający do wysunięcia wniosków, które mogłyby zmienić aktualną praktykę kliniczną. Jest raczej przyczynkiem do poznania nowych uwarunkowań możliwych do pełnego oszacowania w ramach dalszych, wielośrodkowych badań. Warto byłoby, aby uzyskiwanie "zbędnego materiału tkankowego" w czasie operacji kardiochirurgicznych zostało wystandaryzowane oraz usankcjonowane. W chwili obecnej sam sposób pozyskania materiału jest dość kontrowersyjny. Nie każdy rodzic, pomimo szczegółowego wyjaśnienia, na czym proces przeprowadzenia badań polega, wyraża zgodę na pobranie materiału. Sam fakt posiadania dziecka i informacji o tym, że nie jest ono w pełni zdrowym noworodkiem, a ma wrodzoną wadę serca, często jest zbyt nagłą i przytłaczającą informacją, żeby rodzice w tym czasie mogli spokojnie przeanalizować sytuację i wyrazić zgodę na cokolwiek dodatkowego poza samą operacją. Aspekt psychologiczny, wbrew pozorom, w dziedzinie kardiologii dziecięcej,

ze względu na wiek pacjenta odgrywa często bardzo ważną rolę w relacji lekarz – rodzic - pacjent.

Jestem jednak zdania, że wyniki przeprowadzonych badań pozwolą w przyszłości na wyselekcjonowanie odpowiednich markerów w celu oceny możliwości oszacowania stopnia rozwinięcia danej wrodzonej wady serca oraz ryzyka jej progresji w okresie pooperacyjnym. Zakres personalizacji leczenia danej wady, włączenia nowych schematów w te już istniejące, wykorzystania wiedzy o MVD jest wciąż nowością, a zarazem w sposób niewystarczający wspomaga obecnych kardiologów dziecięcych i kardiochirurgów w podejmowaniu decyzji co do dalszego leczenia. Wymaga to bowiem poświęcenia dodatkowego czasu, niekiedy grupy osób, na pobranie materiału, przeanalizowaniu go w aspekcie odpowiednich markerów, a czas w przypadku wrodzonych wad serca, szczególnie tych prowadzących do zagrożenia życia dziecka, jest bezcenny i często opóźnione wykonanie zabiegu kilkanaście godzin później, prowadzi do jeszcze większego stopnia niedotlenienia pacjenta i wiążących się z tym konsekwencji.

Pytanie czy prowadzenie takich badań u dzieci z wrodzoną wadą serca ma istotny wpływ na ich leczenie, przeżycie, pojawienie się niepowodzeń leczenia operacyjnego, prognozowanie przebiegu choroby, włączając w to przewidzenie ewentualnych komplikacji związanych z daną wadą serca, na tym etapie opracowania pozostaje pytaniem bez odpowiedzi. Pierwsze doniesienia na ten temat zapewne zostaną opublikowane w najbliższych latach.

6. Wnioski

1. Gęstość naczyń krwionośnych mikrokrażenia w obszarze mięśnia sercowego w sinicznych wadach serca jest większa niż w wadach niesinicznych. Różnica ta dotyczy zarówno właściwego mięśnia sercowego, jak i obszaru podwosierdziowego. Różnice te mogą być następstwem istotnie większego niedotlenienia tkanek serca u dzieci z sinicznymi wadami serca.
2. Naczynia krwionośne obecne w mięśniu sercowym w sinicznych wadach serca charakteryzują się istotnie niższym stopniem dojrzałości definiowanym ekspresją czynnika von Willebranda. Charakteryzują się również istotnie wyższym potencjałem proliferacyjnym definiowanym ekspresją antygenu CD44.
3. Najbardziej przydatnym białkiem markerowym umożliwiającym ocenę wszystkich naczyń krwionośnych w sercu jest antygen CD34, którego czułość jest równa czułości syntazy tlenu azotu. Najbardziej przydatnym czynnikiem różnicującym stopień dojrzałości naczyń krwionośnych w sinicznych i niesinicznych wadach serca jest czynnik von Willebranda. Antygeny CD44 oraz białko GDF-15 charakteryzują się porównywalną przydatnością w aspekcie badania potencjału angiogenego naczyń krwionośnych w mięśniu sercowym.
4. Oznaczanie gęstości oraz jakości naczyń krwionośnych mikrokrażenia w mięśniu sercowym z materiału pozyskanego w czasie wykonywania operacyjnej korekcji wady serca nie ma znaczenia predykcyjnego w określaniu wczesnych niepowodzeń tego leczenia.

7. Streszczenie

W krajach europejskich wady serca są rozpoznawane u ok. 0,8-1,0% żywo urodzonych noworodków. Zaburzenia morfogenezy serca, które prowadzą do wykształcania wrodzonych wad tego narządu mogą wynikać w sposób bezpośredni z różnego rodzaju mutacji, jak i w sposób pośredni – będąc następstwem niedotlenienia. Jednym z najczulszych parametrów histologicznych określających wartość niedotlenienia a zatem samo prognozowanie, jest ocena porównania gęstości mikrokrążenia (MVD). Gęstość naczyń krwionośnych zwiększa się w dwóch przypadkach: w sytuacji rosnącego metabolizmu tkankowego lub w wyniku niedotlenienia tkanek.

Celem rozprawy doktorskiej była próba oceny gęstości oraz dojrzałości naczyń krwionośnych mięśnia sercowego u dzieci z wrodzonymi wadami serca z wykorzystaniem badań immunohistochemicznych.

Cel ten postanowiono osiągnąć w oparciu o postawione cele szczegółowe:

- Określenie stopnia gęstości naczyń mikrokrążenia (MVD) w wycinkach mięśnia sercowego uzyskanych podczas operacyjnej korekty wrodzonych wad serca
- Ocenę przydatności antygenów CD31, CD34, CD44 oraz GDF-15
- Dokonanie analizy stopnia ekspresji wybranych markerów w wybranych fragmentach mięśnia sercowego u dzieci z wrodzonymi wadami serca
- Zdefiniowanie wartości diagnostycznej oraz rokowniczej MVD określanego w wycinkach mięśnia sercowego uzyskanych podczas operacyjnej korekcji wrodzonych wad serca.

Badaniem objęto 93 dzieci w wieku od 7 dni do 13 lat. Grupę badaną podzielono na dwie grupy porównawcze: **A** - grupa z rozpoznaniem sinicznej wady serca i **B** - grupa z rozpoznaniem późnosinicznej lub niesinicznej wady serca. Podczas operacji kardiochirurgicznej, po uprzednim uzyskaniu zgody rodziców lub opiekunów prawych, pobierano materiał jakim był fragment mięśniówki serca, traktowany jak odpad medyczny. Badany materiał zatapiano w bloczkach parafinowych a następnie wykonywano reakcje immunohistochemiczne za pomocą metody, której celem było umożliwienie oceny ekspresji oraz lokalizacji badanych białek w tkance. W tym celu,

wykonywano pośrednią reakcję immunohistochemiczną z wykorzystaniem biotynylowanej tyraminy. Do wizualizacji reakcji immunohistochemicznej użyto zestawu Catalyzed Signal Amplification System firmy Dako (kod K1500). Badania przeprowadzono z użyciem swoistych przeciwciał : anty-CD31, anty-CD34, anty-CD105, anty-vW , anty-eNOS, anty-CD44, anty-GDF-15. W badanych tkankach oceniano średnią ilość naczyń krwionośnych w mięśniu sercowym a następnie porównywano ich ilość w wadach serca sinicznych i niesinicznych. Obliczenia dokonywano na podstawie uśrednionej liczby naczyń krwionośnych obecnych na 1mm² analizowanej tkanki.

W wyniku przeprowadzonych analiz wykazano, że pomimo istotnej różnicy w całkowitej liczbie naczyń krwionośnych zaopatrujących mięsień sercowy w sinicznych i niesinicznych wadach serca, to odsetek naczyń CD105+, CD34+ oraz CD31+ w poszczególnych grupach wad jest niemalże identyczny. Tylko w przypadku ekspresji czynnika von Willebranda wykazano, że odsetek naczyń vWF+ jest istotnie wyższy w niesinicznych wadach serca. Zarówno w sinicznych jak i niesinicznych wadach serca MVD w obszarze podwierzwiowym była wielokrotnie niższa niż w samym mięśniu sercowym. Ale w obwodowych częściach wycinków (sąsiadujących bezpośrednio ze światłem komór i przedsionków serca) pojawia się istotnie większa liczba naczyń CD34+ w grupie wad sinicznych w porównaniu do grupy wad niesinicznych. Stwierdzono również, że udział CD44 w tworzeniu naczyń krwionośnych w niesinicznych wadach serca był kilkakrotnie niższy niż w grupie wad sinicznych. W zakresie analizy ekspresji białka GDF-15 uzyskane dane były jednakże odwrotne. Wykazano, że w niesinicznych wadach serca udział naczyń krwionośnych GDF15+ wynosi niemalże 100%, a w grupie wad sinicznych jest on istotnie niższy i oscyluje w granicach 80%.

Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowano wnioski, które przedstawiono poniżej.

W wycinkach mięśnia sercowego u dzieci z wrodzoną wadą serca, z pozytywnym odczynem immunohistochemicznym znakowanym anty-eNOS, zauważono znaczną przewagę gęstości naczyń mikrokrążenia w grupie wad pacjentów z wadami serca niesinicznymi.

Niemal wszystkie obecne naczynia krwionośne u dzieci z wrodzonymi wadami serca, wykazują ekspresję antygenu CD34, co może czynić ten marker w tego rodzaju zaburzeniach markerem referencyjnym. Tylko nieco powyżej 60% wykazuje obecność antygenu CD31. Oznacza to, że w przypadku sinicznych jak i niesinicznych wad serca, komórki śródbłonna znajdują się na stosunkowo wczesnych stopniach dojrzewania. Zatem antygen CD34 w większym stopniu niż CD31 może być wykorzystywany do wykrywania gęstości naczyń mikrokrążenia. Poprzez znaczącą ekspresję antygenu CD44, stwierdzono, że intensywny poziom przebudowy łożyska naczyniowego zachodzi w mięśniu sercowym w wadach serca sinicznych. W wadach niesinicznych stwierdzono znamieny udział naczyń krwionośnych GDF15 - pozytywnych, co może świadczyć o przewlekłym procesie uszkodzenia tkanki.

W obszarze podwsięrdziowym znajduje się istotnie wyższy odsetek naczyń CD34+ Takie rozmieszczenie odczynu immunohistochemicznego może być efektem istotnie większego niedotlenienia mięśnia sercowego w grupie wad sinicznych. Oznacza to również, że przebudowa serca w sinicznych wadach serca jest bardziej zaawansowana w obszarze podwsięrdziowym niż w samym mięśniu sercowym. Jedynie ekspresja czynnika von Willebranda jest istotnie niższa w sinicznych wadach serca zarówno w obszarze wsięrdzia jak i obszarze podwsięrdziowym. Zatem w tych wrodzonych wadach serca jest mniej naczyń krwionośnych o maksymalnym stopniu zróżnicowania.

Na podstawie przeprowadzonych badań oznaczenia gęstości oraz jakości naczyń krwionośnych (zarówno w aspekcie ich dojrzałości jak i potencjału angiogenego) nie przekładają się na obecność pojawiania się powikłań w okresie pooperacyjnym. Aktualnie ocena MVD ma wartość diagnostyczną wyłącznie jako analiza porównawcza obecności MVD sinicznych i niesinicznych wad serca, poprzez ekspresję antygenów CD31, CD34, CD105, czynnika vW, CD44 i GDF-15. Tym samym na tym etapie badań, żadne z opracowanych narzędzi nie może być wykorzystane do przebiegu pooperacyjnego.

8. Summary

In European countries, heart defects are diagnosed in about 0.8%-1.0% of infants born alive. Cardiac morphogenesis defects which lead to congenital heart diseases can result directly from various types of mutations or occur indirectly as a response to tissue hypoxia. One of the most sensitive histological parameters reflecting the extent of hypoxia and consequently the prognosis is the evaluation of microvessel density (MVD). The density of blood vessels increases in two situations: increased tissue metabolism or insufficient blood supplies to tissues.

The objective of this PhD thesis was to evaluate the density and maturity of blood vessels in the cardiac muscle of children diagnosed with congenital heart defects using immunohistochemical methods.

The objective was to be fulfilled by:

- Determining microvessel density (MVD) in the cardiac muscle sections obtained during surgical corrections of the congenital heart defects.
- Establishing the usefulness of CD31, CD34, CD44 and GDF-15 antigens.
- Examining the expression of individual markers in the selected cardiac muscle sections in children diagnosed with congenital heart defects.
- Specifying the diagnostic and prognostic value of MVD evaluated in the cardiac muscle sections obtained during surgical corrections of the congenital heart defects.

The study involved 93 children between 7 days and 13 years of age. The group of patients was sub-divided into two groups to be compared: **A** – children diagnosed with cyanotic heart defects and **B** – children with a diagnosis of non-cyanotic or late cyanotic heart failures. Having obtained the parents or legal guardians prior informed consent for the study, the fractions of interventricular treated as medical waste was removed during the surgical corrections of the heart defects. The examined samples were embedded in paraffin and then immunohistochemical reactions were performed using a method which would make it possible to evaluate the expression and location of the studied molecules in tissues. To fulfill this objective, an indirect immunohistochemical

reaction was performed with the use of biotinylated tyramine. The Catalyzed Signal Amplification System provided by Dako (code: K1500) was used to visualize the immunohistochemical reaction. The study was conducted with the use of antibodies against CD31, CD34, CD105, vWF, eNOS, CD44 and GDF-15. The average number of blood vessels in the cardiac muscle was estimated in the examined tissues and then compared in cyanotic and non-cyanotic heart defects. The calculations were made on the basis of an average number of blood vessels per 1mm² of the examined tissue.

The study showed that despite major differences in the overall number of the cardiac muscle's blood vessels in cyanotic and non-cyanotic heart defects, the percentage of CD105+, CD34+ and CD31+ vessels in individual types of defects was almost identical. It was found that only in the case of the expression of von Willebrand factor, the percentage of vWF+ vessels was much higher in non-cyanotic heart defects. Both in cyanotic and non-cyanotic heart defects, the MVD in the subendocardial region was much lower than in the very cardiac muscle. But in the peripheral parts of the sections (in the direct vicinity of the ventricular lumen and the atria), the number of CD34+ vessels was much higher in the cyanotic defects than in the non-cyanotic ones. It was also found that the contribution of CD44 to the development of vessels in non-cyanotic heart defects was several times lower than in cyanotic defects. However, the analyses of the expression of GDF-15 molecule showed the opposite. It was established that in non-cyanotic heart defects, the percentage of GDF15+ blood vessels was almost 100%, while in cyanotic defects it was much lower and oscillated around 80%.

The conducted analyses resulted in a number of conclusions presented below. It was established that in the sections of the cardiac muscle of children diagnosed with congenital heart diseases with a positive immunohistochemical reaction marked as anti-eNOS antibody, the density of microvessels was much higher in patients diagnosed with non-cyanotic heart defects.

Almost all vessels in children diagnosed with congenital heart defects show the expression of antigen CD34 as a result of which this marker can be treated as a reference marker in such types of diseases. Only slightly more than 60% of vessels show the presence of antigen CD31. This means that both in cyanotic and non-cyanotic heart defects, the endothelial cells are at a relatively early stage of maturity. As a result,

antigen CD34 can be more useful to evaluating the density of micro vessels than CD31. Based on the high degree of the expression of antigen CD44, it was established that an intensive remodeling of the vascular bed takes place in the cardiac muscle in cyanotic heart defects. In non-cyanotic defects, a big percentage of positive GDF15 blood vessels was found, which may indicate a chronic tissue injury.

In the subendocardial region there is a much bigger percentage of CD34+ vessels. Such a distribution of the immunohistochemical reaction may result from a much greater hypoxia of the cardiac muscle in children diagnosed with cyanotic heart defects. It also means that cardiac remodeling in cyanotic heart defects is more advanced in the subendocardial region than in the very cardiac muscle. Only the expression of the von Willebrand factor is much lower in cyanotic heart defects, both in the endocardial and the subendocardial regions. This means that in such congenital heart defects, there are fewer blood vessels with the maximum level of discrepancy.

As the conducted study showed, the density and quality of blood vessels (both in terms of their maturity as well as angiogenic potential) do not translate into post-prevalence of complications in hospital. At present, the evaluation of MVD has a diagnostic value only as a comparative analysis of MVD in cyanotic and non-cyanotic heart defects through the expression of CD31, CD34 and CD105 antigens, vW factor, CD44 and GDF-15. This means that at the present stage of the research, none of the developed tools can be used to predict early postoperative course.

9. Piśmiennictwo

1. Ago T, Sadoshima J. *GDF15, a cardioprotective TGF-beta superfamily protein.* Circ Res. 2006; 98:294-7.
2. Alczewska-Baranowska J. *Echokardiografia wrodzonych wad serca.* 2000; 4: 14-19.
3. Antosz H. *Antygen CD34 i komórki CD-34 pozytywne.* Post Biol Kom.2004; 31:198-285.
4. Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M. *CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate.* Cell. 1990; 61:1303-13.
5. Bellón T, Corbí A, Lastres P. *Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor-beta-binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions.* Eur J Immunol. 1993; 23:2340-5.
6. Bekhite MM, Finkensieper A, Rebhan J i inni. *Hypoxia, leptin, and vascular endothelial growth factor stimulate vascular endothelial cell differentiation of human adipose tissue-derived stem cells.* Stem Cells Dev.2014; 23:333-51.
7. Białkowski J, Szkutnik M, Kusa J i inni. *Transcatheter closure of postmyocardial infarction ventricular septal defects with Amplatzer devices.* Rev Esp Cardiol 2007; 60:548-551
8. Białkowski J, Szkutnik M, Bermudez-Canete i inni. *Sindrome de la aorta media causado por enfermedad de Takayasu: tratamiento con stents y seguimiento a medio plazo.* Rev Esp Cardiol 2002; 55: 682-5
9. Blanchet MR, Maltby S, Haddon DJ. *CD34 facilitates the development of allergic asthma.* Blood. 2007; 110: 2005-12
10. Boehm W, Emmel M, Sreeram N. *Balloon atrial septostomy: history and technique.* Images Paediatr Cardiol. 2006; 8:8-14.
11. Bohenek A, Reicher M. *Układ naczyniowy w: Anatomia człowieka.* PZWL, Warszawa, 1993; 3: 124-34,136-38,140-9.
12. Bolger AP, Coats AJ, Gatzoulis MA. *Congenital heart disease: the original heart failure syndrome.* Eur Heart J. 2003; 24:970-6.

13. Buduneli N, Atilla G, Guner G. *Biochemical analysis of total collagen content and collagen types I, III, IV, V and VI in gingiva of various periodontitis categories.* J Int Acad Periodontol. 2001; 3:1-6.
14. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D. i inni. *Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis.* Nature. 1998; 394:485-90.
15. Calapso P, Vitarelli E, Crisafulli C. *Immunocytochemical detection of megakaryocytes by endothelial markers: a comparative study.* Pathologica. 1992; 84: 215-23.
16. Ciszek B. *Układ przewodzący serca w: Wykłady o sercu i kardiologii wad wrodzonych* (red. Karolczak A). Lublin, 2008; 67-73
17. Civin C, Trischmann T, Fackler M i inni. *Leukocyte Typing IV. White cell differentiation antigens. Report on the CD34 cluster workshop.* (red. Knapp W, Dörken B, Gliks W i inni). Oxford–New York–Tokyo: Oxford Univ. press 1989; 818.
18. Dallas NA, Samuel S, Xia L. *Endoglin (CD105): a marker of tumor vasculature and potential target for therapy.* Clin Cancer Res. 2008; 14:1931-7.
19. Dangiell J. Diagnostyka prenatalna – mity i rzeczywistość. Nauka. 2007; 3:31-47
20. DeGrendele HC, Estess P, Siegelman MH. *Requirement for CD44 in activated T cell extravasation into an inflammatory site.* Science. 1997; 278 :672-5.
21. Dimitroff CJ, Lee JY, Rafii S. *CD44 is a major E-selectin ligand on human hematopoietic progenitor cells.* J Cell Biol. 2001; 153:1277-86.
22. Dudley AC. *Tumor endothelial cells.* Cold Spring Harb Perspect Med. 2012; 2 :a006536.
23. Estess P, DeGrendele HC, Pascual V. *Functional activation of lymphocyte CD44 in peripheral blood is a marker of autoimmune disease activity.* J Clin Invest. 1998; 102:1173-82.
24. Felmeden DC, Blann AD, Lip GY. *Angiogenesis: basic pathophysiology and implications for disease.* Eur Heart J. 2003; 24:586-603.
25. Fernández-Ruiz E, St-Jacques S, Bellón T. *Assignment of the human endoglin gene (END) to 9q34-->qter.* Cytogenet Cell Genet. 1993; 64:204-7.

26. Flig K. *Układ krwionośny w: Histologia. Podręcznik dla studentów medycyny i stomatologii.* (red. Zabel M). Elsevier Urban&Partner, Wrocław, 2000; 7:117-26
27. Fonsatti E, Jekunen AP, Kairemo KJ. *Endoglin is a suitable target for efficient imaging of solid tumors: in vivo evidence in a canine mammary carcinoma model.* Clin Cancer Res. 2000; 6:2037-43.
28. Fonsatti E, Del Vecchio L, Altomonte M. *Endoglin: An accessory component of the TGF-beta-binding receptor-complex with diagnostic, prognostic, and bioimmunotherapeutic potential in human malignancies.* J Cell Physiol. 2001; 188:1-7.
29. Gao XF, Shi HM, Sun T i inni. *Effects of Radix et Rhizoma Rhodiolae Kirilowii on expressions of von Willebrand factor, hypoxia-inducible factor 1 and vascular endothelial growth factor in myocardium of rats with acute myocardial infarction.* Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao. 2009; 7:434-40.
30. Gołąb J. *Krążenie limfocytów w : Immunologia* (red. Gołąb J, Jakubisiak M, Lasek W, Stokłosa T). PWN, Warszawa, 2008; 191-204
31. Goldberger A, Middleton KA, Oliver Ja. *Biosynthesis and processing of the cell adhesion molecule PECAM-1 includes production of soluble form.* J Biol Chem. 1994; 269:17183-91.
32. Goodison S, Urquidi V, Tarin D. *CD44 cell adhesion molecules.* Mol Pathol. 1999; 52:189-96.
33. Goh KL, Shore AC, Quinn M. *Impaired microvascular vasodilatory function in 3-month-old infants of low birth weight.* Diabetes Care. 2001; 24:1102-7.
34. Gurzu S, Ciortea D, Munteanu T. *Mesenchymal-to-endothelial transition in Kaposi sarcoma: a histogenetic hypothesis based on a case series and literature review.* PLoS One. 2013; 8:e71530.
35. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS. *Vascular endothelial growth factor and angiogenesis.* Pharmacol Rev. 2004; 56:549-80.
36. Hristov M, Erl W, Linder S, Weber PC. I inni. *Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro.* Blood. 2004; 104:2761-6.
37. Hristov M, Weber C. *Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance.* J Cell Mol Med. 2004; 8:498-508.

38. Jankowska P, Malinska A, Nowicki M i inni. *Evaluation of cardiac muscle microvessel density in children diagnosed with cyanotic heart defects*. *Folia Histochem Cytobiol*. 2013; 51:278-85.
39. Jones AE, Puskarich MA. *Sepsis-induced tissue hypoperfusion*. *Crit.Care Clin*. 2009; 25:769-79.
40. Keiko OO, Hiroyuki H, Hatsue IU. *CD44 expression in plexiform lesions of idiopathic pulmonary arterial hypertension*. *Pathology International*. 2012; 219-25.
41. Książek J. *Wskazania do leczenia wad wrodzonych serca ze zwiększonym przepływem płucnym: Kardiochirurgia – interwencja*. 2005; 23 supl:13-15 .
42. Konkle BA. *Von Willebrand factor and aging*. *Semin Thromb Hemost*. 2014; 40:640-4.
43. Konturek S. *Oddychanie, czynności nerek, równowaga kwasowo-zasadowa, płyny ustrojowe w Fizjologia człowieka*. Kraków, 2001; 3:146
44. Kopeć- Szlęzak J. *Znaczenie funkcjonalne molekuł CD9 Cluster of Differentiation) komórek układu białokrwinkowego*. *Onkol Pol*. 2006; 9:81-6.
45. Kuraitis D, Hou C, Zhang Y i inni. *Ex vivo generation of a highly potent population of circulating angiogenic cells using a collagen matrix*. *J Mol Cell Cardiol*. 2011; 51:187-97.
46. Kuzu I, Bicknell R, Harris AL. *Heterogeneity of vascular endothelial cells with relevance to diagnosis of vascular tumours*. *J Clin.Pathol*. 1992; 45:143-8.
47. Kusa J, Bermudez - Canete R, Herraiz I. *The prognostic value of balloon occlusion in candidates for the various types of cavo-pulmonary anastomosis*. *Cardiol Young* 2003; 13:323-7.
48. Kusa J, Bermudes – Canete R, Matiz S i inni. *Acceso venoso percutaneo braquial: Su utilidad en el caterismo diagnostico e intervencionista en cardiopatias complejas*. *Arch Cardiol Mex* 2004; 74:271-5.
49. Kwiatkowska J, Wierzba J, Aleszewicz-Baranowska J. *Genetic background of congenital conotruncal heart defects-a study of 45 families*. 2007; 65: 32-7.
50. Kwon YH, Jung SY, Kim JW i inni. *Phloroglucinol inhibits the bioactivities of endothelial progenitor cells and suppresses tumor angiogenesis in LLC-tumor-bearing mice*. *PLoS One*. 2012; 7:e33618.

51. Majewski S. *Układ krążenia w: Histologia* (red. Ostrowski K). PZWL, Warszawa, 1995; 567-84
52. Malec E. *Kardiochirurgia wad wrodzonych. Chirurgia wrodzonych wad serca u noworodków – terażniejszość i przyszłość*. *Kardiochir Torakochir Pol* 2006; 3: 282–3.
53. Maltby S, Wohlfarth C, Gold M. *CD34 is required for infiltration of Eosinophils into the Colon and Pathology Associated with DSS-Induced Ulcerative Colitis*. *Am J Pathol*. 2010; 177:1244-54.
54. Muller WA. *The use of anti-PEcam reagents in the control of inflammation*. *Agents Actions Suppl*. 1995; 46:147-57.
55. Muller WA, Weigl SA, Deng X. *PEKAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes*. *J Exp Med*. 1993; 178:449-60.
56. Mulvany MJ, Baumbach GL, Aalkjaer C. *Vascular remodeling. Hypertension*. 1996; 28:505-6.
57. Nadar SK, Al Yemeni E, Blann Ad. *Thrombomodulin, von Willebrand factor and E-selectin as plasma markers of endothelial damage/dysfunction and activation in pregnancy induced hypertension*. *Thromb Res*. 2004; 113:123-8.
58. Newman PJ, Hillery CA, Albrecht R. *Activation-dependent changes in human platelet PECAM-1: phosphorylation, cytoskeletal, association, and surface membrane redistribution*. *J Cell Biol*. 1992; 119: 953-964
59. Newman PJ. *The biology of PECAM-1*. *J Clin Invest*. 1997; 99:3-8.
60. Newman PJ, Newman DK. *Signal transduction pathways mediated by PEKAM-1: new roles for an old molecule in platelet and vascular cell biology*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 953-64.
61. Nico B, Benagiano V, Mangieri D i inni. *Evaluation of microvascular density in tumors: pro and contra*. *Histol Histopathol*. 2008; 23:601-7.
62. Nowicki M, Ostalska-Nowicka D, Derwich K. *Vascular endothelial growth factor(VEGF)-C – a potent risk factor in children diagnosed with stadium 4 neuroblastoma*. *Folia Histochem. Cytobiol*. 2008; 46:493-99.
63. Owoc-Lempach J, Chybicka J. *Znaczenie angiogenezy w nowotworach występujących w populacji dziecięcej*. *Onkol. Pol*. 2006; T9,3:87-92.
64. Paduch R. *Przerzut nowotworowy-znaczenie agregacji komórek nowotworowych z płytkami krwi*. *Onkol. Pol*. 2005; 4:229-38.

65. Pichuantes S, Vera S, Bourdeau A. *Mapping epitopes to distinct regions of the extracellular domain of endoglin using bacterially expressed recombinant fragments*. Tissue Antigens. 1997; 50:265-76.
66. Quackenbush EJ, Letarte M. *Identification of several cell surface proteins of non-T, non-B acute lymphoblastic leukemia by using monoclonal antibodies*. J Immunol. 1985; 134:1276-85.
67. Rakusan K, Flanagan MF, Geva T i inni. *Morphometry of human coronary capillaries during normal growth and the effect of age in left ventricular pressure-overload hypertrophy*. 1992; 86:38-46.
68. Radomski MW. *Nitric oxide: biological mediator, modulator and effector*. Ann Med. 1995; 27:321-9.
69. Raica M, Cimpean AM, Ribatti D. *Angiogenesis in pre-malignant conditions*. Eur J Cancer. 2009; 45:1924-34.
70. Raica M, Cimpean AM, Nico B i inni. *A comparative study of the spatial distribution of mast cells and microvessels in the foetal, adult human thymus and thymoma*. Int J Exp Pathol. 2010; 91:17-23.
71. Ratajska A. *Embriogeneza naczyń wieńcowych w: Wykłady o sercu i kardiologii wad wrodzonych* (red. Karolczak A). Czelej, Lublin, 2008; 19-29.
72. Ratajska A, Kołodzińska A, Ciszek B. *Współzależności między wadami wrodzonymi serca a jego rozwojem w świetle współczesnych badań naukowych*. Kardiologia Polska, 2010; 68:418-27.
73. Rossochacka-Rostalska B, Gisterek I, Suder E. *Wartość prognostyczna oznaczania gęstości unaczynienia guza w raku jajnika*. Wiad.Lek. 2007; 60: 129-37.
74. Roos-Hesselink JW, Meijboom FJ, Spitaels SE i inni. *Excellent survival and low incidence of arrhythmias, stroke and heart failure long-term after surgical ASD closure at young age. A prospective follow-up study of 21-33 years*. Eur Heart J. 2003; 24:190-7.
75. Rosas M, Attie F. *Atrial septal defect in adults*. Timely Top Med Cardiovasc Dis. 200; 11: E34.
76. Rutz T, de Marchi SF, Schwerzmann M i inni. *Right ventricular absolute myocardial blood flow in complex congenital heart disease*. Heart. 2010; 96:1056-62.

77. Sadler JE. *Biochemistry and genetics of von Willebrand factor*. Annu Rev Biochem. 1998; 67:395-424.
78. Sakai T, Hosoyamasa Y. Are the precapillary sphincters and metarterioles universal components of the microcirculation? An historical review. J. Physiol Sci. 2013; 63:319-31.
79. Sackstein R. *The biology of CD44 and HCELL in hematopoiesis: the 'step 2-bypass pathway' and other emerging perspectives*. Curr Opin Hematol. 2011; 18:239-48.
80. Santoro G, Ballerini L, Białkowski J. i inni. *Stent implantation for post-Mustard systemic venous obstruction*. Eur. J. Cardiothorac Surg 1998; 14:332-4
81. Sheibani N, Frazer WA. *Down-regulation of Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 results in thrombospondin-1 expression and concerted regulation of endothelial cell phenotype*. Moll Biol Cell. 1998; 9:701-13.
82. Seal JB, Gewertz BL. *Vascular dysfunction in ischemia-reperfusion injury*. Ann Vasc Surg. 2005; 19:572-84.
83. Sillanpää S, Anttila MA, Voutilainen K. *CD44 expression indicates favorable prognosis in epithelial ovarian cancer*. Clin Cancer Res. 2003; 9:5318-24.
84. Simmons DL, Satterthwaite AB, Tenen DG. *Molecular cloning of a cDNA encoding CD34, a sialomucin of human hematopoietic stem cells*. J Immunol. 1992; 148:267-71.
85. St-Jacques S, Forte M, Lye SJ. *Localization of endoglin, a transforming growth factor-beta binding protein, and of CD44 and integrins in placenta during the first trimester of pregnancy*. Biol Reprod. 1994; 51:405-13.
86. Strelau J, Böttner M, Lingor P. *GDF-15/MIC-1 a novel member of the TGF-beta superfamily*. J Neural Transm Suppl. 2000; 273-6.
87. Sun QH, DeLisser HM, Zukowski MM. *Individually distinct Ig homology domains in PECAM-1 regulate hemophilic binding and modulate receptor affinity*. J Biol Chem. 1996; 271:11090-8.
88. Szczałuba K, Obersztyn E, Mazurczak T. *Zastosowanie nowoczesnych technik cytogenetyki molekularnej w diagnostyce wrodzonych wad*. Perinatologia, Neonatologia, Ginekologia 2010; 3:108-16.
89. Szczeklik W. *Choroby układu oddechowego w: Choroby wewnętrzne*. Medycyna Praktyczna. Kraków. 2005; 468.

90. Szkutnik M, Religa Z, Białkowski J. *Coarctation of the aorta with right aortic arch - a rare case and atypical clinical picture*. Texas Heart Inst J. 1998; 25:212-15.
91. Szkutnik M, Qureshi S, Kusa J I inni. *Use of the Amplatzer Muscular Ventricular Septal Defekt Occluder for Closure of Perimembranous VSDs*. Heart 2007; 93: 355-8.
92. Tada J, Omine M, Suda T. *A common signaling pathway via Syk and Lyn tyrosine kinases generated from capping of the sialomucins CD34 and CD43 in immature hematopoietic cells*. Blood. 1999; 93: 3723-35.
93. Tanaka Y, Albelda SM, Horgan KJ. *CD31 expressed on distinctive T cell subsets is a preferential amplifier of beta 1 integrin-mediated adhesion*. J Exp Med. 1992; 176:245-53.
94. Tang DG, Chen YQ, Newman PJ. *Identification of PECAM-1 in solid tumor cells and its potential involvement in tumor cells adhesion to endothelium*. J Biol Chem 1993; 268:22883-94.
95. Tomanek RJ. *Formation of the coronary vasculature during development*. Angiogenesis. 2005; 8:273-84.
96. Tomczyk M, Paduch R, Wiater A. *The influence of aqueous extracts of selected Potentilla species on normal human colon cells*. Acta Pol Pharm. 2013; 70:523-31.
97. Traczyk WZ. *Fizjologia człowieka*. PZWL, Warszawa, 2005; 363-4.
98. Torsney E, Charlton R, Parums D. *Inducible expression of human endoglin during inflammation and wound healing in vivo*. Inflamm Res. 2002; 51:464-70
99. van Laake LW, van den Driesche S, Post S. *Endoglin has a crucial role in blood cell-mediated vascular repair*. Circulation. 2006; 114:2288-97.
100. Verdegem D, Moens S, Stapor P i inni. *Endothelial cell metabolism: parallels and divergences with cancer cell metabolism*. Cancer Metab. 2014; 2:19.
101. Vischer UM, Ingerslev J, Wollheim CB. *Acute von Willebrand factor secretion from the endothelium in vivo: assessment through plasma propeptide (vWf:AgII) Levels*. Thromb Haemost. 1997; 77:387-93.
102. Villarraga HR, Herrmann J, Nkomo VT. *Cardio-oncology: role of echocardiography*. Prog Cardiovasc Dis. 2014; 57:10-8.

103. Warne CA. *Bicuspid aortic valve and coarctation: two villains part of a diffuse problem.* Heart 2003, 89:965-6.
104. Wojtalik M, Białkowski J, Pawelec M. i inni *Follow up of infants after systemic - pulmonari shunts performed with fresh frozen vein homografts. Postoperative angiocardigraphic assessment.* Journal of Cardiovasc Surg. 1995; 35,1:145-7.
105. Wu Y, Lucia K, Lange M, Kuhlen DJ. *Hypoxia inducible factor-1 is involved in growth factor, glucocorticoid and hypoxia mediated regulation of vascular endothelial growth factor-A in human meningiomas.* Neurooncol. 2014; 119:263-73.
106. Wnuczko K, Szczepański M. *Śródbłonek –charakterystyka i funkcje.* Pol.Merk.Lek.2007; 133:60-5.
107. Wytyczne europejskiego towarzystwa kardiologicznego dotyczące leczenia dorosłych pacjentów z wrodzonymi wadami serca. Kardiologia Polska.2010; 68.
108. Xie Y, Muller WA. *Fluorescence in situ hybridization mapping of the mouse platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM1) to mouse chromosome 6, region F3-G1.* Genomics. 1996; 37:226-8.
109. Zakrzewicz A, Secomb TW, Pries AR. *Angioadaptation: keeping the vascular system in shape.* News Physiol Sci. 2002; 17:197-201.

Załącznik 1. Zgoda Komisji Bioetycznej na prowadzenie badań naukowych część I



UNIwersytet Medyczny Im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym
Im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Collegium Maius
ul. Fredry 10
61-701 Poznań

tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60
fax. (+48 61) 854 61 07
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 456/11

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentystry (Dz. U. 1997, Nr 28, poz. 152); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 480); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 11 marca 2005 r. w sprawie szczegółowych wymagań Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2005, Nr 57, poz. 500); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (Dz. U. z 2004r. Nr 33, poz. 533 ze zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie zgłaszania niespodziewanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 4 listopada 2008r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu uiszczania opłat za rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. Nr 201, poz. 1247), kierując się Zasadami Prawidłowego Prowadzenia Badań Klinicznych – GCP – opracowanymi w oparciu o Deklarację Helsińską.

Komisja, na posiedzeniu w dniu: 12 maja 2011 r.

**rozpatrzyła wniosek, który przedstawiła Pani:
prof. dr hab. n. med. Aldona Siwińska**

**w sprawie prowadzenia badań w
Klinice Kardiologii i Nefrologii Dziecięcej UM w Poznaniu**

Główny badacz: dr hab. n. med. Michał Nowicki
**Członkowie zespołu
badawczego: dr hab. n. med. Danuta Ostalska-Nowicka**
prof. dr hab. n. med. Michał Wojtalik
prof. dr hab. n. med. Elżbieta Kaczmarek
dr n. przyr. Marcin Ruciński

Temat badań: "Badanie molekularnego podłoża wrodzonych wad serca u dzieci w aspekcie zmian adaptacyjnych mięśnia sercowego oraz wczesnych i odległych wyników leczenia".

Uchwała Komisji Bioetycznej nr 641/08 z dnia 12.06.2008r.
Komisja wyraziła zgodę na rozszerzenie składu zespołu badawczego o Panią lek. med. Paulinę Jankowską.

Przewodniczący Komisji

[Podpis]
Prof. zw. dr hab. med. Zygmunt Przybylski

Załącznik 2. Zgoda Komisji Bioetycznej na prowadzenie badań naukowych część II

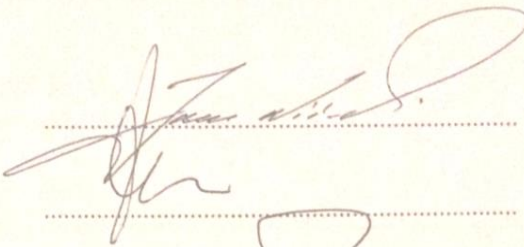

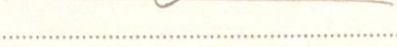
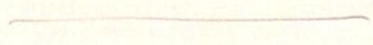
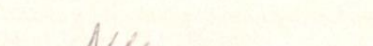
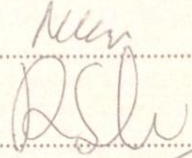
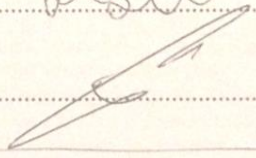
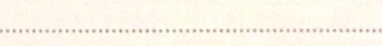
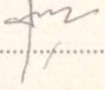
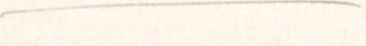
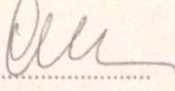
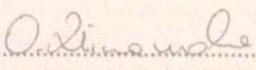
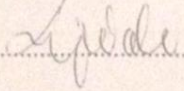
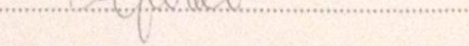
SKŁAD OSOBOWY KOMISJI BIOETYCZNEJ
 12.05.2011r.
 z dnia

Lp.	Imię i Nazwisko	Specjalność	Miejsce Pracy
1.	Przewodniczący Komisji prof. dr hab. Zygmunt Przybylski	medycyna sądowa	Katedra Medycyny Sądowej UM ul. Święcickiego 6, Poznań
2.	Z-ca Przewodniczącego Komisji prof. dr hab. Janusz Wiśniewski	filozof	Wydział Nauk Politycznych i Dziennikarstwa UAM, ul. Umultowska 89A, Poznań
3.	prof. dr hab. Roman Szule	anestezjologia i reanimacja, otolaryngologia	I Klinika Anestezjologii i Intensywnej Terapii UM, ul. Długa 1/2, Poznań
4.	prof. dr hab. Janusz Szymaś	anatomia patologiczna	Katedra Patomorfologii Klinicznej UM ul. Przybyszewskiego 49, Poznań
5.	prof. dr hab. Wojciech Służewski	pediatria, neurologia dziecięca, choroby zakaźne	Klinika Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej UM ul. Szpitalna 27/33, Poznań
6.	prof. dr hab. Henryk Wysocki	choroby wewnętrzne, kardiologia	Klinika Intensywnej Terapii Kardiologicznej i Chorób Wewnętrznych UM ul. Przybyszewskiego 49, Poznań
7.	dr hab. Maciej Krawczyński prof. UM	genetyka kliniczna, okulistyka	Katedra i Zakład Genetyki Medycznej UM ul. Grunwaldzka 55, Poznań
8.	dr hab. Robert Spaczyński prof. UM	ginekologia i położnictwo	Klinika Niepłodności i Endokrynologii Rozrodu UM, ul. Polna 33, 60-535 Poznań
9.	dr med. Piotr Tomczak	onkologia kliniczna, radioterapia	Klinika Onkologii UM, ul. Łąkowa 1/2, Poznań
10.	prof. dr hab. Paweł Chęciński	chirurgia ogólna, naczyniowa i angiologia	Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyniowej oraz Angiologii UM, ZOZ MSWiA ul. Dojazd 34, Poznań
11.	prof. dr hab. Janusz Paluszak	fizjologia kliniczna	Katedra i Zakład Fizjologii UM, ul. Święcickiego 6
12.	ks. prof. dr hab. Jerzy Troska	teologia, etyka	Wydział Teologiczny UAM, ul. Wieżowa 2/4, Poznań
13.	dr hab. Jerzy W. Ochmański prof. UAM	prawnik	Wydział Prawa UAM, ul. Św. Marcin 90, Poznań
14.	dr farm. Olimpia Klimaszewska	farmaceuta	Apteka „Kalifarm”
15.	Barbara Lipiak	pielęgniarka	ZOZ Grunwald

Załącznik 3. Zgoda Komisji Bioetycznej na prowadzenie badań naukowych część III

456/M

Podpisy członków Komisji Bioetycznej - Dotyczy Uchwały nr z dnia 12.05.2011r.

prof. dr hab. JANUSZ WIŚNIEWSKI	
prof. dr hab. ROMAN SZULC	
prof. dr hab. JANUSZ SZYMAŚ	
prof. dr hab. WOJCIECH SŁUŻEWSKI	
prof. dr hab. HENRYK WYSOCKI	
dr hab. MACIEJ KRAWCZYŃSKI prof. UM	
dr hab. ROBERT SPACZYŃSKI prof. UM	
dr med. PIOTR TOMCZAK	
prof. dr hab. PAWEŁ CHEĆCIŃSKI	
prof. dr hab. JANUSZ PALUSZAK	
ks. prof. dr hab. JERZY TROSKA	
dr hab. JERZY W. OCHMAŃSKI prof. UAM	
dr farm. OLIMPIA KLIMASZEWSKA	
BARBARA LIPIAK	

Załącznik 4. Wzór świadomej zgody na udział w badaniach część I

„Badanie molekularnego podłoża wrodzonych wad serca u dzieci w aspekcie zmian adaptacyjnych mięśnia sercowego oraz wczesnych i odległych wyników leczenia.” – informacja dla Rodziców/Opiekunów dziecka.

Szanowni Państwo!

U Państwa dziecka rozpoznano wrodzoną wadę serca, która objawia się zaburzeniami w prawidłowym krążeniu krwi. Dotychczasowe leczenie kliniczne nie przyniosło spodziewanych rezultatów i zgodnie ze wskazaniami Międzynarodowej Federacji ds. Leczenia Wrodzonych Wad Serca u Dzieci, u Państwa dziecka zostanie wykonany zabieg korekcji wady.

W trakcie rekonstrukcji obszaru dotkniętego wadą w sposób naturalny należy usunąć fragmenty mięśnia sercowego. Materiał uzyskany w trakcie tego zabiegu nie jest standardowo badany. W odczuciu lekarzy pracujących w tutejszej Klinice, sytuacja ta powinna ulec zmianie.

Celem zatem badania, którego tytuł znajduje się w nagłówku niniejszego dokumentu, a do którego chcielibyśmy włączyć również Państwa dziecko jest maksymalne rozszerzenie badań dodatkowych, które mogą zostać wykonane z już pobranego materiału w czasie korekcji wady serca. Należy nadmienić, że do oznaczeń tych nie będzie dodatkowo pobierany wycinek serca od Państwa dziecka. W trakcie rutynowo wykonywanych kontrolnych badań biochemicznych, zostanie zabezpieczone 2ml krwi do badań genetycznych molekularnego podłoża wady serca.

Efektom przeprowadzenia ww. badania może być bardziej precyzyjne rozpoznanie choroby, a co się z tym wiąże bardziej dokładne określenie rokowania, czy wprowadzenie skuteczniejszej terapii, a więc działania zmierzające do zwiększenia prawdopodobieństwa wyleczenia Państwa dziecka.

Badania te zarazem nie są obciążone żadnym dodatkowym ryzykiem, wykraczającym ponad to, które jest związane z samą korekcją wady serca.

Dotychczas nie przeprowadzano takich badań w Polsce.

Załącznik 5. Wzór świadomej zgody na udział w badaniach część II

Poznań, dnia

**Formularz Świadomej Zgody Rodziców/Opiekunów Dziecka
leczzonego w Klinice Kardiologii i Nefrologii Dziecięcej
oraz w Klinice Kardiochirurgii Dziecięcej UM w Poznaniu
na wykonanie badań molekularnego podłoża wrodzonej wady serca**

Po zapoznaniu się z treścią dokumentu informującego o rozpoznaniu choroby u
mojego dziecka ur.
w, wyrażam zgodę na jego udział w badaniach klinicznych
oraz przetwarzanie danych związanych z tym udziałem przez osoby przeprowadzające ww.
badania kliniczne. Zostałam/em poinformowana/y, iż w każdej chwili, ale nie później niż jeden
dzień przed planowanym zabiegiem kardiochirurgicznym mogę wycofać zgodę na udział mojego
dziecka w badaniu klinicznym.

Otrzymałam/em również jasne i pełne informacje dotyczące zabiegu oraz kopię
podpisywanego formularza.

Podpis Rodzica/Opiekuna dziecka

Załącznik 6. Poszczególne etapy badania ekspresji białek z wykorzystaniem metody immunohistochemicznej

1. Odparafinowanie w ksylenach (3×10 minut) a następnie nawadnianie w szeregu alkoholi o malejącym stężeniu: 99.8%, 96%, 85%, 70% (po 3 minuty) i wodzie destylowanej (5 minut).
2. Odzyskiwanie epitopu w buforze cytrynianowym, w podwyższonej temperaturze przez 20 minut (Target Retrieval Solution, nr kat. S1700,Dako).
3. Płukanie 3 x w PBS – po 3 min.
4. Hamowanie aktywności endogennej peroksydazy za pomocą 5% roztworu H₂O₂ - 5 min.
5. Płukanie 3 x w PBS – po 3 min.
6. Inkubacja z normalną surowicą od takiego samego gatunku jak przeciwciało biotynylowane (tzw. drugie przeciwciało) przez 5 minut
7. Inkubacja ze specyficznymi przeciwciałami – 18 h w 4°C, a następnie 1 h w temperaturze pokojowej.
8. Płukanie 3 x w PBS – po 3 min.
9. Inkubacja przez 15 minut z przeciwciałem biotynylowanym (tzw. drugie przeciwciało)
10. Płukanie 3 x w PBS – po 3 min.
11. Inkubacja z kompleksem streptawidyna-biotyna (15 minut).
12. Płukanie 3 x w PBS – po 3 min.
13. Inkubacja z biotynylowaną tyraminą (15 minut)
14. Płukanie 3 x w PBS – po 3 min.
15. Inkubacja z kompleksem streptawidyna-peroksydaza (15 minut).
16. Płukanie 3 x w PBS – po 3 min.
17. Inkubacja z 3,3'-diaminobenzydyną (DAB), stanowiącą substrat dla peroksydazy – 5 min.
18. Płukanie w wodzie bieżącej – 10 min.
19. Barwienie hematoksyliną – 2 min.
20. Płukanie w wodzie bieżącej – 10 min.
21. Odwodnienie w szeregu alkoholi o wzrastającym stężeniu (70%, 80%, 85%, 90%, 2x100%) oraz ksylene (2x).
22. Zamknięcie preparatów za pomocą histofluidu (Marienfeld) i szkiełek nakrywkowych.

Załącznik 7. Opis modyfikacji wykonywania reakcji immunohistochemicznej w przypadku oznaczania antygenu CD105 (endogлина)

1. Płukanie preparatów biopsji mięśnia sercowego w PBS – 3x1 min.
2. Inkubacja z 1% albuminą bydlęcą – 45 min. w temperaturze pokojowej.
3. Inkubacja ze specyficznym przeciwciałem anti-CD105 w rozcieńczeniu 1:10 (Santa Cruz) - 18 h w 4°C.
4. Płukanie w PBS – 5x1 min.
5. Inkubacja z przeciwciałami II rzędu sprzężonymi z barwnikiem fluorescencyjnym kozim anti-mysim Alexa Flour 555 w stężeniu 1:200 (MoBiTec) – 1h w 37°C.
6. Płukanie w PBS – 3x1 min.
7. Zamknięcie preparatów w medium (Dako Cytomation Fluorescent Mounting Medium, Dako).