



UNIwersytet
PRZYRODNICZY
WE WROCLAWIU



**Ocena parametrów związanych z gospodarką żelazem w nerce, wątrobie i śledzionie świń,
które przeżyły ostry incydent niedokrwienia mięśnia sercowego**

**Evaluation of parameters related to iron metabolism in the kidney, liver and spleen of pigs
that underwent an acute incident of myocardial ischemia**

Rozprawa doktorska

lek. wet. Kacper Czesław Nowak
Katedra Chorób Wewnętrznych z Kliniką Koni, Psów i Kotów
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Promotorki:

Prof. dr hab. Urszula Paśławska
Katedra Chorób Wewnętrznych z Kliniką Koni, Psów i Kotów
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Prof. dr hab. Marzenna Podhorska Okołów
Zakład Badań Ultrastrukturalnych
Wydział Lekarski
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Wrocław 2023

ProHum - Interdyscyplinarna Szkoła Doktorska- planowanie badań eksperymentalnych,
tworzenie i optymalizacja zwierzęcych modeli doświadczalnych z umiejętnościami
transferowania ich do badań klinicznych w medycynie człowieka

Umowa nr POWR.03.02.00-00-I008/17

Podziękowania za wsparcie i bezpośredni wkład w tworzenie niniejszej pracy:

Promotorce, Profesor Urszuli Paślawskiej oraz doktorowi Robertowi Paślawskiemu

Promotorce, Profesor Marzennie Podhorskiej-Okołów

Profesor Lilianie Kiczak

Doktor Aleksandrze Piotrowskiej

Profesorowi Jackowi Bani, doktor Aleksandrze Tabiś oraz wszystkim pracownikom

Zakładu Higieny Surowców Zwierzęcych

Doktor Patrycji Piątek-Matuszak, doktorowi Adrianowi Janiszewskiemu,
doktorowi Marcinowi Michałkowi oraz lek. wet. Michałowi Płóciennikowi

Doktor Alicji Tomaszek

Rodzinie

Przyjaciołom

Spis treści

Wykaz skrótów	6
Streszczenie pracy w języku polskim	8
Summary	9
1. Wstęp	11
1.1 Niewydolność serca – definicja, klasyfikacja i znaczenie dla społeczeństwa	11
1.2 Wpływ niewydolności serca na inne narządy i układy	12
1.2.1 Wpływ niewydolności serca na nerki	13
1.2.2 Wpływ niewydolności serca na wątrobę	14
1.2.3 Wpływ niewydolności serca na śledzionę	14
1.3 Zwierzęce modele zawału mięśnia sercowego	15
1.4 Testy oceniające funkcję serca w MI	17
1.4.1. Elektrokardiografia	17
1.4.2 Markery krwi używane w diagnostyce MI	18
1.4.3 Badanie echokardiograficzne	19
1.5 Leczenie MI	23
1.5.1 Implantacja stentu, bypass	23
1.5.2 Leczenie farmakologiczne	24
1.5.3 Leczenie nefarmakologiczne– terapia komórkami macierzystymi	24
1.5.4 Potencjalne zagrożenia związane z terapią komórkami macierzystymi	30
1.6. Żelazo, rola żelaza w organizmie, gospodarka żelazem	32
1.6.1. Transferyna	35
1.6.2. Ferrytyna	36
1.6.3. Hepcydyna	37
1.7 Zaburzenia homeostazy żelaza w niewydolności serca	38
1.7.1. Niedobór żelaza w niewydolności serca	38
1.7.2. Nadmiar żelaza w niewydolności serca	39
1.8 Suplementacja żelaza jako cel terapeutyczny	40
2. Cel pracy	41
3. Materiały i metody	41
3.1. Wybór świni domowej jako zwierzęcia modelowego	41

3.2.	Badanie wstępne.....	42
3.3.	Wybór modelu niewydolności serca i technika wykonania zawału serca (MI).....	42
3.4.	Schemat badania.....	44
3.5.	Western Blotting	45
3.5.1.	Ferrytyna.....	45
3.5.2.	Hepcydyna	46
3.5.3.	Barwienie błękitem pruskim żeli białkowych	47
3.6.	Pomiar TIBC	48
3.7.	Pomiar poziomu żelaza w surowicy krwi i parametry biochemiczne.....	48
3.9.	Barwienie błękitem pruskim preparatów histologicznych.....	48
3.10.	Immunohistochemia	50
3.11.	Statystyczna analiza danych	51
4.	Wyniki	52
4.1.	Badanie echokardiograficzne	52
4.2.	Badanie elektrokardiograficzne.....	55
4.3.	Badanie angiograficzne	55
4.4.	Badanie pośmiertne	56
4.5.	Troponina I oraz BNP	57
4.6.	Całkowita zdolność wiązania surowicy (TIBC), procent wysycenia transferyny żelazem (TSAT), koncentracja żelaza.....	59
4.7.	Oznaczenia w żelu poliakrylamidowym po rozdziale elektroforetycznym białek:	61
4.7.1.	Żelazo, łańcuch lekki i ciężki ferrytyny – nerka.....	61
4.7.2.	Żelazo, łańcuch lekki i ciężki ferrytyny – wątroba.....	62
4.7.3.	Żelazo, łańcuch lekki i ciężki ferrytyny– śledziona.....	63
4.7.4.	Hepcydyna – wątroba	64
4.8.	Immunohistochemia oraz barwienie błękitem pruskim na żelazo w preparatach histologicznych.....	65
4.8.1.	Żelazo, łańcuch lekki i ciężki ferrytyny – nerka.....	65
4.8.2.	Żelazo, łańcuch lekki i ciężki ferrytyny – wątroba.....	70
4.8.3.	Żelazo, łańcuch lekki i ciężki ferrytyny – śledziona.....	73
5.	Dyskusja	77
5.1.	Ocena modelu zwierzęcego MI.....	77

5.2. Ocena odległych efektów MI na parametry gospodarki żelazowej w krwi: TIBC, Fe ⁺³ i TSAT.....	78
5.3. Żelazo, ferrytyna i hemosyderyna w tkankach.....	79
5.4. Hepcydyna w tkankach	82
5.5. Wnioski	85
Spis rycin	87
Spis tabel.....	89
Piśmiennictwo.....	90

Wykaz skrótów

ACCF – American College of Cardiology

ACS – acute coronary syndrome, ostry zespół wieńcowy

AHA – American Heart Association

AHF – acute heart failure, ostra niewydolność serca

AlAT – aminotransferaza alaninowa

ALDO – aldosteron

ANG II – angiotensyna II

AP – alkaline phosphatase, fosfataza alkaliczna

APR – acute phase response, ostra odpowiedź zapalna

AspAT – aminotransferaza asparaginianowa

ATSC – mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej

AV – przedsionkowo komorowy

BMS – bare metal stent, stent metalowy

CAD – coronary artery disease, choroba wieńcowa

CHF – chronic, congestive heart failure, przewlekła zastoinowa niewydolność serca

DCB – drug coated balloon, balon pokryty substancją aktywną

DES – drug eluting stent, stent uwalniający substancję aktywną

ECHO – badanie echokardiograficzne

ECM – extracellular matrix, macierz zewnątrzkomórkowa

EF (%) – ejection fraction, frakcja wyrzutowa komory lewej

EKG – badanie elektrokardiograficzne

ESC – European Society of Cardiology

FT – ferrytyna

FTH – łańcuch ciężki ferrytyny

FTL – łańcuch lekki ferrytyny

GAPDH – dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego

HfpEF – heart failure with preserved ejection fraction, niewydolność serca z zachowaną frakcją wyrzutową

HfrEF – heart failure with reduced ejection fraction, niewydolność serca ze zmniejszoną frakcją wyrzutową

ID – iron deficiency, niedobór żelaza

IL-1 – interleukina 1

IL-2 – interleukina 2

IL-6 – interleukina 6

ISR – in-stent restenosis, restenoza wewnątrz stentu

LAD – left anterior descending artery, gałąź międzykomorowa przednia lewej tętnicy wieńcowej

MI – myocardial infarction, zawał serca

MSC – mezenchymalne komórki macierzyste

PCI – percutaneous coronary intervention, przezskórna interwencja wieńcowa

POBA – plain old balloon angioplasty, angioplastyka balonowa

RAAs – Renin-Angiotensin-Aldosterone system, układu renina-angiotensyna-aldosteron

TIBC – Total iron binding capacity, całkowita zdolność wiązania żelaza

TNF α – tumor necrosis factor α , czynnik martwicy nowotworów alfa

TSAT – Transferrine saturation, nasycenie transferyny (%)

VF – ventricular fibrillation, migotanie komór

WHF – World Heart Federation

Streszczenie pracy w języku polskim

Niewydolność serca jest jednym z najpowszechniejszych problemów zdrowotnych z jakimi zmagają się ludzie. Jedną z najczęstszych jej form jest choroba wieńcowa, która jest główną przyczyną zawału serca (MI), powodujących ostrą niewydolność serca. W ostatnich latach badaniom poddano związki pomiędzy przewlekłą niewydolnością serca a zaburzeniami gospodarki żelazowej. Przedmiotem niniejszej pracy było zbadanie czy MI może wywołać długotrwałe zaburzenia homeostazy żelaza. Badano systemowy zasób żelaza oraz stężenie żelaza i kluczowych białek zaangażowanych w gospodarkę żelazową w nerce, wątrobie oraz śledzionie. Dodatkowy aspekt pracy stanowiła ocena czy intramiokardialna terapia MI komórkami macierzystymi istotnie wpływa na homeostazę żelaza.

Badania przeprowadzono na modelu świni domowej. Zwierzęta podzielono na cztery grupy: kontrolną (KON), grupę u której wywołano MI i podano intramiokardialnie płyn fizjologiczny, oraz dwie grupy świń u których intramiokardialnie podano dwie testowane zawiesiny komórek macierzystych (MI+L1 i MI+L2). Dwie ostatnie grupy otrzymywały dodatkowo takrolimus. Wszystkie grupy otrzymywały terapię przeciwplatekarną polegającą na podaniu kwasu acetylosalicylowego (aspiryny). MI wywołano poprzez zamknięcie przepływu w gałęzi zstępującej lewej tętnicy wieńcowej balonem angioplastycznym. Komórki macierzyste podawano przy użyciu systemu NOGA. Jest to system mapowania elektrofizjologicznego serca, który tworzy trójwymiarową wizualizację elektromechaniczną komory. Tak utworzona mapa umożliwiała zlokalizowanie miejsca zawałowego oraz nawigację w celu najdokładniejszego podania preparatu komórek. Świnie badano trzykrotnie, przed wykonaniem procedury, w 28 dniu i po 3 miesiącach od MI. Badanie kontrolne obejmowało badanie kliniczne, elektrokardiograficzne, echokardiograficzne, badania morfologiczne i biochemiczne krwi. Po wykonaniu trzeciego badania kontrolnego świnię poddano eutanazji, wykonano badanie sekcyjne i pobrano próbki narządów do badań histopatologicznych (barwienie preparatów histologicznych z narządów błękitem pruskim w celu wykrywania i lokalizowania żelaza w tkankach) i proteomicznych. Badania przeprowadzono na ekstraktach homogenatów tkankowych rozdzielonych elektroforetycznie w żelach poliakrylamidowych. Metodą western blotting oznaczano łańcuch lekki i ciężki ferrytyny w nerce, wątrobie oraz śledzionie oraz białko hepacydynę w wątrobie. Oznaczono też wybrane parametry gospodarki żelazowej w surowicy

krwi. Wykonano reakcje immunohistochemiczne przeciwko łańcuchowi lekkiemu i ciężkiemu ferrytyny w preparatach histologicznych.

Według uzyskanych wyników u zwierząt z grup MI zaobserwowano wzrost zasobów żelaza w wątrobie i śledzionie. Odnotowano wyższe poziomy łańcucha lekkiego ferrytyny w wątrobie, oraz łańcucha ciężkiego w wątrobie oraz korze nerki. Potwierdzono także, że MI nie towarzyszyły długotrwałe zaburzenia w systemowym statusie żelaza. W grupach leczonych komórkami macierzystymi stwierdzono istotnie niższy poziom hepcydyny w tkance wątroby.

Summary

Heart failure is one of the most common health problems facing humanity. One of the most common forms of it is coronary artery disease, which is the main cause of heart attack (MI) causing acute heart failure. In recent years, the links between chronic heart failure and iron disorders have been studied. The subject of this study was to investigate whether MI can cause long-term disorders of iron homeostasis. The systemic iron supply and the amount of iron and key proteins involved in iron metabolism in the kidney, liver, and spleen were studied. An additional aspect of the work was the assessment of whether intramyocardial MI stem cell therapy significantly affects iron homeostasis.

The research was conducted on a domestic pig model. The animals were divided into four groups: control group (KON), a group in which MI was induced and 0,9% NaCl normal saline was injected intramyocardially and two groups of pigs in which two tested stem cell suspensions (MI+L1 and MI+L2) were intramyocardially administered. The last two groups received additional taklimus. All groups received antiplatelet treatment – aspirin. MI was induced by closing the flow in the left anterior descending coronary artery with an angioplastic balloon. Stem cells were administered using the NOGA system. The pigs were examined three times, prior to the procedure, on day 28 and 3 months after MI. The follow-up examination included clinical, electrocardiography, echocardiography, morphological and biochemical blood tests. After the third check-up, the pigs were euthanized, a post-mortem examination was performed and organ samples were taken for histopathological examination (staining of histological slides from organs with Prussian blue to detect and localize iron in tissues) and

proteomic examinations. The research was conducted on extracts of tissue homogenates electrophoretically separated in polyacrylamide gels. Western blotting was used to determine the light and heavy ferritin chain in the kidney, liver and spleen and hepcidin protein in the liver. Selected parameters of iron management in blood serum were also determined. Immunohistochemical reactions for the ferritin light and heavy chain detection were performed in histological slides.

According to the results obtained, an increase in iron resources in the liver and spleen was observed in animals from the MI groups. Higher levels of the ferritin light chain in the liver and the heavy chain in the liver and renal cortex were reported. It was also confirmed that MI was not accompanied by long-term disturbances in the systemic status of iron. In the stem cell groups, significantly lower levels of hepcidin in liver tissue were found.

1. Wstęp

1.1 Niewydolność serca – definicja, klasyfikacja i znaczenie dla społeczeństwa

Niewydolność serca jest istotnym i rosnącym problemem zdrowia publicznego na całym świecie. Jest przyczyną niemal 18 milionów zgonów każdego roku [Hiraiwa 2021]. Szacuje się, że w samych Stanach Zjednoczonych z niewydolnością serca żyje ponad 6 milionów osób, a liczba ta będzie rosła wraz ze starzeniem się społeczeństwa [Mozzafarian 2016]. Liczba osób żyjących ze zdiagnozowaną niewydolnością serca wzrasta również wraz z poprawą jakości opieki zdrowotnej w wielu krajach i wykorzystaniem coraz doskonalszych narzędzi diagnostycznych. Mimo to część pacjentów w podeszłym wieku pozostaje nie właściwie zdiagnozowana poprzez maskowanie objawów niewydolności serca przez inne problemy zdrowotne, albo nawet mechanizmy kompensacyjne [Skrzypek 2018]. Niewydolność serca jest złożonym i wieloaspektowym schorzeniem, na które składa się szereg czynników fizjologicznych, genetycznych i środowiskowych. Pomimo postępów w diagnozowaniu i leczeniu, niewydolność serca pozostaje główną przyczyną śmiertelności, z 5-letnią śmiertelnością sięgającą 50%, dlatego problem ten wymaga dalszych badań [Gheorghide 2010].

Niewydolność serca można klasyfikować na różne sposoby. Jeden z nich to podział na dwa rodzaje: dysfunkcję skurczową (niewydolność serca z zachowaną frakcją wyrzutową, (ang. heart failure with preserved ejection fraction, HFpEF) i dysfunkcję rozkurczową (niewydolność serca ze zmniejszoną frakcją wyrzutową (ang. heart failure with reduced ejection fraction, HFrEF). Innym sposobem kwalifikacji niewydolności serca jest podział ze względu na okoliczności jej wystąpienia, przebieg, dynamikę i czas trwania objawów. Według tego podziału rozróżniamy: ostrą niewydolność serca (ang. acute heart failure, AHF) i przewlekłą zastoinową niewydolność serca (ang. chronic, congestive heart failure, CHF).

Choroba wieńcowa (ang. coronary artery disease, CAD) powodująca zawał serca jest jedną z najczęstszych przyczyn niewydolności serca i najczęstszą przyczyną AHF [Girerd 2022, Severino 2020]. AHF jest medycznym stanem nagłym związanym z krytycznym zwężeniem lub całkowitą niedrożnością jednej lub kilku tętnic wieńcowych. w wyniku czego rozwija się ostre niedokrwienie mięśnia sercowego tzw. ostry zespół wieńcowy (ang. acute coronary syndrome, ACS). Pojęcie ACS obejmuje niestabilną dławicę piersiową i zawał serca (ang. myocardial

infarction, MI). CAD jest jedną z najczęstszych przyczyn zgonów na świecie [Harjola 2017]. W 2018 roku organizacje kardiologiczne (ESC, ACCF, AHA, WHF) na podstawie obiektywnych markerów martwicy mięśnia sercowego uzgodniły uniwersalną definicję zawału mięśnia sercowego (MI), w której istotą diagnozy było wystąpienie ostrego uszkodzenia mięśnia sercowego i wykazanie jako jego podstawy niedokrwienia [Budaj 2019]. Do istotnej dysfunkcji skurczowej lewej komory po zawale dochodzi u około 39% chorych, przy czym objawy niewydolności serca pojawiają się aż u 75% chorych. Nawet u osób z bezobjawowym uszkodzeniem lewej komory śmiertelność jest porównywalna do chorych objawowych. Te dane obrazują jak istotne znaczenie kliniczne, społeczne i ekonomiczne ma zawał serca.

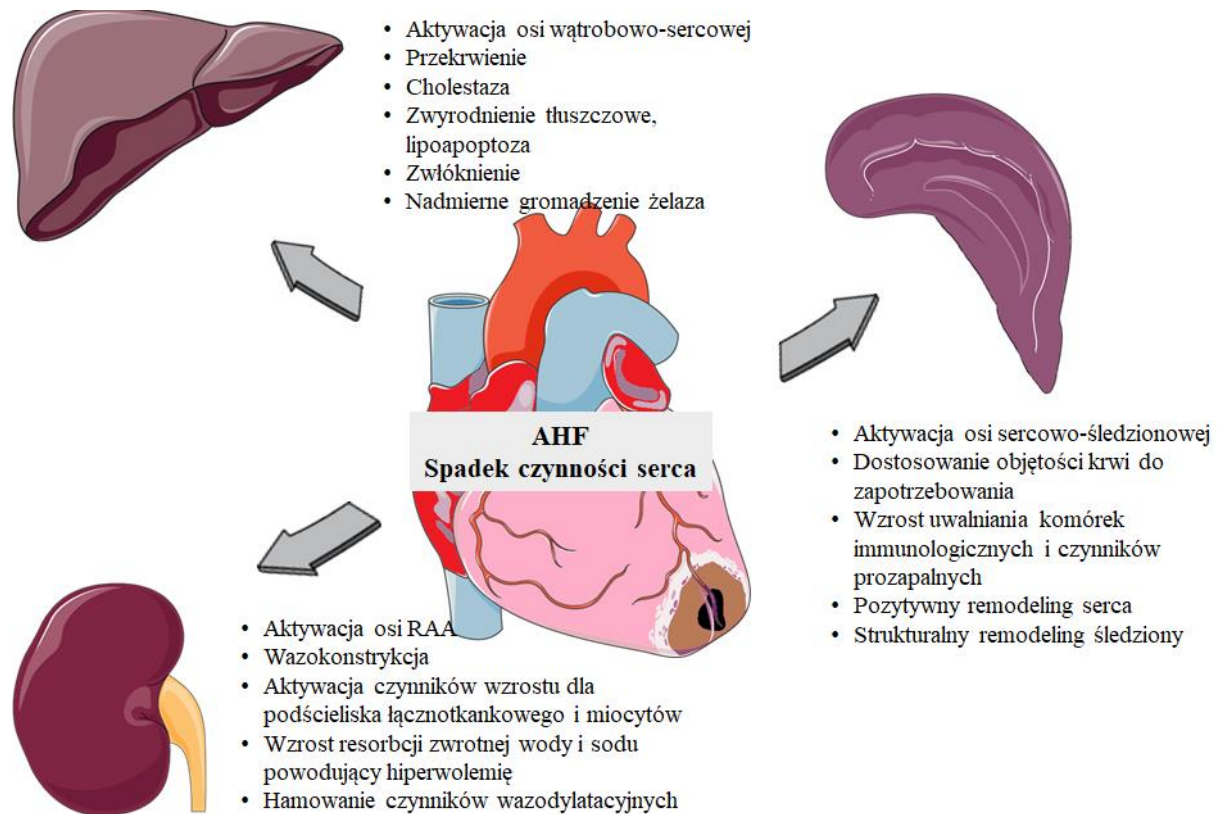
MI jako przyczyna ACS został wykorzystany w niniejszej pracy. Poza tym AHF mogą powodować i inne przyczyny, zarówno sercowe, jak i pozasercowe. Należą do nich choroby zastawkowe, kardiomiopatie, arytmie, zapalenie mięśnia sercowego, nadciśnienie tętnicze, zatorowość płucna, a także intoksykacje [Dickstein 2008].

Klinicznie AHF objawia się m.in. dusznością, bólem w klatce piersiowej, utratą sił i obrzękami, a nawet utratą przytomności. AHF może wystąpić w wyniku nowego epizodu niewydolności serca, lub jako nagłe zaostrzenie przewlekłej niewydolności serca.

1.2 Wpływ niewydolności serca na inne narządy i układy

Stan upośledzonego krążenia krwi ma szeroki wpływ na cały organizm chorego. Wiele narządów i układów dotykają konsekwencje niewydolności serca w postaci hipotensji i hipoperfuzji. Największe nasilenie zmian patologicznych obserwuje się w płucach, w których zaburzenia krążenia doprowadzają do obrzęku. Obniżenie ciśnienia krwi może zmniejszyć przepływ krwi w centralnym układzie nerwowym. Gorsza perfuzja mózgu może prowadzić do objawów upośledzenia funkcji poznawczych, dezorientacji i trudności z koncentracją, które dołączają się do objawów duszności i odkrztuszania. Niewydolność serca może wiązać się z osłabieniem i zmęczeniem mięśni, zarówno w związku z bezpośredniego osłabienia zaopatrzenia tkanki mięśniowej w krew, jak i pośrednio poprzez obniżenie utlenowania krwi w skutek negatywnego wpływu zastoju w płucach. Spadek przepływu krwi i hipoksja tworzą warunki sprzyjające powstawaniu zakrzepów, szczególnie gdy AHF towarzyszy arytmia, co może prowadzić do incydentów zakrzepowo-zatorowych. Najgroźniejsze konsekwencje

powikłań zakrzepowo-zatorowych dotyczą serca (zawał serca) i mózgu (udar niedokrwienny) [Wendelboe 2016]. Wpływ niewydolności serca na funkcje nerek, wątroby i śledziony przedstawia ryc. 1.



Ryc. 1. Wpływ niewydolności serca na funkcje nerek, wątroby i śledziony

1.2.1 Wpływ niewydolności serca na nerki

Narządem wrażliwym na hipotensję i hipoperfuzję są nerki. Relację pomiędzy sercem a nerkami określa się jako syndrom sercowo-nerkowy. Dysfunkcja nerek często towarzyszy różnym formom niewydolności serca. Jej występowanie wiąże się ze zwiększoną zachorowalnością i śmiertelnością. W patofizjologii największą rolę odgrywa zmniejszona perfuzja [Damman 2015] powodująca uruchomienie mechanizmu kompensacyjnego nazywanego układem renina-angiotensyna-aldosteron (ang. Renin-Angiotensin-Aldosterone system, RAAs), co z kolei skutkuje obkurczeniem naczyń krwionośnych. Zwężenie naczyń

zwiększa opory obwodowe i ciśnienie tętnicze, jednocześnie dochodzi do pobudzenia układu współczulnego oraz zwiększenia wydzielania aldosteronu (ALDO). W przypadku, gdy AHF przechodzi w CHF Angiotensyna II (ANG II) wykazuje działanie zwiększające wytwarzanie czynników wzrostowych powodujących remodeling ścian naczyń krwionośnych (przerost podścieliska łącznotkankowego i miocytów warstwy mięśniowej) i serca (przerost i włóknienie). Jednak najsilniejsze zmiany zwłóknieniowe jako konsekwencja RAAs obserwuje się w nerkach. ANG II i ALDO powodują nasilenie resorpcji zwrotnej wody i sodu, a utratę z moczem jonów potasu i magnezu. To sprzyja rozwojowi arytmii i jest przyczyną obrzęków zastoinowych. Dodatkowo ANG II wzmacnia pragnienie i upośledza mechanizmy kontroli ciśnienia poprzez hamowanie syntezy prostaglandyn naczyniorozszerzających i upośledzenie wrażliwości baroreceptorów [Engeli 2000].

1.2.2 Wpływ niewydolności serca na wątrobę

AHF prowadzi do istotnych zmian w krążeniu wątrobowym. Wzrasta ciśnienie w prawym przedsionku, a co za tym idzie w żyłach wątrobowych, co prowadzi to do obrzęku zastoinowego wątroby. Klinicznie objawia się on powiększeniem i twardością narządu, a w badaniach krwi wzrostem aktywności tzw. enzymów wątrobowych (aminotransferazy alaninowej, ALAT i asparaginianowej AspAT). Upośledzona perfuzja z powodu mniejszego rzutu serca jest przyczyną tzw. hepatopatii zastoinowej, ale może doprowadzić nawet do ostrej martwicy hepatocytów lub do rozwoju kardiogenego niedokrwienego zapalenia wątroby [Alvarez 2011, Henrion 2003]. W hepatopatii zastoinowej dochodzi do utrudnionego odpływu żółci, co skutkuje wzrostem fosfatazy alkalicznej w surowicy krwi, a w hepatocytach gromadzeniem się barwinków żółciowych oraz poszerzeniem okienek w zatokach żylnych, co z kolei skutkuje wyciekaniem płynu bogatego w białko do przestrzeni Dissego i martwicą hepatocytów [Giallourakis 2002]. Zmiany degeneracyjne, a następnie martwicze rozpoczynają się od żyły centralnej i rozszerzają w kierunku obwodu zrazika [Sepesy 2006].

1.2.3 Wpływ niewydolności serca na śledzionę

Wpływ niewydolności serca na śledzionę jest omawiany zdecydowanie rzadziej w porównaniu do wątroby lub nerek. [Hiraiwa 2022]. Strukturalnie śledzionę można podzielić na

dwa główne regiony, utworzone przez miazgą białą i miazgą czerwoną (przeważająca większość tkanki śledziony). W miazdze czerwonej patogeny, pozostałości komórkowe i stare erytrocyty są skutecznie usuwane z krążenia, a żelazo jest przetwarzane przez liczne makrofagi. Biała miazga jest głównym regionem immunologicznym śledziony u gryzoni i ludzi. Składa się głównie z komórek limfoidalnych w wysoce zorganizowanym przedziale, w którym inicjowane są adaptacyjne odpowiedzi immunologiczne [Hirawa 2022, Prabhu 2018, Swirski 2009]. Aktywacja komórek odpornościowych śledziony i zmiany w gospodarce żelazem mają duże znaczenie w przewlekłej odpowiedzi zapalnej, która towarzyszy przebudowie serca (ang. heart remodeling). Interakcje między sercem a śledzioną są złożone i dwukierunkowe, dlatego wprowadzono pojęcie osi sercowo-śledzionowej [Hiraiwa 2022]. Związek pomiędzy sercem a śledzioną został opisany po raz pierwszy przez Rein i wsp., którzy wykazali, że stymulacja elektryczna śledziony powoduje poprawę czynności serca [Rein 1951]. Wykazano, że objętość śledziony jest skorelowana z ciśnieniem w tętnicy płucnej i ciśnieniem zaklinowania w kapilarach płucnych. Ponadto częstość akcji serca i objętość śledziony są niezależnymi wyznacznikami wskaźnika pulsacji, odzwierciedlającego obciążenie wstępne serca u pacjentów z niewydolnością serca [Hiraiwa 2021]. W badaniu tym stwierdzono, że pomiary śledziony mogą pomóc w oszacowaniu stanu objętości systemowej krwi. W innym badaniu wykazano użyteczność oceny związku między wskaźnikiem objętości śledziony a rokowaniem u pacjentów z niewydolnością serca [Hirawa 2022].

1.3 Zwierzęce modele zawału mięśnia sercowego

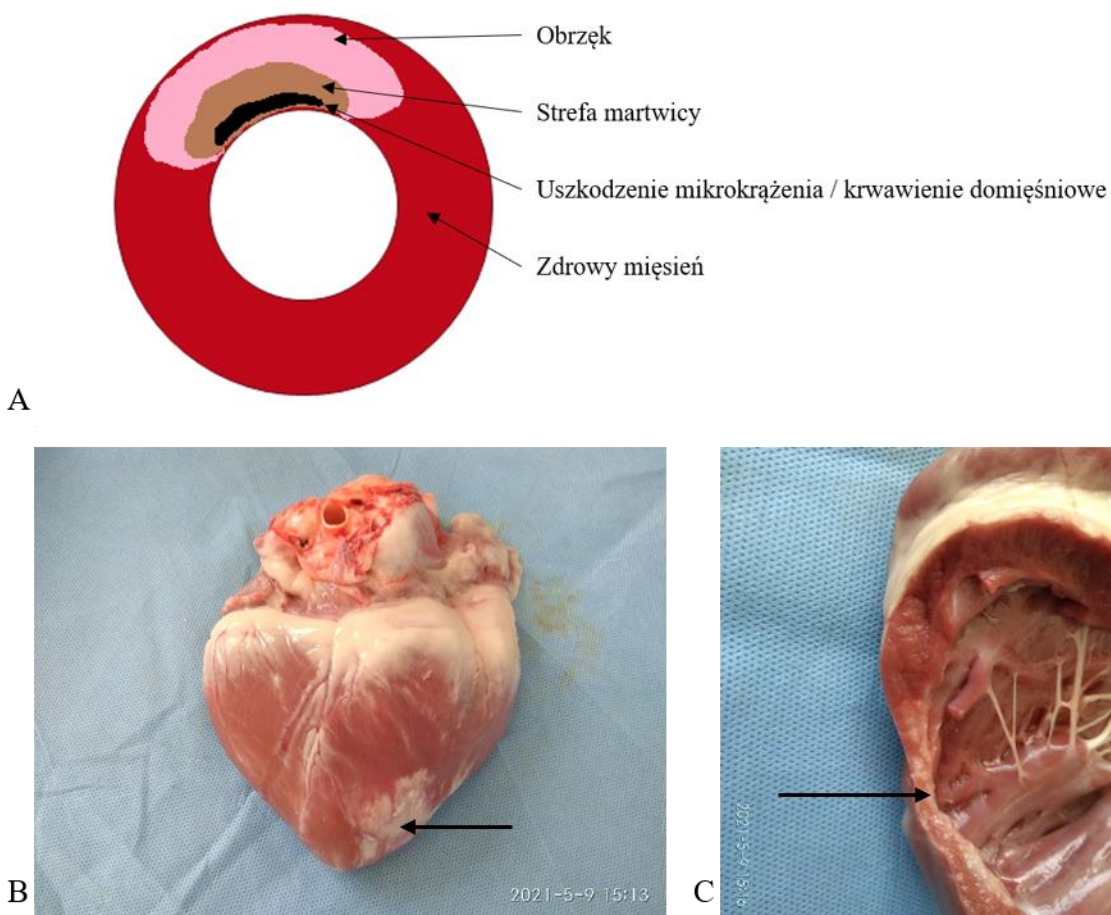
Historycznie psy były najczęściej wykorzystywanym modelem zawału serca i jego skutków. Dzięki nim wykryto, że szybka reperfuzja trombolityczna umożliwia ocalenie niedokrwionego mięśnia sercowego [Przyklenk 1986]. Te badania stworzyły fundament, na którym opierają się obecne wytyczne dotyczące leczenia ostrych zespołów wieńcowych. W modelu psim zawały serca wykonywano poprzez wielokrotną mikroembolizację lewej tętnicy wieńcowej [Dixon 2009].

Wadą modelu psiego jest silnie rozwinięte krążenie oboczne, które powoduje, że nieprzewidywalny jest zarówno proces indukcji zawału jak i jego zejścia [White 1986]. W wyniku mikroembolizacji powstają liczne drobne ogniska nekrotyczne, które różnią się od

jednoogniskowych zmian, obejmujących duży obszar komory, które są typowe dla zawału u ludzi [Dixon 2009]. Z tych powodów świnia została uznana za najlepszy model zwierzęcy do badań nad zawałem serca ze względu na anatomiczne, fizjologiczne i patologiczne podobieństwa między układem sercowo-naczyniowym człowieka i świni. Serce świni jest tej samej wielkości i niemal identyczna jest anatomia tętnic wieńcowych. Brak jest sieci naczyń pobocznych, ale przede wszystkim jest możliwość wywoływania zawałów o przewidywalnym zakresie i lokalizacji poprzez zamknięcie tętnicy wieńcowej przy pomocy balonu naczyniowego [Dixon 2009, Weaver 1986]. Ryc. 2 i 3. Po okluzji naczynia rozwija się zawał serca (MI) identycznie jak u ludzi i powoduje AHF. Reimer i wsp. opisali stopniowe szerzenie się „fali martwicy”, doprowadzające już w czasie od 4 do 6 godzin od zamknięcia tętnicy dozawałowej do nieodwracalnych zmian w obszarze jej unaczynienia [Reimer 1977]. Stwierdzono, że martwica rozwija się początkowo w obszarze podśierdziowym, a następnie rozszerza się w kierunku nasierdzia (rycina 3).



Ryc. 2. Świnia przygotowana do procedury indukcji zawału serca.



Ryc. 3. A) Schemat przedstawiający strefy zawału mięśnia sercowego B) Obszar martwicy mięśnia sercowego (strzałka) po eksperymentalnej indukcji zawału serca u świni C) przekrój przez lewą komorę serca u tej samej świni ukazujący obszar pełnościennej martwicy (strzałka). W strefie granicznej widoczna jest martwica podwsierdziowa.

1.4 Testy oceniające funkcję serca w MI

1.4.1. Elektrokardiografia

Najpowszechniej stosowaną metodą diagnostyczną w medycynie człowieka do szybkiej diagnostyki MI jest EKG. Objawem świeżego zawału jest pojawienie się wysokich, szerokich i symetrycznych załamek T w tych odprowadzeniach, w których w dalszym etapie dochodzi do uniesienia odcinków ST. Obraz taki pojawia się krótkotrwale w ciągu pierwszych dwóch godzin po wystąpieniu bólu (ang. hyperacute T waves). Potem stopniowo unoszą się odcinki ST w co

najmniej dwóch odprowadzeniach reprezentujących obszar unaczynienia serca przez jedną z trzech głównych tętnic wieńcowych. Ryc. 4.



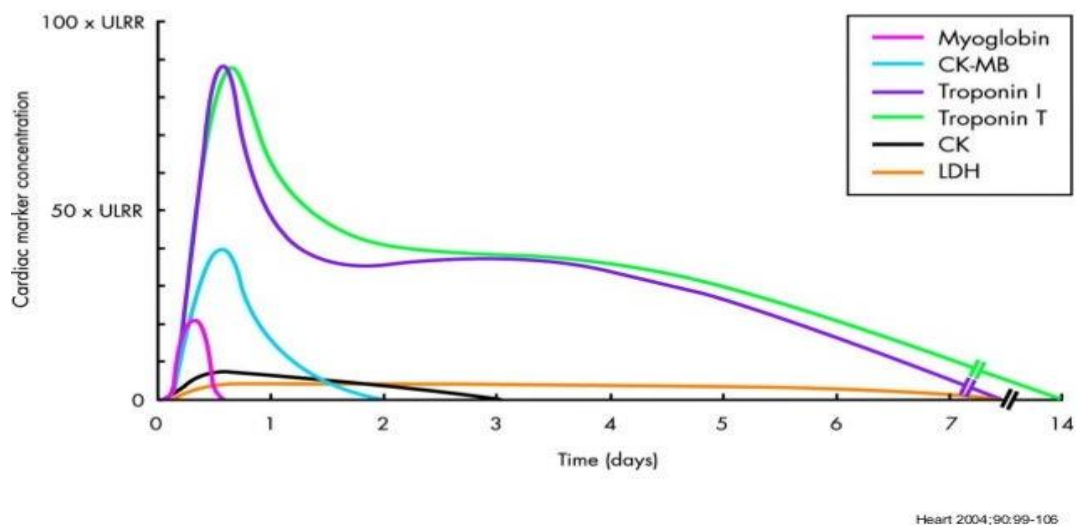
Ryc. 4. Badanie elektrokardiograficzne świni A) przed zawałem serca, B) po indukcji zawału serca. Schemat zmian EKG w trakcie ostrego niedokrwienia [Dąbrowska 2021].

Równoległe, w pierwszych godzinach od wystąpienia bólu zawałowego, pojawiają się nieprawidłowe załamki Q lub zespoły QS, a załamki T ulegają stopniowemu odwróceniu. W ostatnich latach obniżono granicę normy czasu trwania załamek Q, co zwiększyło częstość rozpoznawania zawałów serca, ale też zwiększyło odsetek rozpoznań fałszywie dodatnich [Thygesen 2007]. Odsetek fałszywie dodatnich rozpoznań świeżego zawału nawet w najlepszych ośrodkach wynosi 12%. Stąd zaleca się aby wynik badania EKG oceniać łącznie z markerami krwi.

1.4.2 Markery krwi używane w diagnostyce MI

Wytypowano i potwierdzono użyteczność kliniczną wielu biomarkerów. Jedne z nich służą do obserwacji uszkodzenia mięśnia sercowego: peptydy natriuretyczne (ANP, BNP, NT-proBNP), troponiny, inne do analizy aktywności fibrynolitycznej np. metaloproteinaza-1 (MMP-1), a jeszcze inne wykazują aktywność czynników wzrostu np. transformujący czynnik

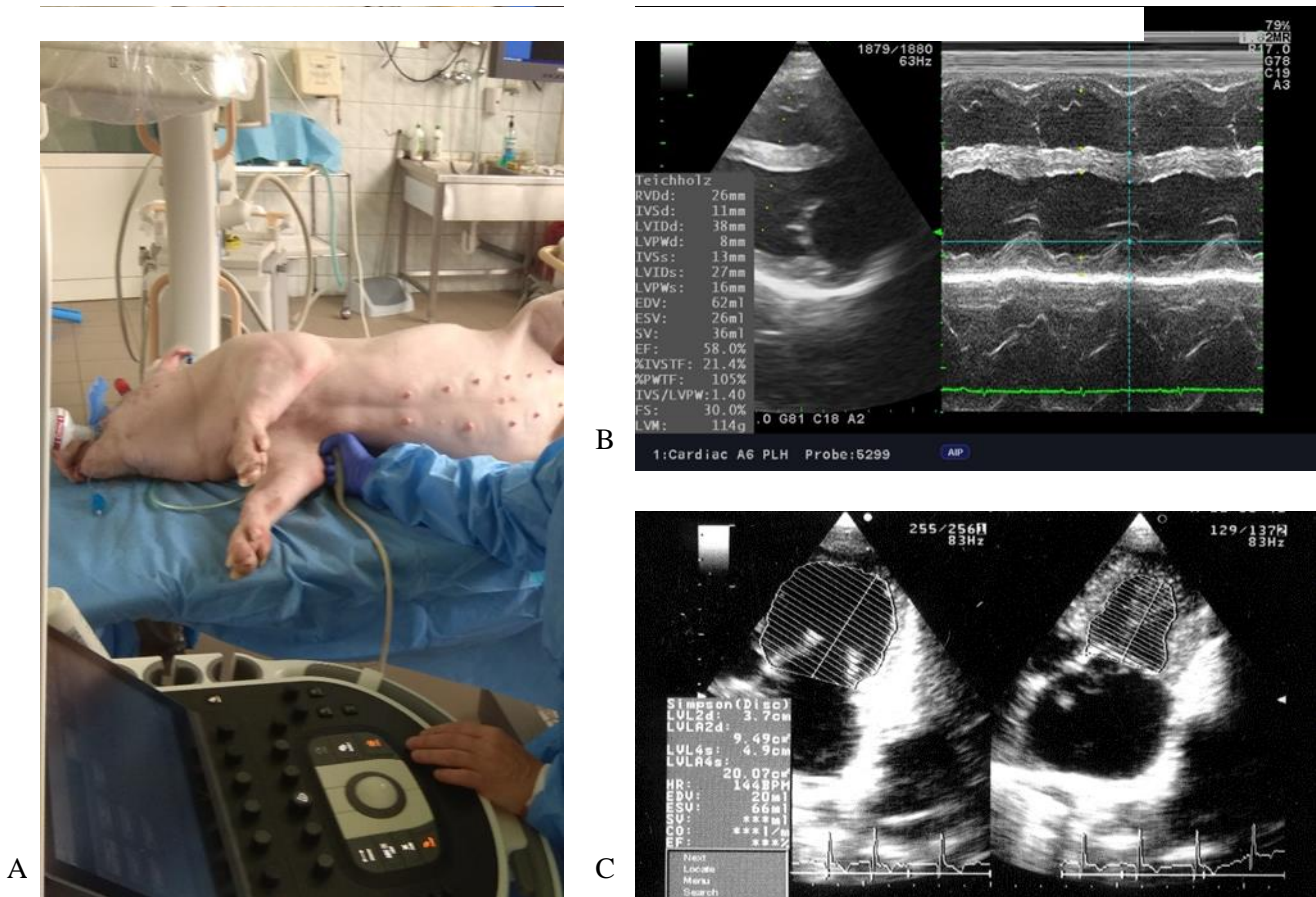
wzrostu beta 1 (TGF- β 1), który promuje transaktywację miofibroblastów i syntezę ECM [Gyöngyösi 2019, López 2015]. Wybór markera jest uzależniony od czasu, który minął od rozpoczęcia niedokrwienia mięśnia sercowego, ponieważ szczyty ich stężenia występują w różnym czasie. Ryc. 5.



Ryc. 5. Zależność czasowa profilów wybranych markerów zawału serca u ludzi [French 2004].

1.4.3 Badanie echokardiograficzne

Jednym z najbardziej użytecznych narzędzi diagnostycznych jest ultrasonografia, która jest metodą tanią, powszechnie dostępną i umożliwia nieinwazyjne monitorowanie zmian morfologicznych i czynnościowych mięśnia sercowego oraz ocenę regionalnej funkcji skurczowej i rozkurczowej lewej komory. Regionalne zaburzenia czynności skurczowej wywołane przez niedokrwienie można wykryć w badaniu echokardiograficznym niemal natychmiast po jego wystąpieniu (jeżeli zawał obejmuje powyżej 20% grubości ściany komory) [Scirica 2010]. Ryc. 6A.



Ryc. 6. A) Badanie echokardiograficzne świni z eksperymentalnie wyindukowanym zawałem serca. B) Projekcja przymostkowa prawa w osi długiej (przekrój podłużny czterojamowy). Po stronie lewej obraz dwuwymiarowy, po stronie prawej obraz M-mode. Na podstawie pomiarów wyliczana jest FS i EF przy użyciu wzoru Teicholza. C) Projekcja przymostkowa lewa w przekrój koniuszkowy czterojamowy. Frakcja wyrzutowa (EF) jest wyliczana poprzez sumowanie objętości dysków.

Ocena funkcji skurczowej serca u chorych po zawałe oceniana jest jako prawidłowa – normokineza, osłabiona – hipokineza, zniesiona – akineza, zaburzona – dyskineza, zwiększona – hiperkineza. Do oszacowania czynności skurczowej serca używa się parametrów tj.:

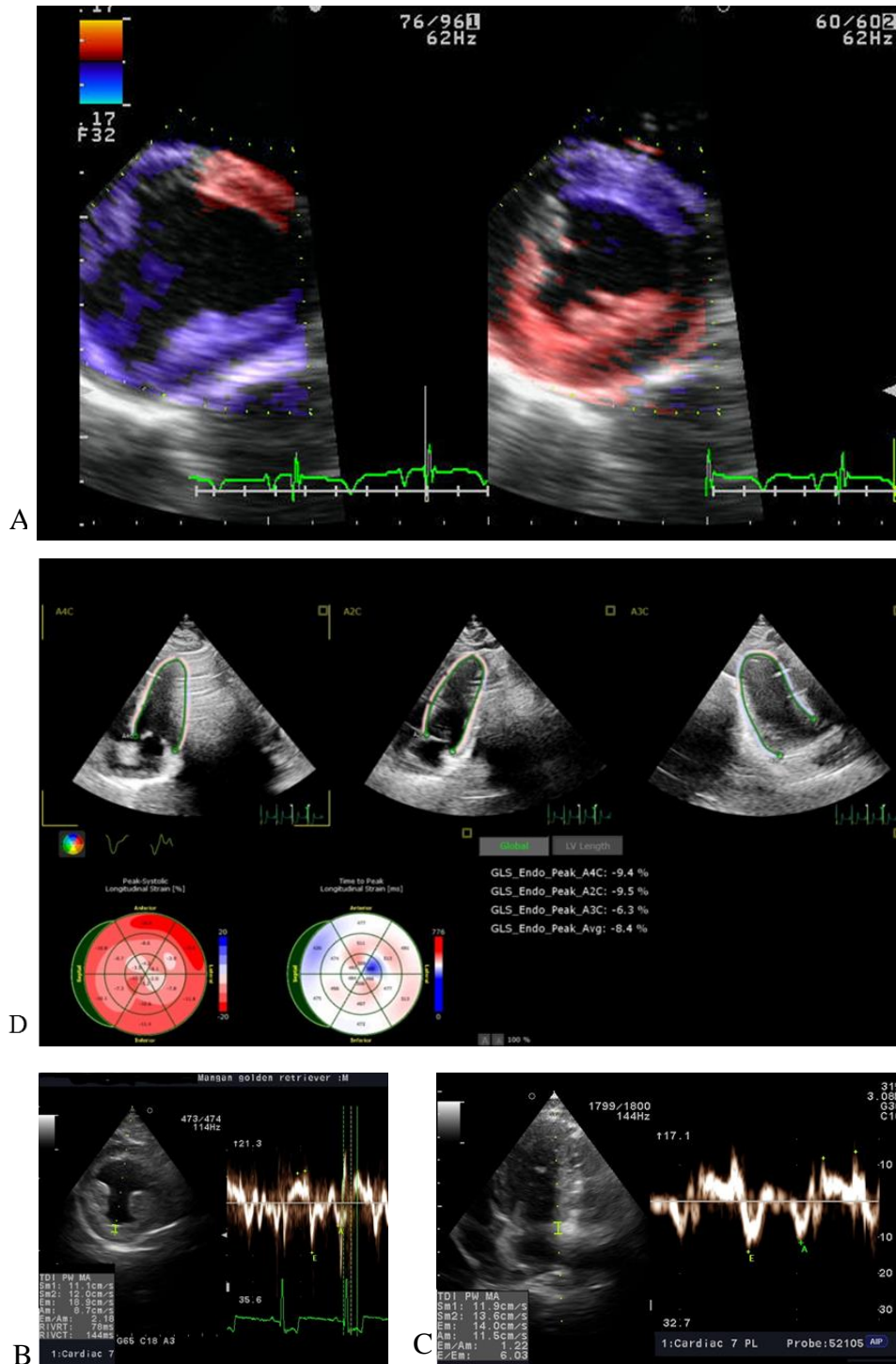
1. Frakcja skracania (SF, ang shortening fraction). Obliczana jest na podstawie równania Teicholza z obrazu M-mode z projekcji przymostkowej. $FS [\%] = (\text{średnica końcoworozkurczowa komory lewej LVIDd} - \text{średnica końcowoskurczowa komory lewej LVIDs}) : \text{średnica końcoworozkurczowa komory lewej LVIDd}$. Ryc. 6B

2. Frakcja wyrzutowej (EF, ang. ejection fraction) ocenianej na podstawie obrazu M-mode z projekcji przymostkowej, przy założeniu, że długość komory lewej jest dwukrotnością jej szerokości. $EF [\%] = (\text{objętość końcoworozkurczowa komory lewej} - \text{objętość końcowoskurczowa komory lewej}) : \text{objętość końcoworozkurczowa komory lewej}$. Obecnie metody 1 i 2 nie są zalecane do oceny czynności skurczowej serca, ponieważ mogą być obciążone istotnym błędem u chorych z odcinkowymi zaburzeniami kurczliwości po MI.
3. Frakcja wyrzutowa ocenianej z obrazów koniuszkowych metodą Simpsona. Objętość komory lewej w rozkurczu i skurczu obliczane jest poprzez sumowanie objętości dysków uzyskanych z obrazów dwuwymiarowych koniuszkowych. Frakcja wyrzutowa komory lewej zależy od objętości, obciążenia wstępnego, następczego, częstotliwości rytmu serca i czynności zastawek, nie jest również odpowiednikiem objętości wyrzutowej. Ryc. 6C.
4. wskaźnika kurczliwości (WMSI, ang. wall motion score index). Oceniana jest kurczliwość poszczególnych 17 segmentów komory lewej w prezentacji dwuwymiarowej w projekcji dwu-, trój- i czterojamowej. WMSI jest obliczony na podstawie ilorazu sumy punktacji ocenianych segmentów i liczby ocenianych segmentów

$$WMSI = \frac{\text{suma punktów odpowiadających kurczliwości poszczególnych segmentów}}{\text{liczba ocenianych segmentów}}$$

5. oceny skurczowego przemieszczenia płaszczyzny AV,
6. prędkości skurczowych ocenianych za pomocą TDI oraz pomiary odkształcenia (strain) i tempa odkształcenia (strain rate).

Obrazowanie odkształceń stanowi bardziej czułą niż ocena EF metodę wykrywania niewielkich zmian czynności skurczowej komory lewej. Jednak aktualnie rutynowe stosowanie obrazowania odkształceń w praktyce klinicznej ograniczają problemy związane z powtarzalnością i standaryzacją metody. Ryc. 7.



Ryc. 7. Ocena czynności skurczowej i rozkurczowej komory lewej przy użyciu dopplera tkankowego. A) obrazowanie kodowane kolorem, prawidłowy obraz przeciwstawnie poruszających się ścian komory lewej. W części lewej obrazu przegroda międzykomorowa wykonuje ruch rozkurczowy skierowany w kierunku głowicy (kolor czerwony), natomiast wolna

ściana lewej komory wykonuje ruch od głowicy (kolor niebieski). Prawa część obrazu pokazuje obraz w skurczu, B) ta sama co w obrazie A projekcja przymostkowa prawa w osi krótkiej ukazująca czynność warstwy okrężnych mięśni komory lewej C) doppler spektralny projekcja koniuszkowa dwujamowa pomiar czynności warstwy podłużnych mięśni komory lewej. D) Badanie Strain w projekcjach koniuszkowych dwu-, trój- i czterojamowej ukazujące kurczliwość poszczególnych segmentów komory lewej.

1.5 Leczenie MI

1.5.1 Implantacja stentu, bypass

Złotym standardem w leczeniu ostrego zawału serca jest jak najszybsze udrożnienie tętnicy wieńcowej poprzez implantację stentu w miejscu krytycznego zwężenia w postaci przezskórnej interwencji wieńcowej (ang. percutaneous coronary intervention, PCI). Zaletami tego typu leczenia jest mała inwazyjność procedury, niskie ryzyko oraz krótki czas jej wykonania. Obecnie w leczeniu ostrego zawału mięśnia sercowego stosuje się głównie stenty metalowe (ang. bare metal stent, BMS). Istnieje także alternatywa, zastosowanie stentu wydzielającego substancję aktywną (ang. drug eluting stent, DES) – lek antyproliferacyjny hamujący rozrost śródbłonna i ograniczający ryzyko restenozy w świetle stentu (ang. in-stent restenosis, ISR). Nie jest to jednak rekomendowane do rutynowego stosowania w ostrym MI [Vlaar 2007]. W niektórych przypadkach bezpieczne i skuteczne może okazać się użycie balonu pokrytego substancją aktywną (ang. drug coated balloon, DCB) [Hu 2021] lub zwyczajnej angioplastyki balonowej (ang. plain old balloon angioplasty, POBA) [Obagi 2021], jednak wciąż za standardowe leczenie uznaje się implantację stentu.

Metodą obarczoną większym ryzykiem, powiązaną z dłuższym okresem rekonwalescencji jest pomostowanie aortalno-wieńcowe. Kardiochirurgiczny zabieg ominięcia zwężonych miejsc tętnic wieńcowych nie jest pierwszym wyborem w leczeniu ostrego zawału serca, stanowi jednak możliwość w przypadkach, które nie kwalifikują się do przezskórnej interwencji wieńcowej, lub u których taka interwencja okazała się nieskuteczna czy też niemożliwa [Shi 2018].

1.5.2 Leczenie farmakologiczne

W pierwszych chwilach leczenia ostrego niedokrwienia mięśnia sercowego zazwyczaj stosuje się leczenie przeciwplatekcyjne - kwas acetylosalicylowy, często jeszcze przed przyjazdem zespołu ratunkowego lub udaniem się do placówki opieki zdrowotnej. W dalszym etapie terapia przeciwplatekcyjna może zostać rozszerzona o klopidoogrel, a także heparynę. W przypadku, kiedy nie ma możliwości wykonania PCI (przezskórnej interwencji wieńcowej, *percutaneous coronary intervention*) w przeciągu 90 minut rozpoczyna się terapię trombolityczną np. streptokinazą. Leczenie trombolityczne może okazać się wystarczające, jednak w innym przypadku zalecane jest jego uzupełnienie PCI.

Dalsze leczenie farmakologiczne dotyczy pozawałowej przebudowy serca i od kilkudziesięciu lat nie ma co do tego jednolitego podejścia. Standardowa farmakoterapia obejmuje inhibitory konwertazy angiotensyny I (ACE-I), antagonistów aldosteronu, blokery receptorów angiotensyny II oraz blokery receptorów β -adrenergicznych [Cohn 2001, Jugdutt 2003, Latini 1995, Zannad 2000]. Leki moczopędne (w tym spironolakton) działają dobrze jako leki zmniejszające obrzęk. Badania pokazują, że pomimo stosowania najnowszych metod leczenia farmakologicznego u osób z zawałem serca - jesteśmy w stanie wyeliminować objawy kliniczne, ale nie jesteśmy w stanie wyeliminować włóknienia [Gyöngyösi 2019, Querejeta 2004]. Innymi słowy, istniejące strategie leczenia nie odniosły sukcesu. Powstała blizna chroni mięsień sercowy przed pęknięciem, ale jednocześnie przewlekłe rozlane lub ogniskowe reaktywne zwłóknienie mięśnia sercowego wynikające z przeciążenia ciśnieniowego lub objętościowego zaostroża zaburzenia czynnościowe [Gyöngyösi 2019, Camelliti 2005].

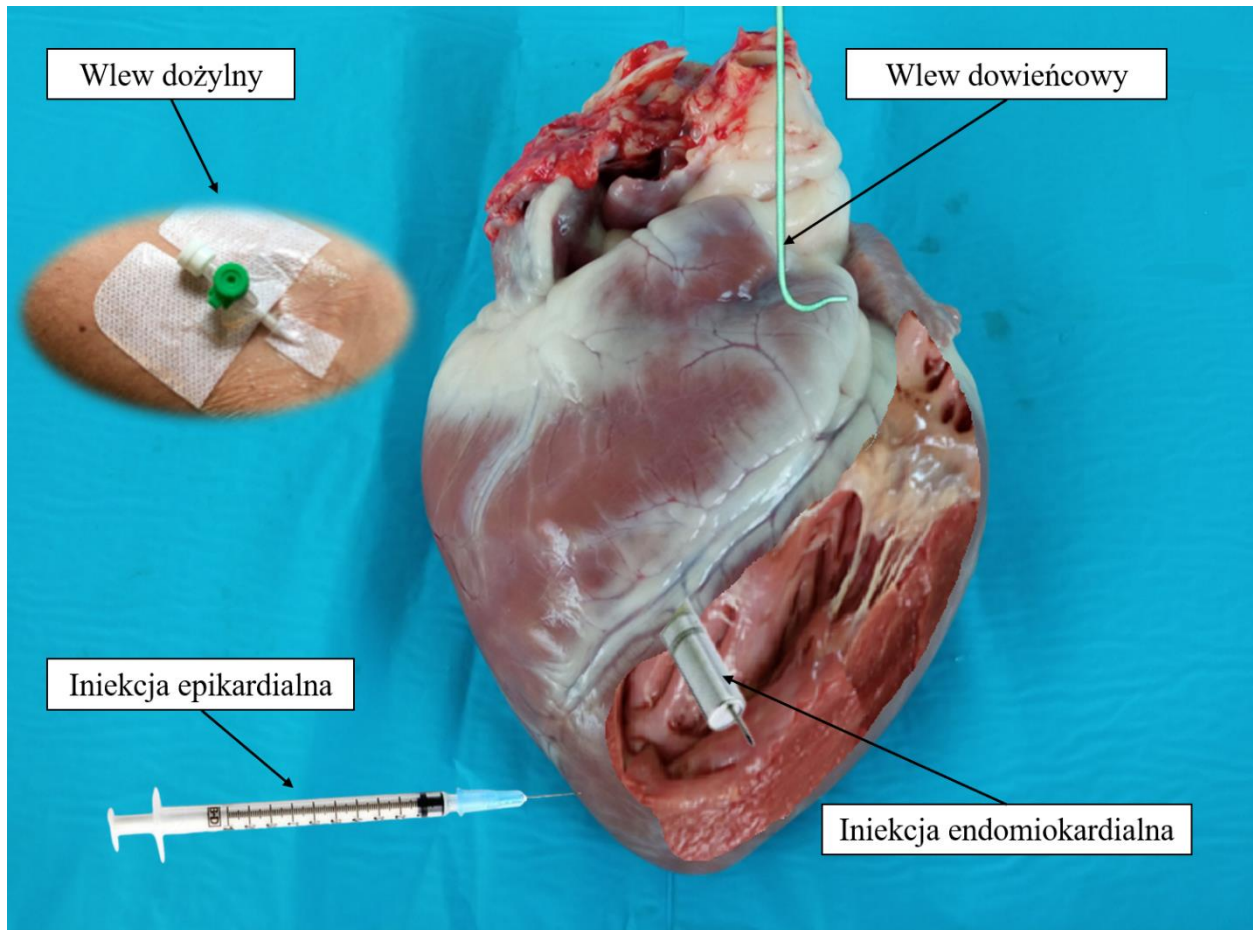
1.5.3 Leczenie niefarmakologiczne – terapia komórkami macierzystymi

Rozwój medycyny regeneracyjnej stworzył możliwości dla poszukiwania możliwości leczenia choroby niedokrwiennej serca za pomocą komórek macierzystych. Badania nad możliwością regeneracji mięśnia sercowego poprzez zastosowanie endogennych sercowych komórek macierzystych rozpoczął Philippe Menasché we Francji w 2001 roku [Quaini 2002, Orlic 2001].

Pierwszy przeszczep ludzkich embrionalnych pluripotencjalnych komórek macierzystych do miokardium dorosłych makaków pigtail (*Macaca nemestrina*) został przeprowadzony przez

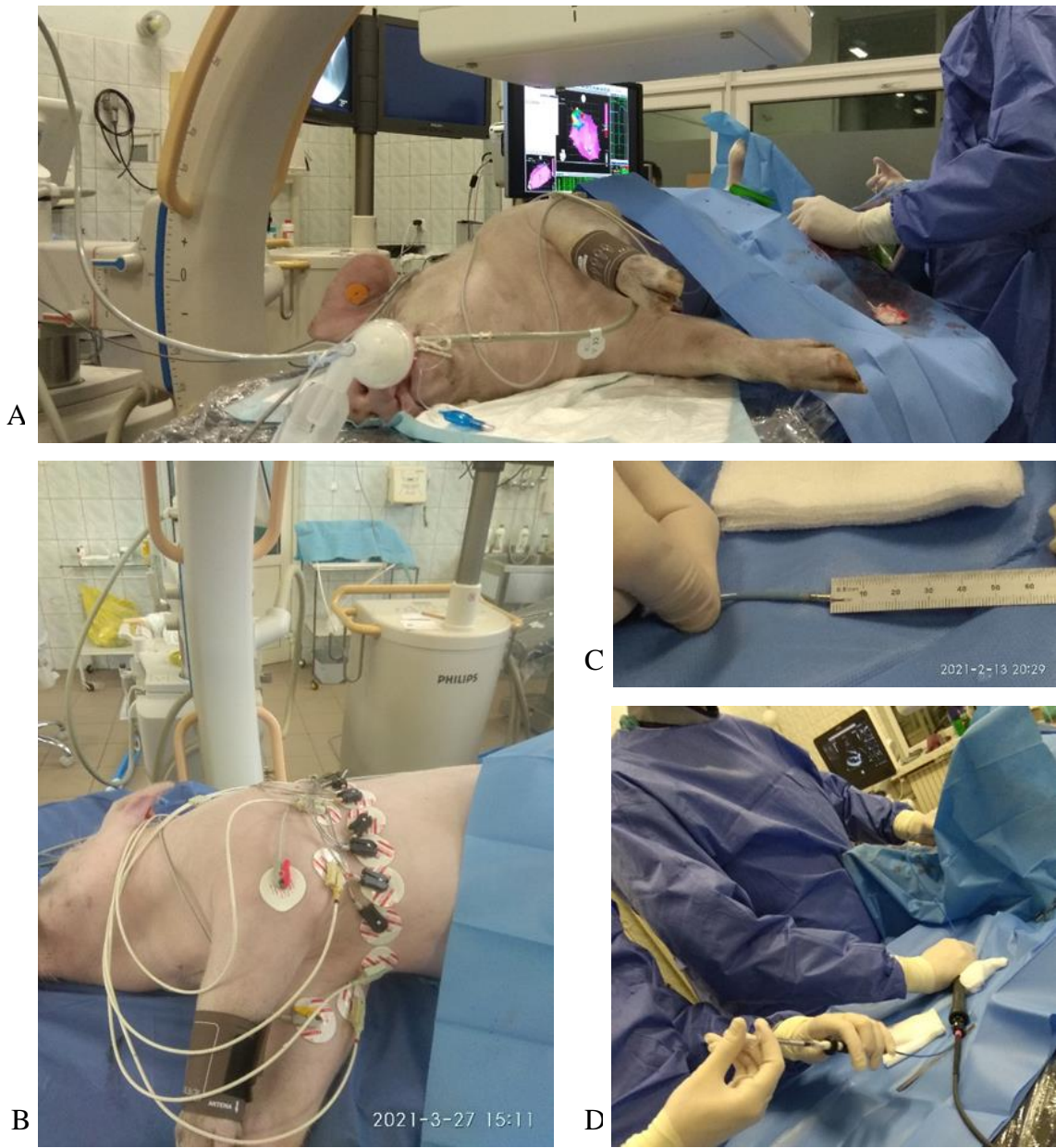
Chong i wsp. 2 tygodnie po ostrym niedokrwieniu mięśnia sercowego. Badacze ci odkryli, że znaczna liczba przeszczepionych komórek przeżyła i była zdolna do elektrycznego sprzężenia w sercach naczelnych po 3 miesiącach od wstrzyknięcia [Chong 2014]. Nie wykryto tworzenia się potworniaków ani zagnieżdżenia komórek w narządach poza organem docelowym. Jednak autorzy nie byli w stanie stwierdzić, czy przeszczepienie ludzkich ESC-CM złagodziło dysfunkcję serca lub późniejszą niewydolność serca z powodu małej liczby zwierząt wykorzystanych w badaniu.

Wyodrębniono kilka grup komórek, których przydatność badano: indukowane komórki pluripotencjalne (cechujące się nadekspresją Oct3/4, Sox 2, Klf4, c-Myc), komórki multipotencjalne (mające możliwość regeneracji w komórki przynależne do danego listka zarodkowego) i komórki unipotencjalne, które różnicują do jednego rodzaju komórek, np. komórek jednej tkanki. Komórki progenitorowe mięśnia sercowego (nazywane są cardiac stem cells lub cardiac progenitor cells) mogą się różnicować w kardiomiocyty, mięśnie gładkie lub komórki śródbłonna [Beltrami 2003]. W kolejnych latach przeprowadzono i opublikowano szereg badań doskonalących tę technikę leczenia [Chimenti 2003, Hatzistergos 2015, Huang 2010, Quyyumi 2017, Wojakowski]. Analiza tych badań wykazała, że głównym problemem było kotwiczenie komórek macierzystych w obszarze zawału. Czynniki kotwiczące komórki macierzyste (SDF-1, stromal derived factor), okazał się zbyt mało aktywny, aby wywołać oczekiwany efekt. Zaobserwowano, że podanie śródmięśniowe (dosercowe, intramiokardialne) jest skuteczniejsze niż dożylnie lub dotętnicze (Ryc. 8). Komórki podawano w ten sposób podczas zabiegów pomostowania (po wykonaniu torakotomii) lub endokardialnie za pomocą cewników.

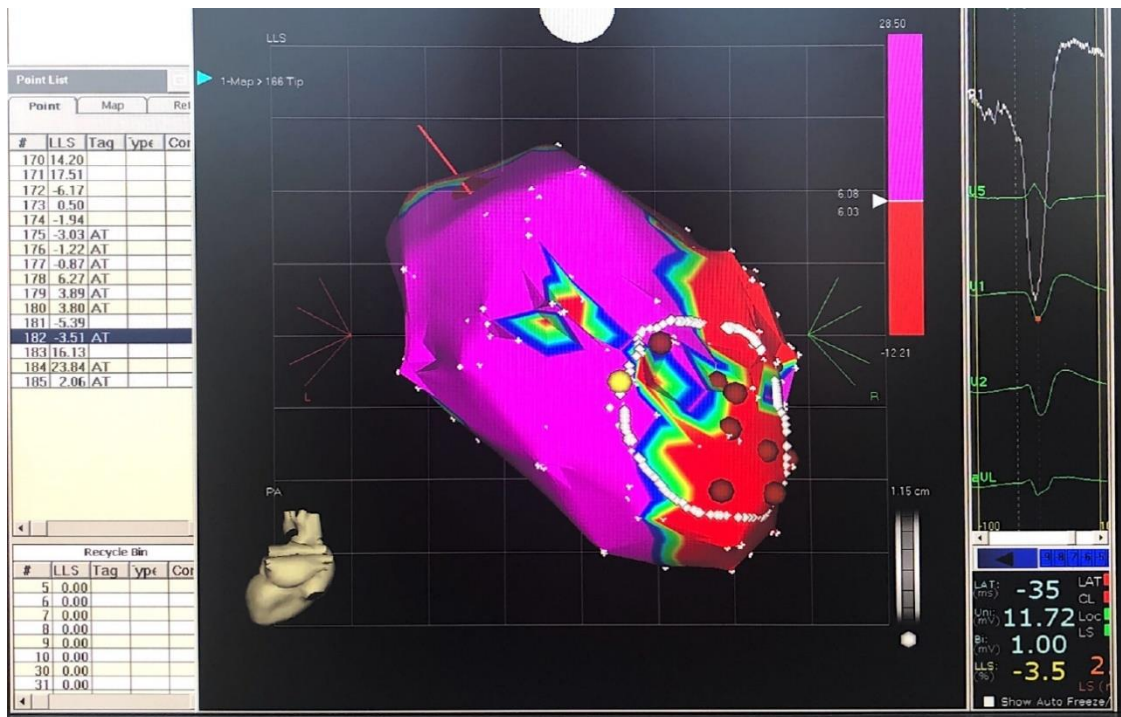


Ryc. 8. Drogi podania komórek macierzystych w zawale serca: wlew dożylny, wlew dowieńcowy, iniekcja epikardialna, iniekcja endomiokardialna.

Jednym z najdokładniejszych sposobów celowanego podawania komórek macierzystych jest mapowanie elektromechaniczne NOGA 3D, które dzięki analizie zmian przewodnictwa komór pozwala na identyfikację granicznej strefy zawału [Duran 2012]. System NOGA 3D umożliwia również precyzyjne podanie komórek w wybraną lokalizację lewej komory. Ryc. 9 i 10.



Ryc. 9. System NOGA. A) Inwazyjne badanie elektrofizjologiczne -mapowanie pozawałowych obszarów uszkodzenia komory B) przygotowanie świni z eksperymentalnie wyindukowanym zawałem serca do badania NOGA C) kontrola głębokości podania komórek macierzystych D) intramiokardialne podanie komórek macierzystych u świń eksperymentalnych.



Ryc. 10. System NOGA. Mapa elektrofizjologiczna obrazująca obszar obniżonej kurczliwości lewej komory (zaznaczony linią przerywaną białą) u świni z eksperymentalnie wyindukowanym zawałem serca. Obszar obniżonej kurczliwości obejmuje koniuszka serca i segment koniuszkowy ściany przedniej. Brązowe znaczniki ukazują miejsca podania komórek macierzystych.

Kluczowym aspektem jest rodzaj dostarczanych komórek macierzystych. Wykazano, że komórki macierzyste uzyskiwane z krwi (tj. BMC, CPC i PSC) mogą migrować do miejsca uszkodzenia [Hastings 2015], ale nie różnicują się w kardiomiocyty w obszarze niedokrwienia [Murry 2004] i mają niewydajny system naprawczy DNA, przez co zbyt szybko się starzeją [Kang 2015]. Oprócz komórek prekursorowych dla kardiomiocytów muszą być podawane komórki, które umożliwią ich przeżycie w obszarze martwicy. Mezenchymalne komórki macierzyste (MSC) wydają się być niezwykle obiecującym środkiem terapeutycznym do regeneracji tkanek. MSC uzyskano na przykład z podskórnej białej tkanki tłuszczowej (ATSC) brzucha świni. Wykazano, że domięśniowe wstrzyknięcie ATSC (mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej) w zaplanowany wcześniej obszar, poprawiło funkcję skurczową lewej komory, zmniejszyło zakres zawału [Kim 2017] i modulowało

odbudowę lokalnej macierzy międzykomórkowej w warunkach zapalenia lub uszkodzenia. Substancje parakrynowe pomagają w naprawie serca poprzez aktywację endogennych prekursorów, promowanie neowaskularyzacji, modulowanie macierzy zewnątrzkomórkowej, cytoprotekcję oraz hamowanie apoptozy, zwłóknienia i zapalenia [Chimenti 2003, Gnechi 2008, Tang 2018].

Dojrzałe komórki macierzyste uwalniają czynniki wzrostu, takie jak czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF), pochodzący z komórek zrębu czynnik 1 (SDF-1, znany również jako chemokina motywu CXC 1 CXCL12) i insulinopodobny czynnik wzrostu-1 (IGF-1) [Abushouk 2019, Klarenbosch 2019, Lefer 2017, Rota 2008, Tang 2010, Tang 2018]. Kontakt żywych miocytów z mezenchymalnymi komórkami macierzystymi zapewnia niezbędny fizyczny kontakt do wspomagania naprawy mięśnia sercowego, czyli poprawę zarówno na poziomie strukturalnym, jak i metabolicznym. W strefie granicznej znajdują się komórki, które przeżyły, ale są ciągle zagrożone śmiercią (o czym świadczy zwiększony poziom fosforylacji T17-PLB i aktywacja kaspazy-3 (która może eskalować ekspansję zawału), a które mogą zostać uratowane dzięki poprawie warunków otaczającego środowiska tkankowego. Najnowsze wyniki podkreślają rolę jednoczesnego podawania komórek niemiocytarnych, które zapewniają wsparcie parakrynowe i angiogenne. Wykazano, że mezenchymalne komórki macierzyste różnicują się nie tylko w komórki endotelium i komórki mięśni gładkich, ale również w kardiomiocyty [Oswald 2004, Toma 2002]. Nie ma też jednolitego poglądu nt. wpływu liczby podawanych komórek. Z jednej strony badania wskazują, że lepsze wyniki są uzyskiwane w przypadku podania większej liczby komórek [Kolanowski 2010], a inni autorzy wykazali znaczący spadek frakcji wyrzutowej po podaniu wysokich dawek komórek ($> 83 \times 10^6$ komórek) [Mathiasen 2020, Bolli 2020].

W tab. 1 przedstawiono wyniki badań kliniczne w których transplantacja komórek macierzystych po ostrym zawale serca przyniosła korzyści pacjentom. BMC (ang. bone marrow-derived cells) – komórki macierzyste szpiku kostnego, CPC (ang. circulating progenitor cells) – komórki macierzyste krwi obwodowej, MSC (ang. mesenchymal cells) – komórki mezenchymalne, PSC G-CSF (ang. granulocyte-colony stimulating factor G-CSF mobilized peripheral blood stem cells) zmobilizowane komórki macierzyste krwi obwodowej [Carbone 2021].

Autor	Rok	Nazwa badania	Źródło komórek	Liczba pacjentów	% wzrostu LVEF
Strauer BE	2002	–	BMC	10	2
Assmus B	2002	TOPCARE-AMI	CPCBMC	119	8.6
Perin EC	2003	–	BMC	21	3.2
Britten MB	2003	TOPCARE-AMI	CPCBMC	1513	5
Chen SL	2004	–	MSC	69	14
Perin EC	2004	–	BMC	20	10
Schachinger V	2004	TOPCARE-AMI	CPCBMC	3029	8
Wollert KC	2004	BOOST	BMC	60	7
Kang HJ	2004	MAGIC	PSC	27	6.4
Strauer BE	2005	IACT	BMC	18	15
Ince H	2005	FIRSTLINE-AMI	PSC	25	6
Janssens S	2006	–	BMC	67	2.8
Schachinger V	2006	REPAIR-AMI	BMC	204	7.3
Hare J	2009	–	MSC	53	6.4
Wohrle J	2013	SCAMI	BMC	42	4
Assmus B	2014	REPAIR-AMI	BMC	204	2.5
Duan F	2015	–	BMC	42	15
Quyuyumi AA	2017	PreSERVE-AMI	BMC	281	2.2
Kim SH	2018	–	MSC	26	5.4
Achilli F	2019	STEM-AMI	PSC	161	5.1
Total				1437	

LVEF- frakcja wyrzutowa komory lewej

Tabela 1. W przedstawionych wyżej 20 badaniach, w których udział wzięło 1437 pacjentów średni wzrost frakcji wyrzutowej komory lewej wyniósł 7.2%, a w 14 badaniach, w których udział wzięło 1705 pacjentów nie uzyskano istotnego wzrostu frakcji wyrzutowej [Carbone 2021].

1.5.4 Potencjalne zagrożenia związane z terapią komórkami macierzystymi

Mezenchymalne komórki macierzyste/zrębowe (MSC) są obecnie najczęściej używanymi komórkami ze względu na brak ograniczeń etycznych i ryzyka związanego ze stosowaniem, np. embrionalnych komórek macierzystych. Międzynarodowe Towarzystwo Terapii

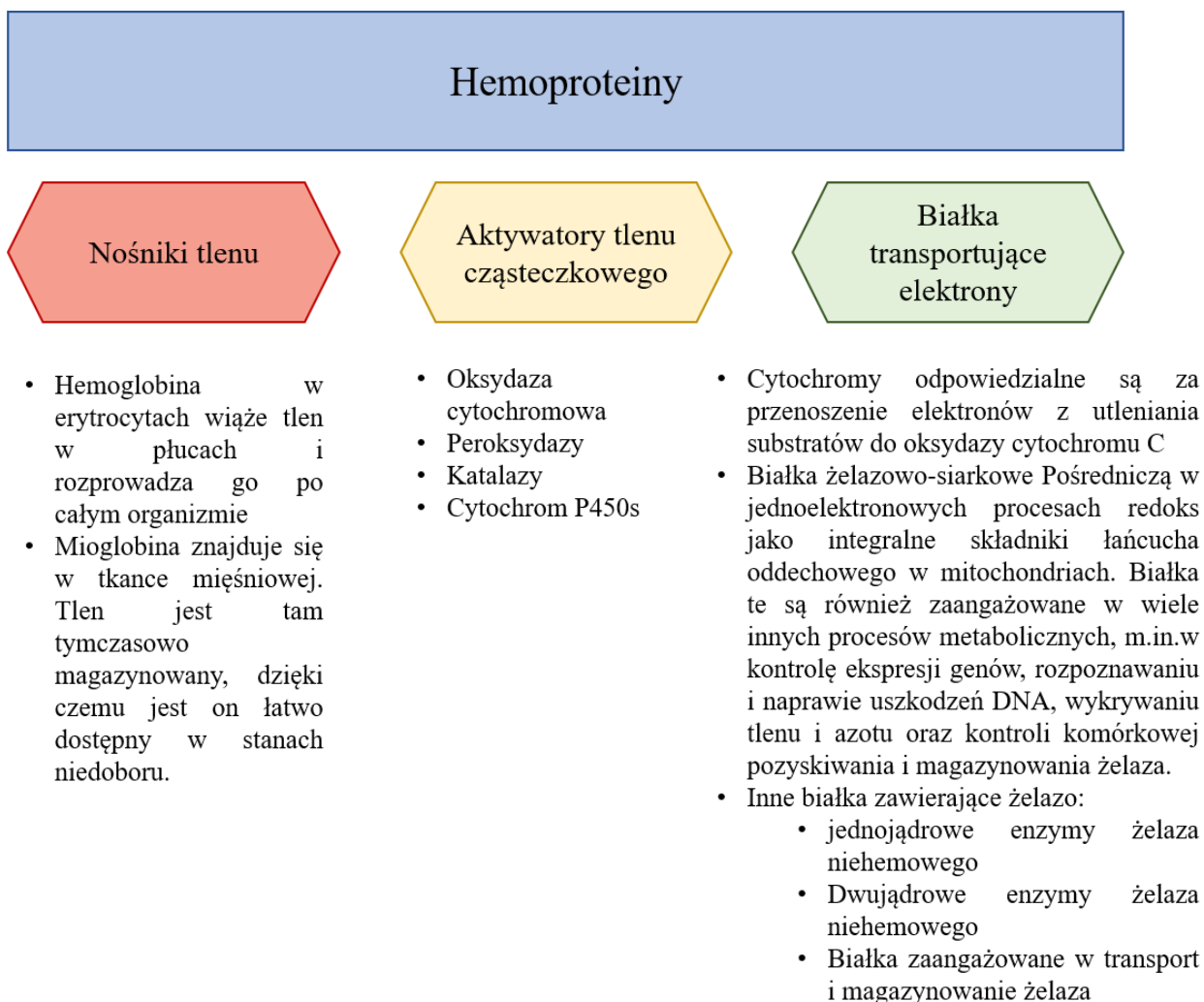
Komórkowej (ISCT) zidentyfikowało MSC jako komórki zdolne do przylegania do plastiku w standardowych warunkach hodowli, do różnicowania *in vitro* do osteoblastów, adipocytów i chondroblastów, ich ekspresji CD73, CD90 i CD105 oraz braku ekspresji CD34, CD45, CD14 lub CD11b, CD19 lub CD79 α i HLA-DR [Domenici 2006]. Jednak są one morfologicznie nie do odróżnienia od fibroblastów pod względem fenotypowym, zarówno pod względem budowy, markerów powierzchniowych komórek, potencjału różnicowania, jak i właściwości immunomodulujących. Nawet macierz zewnątrzkomórkowa wydzielana przez MSC jest podobna do tej wydzielanej przez fibroblasty [Denu 2016]. Wyniki wskazują, że fibroblasty są w rzeczywistości starzejącymi się MSC [Soundararajan 2018]. Proces zwłóknienia, który hamuje stan zapalny, jest ewolucyjnie bardzo konserwatywnym mechanizmem obronnym przeciwko szerokiej gamie patologii [Thannickal 2014]. Badania Desmouliere'a wykazały, że główną przyczyną zwłóknienia na poziomie komórkowym jest gromadzenie się i utrzymywanie się miofibroblastów podczas naprawy i gojenia tkanek, co prowadzi do przekształcenia ziarniny w bliznę przerostową z nadmierną produkcją ECM i upośledzeniem mikrokrażenia [Desmouliere 2003]. Co więcej, miofibroblasty w tkance zwłókniałej nie tylko nabywają oporność (tak jak komórki T) na apoptozę indukowaną przez receptory śmierci Fas (CD93 z rodziny TNF), ale także promują własne przeżycie poprzez ekspresję cząsteczek Fas i zabijanie otaczających limfocytów [Wallach-Dayana 2007]. Deregulacja mikrośrodowiska odgrywa rolę w zaburzeniu równowagi populacji komórek progenitorowych, co może przyczyniać się do nieprawidłowej naprawy z nadmiernym zwłóknieniem w płucach, wątrobie i nerkach [Desmouliere 2003, McNulty 2012].

Wykazano, że przeszczepienie kardiomiocytów embrionalnych prowadzi do zwiększenia stabilności elektrycznej uszkodzonego serca, w szczególności poprawy sprzężenia między przeszczepem a gospodarzem oraz zmniejszenia częstości występowania częstoskurczu komorowego, właściwości zależnej od koneksyny-43 [Roell 2007, Zheng 2013]. W rzeczywistości przeszczepienie mioblastów szkieletowych, które nie wyrażają Cx43, wykazało znaczny wzrost częstości arytmii. Niemniej jednak ekspresja Cx43 nie jest sama w sobie wystarczająca do stłumienia arytmicznego potencjału przeszczepu komórek macierzystych ponieważ istnieją również inne mechanizmy odpowiedzialne za rozwój arytmii: 1) brak integracji elektromechanicznej, 2) przeszczepienie pochodnych niekardiomiocytów, 3) miejscowy uraz i obrzęk, 4) kielkowanie nerwu powodujące zwiększoną aktywację

współczulną (przeszczepianie MSC wywołuje kiełkowanie nerwów i wysoką gęstość nerwów współczulnych), 5) droga dostarczania komórek, przy czym domięśniowe jest bardziej arytmogenne niż dowieńcowe; 6) reakcje immunologiczne prowadzące do odrzucenia i zapalenia; 7) okres integracji („automatyzacji”) przeszczepu oraz 8) osoby, w przypadku których ekspresja połączeń szczelinowych, takich jak koneksyna-43, wpływa na arytmogenność przeszczepu [Almeida 2015, Pak 2003]. Większość badań, w których badano przeszczepianie komórek macierzystych do leczenia zawału była wykonywana na modelu mysim, mniejszość na modelu kawii domowej (świnki morskiej). Część badaczy uważa, że wysoka częstość akcji serca 500-600/min myszy i 230/min u kawii domowej oraz niewielkie rozmiary serca w stosunku do stosowanych objętości płynów, w których zawieszono komórki są odpowiedzialne za obserwowane zaburzenia rytmu, ponieważ przy wykorzystaniu modeli dużych częstość pojawiania się arytmii jest istotnie niższa [Chong 2014].

1.6. Żelazo, rola żelaza w organizmie, gospodarka żelazem

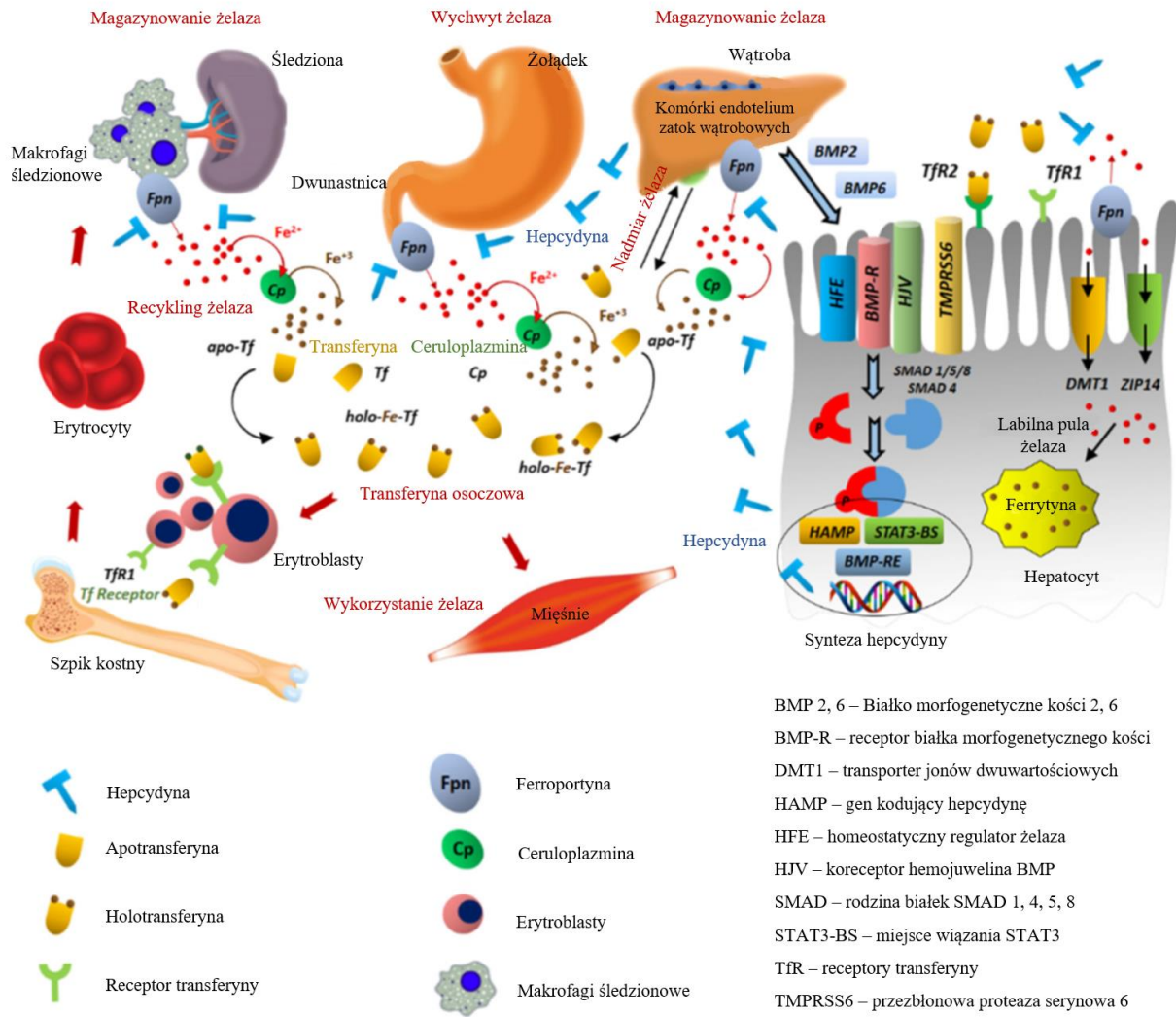
Żelazo jest zaliczane do mikroelementów, ponieważ jego ilość w organizmie jest niewielka. Jednak odgrywa ono niezwykle ważne role w organizmie takie jak: transport tlenu za pomocą hemoglobiny, magazynowanie tlenu po połączeniu z mioglobina, budowanie centrów w wielu enzymach odpowiedzialnych za oddychanie komórkowe, utlenianie i redukcję [Harvey 2008]. Unikatowe możliwości jonów żelaza wynikają z możliwości modulowania potencjału redoks Fe^{2+}/Fe^{3+} w praktycznie całym istotnym biochemicznie zakresie. Jest to możliwe dzięki oddziaływaniu ligandów białkowych. Klasyfikacja białek zawierających jony żelaza oparta jest zazwyczaj na pełnionych funkcjach biochemicznych (Ryc.11) [Korolnek 2014].



Ryc. 11. Hemoproteiny i ich rola w organizmie

Duża potencjalna szkodliwość żelaza powoduje, że jego pozyskiwanie jest ściśle dostosowane do potrzeb organizmu. Podobnie ścisłej kontroli podlega dostęp do łatwo dostępnych depozytów żelaza. Depozyty te są uruchamiane w stanach nagłego wzrostu zapotrzebowania na jony żelaza [Naigamwalla 2012]. Na homeostazę żelaza składają się dwa systemy: ogólnoustrojowa i komórkowa homeostaza żelaza. Ogólnoustrojowa homeostaza żelaza reguluje pozyskiwanie żelaza z pokarmu, aby jego stężenie w osoczu krwi utrzymywało się w wąskim, fizjologicznym zakresie [Chifman 2014]. Za komórkową homeostazę żelaza

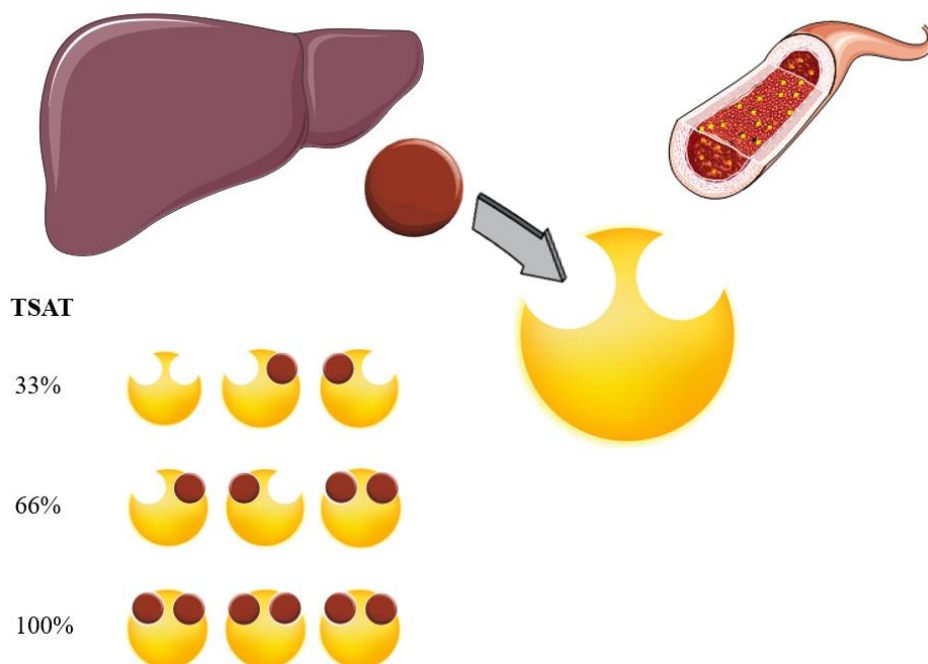
odpowiadają komórki, które mają zdolność importowania żelaza oraz komórki magazynujące jego nadmiar [Lynch 2018]. Prawie dwie trzecie żelaza w organizmie znajduje się w przedziale erytroidalnym, dlatego tempo erythropoezy ma dominujący wpływ na regulację wchłaniania, transportu i magazynowania żelaza [Vogt 2021]. Ogólny schemat homeostazy żelaza przedstawiono na rycinie nr 12.



Ryc. 12. Ogólny schemat homeostazy żelaza [Tippairote 2021]

1.6.1. Transferyna

Żelazo jest transportowane do komórek, za pośrednictwem krwi i płynów pozanaczyniowych przy pomocy nośnika transferyny. Transferyna bez przyłączonego żelaza (apotrasferyna), jest jednołańcuchową glikoproteiną z dwoma podjednostkami, z których każda może wiązać jeden jon żelaza [Lynch 2018]. Żelazo związane z transferyną jest nadal rozpuszczalne, ale nie jest w stanie generować toksycznych wolnych rodników. Wiązanie żelaza zależy w dużym stopniu od pH krwi i jest największe powyżej pH 7,0. W przypadku obniżenia pH następuje dysocjacja jonów żelaza i jest praktycznie całkowita poniżej pH wynoszącego 4,5. Głównymi źródłami żelaza wiążącego się z transferyną są enterocyty dwunastnicy, makrofagi w śledzionie, wątrobie i szpiku kostnym oraz hepatocyty. Wiązanie z transferyną wymaga utlenienia żelaza do formy żelazowej, pośredniczy w tym hafaestyna (związana z błoną komórkową ferrokazydaza wielomiedziowa). W tym procesie ważną rolę odgrywa ceruloplazmina, [Wessling-Resnick 2018]. Całkowita zdolność wiązania żelaza (TIBC) jest miarą zdolności osocza do przenoszenia żelaza i reprezentuje maksymalne stężenie żelaza, które może być wiązane przez transferynę osocza. Wysycenie żelaza odzwierciedla ilość żelaza związanego z transferyną i jest niskie w przypadku niedokrwistości z niedoboru żelaza. [Naigamwalla 2012]. Procent nasycenia transferyny (TSAT) jest obliczony na podstawie TIBC i stężenia żelaza $TSAT = (\text{stężenie żelaza} / TIBC) \times 100$. Fizjologicznie wynosi około 35% (30-38%) i odpowiada to stężeniu żelaza w osoczu lub surowicy (rycina nr 13).



Ryc. 13. Schemat procentowego nasycenia transferyny (TSAT). Transferyna jest wydzielana przez wątrobę do krwi, tam łączy się z jonami żelaza.

Stężenie transferyny rośnie w warunkach niedoboru żelaza, a spada stopień jej wysycenia żelazem. Zarówno stężenie żelaza w osoczu oraz TSAT wykazują zmienność dobową. Zwykle ich stężenie jest wyższe w godzinach porannych, tj. w okresie rozpoczynającej się aktywności dziennej, po nocnym wypoczynku [Lynch 2018]. Żelazo jest odbierane przez komórki docelowe, a apotransferyna wraca do osocza lub płynu pozakomórkowego.

1.6.2. Ferrytyna

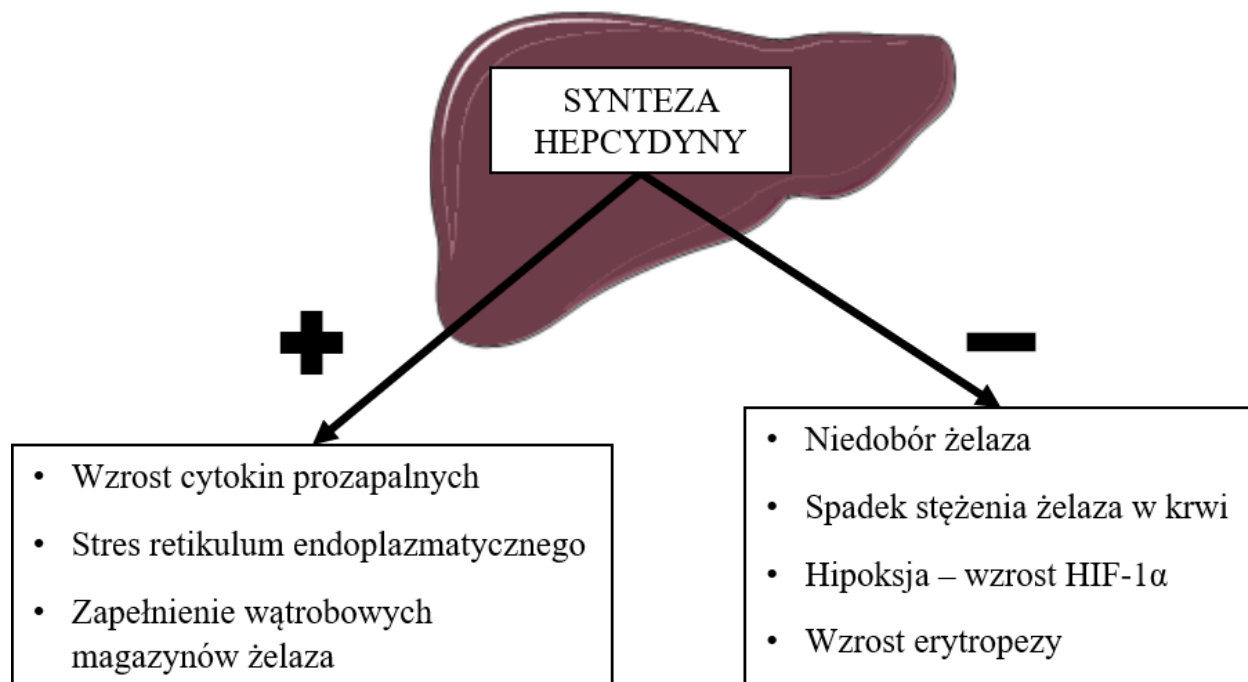
Ferrytyna jest białkiem magazynującym jony żelaza Fe^{3+} w wątrobie i innych narządach. Utrzymuje żelazo w dostępnej i nieszkodliwej formie. Jej synteza jest ściśle i wielopoziomowo regulowana na etapie ekspresji genu, transkrypcji i translacji [Vogt 2021]. W różnych tkankach występuje wiele izoferrytyn, w zależności od specyficznych kombinacji dwóch typów podjednostek: łańcucha ciężkiego tzw. H i łańcucha lekkiego tzw. L. Izoferrytyny bogate w H przeważają w mięśniu sercowym, czerwonych i białych krwinkach, natomiast L głównie w wątrobie, śledzionie i łożysku. Ferrytyna jest białkiem rozpuszczalnym, ale może ulegać

degradacji do nierozpuszczalnej hemosyderyny [Knovich 2009]. Obie formy ferrytyny budują kulistą nanoklatkę w której zmagazynowane jest łatwo dostępne żelazo. W normalnych warunkach większość zmagazynowanego żelaza jest przechowywana w postaci ferrytyny, jednak wraz z przeciążeniem organizmu żelazem wzrasta udział hemosyderyny. Wbudowywanie żelaza do ferrytyny zapobiega oksydacyjnemu uszkodzeniu tkanek. Synteza ferrytyny jest indukowana przez obecność żelaza. Ostateczna degradacja ferrytyny wciąż jest nieodkryta. Stężenie surowiczej ferrytyny jest wprost proporcjonalne do wielkości zapasów żelaza, dlatego jest używane jako marker ilości żelaza w zapasach organizmu, jeżeli nie występuje jednocześnie infekcja lub stan zapalny [Vogt 2021].

Stan zapalny towarzyszący chorobom chronicznym jest drugą (po niedoborze żelaza w diecie) co do częstości przyczyną niedokrwistości. W tym przypadku niskie stężenie żelaza w surowicy i TIBC są uważane za odzwierciedlenie wzrostu syntezy hepcydyny.

1.6.3. Hepcydyna

Hepcydyna jest kluczowym białkiem regulującym wchłanianie żelaza, jego recykling i wielkość zapasów. Syntetyzowana jest głównie w hepatocytach jako 84-aminokwasowy nieaktywny peptyd. Aktywacja zachodzi w aparacie Golgiego. Do krwi wydzielany jest aktywny 25-aminokwasowy peptyd. Krążąca hepcydyna jest związana z α 2-makroglobuliną. Regulację syntezy hepcydyny przedstawiono na rycinie 13.



Ryc. 14. Regulacja syntezy hepcydyny

Aktywna cząsteczka hepcydyny ulega dalszemu przetwarzaniu, w wyniku czego powstają dwa mniejsze peptydy 20- i 22- aminokwasowe, które można oznaczyć w moczu, ale nie są wykrywalne w osoczu lub występują w bardzo małych stężeniach u zdrowych ludzi i zwierząt. Główną drogą usuwania hepcydyny z krążenia jest nieuregulowane wydalanie nerkowe. Poza tym hepcydyna jest usuwana przez endocytozę indukowaną receptorami, znajdującymi się głównie w hepatocytach i makrofagach wątroby, śledziony i szpiku kostnego.

1.7 Zaburzenia homeostazy żelaza w niewydolności serca

Jak wspomniano wyżej niewydolność serca powoduje złożone zaburzenia homeostazy żelaza, charakteryzujące się jednoczesnym występowaniem niedoboru i nadmiaru żelaza.

1.7.1. Niedobór żelaza w niewydolności serca

Obniżenie dostępności żelaza służy ochronie organizmu przed niekontrolowanym rozwojem bakterii i wirusów i stanowi jedną ze składowych ostrej fazy odpowiedzi zapalnej (APR, acute phase response) [Amaral 2019]. Niewydolność serca jest stanem w którym wzrasta

synteza cytokin prozapalnych tj. interleukinY 1 (IL-1), interleukinY 6 (IL-6) i czynnika martwicy nowotworów alfa (tumor necrosis factor α , TNF α) [Nemeth 2003]. Cytokiny prozapalne takie jak IL-2 i IL-6 stymulują syntezę hepcydyny, która nie tylko zmniejsza wchłaniania żelaza w jelitach, ale również powoduje deponowanie żelaza w układzie siateczkowo-śródbłonkowym [Koukoulas 2022]. Wzrost magazynowania żelaza w warunkach stanu zapalnego jest przy tym niezależny od ilości zapasów żelaza w komórce. Jednocześnie dochodzi do ograniczenia uwalniania żelaza z depozytów komórkowych. Zaburzenia homeostazy żelaza są nadspodziewanie często obserwowane u ludzi z niewydolnością serca - w przypadku chronicznej niewydolności serca stwierdza się je u 40-70% osób [McDonagh 2018], natomiast w przypadku ostrej niewydolności serca ten odsetek może sięgać nawet 80% [Loncar 2021]. Początkowo podejrzewano, że HF jest to specyficzny stan stresu dla organizmu, powodujący wzrost wytwarzania hepcydyny [Ohno 2015, Ghafourian 2020]. Jednak późniejsze badania wykazały, że stężenie hepcydyny, u pacjentów kardiologicznych może być prawidłowe, a nawet obniżone [Jankowska 2014, Camaschella 2018, Ghafourian 2020]. Dlatego nadal nie jest jasne, czy rozregulowanie metabolizmu żelaza w chorobach serca jest przystosowawcze (stanowi wysiłek regulacyjny organizmu w celu utrzymania komórkowej homeostazy żelaza), czy też jest nieprzystosowawcze (jest skutkiem choroby). Jeżeli zaburzenia gospodarki żelazem trwają długo, to u ludzi obserwowano jednocześnie rozwój anemii z niedoboru żelaza (iron deficiency, ID) i uszkodzenie hepatocytów z powodu nadmiaru żelaza [Schultheiss 2002].

Najczęściej stosowaną definicją niedoboru żelaza (iron deficiency, ID), przyjętą również przez Europejskie Towarzystwo Kardiologiczne (ESC), jest poziom ferrytyny $<100 \mu\text{g/L}$ lub ferrytyny (100 do $300 \mu\text{g/L}$) z wysyceniem transferyny (TSAT) $<20\%$ [McDonagh 2021]. Ta definicja ID była jednak krytykowana, ponieważ nigdy nie została zweryfikowana u pacjentów z AHF [Alnuwaysir 2021].

1.7.2. Nadmiar żelaza w niewydolności serca

Nadmiar żelaza w tkankach jest klasyfikowany jako hemochromatoza. Hemochromatoza charakteryzuje się nadmiernym magazynowaniem żelaza w komórkach Kupffera wątroby bez widocznego uszkodzenia komórek wątrobowych [Piperno 1998]. Przyczynami mogą być: duże ilości żelaza w diecie, transfuzje krwi lub talasemie [Halliday 1996]. Hemochromatoza charakteryzuje się gromadzeniem ferrytyny i hemosyderyny w hepatocytach, komórkach

Kupffera, komórkach nabłonka dróg żółciowych, sercu, trzustce, stawach i fibroblastach skóry właściwej [Powell 1998]. Akumulacja żelaza w hepatocytach, przekraczająca zdolność bezpiecznego magazynowania pierwiastka, przyczynia się do wzrostu ilości wolnych rodników. Rozwijający się stres oksydacyjny prowadzi do uszkodzenia błon komórkowych i rozwoju zmian zwyrodnieniowych takich jak zwyrodnienie balonowate i stłuszczenie. Powoduje również przyspieszoną śmierć komórek, aktywację makrofagów i rozwój reakcji zapalnej. To skutkuje włóknieniem i patologiczną przebudową struktury wątroby doprowadzającą do marskości wątroby [Lisboa 1971, Schultheiss 2002].

1.8 Suplementacja żelaza jako cel terapeutyczny

W ostatnich latach podjęto wiele prób leczenia niedokrwistości u pacjentów z CHF + ID za pomocą środków stymulujących erytropoezę i doustną lub dożylną podaż żelaza. Wykazano, że zarówno podanie ESA jak i żelaza poprawiło czynność serca i zmniejszyło nasilenie objawów CHF [Avni 2014]. W dwóch badaniach obserwacyjnych Bolger i wsp. stwierdzili, że dożylna podaż żelaza zwiększyła wydolność wysiłkową i zmniejszyła objawy CHF [Bolger 2006]. Usmanov i wsp. zaobserwowali przy dożylnym podaniu żelaza poprawę przebudowy serca i klasy niewydolności serca wg. New York Heart Association [Usmanov 2008].

2. Cel pracy

Istnieją badania łączące zaburzenia gospodarki żelazowej z przewlekłą niewydolnością serca. Diagnostyka i korygowanie tych zaburzeń stało się elementem zaleceń w leczeniu tej formy niewydolności serca. Jedynie pojedyncze doniesienia sugerują zmiany w statusie żelaza w związku z ostrą niewydolnością serca. Ten typ niewydolności serca występuje często w formie ostrego niedokrwienia mięśnia sercowego, u którego podłoża leży choroba wieńcowa. Przed homeostazą żelaza, która jest dziedziną bardzo szeroką i wciąż nie do końca poznaną, także stawia się obecnie pytania, na które wciąż brakuje satysfakcjonujących odpowiedzi. Łącząc powyższe fakty postanowiono przeprowadzić badania, które odkryją nieznane fakty leżące na styku gospodarki żelazowej i ostrego incydentu niedokrwienia mięśnia sercowego.

Ogólnym celem pracy była ocena gospodarki żelazowej w odpowiedzi na incydent ostrego niedokrwienia mięśnia sercowego na modelu świni domowej. Badano czy ostry, krótki incydent niedokrwienno może spowodować długotrwałe zaburzenia gospodarki żelazowej.

Pierwszym celem pracy była ocena gospodarki, tj. systemowego statusu żelaza (Fe^{3+} , TIBC, TSAT) oraz wybranych markerów gospodarki żelazowej w nerce, wątrobie i śledzionie (Fe^{3+} , ferrytyna, hepcydyna) w odpowiedzi odległej na incydent ostrego niedokrwienia mięśnia sercowego w modelu świni domowej.

Drugim celem było zbadanie, czy terapia zawału serca przy wykorzystaniu intramiokardialnego podania dwóch modeli terapii komórkowej wpływa istotnie na homeostazę żelaza w dalszej perspektywie.

3. Materiały i metody

3.1. Wybór świni domowej jako zwierzęcia modelowego

Jako zwierzę modelowe wybrano świnię domową (*Sus scrofa*) ze względu na podobieństwo anatomiczne, które umożliwia bezpośrednie stosowanie konwencjonalnych technik i urządzeń dostępnych dla medycyny człowieka, a także podobieństwo fizjologiczne, które opiera się na zbliżonych reakcjach układu na bodźce fizyczne i farmakologiczne. Popularność świńskiego

modelu w kardiologicznych badaniach translacyjnych jest spowodowana również największym podobieństwem reakcji patofizjologicznych do tych u człowieka w porównaniu do innych modeli zwierzęcych np. gryzoni i królików [Suzuki 2011, Paślawska 2011]. Zwierzętami opiekowano się zgodnie z wytycznymi prawa polskiego dotyczącymi warunków utrzymania zwierząt doświadczalnych, co zostało wyszczególnione we wniosku do Lokalnej Komisji Etycznej. Na wykonanie doświadczenia uzyskano uchwałę nr WAW2/185/2019 II Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach przy SGGW w Warszawie i dla grupy kontrolnej nr 23/2009 I Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach przy Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej we Wrocławiu. Ogółem w badaniu uczestniczyło 21 zwierząt.

3.2. Badanie wstępne

Wykonywane były wstępne badania: kliniczne, echokardiograficzne serca (ECHO), elektrokardiograficzne (EKG) i pobierana była krew z żyły brzeżnej ucha zgodnie z metodyką opisaną wcześniej [Wojakowski, Paślawska 2011]. Badania te wykonano w celu wykrycia i ewentualnego wykluczenia zwierząt w podklinicznym stadium choroby. Do oceny czynności skurczowej serca wykorzystano frakcję wyrzutową komory lewej (ejection fraction, EF) obliczano przy użyciu Simpsona (metoda sumowania dysków). Obliczano średnią z obrazów w projekcji koniuszkowej dwu, trzy i czterojamowej.

3.3. Wybór modelu niewydolności serca i technika wykonania zawału serca (MI)

Zaburzenia gospodarki żelazem są słabo poznane w AHF, dlatego wybrany został model ostrego niedokrwienia mięśnia sercowego - MI. MI wykonywano przez kontrolowaną okluzję tętnicy wieńcowej. W doświadczeniu udział wzięły świnię rasy wielkiej polskiej białej o początkowej masie ciała ok. 40 kg. Zwierzęta były premedykowane mieszaniną medetomidyny ($1\text{mg}/\text{m}^2$, Laboratoris SYVA S.A.U., Hiszpania; Cepetor $1\text{mg}/\text{ml}$, CP-Pharma Handelsges GmbH, Niemcy), ketaminy ($8\text{mg}/\text{kg}$ m.c., Bioketan $100\text{mg}/\text{ml}$, Vetoquinol Biowet sp. z o.o., Polska) i midazolamu ($5\text{ mg}/\text{m}^2$; Midanium, Polfa Warszawa S. A., Polska) sporządzoną *ex tempore* przed podaniem w iniekcji domięśniowej. Następnie umieszczano kateter w żyłę obwodowej (żyłę brzeżnej ucha). Wykonywane były wstępne badania – echokardiograficzne

serca (ECHO), elektrokardiograficzne (EKG) oraz pobierano krew. Badania te wykonywano w celu wykrycia i ewentualnego wykluczenia zwierząt w podklinicznym stadium choroby. Do oceny czynności skurczowej serca wykorzystywano frakcję wyrzutową komory lewej (ang. ejection fraction, EF), którą obliczano przy użyciu Simpsona (metoda sumowania dysków). Obliczano średnią z obrazów w projekcji koniuszkowej dwu, trzy i czterojamowej. Znieczulenie ogólne indukowano poprzez dożylną iniekcję propofolu (2-5 mg/kg m.c. wg efektu działania; Propomidor 10mg/ml, Orion Pharma, Finlandia), przeprowadzano intubację dotchawiczą i kontynuowano zabieg w znieczuleniu wziewnym izofluranem (2-4 vol%, Vetflurane, Virbac, Francja) i dożylnym fentanylem (1,5-3 µg/kg m.c.; Fentadon 50 mg/ml, Eurovet Animal Health BV, Wielka Brytania). Następnie metodą Seldingera uzyskiwano przezskórny dostęp do tętnicy biodrowej, w której umieszczano koszulkę naczyniową. Przez koszulkę wprowadzano prowadnik uniwersalny, dzięki któremu bezpiecznie umieszczano koniec cewnika prowadzącego w opuszcze aorty. W następnej kolejności końcówkę cewnika umieszczano w lewej tętnicy wieńcowej. Prawidłowe położenie cewnika potwierdzano poprzez wstrzyknięcie środka kontrastującego opartego na jodzie. Takie badanie angiograficzne było następnie rejestrowane i służyło jako punkt odniesienia do dalszych etapów procedury. Badanie to stanowiło także źródło pomiarów, w oparciu o które podejmowano decyzje, co do wyboru rozmiaru balonu oraz stopnia jego wypełnienia. Poprzez cewnik do tętnicy wieńcowej zstępującej wprowadzano prowadnik angioplastyczny. Po prowadniku zsuwano balon angioplastyczny do gałęzi międzykomorowej przedniej lewej tętnicy wieńcowej (left anterior descending artery – LAD). Jako miejsce okluzji wybrano część LAD dystalną do pierwszej dużej gałęzi diagonalnej. Po wypełnieniu balonu angioplastycznego i uzyskaniu w jego wnętrzu ciśnienia, które umożliwiło rozprężenie balonu do średnicy koniecznej do okluzji tętnicy wykonywano kolejne badanie angiograficzne, którego celem było potwierdzenie odcięcia przepływu krwi w LAD dystalnie względem balonu. Stan okluzji utrzymywano przez 30 minut, po czym następowała stopniowa deflacja balonu (zmniejszanie ciśnienia i objętości), aż do całkowitego przywrócenia przepływu przez LAD. To potwierdzane było końcowym badaniem angiograficznym. Zarówno w trakcie okluzji, jak i po niej, w trakcie reperfuzji, dochodziło do zaburzeń rytmu serca, które w razie potrzeby korygowane były podaniem leków antyarytmicznych (lidokaina wg efektu działania; Lignocainum hydrochloricum WZF 2%, Polfa Warszawa, Polska) lub przerywane defibrylacją. Po okresie reperfuzji w grupach zwierząt leczonych podawano ludzkie komórki macierzyste przy

użyciu systemu NOGA tj. pod kontrolą systemu elektrofizjologicznego. Komórki mezenchymalne i mioblasty pochodziły z hodowli komórkowych z Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu. Zwierzęta po przeprowadzeniu całej procedury wybudzano ze znieczulenia ogólnego.

3.4. Schemat badania

Zwierzęta podzielono losowo na cztery grupy:

- Grupa kontrolna (6 zwierząt) – zwierzęta wprowadzane były w znieczulenie ogólne i uzyskiwano dostęp dotętniczy poprzez umieszczenie koszulki naczyniowej w tętnicy udowej, ale nie wykonywano okluzji naczynia wieńcowego.
- Grupa MI (ostrego niedokrwienia mięśnia sercowego prowadzącego do AHF) – (5 zwierząt) zwierzęta po wprowadzeniu w stan znieczulenia ogólnego miały indukowany ostry incydent niedokrwienia serca zgodnie z powyższym opisem. Dodatkowo do mięśnia lewej komory poprzez iniekcję endokardialną podawano sól fizjologiczną tuż po zawale jak i w 28 dniu po zawale.
- Grupa MI+L1 – (5 zwierząt) grupa tzw. zawał wczesny. MI indukowano tak jak w grupie poprzedniej, jednak tuż po zawale podane zostały podane drogą iniekcji endokardialnej komórki mezenchymalne, a w 28 dniu po zawale mioblasty.
- Grupa MI+L2 – (5 zwierząt) grupa tzw. zawał późny - MI indukowano tak jak w grupie poprzedniej, jednak tuż po zawale w formie iniekcji endokardialnej podano płyn fizjologiczny a w 28 dniu po zawale podano obie populacje komórek, zarówno komórki mezenchymalne, jak i mioblasty.

Od dnia indukcji zawału do dnia eutanazji zwierzętom podawano doustnie lek przeciwplatekrowy – 75 mg kwasu acetylosalicylowego (ABREA, KRKA, Słowenia). Zwierzętom, które otrzymywały komórki macierzyste podawana doustnie lek immunosupresyjny takrolimus w dawce 0,1 mg/kg masy ciała 2x dziennie w celu osłabienia odpowiedzi immunologicznej (Prograf, Astellas Pharma US, Inc.). Po obserwacji 3 miesięcznej, przed eutanazją, zwierzęta wprowadzane były w stan znieczulenia ogólnego wg podanego wyżej

schematu, w celu przeprowadzenia terminalnego pobrania krwi, badań EKG, ECHO i badania elektrofizjologicznego. Następnie zwierzęta poddawano eutanazji poprzez pogłębienie narkozy dożylnym podaniem pentobarbitalu. Po potwierdzeniu zgonu zwierzęcia wykonywano sekcję zwłok z pobraniem próbek narządów: wątroby, nerki i śledziona, które zabezpieczano poprzez witrifikację w ciekłym azocie, a następnie przechowywano w temperaturze -80°C oraz konserwowano w 10% buforowanej formalinie celem poddania dalszej obróbce histologicznej.

3.5. Western Blotting

3.5.1. Ferrytyna

W celu izolacji ferrytyny stosuje się homogenizację tkanki w wodzie i ogrzewanie tak uzyskanego homogenatu w temp. 80°C [Bezkorovainy 1980]. Podgrzewanie nie powoduje utraty struktury trzeciorzędowej przez ferrytynę, natomiast pozostałe białka ulegają denaturacji i mogą zostać usunięte z roztworu poprzez wirowanie [Harrison 1996, Bertrand 1979]. Próbkę tkanki wątroby, nerki i śledziony, w których zamierzano oznaczyć łańcuch lekki i ciężki ferrytyny ważono (fragmenty około 50 mg), po zważeniu homogenizowano w homogenizatorze TissueRuptor Qiagen w wodzie o objętości stanowiącej czterokrotność masy tkanki. Uzyskany homogenat inkubowano w 80°C przez 10 minut. Następnie homogenat wirowano w 13 tys. obr./min. przez 15 minut i po wirowaniu do dalszej analizy pozostawiano supernatant – wyciąg tkankowy wzbogacony w ferrytynę. Czystość tak uzyskanego roztworu ferrytyny jest oceniana na 72-75% [Miyazaki 2002].

Próbki rozdzielano w warunkach nieredukujących SDS PAGE (8% żel), po czym prowadzono transfer na membranę PVDF (Millipore). Po transferze membranę przepłukiwano w buforze Quentix Signal Enhancer (Pierce) i blokowano przez 1h w 5% odtłuszczonego mleku w PBS zawierającym 0.5 % (v/v) Triton X-100 (Sigma), a następnie inkubowano przez noc w 4°C z odpowiednim przeciwciałem (Tab.2).

Białko wykrywane	Przeciwciało pierwszego rzędu	Przeciwciało drugiego rzędu
FTL	Anti-Ferritin Light Chain antibody Abcam (ab186871)	Anti-Rabbit IgG Sigma-Aldrich (A6154)
FTL	Ferritin light chain Antibody Santa Cruz Biotechnology (sc-14420)	Donkey anti-Goat IgG (H+L) Sigma-Aldrich (A15999)
FTH	Anti-Ferritin Heavy Chain antibody Abcam (ab231253)	Anti-Rabbit IgG Sigma-Aldrich (A6154)
Hepcydyna	Anti-Hepcidin-25 antibody Abcam (ab30760)	Anti-Rabbit IgG Sigma-Aldrich (A6154)
Ferroportyna	Anti-SLC40A1 antibody [C2] Abcam (ab239583)	Anti-Mouse IgG Sigma-Aldrich (A9044)

Tabela 2. Przeciwciała zastosowane w metodzie western blotting

Przeciwciała pierwszorzędowe były wykrywane za pomocą odpowiednich przeciwciał drugorzędowych skoniugowanych z enzymem peroksydazą chrzanową (HRP). Sygnał chemiluminescencyjny wywoływano poprzez inkubację membran w odczynniku Super Signal West Femto (Thermo) i wykrywano za pomocą urządzenia ChemiDoc. Ze względu na sposób przygotowania próbki (brak białek nieodpornych na denaturację w wysokiej temperaturze) nie była możliwa normalizacja skierowana na standardowo używane w tym celu białka. Wobec tego pomiary normalizowano na masę tkanki użytą w przygotowywaniu homogenatu.

3.5.2. Hepcydyna

Ze względu na małe rozmiary hepcydyny, która jest hormonem peptydowym, do oznaczania tego białka w wątrobie metodą Western Blotting zastosowano procedury dla małych białek.

Fragmety tkanek ważono i homogenizowano w roztworze Tissue Extraction Reagent (Thermo) z dodatkiem mieszaniny inhibitorów proteaz (Thermo). Homogenaty inkubowano na lodzie przez 15 minut, a następnie wirowano w 13 tys. obr./min. w temp. 4°C. W supernatancie

mierzono białko metodą BCA. Do rozdzielania elektroforetycznego używano komercyjnego żelu gradientowego Bio-Rad TGX 4-20%. Do studzienek żelu наносono 125 µg białka. Rozdział prowadzono w redukujących warunkach SDS PAGE. Rozdzielone elektroforetycznie białka transferowano na membranę Immobilon P^{SQ} (Millipore) gwarantującą lepszą adsorpcję małych białek. Posługiwano się także metodą szybkiego transferu półsuchego (Trans-Blot Turbo Transfer System). Aby wzmocnić sygnał membrany po transferze płukano w zestawie roztworów West Femto Signal Enhancer i blokowano w 5% roztworze odtłuszczonego mleka w PBS z dodatkiem 0,5% Triton X-100. Membrany inkubowano w roztworze przeciwciała pierwszorzędowego w roztworze blokującym przez noc w temp. 4°C następnie wykrywano je przeciwciałem drugiego rzędu z HRP (Tabela 2). Proces wywoływania i archiwizacji sygnału chemiluminescencyjnego odbywał się analogicznie do tego w metodzie oznaczania łańcucha lekkiego i łańcucha ciężkiego Ponadto w celu normalizacji pomiarów z membran usuwano przeciwciała pierwszego i drugiego rzędu, ponownie blokowano roztworem odtłuszczonego mleka i poddawano ponownej inkubacji z przeciwciałem przeciwko dehydrogenazie aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH) a następnie z przeciwciałem drugiego rzędu i wywoływano sygnał identycznie jak w poprzednio wspomnianych przypadkach.

Uzyskane prążki reprezentujące badane białka analizowano densytometrycznie przy pomocy programu Bio-Rad Image Lab. W celach porównawczych wybrano jednego z badanych osobników jako tzw. kalibratora. Próbką odpowiadającą temu osobnikowi towarzyszyła każdej serii pomiarów stanowiąc punkt odniesienia do dalszych obliczeń. Wyniki stanowiły stosunek badanego parametru próbki do wartości parametru uzyskanego dla osobnika – kalibratora. Takie rozwiązanie pozwalało zniwelować potencjalne różnice w mocy sygnału poszczególnych serii pomiarowych.

3.5.3. Barwienie błękitem pruskim żeli białkowych

Wyciągi tkankowe wzbogacone w ferrytynę (przygotowane tak jak w punkcie 3.5.1) z wątroby, śledziony i nerki poddawano identycznemu rozdzielaniu elektroforetycznemu. Rozdzielano w 8% żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE, warunki nieredukujące). Żele białkowe barwiono w mieszaninie 5% roztworu żelazicyjanku potasu - $K_4Fe(CN)_6$ i 5% kwasu solnego (1:1). Żelazo na 3 stopniu utlenienia (Fe^{3+}) wybarwiała się w postaci stabilnego kompleksu błękitu pruskiego. Błękitne prążki odpowiadały położeniem prążkom łańcucha

lekkiego i ciężkiego ferrytyny w metodzie Western blotting. Po procesie barwienia żel przepłukiwano wodą i fotografowano przy pomocy urządzenia ChemiDoc w celu archiwizacji i dalszej analizy densytometrycznej użyciem programu Image Lab. Podobnie jak w analizie Western blotting w barwieniu błękitem pruskim po rozdiale elektroforetycznym użyto jednego z osobników jako kalibratora w celu niwelacji ewentualnych różnic pomiędzy seriami pomiarowymi.

3.6. Pomiar TIBC

Pomiar całkowitej zdolności transferyny do wiązania żelaza przeprowadzono przy użyciu komercyjnego zestawu Total Iron-Binding Capacity (TIBC) and Serum Iron Assay Kit (Abcam ab239715) zgodnie z załączoną instrukcją. Do pomiaru użyto surowicy krwi zwierząt z ostrą niewydolnością serca odpowiednio z pobrania w dniu incydentu ostrego niedokrwienia mięśnia sercowego oraz z dnia badania terminalnego i eutanazji.

3.7. Pomiar stężenia żelaza w surowicy krwi i parametry biochemiczne

Pomiar poziomu żelaza w surowicy krwi został wykonany przez komercyjne diagnostyczne laboratorium weterynaryjne Vetlab we Wrocławiu, łącznie z panelem pozostałych oznaczeń biochemicznych.

3.8. Pomiar BNP-26 i troponiny I

Pomiar BNP-26 wykonano z użyciem komercyjnie dostępnego zestawu ELISA, dla świńskiego białka wyprodukowanego przez BMA Biomedicals, Peninsula Laboratories. Materiałem była surowica świń pobrana w dwóch punktach czasowych – 28 i 88 dzień doświadczenia. Ten sam materiał posłużył także do oznaczeń troponiny I, które przeprowadzono w zewnętrznym laboratorium SYNLAB Vet GmbH w Lipsku.

3.9. Barwienie błękitem pruskim preparatów histologicznych

Tkanki zabezpieczone w postaci bloczków parafinowych poddano cięciu na skrawki histologiczne mikrotomem. Skrawki przeniesiono na szkiełka histologiczne i poddano

deparafinizacji w szeregu ksylenu a następnie w szeregu alkoholowym kończąc na przepłukaniu w wodzie. Przygotowany w ten sposób preparat barwiono błękitem pruskim poprzez zanurzenie w 5% roztworze żelazicyjanku potasu - $K_4Fe(CN)_6$ połączonym z 5% HCl (1:1) na 30 minut. Preparat był następnie przepłukiwany wodą i poddawany barwieniu kontrastującym Nuclear Fast Red (Sigma-Aldrich) w celu uwidocznienia struktur tkankowych niewybarwionych błękitem pruskim, a następnie płukany w wodzie. Zabarwiony w ten sposób preparat przeprowadzano z powrotem przez szereg alkoholi i ksylenów, po czym pokrywano balsamem kanadyjskim Histofluid w celu naklejenia szkiełka nakrywkowego.

Gotowe preparaty skanowane były za pomocą skanera mikroskopowego 3D Histech w wysokiej rozdzielczości. Ocenę preparatów dokonywano w 5-7 reprezentatywnych polach widzenia. W przypadku nerek oceniano odrębnie korę i rdzeń narządu (pięć pól w każdej z części). Wybrane obrazy były następnie analizowane za pomocą oprogramowania ImageJ [Jensen 2013]. Ponieważ barwny sygnał jest nałożony na obraz tła struktur tkankowych niezbędne jest jego wyodrębnienie z całości zdjęcia. Analiza obrazu polegała na dekonwolucji koloru – rozdzieleniu kolorowego obrazu na trzy kanały kolorów, z których jeden odpowiadał najbliższemu analizowanemu kolorowi barwienia błękitem pruskim. Proces przejścia z wielokolorowego obrazu do obrazu zawierającego jedynie kolor barwienia błękitem pruskim był konieczny ze względu na to, że kolejny etap protokołu da się użyć wyłącznie w obrazach monochromatycznych [Singh 2005]. Kolejnym etapem analizy była segmentacja metodą progowania. Korzystając z histogramu jasności pikseli wybrano zakres progu, który najtrafniej odpowiadał pozytywnemu sygnałowi zabarwienia błękitem pruskim. Obraz żelaza uzyskany w preparatach histologicznych miał dwoistą formę. Z jednej strony zawartość żelaza na 3 stopniu utlenienia wyrażona była obecnością zdyfundowanego błękitnego zabarwienia cytoplazmy komórek, które nie miało wyraźnych odgraniczeń i zajmowało większe obszary. Z drugiej zaś strony żelazo Fe^{3+} widoczne było w postaci zbitych złogów, które najczęściej przybierały kształty owalnych granul niewielkiego rozmiaru (do kilkunastu μm) czasami przyjmującymi układy wypełniające wnętrze komórek. Aby dostosować analizę do takiej prezentacji wybarwienia żelaza parametry segmentacji przez progowanie zostały dobrane w dwóch zestawach tak, aby uwzględniać w głównym stopniu jedną lub drugą postać sygnału. Obróbka obrazu poprzez progowanie wyodrębnia pożądaną postać sygnału z tła i upraszcza jego ilościowe oszacowanie. Obraz przekonwertowany do formy binarnej poddawany był działaniu

odpowiednich filtrów dotyczących wielkości i kształtu sygnałów. Zakwalifikowane pola odpowiadające miejscom wybarwionym błękitem pruskim były zliczane uwzględniając ich liczbę i powierzchnię [Hartig SM]. Wynik w postaci względnej powierzchni pola widzenia (% area) był parametrem wyjściowym do dalszej analizy statystycznej.

3.10. Immunohistochemia

Na skrawkach histologicznych z wątroby, śledziony i nerki przeprowadzono reakcje immunohistochemiczne, ukierunkowane na wykrywanie łańcucha lekkiego oraz łańcucha ciężkiego ferrytyny. Do wykrywania łańcuchów ferrytyny użyto przeciwciał:

- Anti-Ferritin Light Chain antibody Abcam (ab186871)
- Anti-Ferritin Heavy Chain antibody Abcam (ab231253)

Reakcje immunohistochemiczne przeprowadzono za pomocą urządzenia Autostainer, które w zautomatyzowany sposób przeprowadza reakcję na serii preparatów gwarantując wysoką precyzję i powtarzalność wykonanej techniki. Podobnie jak w przypadku barwienia preparatów błękitem pruskim preparaty immunohistochemiczne zostały zeskanowane w celu dalszej analizy obrazu. W tym przypadku także użyto programu ImageJ, jednak modyfikacji uległy kody kolorów w etapie dekonwolucji koloru, tak aby wyizolować warstwę koloru odpowiadającą kolorowi pozytywnej reakcji immunohistochemicznej. Dalsze etapy również podległy nieznacznym modyfikacjom. Dostrojenia wymagały na przykład parametry segmentowania obrazu przez progowanie, jednak zasada a także etapy analizy przebiegały identycznie. Ponadto przeprowadzono wizualną ocenę półilościową intensywności reakcji immunohistochemicznej w wybranych strukturach badanych organów. Dla wątroby oceniano intensywność reakcji w trzech strefach zrazika anatomicznego - obwodowej, pośredniej i centralnej, a także w tkance łącznej okołozrazikowej. W śledzionie oddzielnej ocenie poddano miazgę białą, miazgę czerwoną i torebkę. W przypadku nerek osobno oceniano rdzeń i korę, z uwzględnieniem bardziej szczegółowych struktur histologicznych – kanalików krętych bliższych i dalszych, kłębuszków nerkowych.

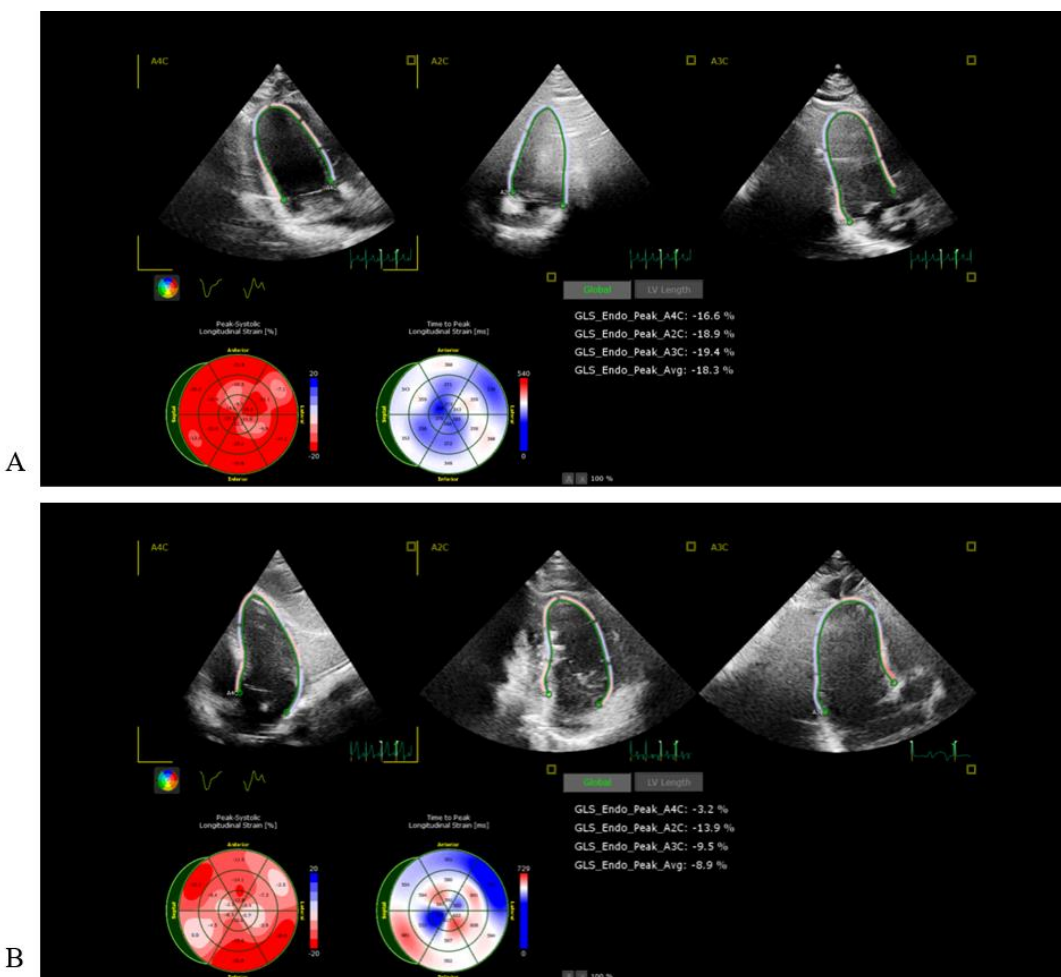
3.11. Statystyczna analiza danych

Statystyczną analizę danych przeprowadzono za pomocą programu Statistica, wersja 13.3 (StatSoft, Polska). Rozkład danych badano przy użyciu testu Shapiro-Wilka. Istotność statystyczną ustalono na poziomie $p < 0,05$. Istotność statystyczną różnic pomiędzy wieloma grupami badano przy użyciu testu Anova oraz testu Kruskala-Walisa.

4. Wyniki

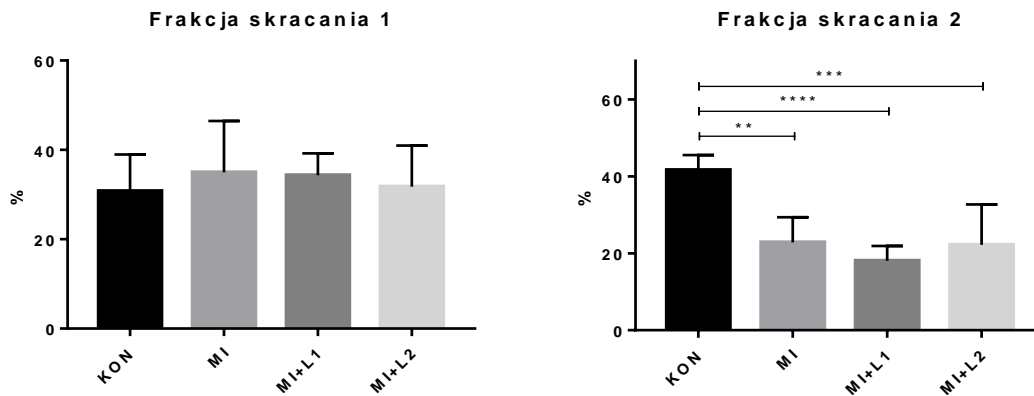
4.1. Badanie echokardiograficzne

W badaniu echokardiograficznym zaobserwowano istotne zaburzenia czynności w okresie indukcji zawału. Ani w badaniu przed zawałem, ani w czasie badań kontrolnych nie wykazano przekroczenia wartości fizjologicznych. Ryc. 15 A. Bezpośrednio po indukcji zawału obserwowano spadek czynności komory lewej. Ryc. 15 B.



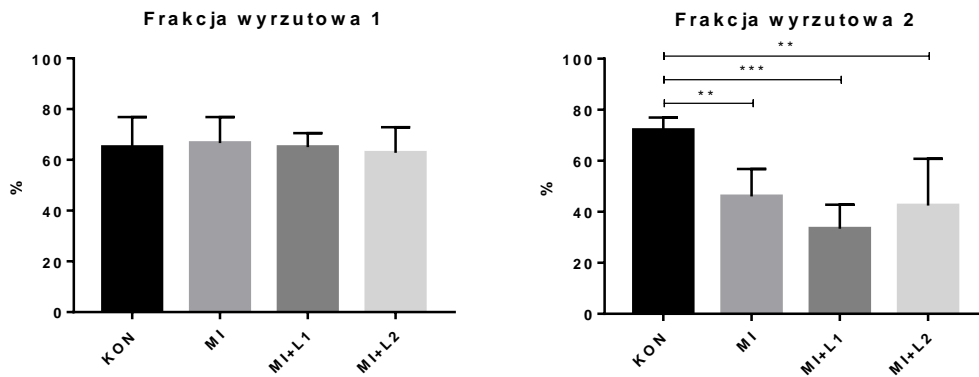
Ryc. 15. Badanie echokardiograficzne reprezentatywnej świni. Projektcja koniuszkowa dwu-, trój- i czterojamowa dla obliczenia globalnej czynności komory lewej. A) świnią przed indukcją zawału wszystkie segmenty komory lewej wykazują prawidłową czynności skurczową

i rozkurczową B) badanie po indukcji zawału. Widoczny jest spadek czynności serca spowodowany obecnością segmentów hipokinetycznych. Analiza odkształcenia segmentów mięśnia komory metodą strain.



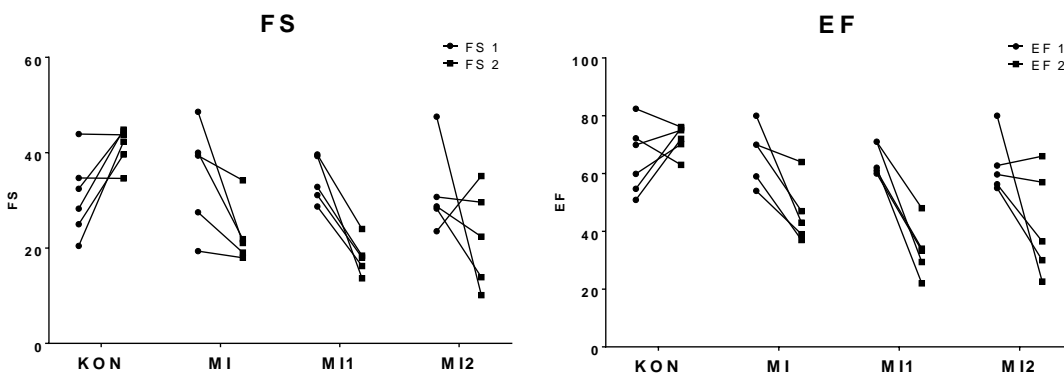
Ryc. 16. Wykresy przedstawiające uśrednione pomiary frakcji skracania z odchyleniami standardowymi dla badanych grup. Wyniki z badania 1 – przed zawałem (wykres po lewej) oraz podczas kontroli na zakończenie doświadczenia (wykres po prawej).

Fracja skracania nie wykazała zróżnicowania grup istotnego statystycznie w pierwszym pomiarze echokardiograficznym. W drugim pomiarze natomiast potwierdzona została istotna statystycznie różnica (ANOVA, $p < 0,0001$), oraz potwierdzone różnice pomiędzy grupą KON a grupami: MI ($p = 0,0011$), MI+L1 ($p < 0,0001$) oraz MI+L2 ($p = 0,0008$). W grupie KON w drugim pomiarze frakcja skracania była większa niż w pozostałych grupach.



Ryc. 17. Wykresy przedstawiające uśrednione pomiary frakcji wyrzutowej z odchyleniami standardowymi dla badanych grup. Wyniki z badania 1 – przed zawałem (wykres po lewej) oraz podczas kontroli na zakończenie doświadczenia (wykres po prawej).

Frakcja wyrzutowa w pierwszym pomiarze echokardiograficznym nie wykazywała zróżnicowania między grupami. Drugi pomiar wykazał istotne statystycznie zróżnicowanie między grupami (ANOVA, $p=0,0002$) z różnicami pomiędzy grupą KON a grupami: MI ($p=0,0088$), MI+L1 ($p<0,0002$) oraz MI+L2 ($p=0,0030$). W przypadku frakcji wyrzutowej w drugim pomiarze grupa kontrolna osiągnęła największe wartości.



Ryc. 18. Wykresy przedstawiające zmianę frakcji skracania (wykres po lewej) oraz frakcji wyrzutowej (wykres po prawej) u poszczególnych osobników z podziałem na grupy. Kółkami

oznaczono wartość pierwszego pomiaru, kwadratami wartość pomiaru drugiego. Oba punkty połączone odcinkiem dla zobrazowania tendencji.

Zarówno we frakcji skracania jak i we frakcji wyrzutowej widoczna była tendencja wzrostowa parametru w perspektywie badania w dwóch punktach czasowych dla grupy kontrolnej (KON). W przypadku pomiarów wykonanych u osobników z grup badanych, z wywołanym ostrym incydem niedokrwienia mięśnia sercowego widać wyraźne tendencje spadkowe obu parametrów.

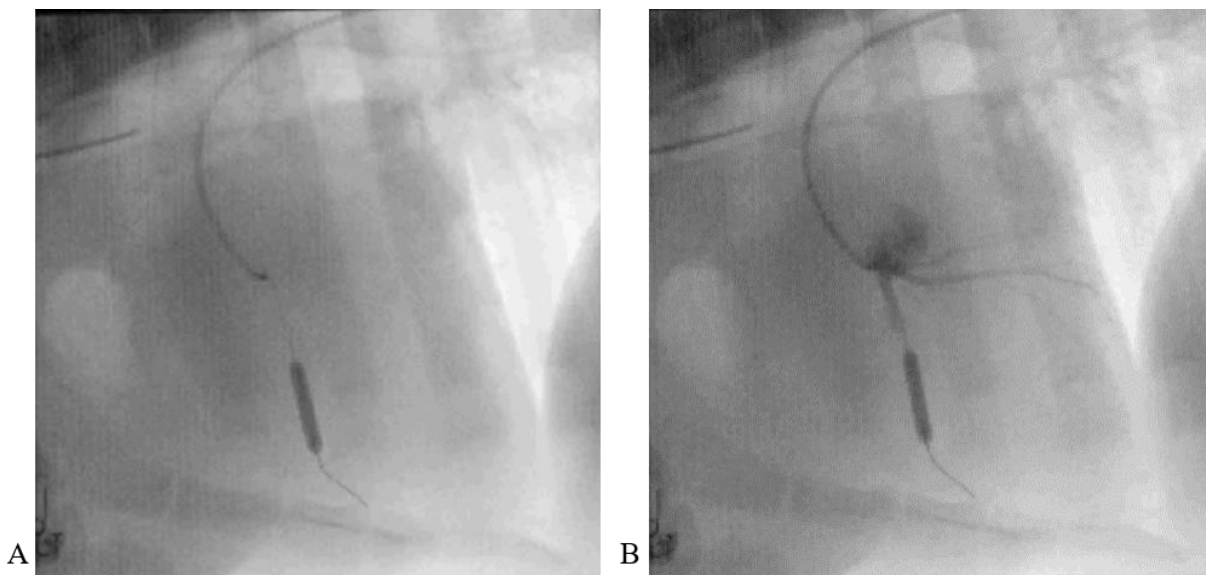
4.2. Badanie elektrokardiograficzne

U żadnej ze świń nie stwierdzono zaburzeń rytmu w badaniu wstępnym i w badaniach kontrolnych. U wszystkich świń obserwowano zaburzenia elektrokardiograficzne w okresie indukcji zawału w postaci uniesienia segmentu ST, wzrostu amplitudy załamka T, częstoskurczy komorowych i nadkomorowych, pojedynczych epizodów migotania komór.

U wszystkich świń nasilenie arytmii następowało w okresie reperfuzji, ale udało się je umiarować za pomocą farmakoterapii lub w razie potrzeby przez mechaniczne kompresje klatki piersiowej oraz defibrylację.

4.3. Badanie angiograficzne

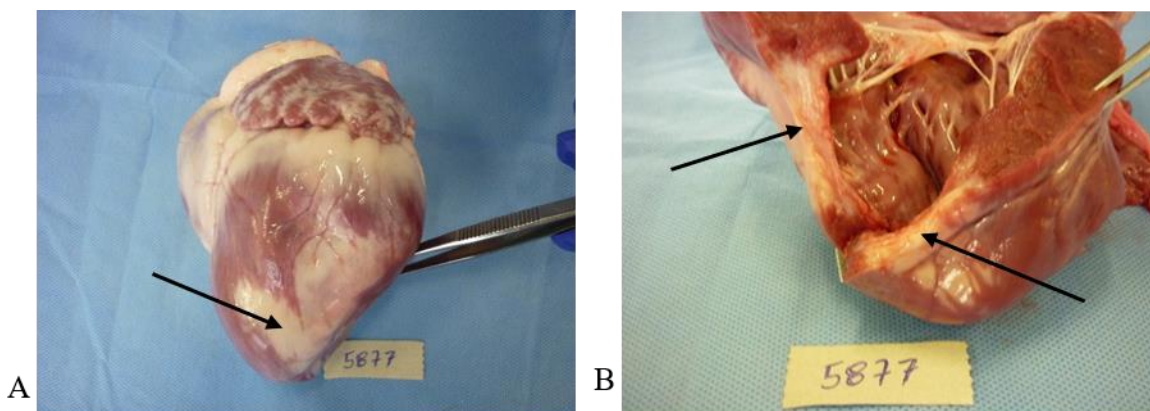
W badaniu angiograficznym oceniano obrazy z koronarografii lewej tętnicy wieńcowej. Badanie pozwoliło na ocenę przebiegu gałęzi międzykomorowej przedniej (LAD) oraz jej odgałęzień. Na tej podstawie dokonywano identyfikacji prawidłowego położenia balonu angioplastycznego przed jego rozprężeniem. Po podaniu kontrastu do lewej tętnicy wieńcowej potwierdzono obecność skutecznej okluzji tętnicy wieńcowej - brak wykontrastowania dalszego biegu tętnicy za balonem. Ryc. 19.



Ryc. 19. Badanie angiograficzne podczas wykonywania modelu zawałowego. A) widoczny cewnik prowadzący umieszczony u ujścia lewej tętnicy wieńcowej, prowadnik oraz rozprężony balon angioplastyczny w świetle tętnicy. B) Badanie kontrastowe. Do ujścia lewej tętnicy wieńcowej został podany bolus środka kontrastującego. Widać wypływ zwrotny z tętnic wieńcowych do opuszki aorty, wykontrastowaną i drożną gałąź okalającą oraz zamkniętą balonem gałąź międzykomorową przednią.

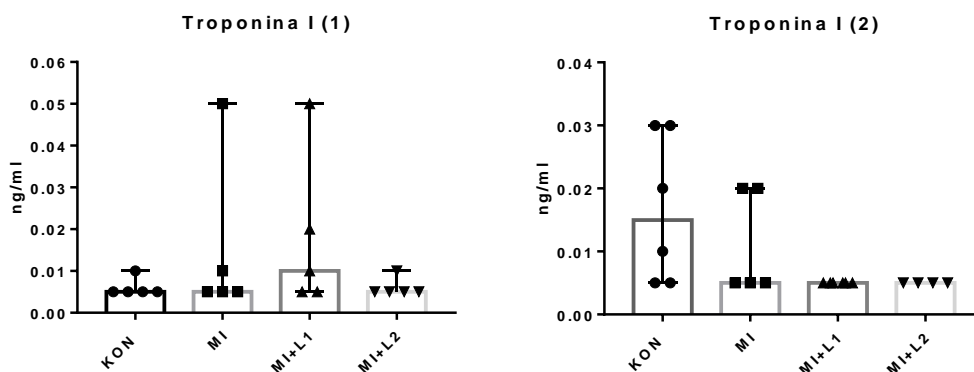
4.4. Badanie pośmiertne

W badaniu pośmiertnym obserwowano zmiany nekrotyczne w okolicy koniuszka lewego, obejmujące w mniejszym lub większym zakresie również ścianę przednio-boczną komory lewej (strzałka) odpowiadające segmentom za unaczynionym za miejscem okluzji. Ryc. 20 A i B.



Ryc. 20. Badanie sekcyjne świni z eksperymentalnie wywołanym zawałem serca, u której obszar zawału był największy. A) strzałka wskazuje obszar martwicy zawałowej B) strzałki wskazują miejsca w których na przecięciu widać, iż zawał objął całą grubość ściany lewej komory.

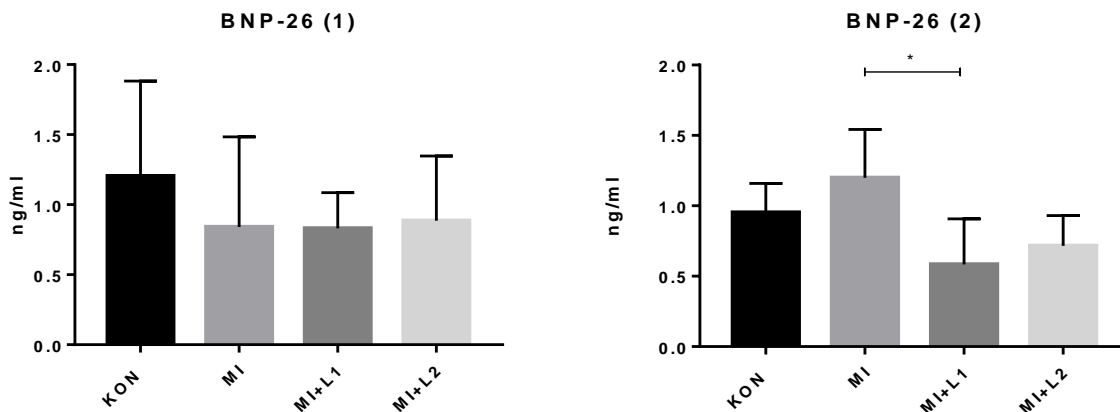
4.5. Troponina I oraz BNP



Ryc. 21. Wykresy przedstawiające uśrednione pomiary troponiny dla badanych grup oraz wartość pomiarów dla poszczególnych osobników. Wyniki z badania 1 – 28 dni po zawałe (wykres po lewej) oraz podczas kontroli na zakończenie doświadczenia (wykres po prawej).

Wykonane oznaczenia troponiny I przybrały bardzo niskie wartości. Zaledwie 7 wyników w pierwszym badaniu oraz 6 w badaniu drugim osiągnęły lub przewyższyły dolny próg

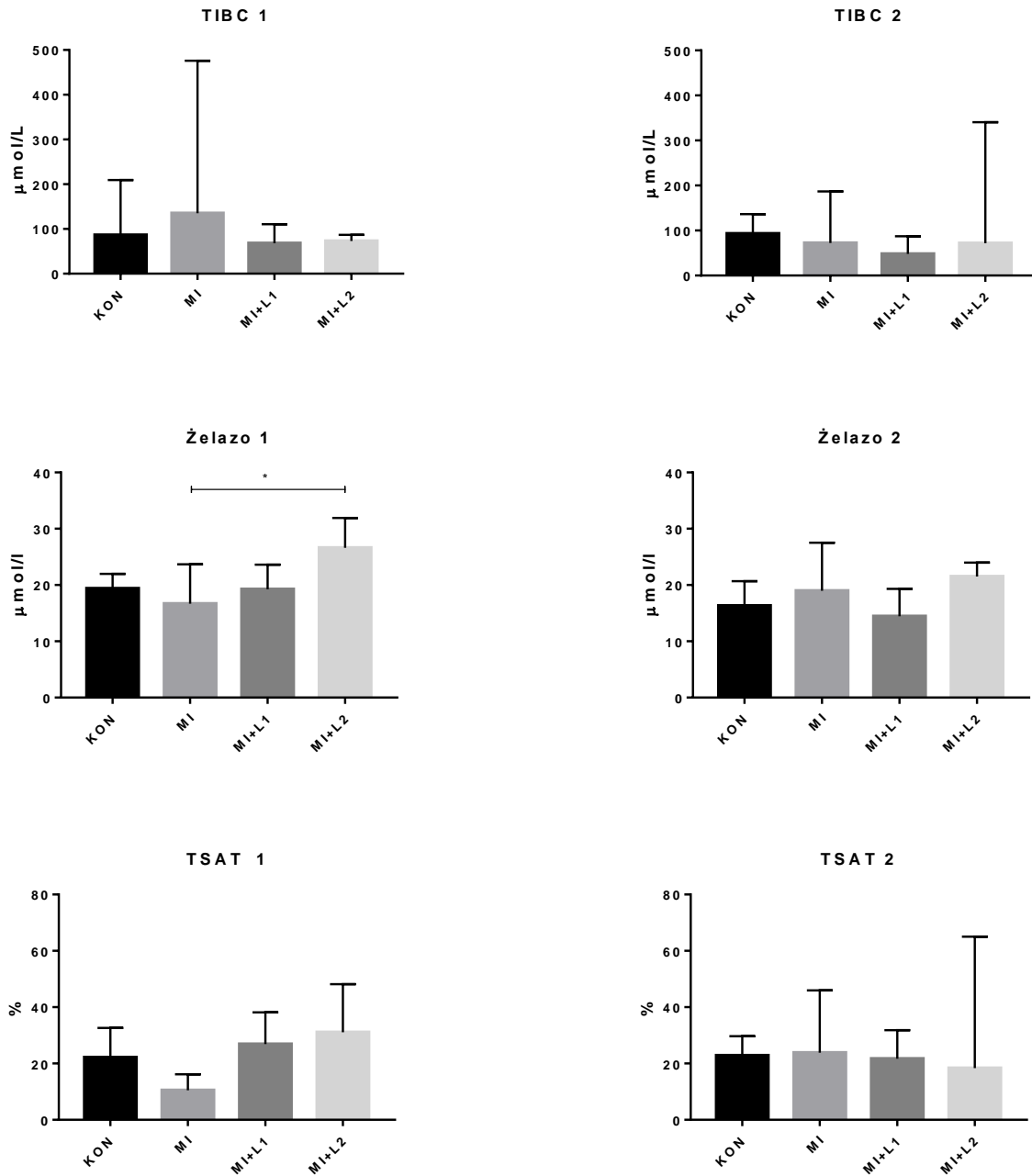
czułości testu (0,01 ng/ml). Dla pomiaru pierwszego (dzień 28 po MI) nie wykazano istotnej statystycznie różnicy pomiędzy grupami. W pomiarze drugim (badanie końcowe) test Kruskala-Wallisa wykazał zróżnicowanie pomiędzy grupami z $p=0,0426$ jednak testowanie post-hoc nie wykazało istotnych różnic pomiędzy żadną z par grup. Najbardziej zróżnicowane okazały się grupy KON oraz MI+L1 z $p=0,0716$.



Ryc. 22. Wykresy przedstawiające mediany z 95% przedziałem ufności pomiarów BNP-26 dla badanych grup oraz wartość pomiarów dla poszczególnych osobników. Wyniki z badania 1 – 28 dni po zawale (wykres po lewej) oraz podczas kontroli na zakończenie doświadczenia (wykres po prawej).

Analiza wyników pomiaru BNP-26 testem ELISA w pierwszym pomiarze nie wykazała różnic istotnych statystycznie pomiędzy grupami. W drugim pomiarze natomiast test Kruskala-Wallisa wykazał różnice między grupami ($p=0,0237$) z różnicą między parą grup MI oraz MI+L1 ($p=0,0354$).

4.6. Całkowita zdolność wiązania surowicy (TIBC), procent wysycenia transferyny żelazem (TSAT), koncentracja żelaza.

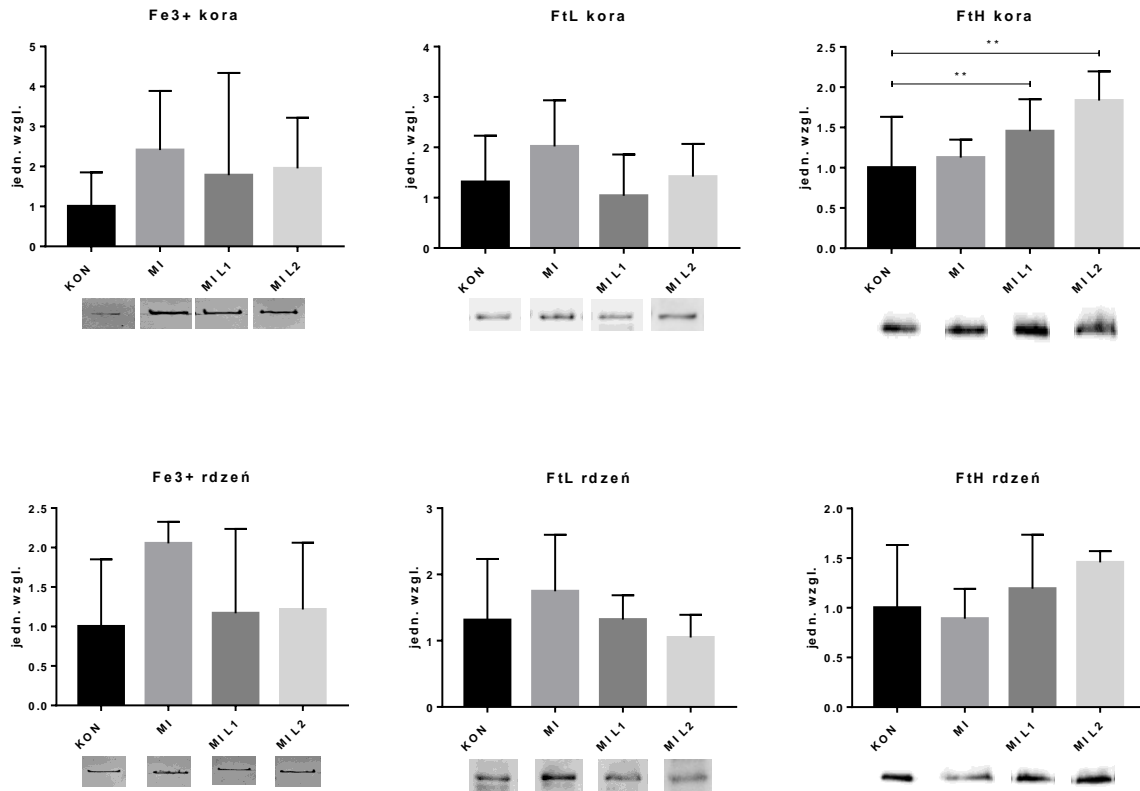


Ryc. 23. Wyniki pomiarów TIBC, stężenia żelaza w surowicy oraz TSAT w 28 dniu po zawale (wykresy po lewej) oraz na zakończenie doświadczenia (wykresy po prawej). Wyjściowe badania krwi nie wykazały odchyłeń od normy w zakresie parametrów hematologicznych

i biochemicznych. Badanie TIBC Oznaczenia parametrów gospodarki żelazowej wykonane w surowicy krwi nie były zróżnicowane. Różnic istotnych statystycznie nie wykazano w przypadku całkowitej zdolności wiązania żelaza (TIBC), zarówno w pomiarze 1 (28 dzień doświadczenia) ani w pomiarze 2 (badanie końcowe). W przypadku pierwszego pomiaru stężenia żelaza w surowicy krwi wykazano między grupami różnice istotne statystycznie (ANOVA, $p=0,0384$). Analiza post-hoc wskazała na różnicę między grupą MI oraz MI+L2 (Tukey, $p=0,0316$). Końcowy pomiar stężenia żelaza nie wykazywał różnic istotnych statystycznie między grupami. Podobnie wysycenie transferyny (TSAT) nie wykazywało różnic między grupami w żadnym z pomiarów.

4.7. Oznaczenia w żelu poliakrylamidowym po rozdziale elektroforetycznym białek:

4.7.1. Żelazo, łańcuch lekki i ciężki ferrytyny – nerka



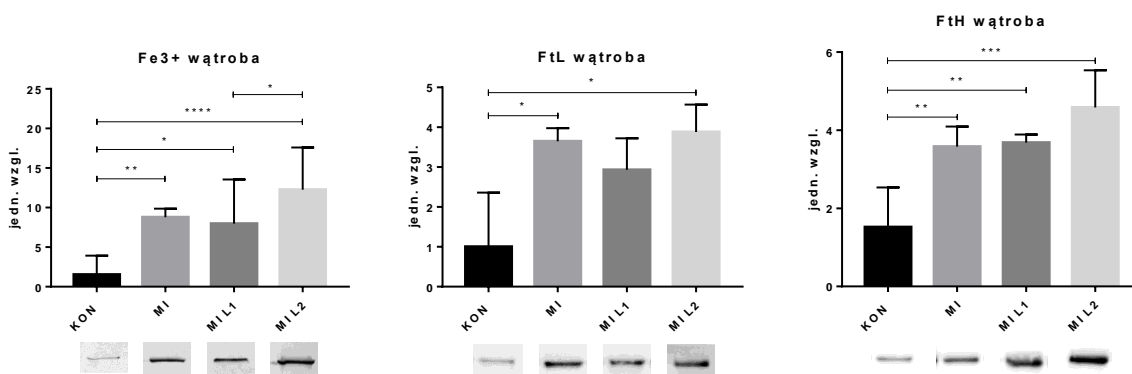
Ryc. 24. Wyniki pomiarów żelaza oraz łańcucha lekkiego i ciężkiego ferrytyny w korze i rdzeniu nerki.

Analiza statystyczna wyników barwienia błękitem pruskim próbek narządów w żelu poliakrylamidowym po rozkładzie elektroforetycznym w przypadku nerek nie wykazała istotnych różnic między grupami, zarówno w dla kory jak i rdzenia narządu.

Oznaczenie łańcucha lekkiego ferrytyny metodą western blotting w tkance nerki nie wykazało istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi grupami zarówno dla kory nerki jak i dla jej rdzenia.

W oddzielnym oznaczeniu łańcucha ciężkiego ferrytyny metodą western blotting dla kory i rdzenia nerki wykazano istotne statystycznie zróżnicowanie grup dla kory nerki (ANOVA, $p=0,0029$). Analiza post-hoc testem Tukeya wskazała na istotne różnice pomiędzy grupą kontrolną (KON) a grupą z leczeniem nr 2 (MI+L2) z wartością $p=0,0041$ oraz pomiędzy grupą zawału (MI) a grupą MI+L2 ($0,0068$). Dla rdzenia nerki nie wykazano różnic istotnych statystycznie.

4.7.2. Żelazo, łańcuch lekki i ciężki ferrytyny – wątroba



Ryc. 25. Wyniki pomiarów żelaza oraz łańcucha lekkiego i ciężkiego ferrytyny w tkance wątroby.

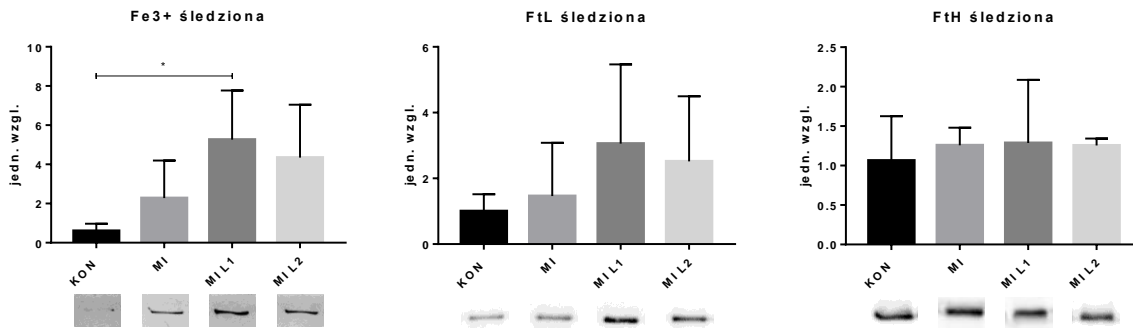
W przypadku barwienia błękitem pruskim na żelazo potwierdzono istotne statystycznie zróżnicowanie między grupami (ANOVA, $p=0,0001$). Porównania wielokrotne testem Tukeya wskazały istotne różnice pomiędzy grupą kontrolną (KON) a pozostałymi grupami: $p=0,0074$ z grupą MI, $p=0,0165$ z grupą MI+L1 oraz $p < 0,0001$ z grupą MI+L2. Dodatkowo istotna statystycznie różnica występowała pomiędzy grupami leczenia eksperymentalnego MI+L1 oraz MI+L2 ($p=0,043$). W każdym z tych przypadków sygnał łańcucha ciężkiego był silniejszy w grupach badanych niż w grupie kontrolnej.

W przypadku oznaczenia łańcucha lekkiego ferrytyny w tkance wątroby porównanie grup testem Kruskala-Wallisa wykazało istotne statystycznie zróżnicowanie pomiędzy grupami ($p=0,0066$). Analiza post-hoc Dunna wykazała istotne różnice pomiędzy grupą kontrolną (KON) a grupą zawału (MI) oraz pomiędzy grupą kontrolną (KON) a grupą zawału z leczeniem

nr 2 (MI+L2). W obu przypadkach sygnał łańcucha lekkiego ferrytyny był ponad trzykrotnie silniejszy w grupach MI oraz MI+L2 niż w grupie kontrolnej.

Oznaczenia łańcucha ciężkiego ferrytyny w mięszu wątroby wykazały istotne statystycznie zróżnicowanie między grupami (ANOVA, $p=0,0002$). Porównania międzygrupowe testem Tukeya potwierdziły istotne różnice pomiędzy grupą kontrolną (KON) a pozostałymi grupami: $p=0,0049$ z grupą MI, $p=0,0079$ z grupą leczenia nr 1 (MI+L1) oraz $p=0,0001$ z grupą MI+L2. W każdym z tych przypadków sygnał łańcucha ciężkiego był silniejszy w grupach badanych niż w grupie kontrolnej.

4.7.3. Żelazo, łańcuch lekki i ciężki ferrytyny– śledziona

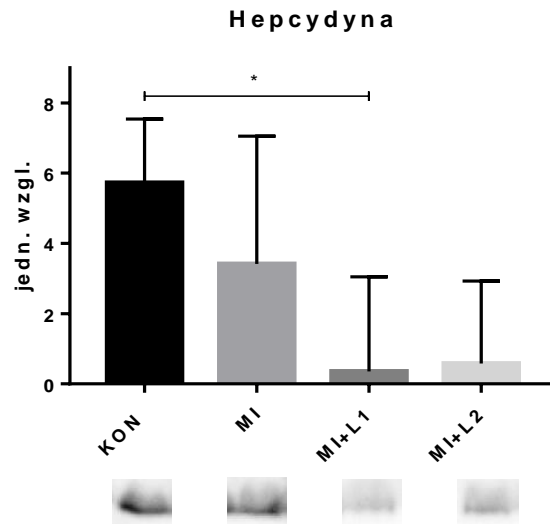


Ryc. 26. Wyniki pomiarów żelaza oraz łańcucha lekkiego i ciężkiego ferrytyny w tkance śledziona.

W oznaczeniach żelaza błękitem pruskim wykonanych w mięszu śledziona potwierdzono istotną statystycznie różnicę pomiędzy grupą KON a grupą MI+L1 (Kruskal-Wallis $p=0,0229$; Dunn $p=0,0234$).

W śledziona podobnie jak w przypadku nerek nie wykazano istotnej statystycznie różnicy między badanymi grupami w oznaczeniu łańcucha lekkiego ani łańcucha ciężkiego ferrytyny.

4.7.4. Hepcydyna – wątroba

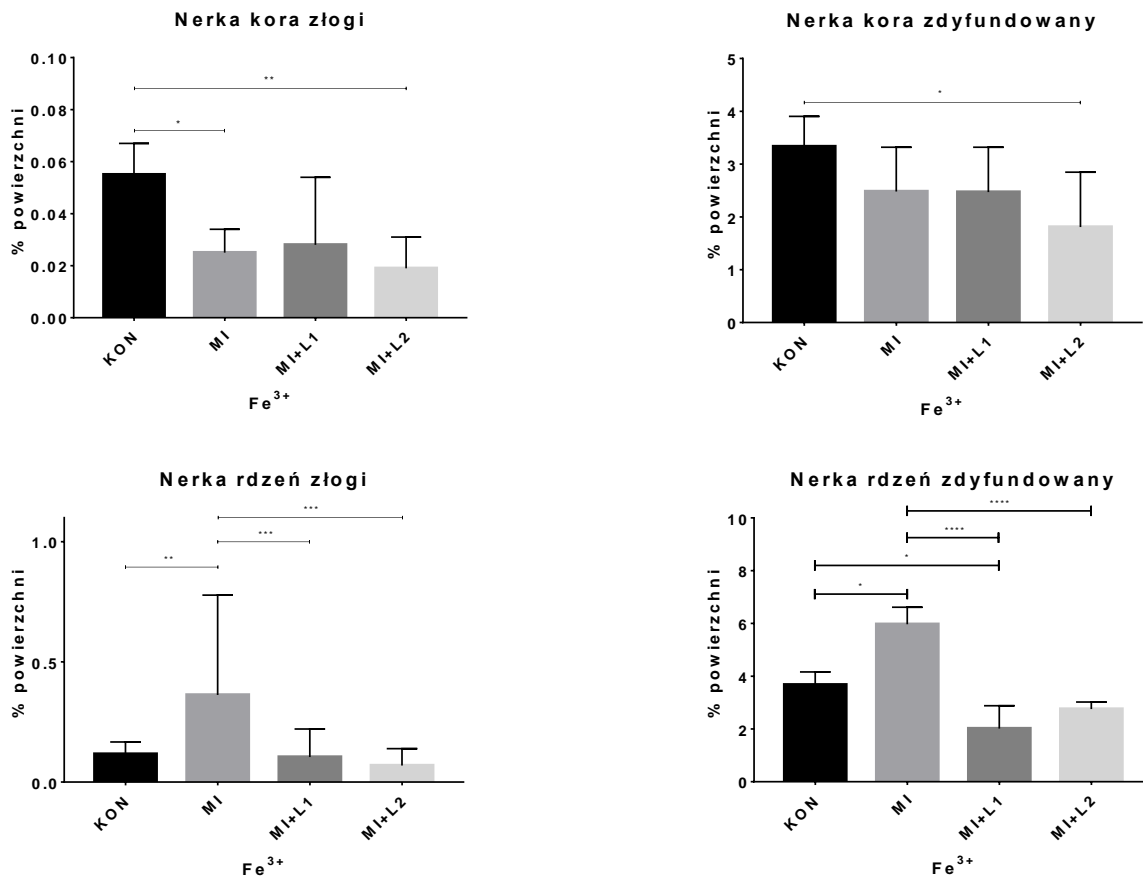


Ryc. 27. Wyniki pomiaru ilości białka hepcydyny w wątrobie.

W tkance nerek i śledziony ilość hepcydyny była poniżej czułości testu dlatego jej oznaczenie okazało się możliwe tylko w próbkach pobranych z wątroby. Analiza statystyczna wykazała istotne różnice między grupami (Kruskal-Wallis, $p=0,0139$). Testowanie post-hoc potwierdziło istotną różnicę pomiędzy grupą KON a grupą MI+L1 ($p=0,0385$). Różnica pomiędzy grupą KON a grupą MI+L2 była bliska istotności statystycznej ($p=0,0836$)

4.8. Immunohistochemia oraz barwienie błękitem pruskim na żelazo w preparatach histologicznych

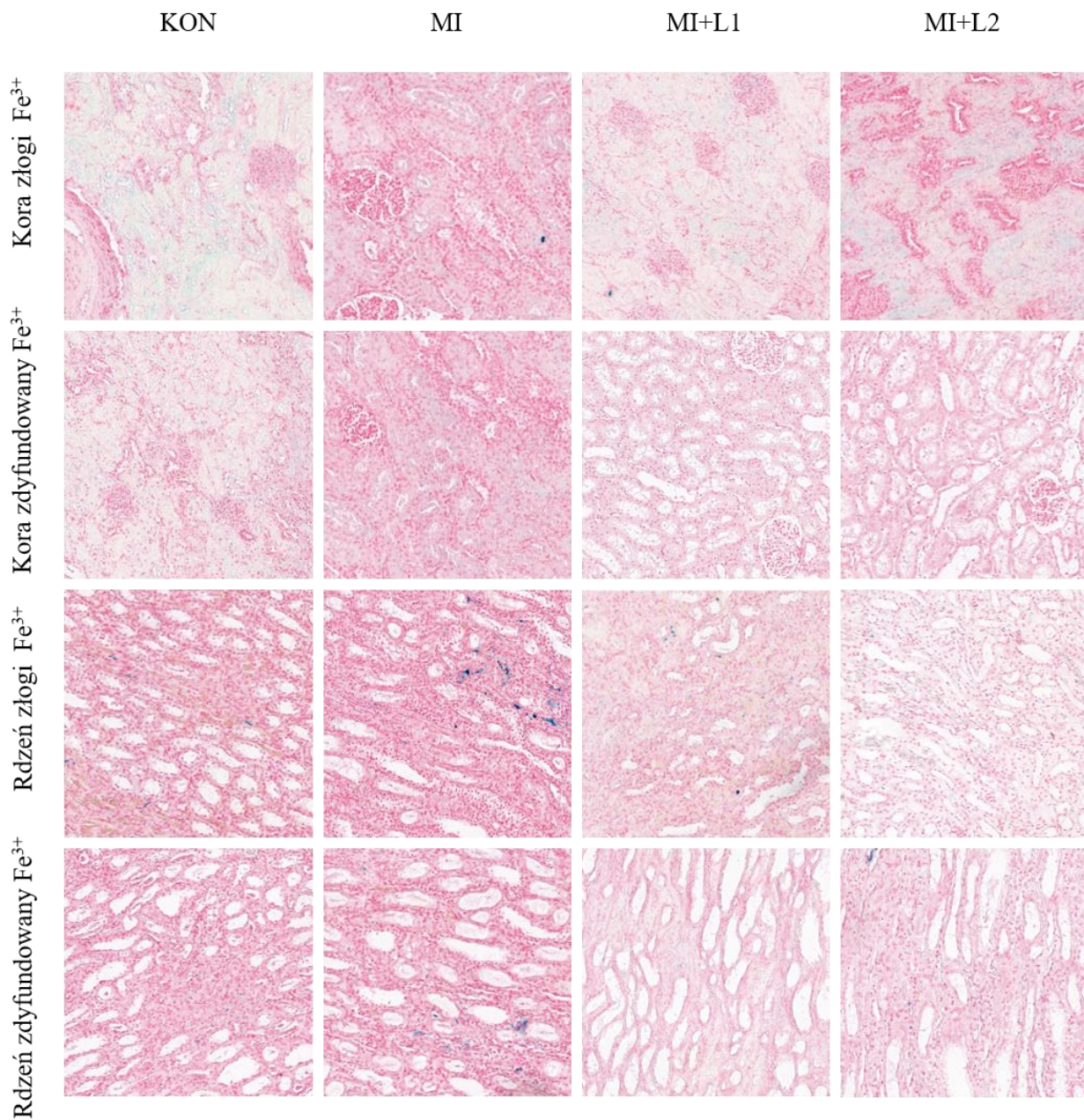
4.8.1. Żelazo, łańcuch lekki i ciężki ferrytyny – nerka



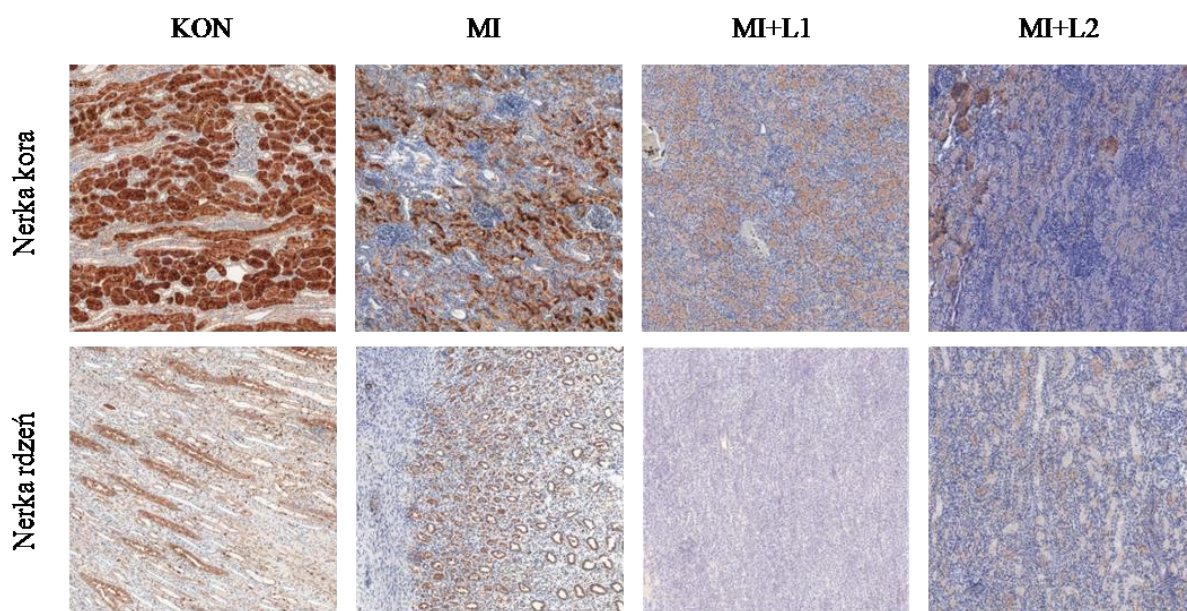
Ryc. 28. Wyniki barwienia na żelazo błękitem pruskim preparatów z nerek.

Barwienie błękitem pruskim preparatów histologicznych uwzględniało dwie formy analizowanego sygnału. Silny skupiony sygnał w złogach, oraz rozproszony, dyfundowany sygnał o mniejszym natężeniu. W przypadku złogów żelaza w korze nerki analiza statystyczna wykazała istotne różnice między badanymi grupami (Kruskal-Wallis, $p=0,0003$). Według analizy post-hoc przeprowadzonej testem Dunna różnice wystąpiły pomiędzy grupą KON a MI ($p=0,0115$) oraz KON a MI+L2 ($p=0,0005$). Zdyfundowany barwnik w korze nerki także wykazywał różnice (Kruskal-Wallis, $p=0,0436$) między grupami KON a MI+L2 ($p=0,0352$).

Złogi żelaza w rdzeniu nerki także wykazywały zróżnicowanie międzygrupowe (Kruskal-Wallis, $p=0,0003$). Dotyczyło ono porównania grup: KON oraz MI ($p=0,0045$), MI oraz MI+L1 ($p=0,0008$) a także MI oraz MI+L2 ($p=0,0003$). Barwnik zdyfundowany w rdzeniu nerki był grupowo zróżnicowany (Kruskal-Wallis, $p<0,0001$). Wielokrotne porównanie testem Dunna potwierdziło istotne różnice pomiędzy grupą KON a grupą MI ($p=0,0218$), grupą KON a grupą MI+ L1 ($p=0,0188$), pomiędzy grupami MI a MI+L1 ($p<0,0001$) a także między grupami MI oraz MI+L2 ($<0,0001$).



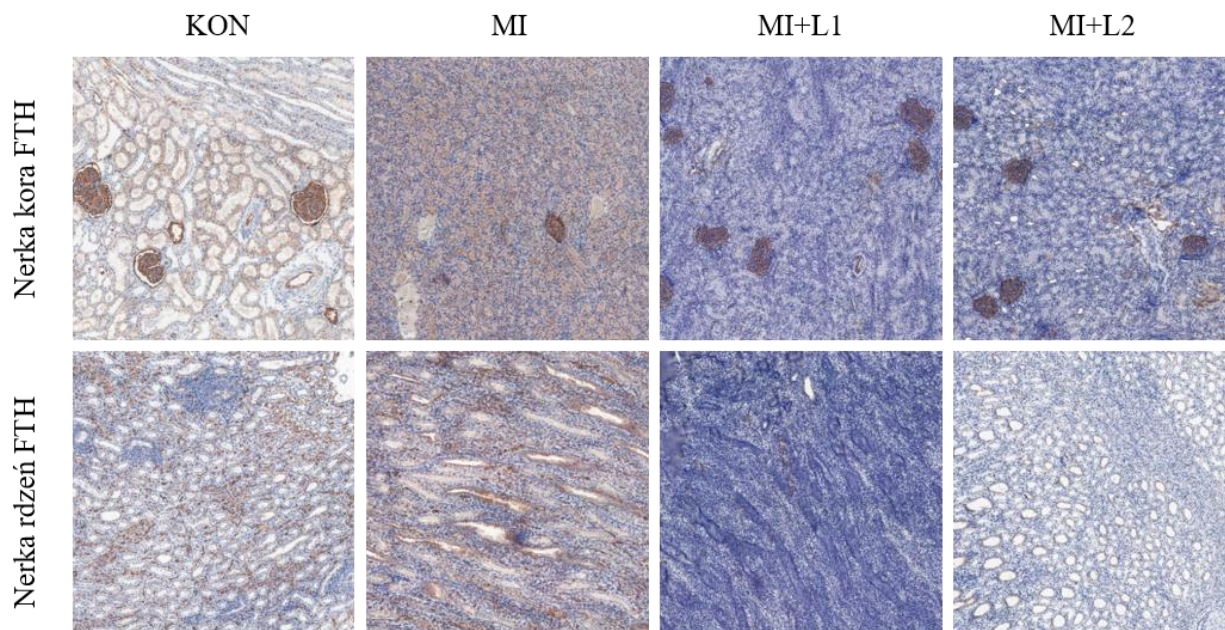
Ryc. 29. Układ przedstawiający przykładowe zdjęcia z preparatów odzwierciedlające procent powierzchni sygnału błękitu pruskiego w korze i rdzeniu nerki w czterech badanych grupach. Widoczna niska wartość sygnału (poniżej 0,5% powierzchni dla złogów oraz poniżej 6% powierzchni dla barwnika dyfundowanego)



Ryc. 30. Układ przykładowych zdjęć z reakcją immunohistochemiczną na łańcuch lekki ferrytyny dla poszczególnych grup badania w korze i rdzeniu nerki. Wyniki uzyskane dla tych zdjęć są przybliżone do median wyników grup.

	Nerka FTL						
	sygnał ogólnie	kanaliki proks.	kanaliki dyst	kłębuszki	torebka Bowmana	kora	rdzeń
KON	3,00	3,00	3,00	1,50	1,83	3,00	2,25
MI	2,40	2,60	1,80	1,40	0,20	2,60	1,80
MI+L1	2,00	1,80	1,00	1,20	0,40	1,80	1,50
MI+L2	1,50	2,00	0,75	0,75	0,00	1,75	1,13

Tabela 3. Średnie wartości sygnału reakcji immunohistochemicznej przyznanej wybranym strukturom nerki (w skali 0-3) barwienie na łańcuch lekki ferrytyny.

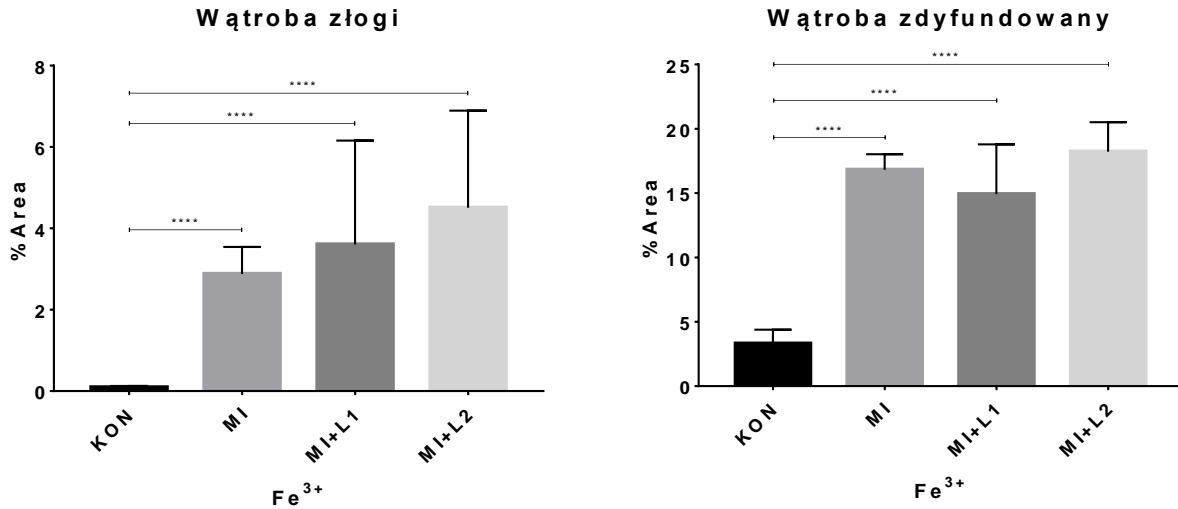


Ryc. 31. Układ przykładowych zdjęć z reakcją immunohistochemiczną na łańcuch ciężki ferrytyny dla poszczególnych grup badania w korze i rdzeniu nerki. Wyniki uzyskane dla tych zdjęć są przybliżone do median wyników grup.

	Nerka FTH						
	kanaliki proks.	kanaliki dyst.	kłębuszki	torebka Bowmana	śródbłonek	kora	rdzeń
KON	1,8	0,7	3,0	3,0	2,8	2,0	1,2
MI	2,0	2,0	3,0	3,0	2,5	2,3	1,3
MI+L1	0,4	0,2	3,0	3,0	3,0	1,2	0,0
MI+L2	1,0	0,2	3,0	2,6	2,2	1,4	0,6

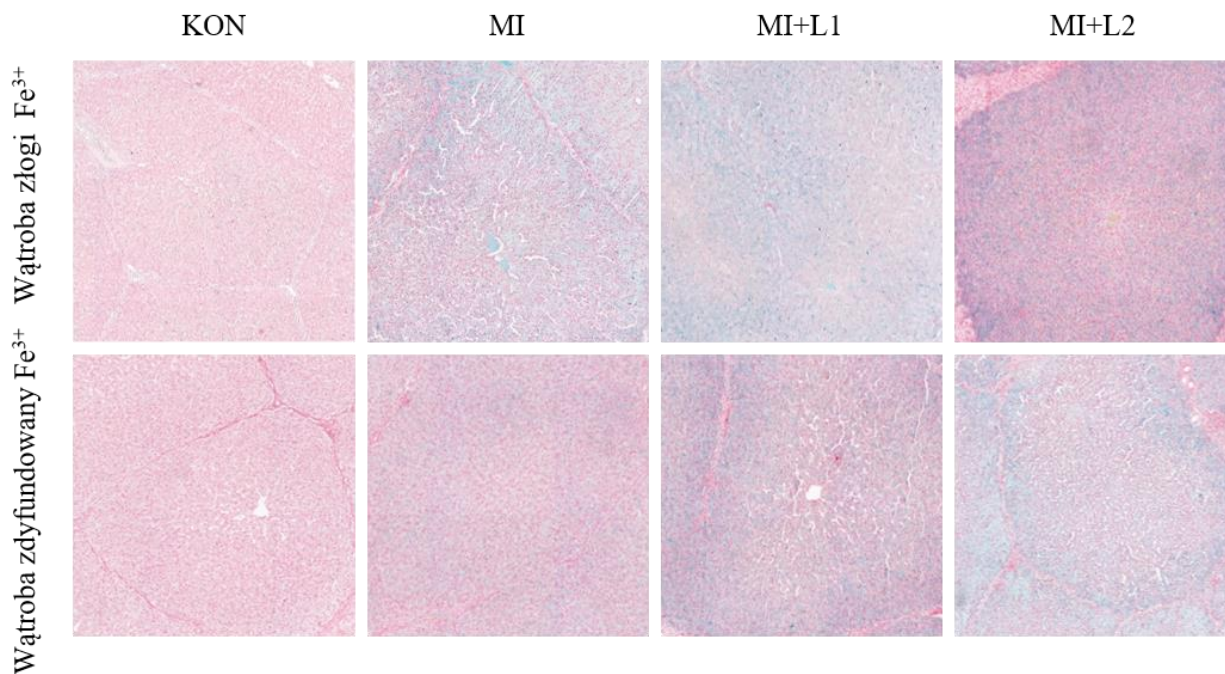
Tabela 4. Średnie wartości sygnału reakcji immunohistochemicznej przyznanej wybranym strukturom nerki (w skali 0-3) barwienie na łańcuch ciężki ferrytyny

4.8.2. Żelazo, łańcuch lekki i ciężki ferrytyny – wątroba

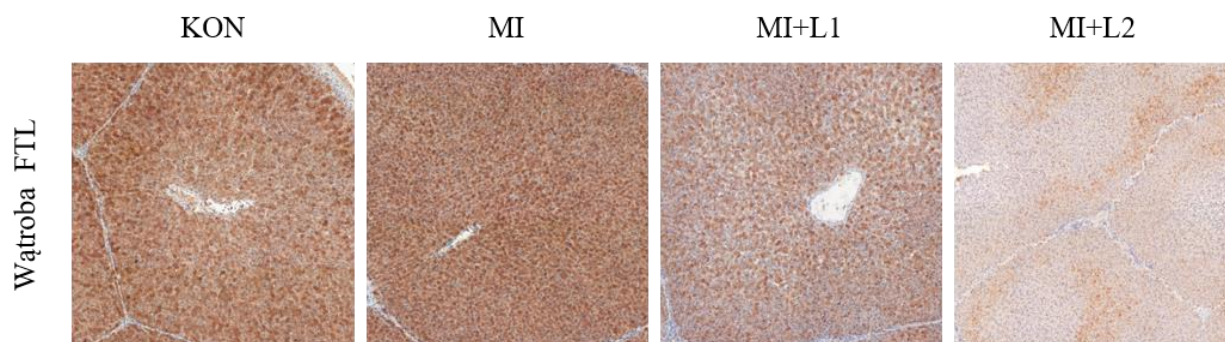


Ryc. 32. Wyniki pomiaru sygnału z barwienia błękitem pruskim w preparatach z wątroby.

Analiza statystyczna błękitu pruskiego skupionego w złogach w mięszu śledziony wykazała istotne zróżnicowanie między grupami (Kruskal-Wallis, $p < 0,0001$). Analiza post hoc potwierdziła różnice pomiędzy grupą KON a grupami: MI ($p = 0,0008$), MI+L1 ($p < 0,0001$), MI+L2 ($p < 0,0001$), a także pomiędzy grupą MI a grupami: MI+L1 ($p = 0,0005$) oraz MI+L2 ($p < 0,0001$). Sygnał zdyfundowany w śledzionie był także istotnie statystycznie różny między grupami ($p < 0,0001$). Wielokrotne porównania Dunna wskazały różnice statystycznie istotne pomiędzy grupą KON oraz MI ($p = 0,0002$), KON oraz MI+L1 ($p < 0,0001$), a także pomiędzy grupami MI+L1 i MI+L2 ($p = 0,0203$).



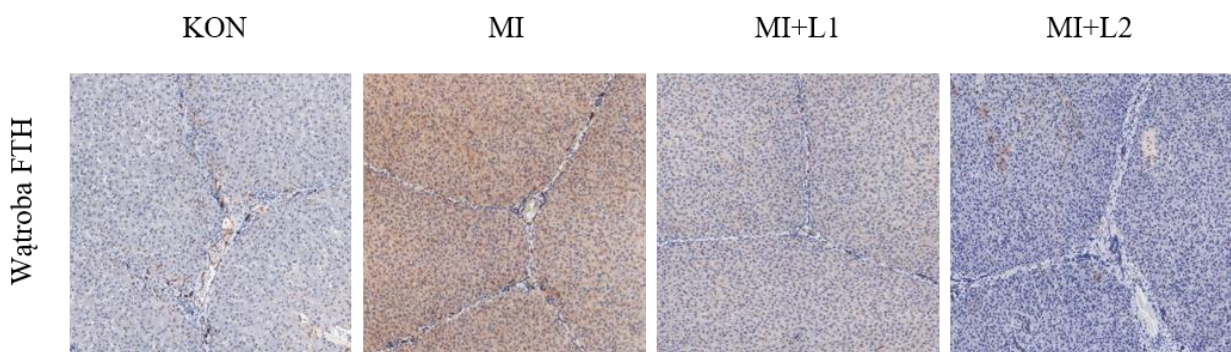
Ryc. 33. Układ przedstawiający przykładowe zdjęcia z preparatów odzwierciedlające procent powierzchni sygnału błękitu pruskiego w preparatach z wątroby w czterech badanych grupach.



Ryc. 34. Układ przykładowych zdjęć z reakcją immunohistochemiczną na łańcuch lekki ferrytyny dla poszczególnych grup badania w preparatach z wątroby. Wyniki uzyskane dla tych zdjęć są przybliżone do median wyników grup.

	Wątroba FTL				
	sygnał ogólnie	strefa 1	strefa 2	strefa 3	tk. okołozrazikowa
KON	2,83	3,00	2,83	2,83	0,17
MI	3,00	3,00	3,00	3,00	0,25
MI+L1	1,60	2,00	1,60	1,40	0,40
MI+L2	1,20	1,20	1,20	1,20	0,00

Tabela 5. Średnie wartości sygnału reakcji immunohistochemicznej przyznanej wybranym strukturom wątroby (w skali 0-3) barwienie na łańcuch lekkiej ferrytyny

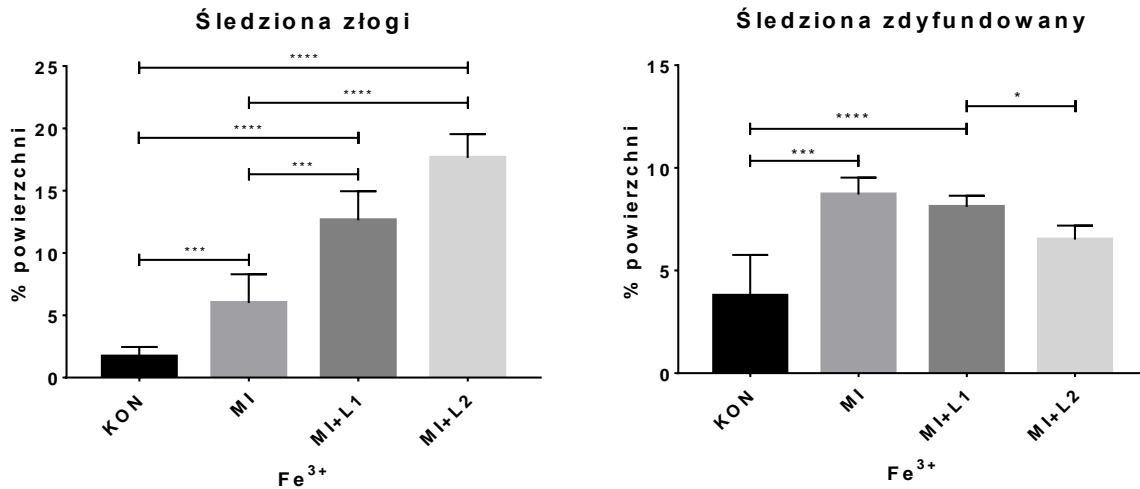


Ryc. 35. Układ przykładowych zdjęć z reakcją immunohistochemiczną na łańcuch ciężkiej ferrytyny dla poszczególnych grup badania w preparatach z wątroby. Wyniki uzyskane dla tych zdjęć są przybliżone do median wyników grup.

	Wątroba FTH				
	strefa 1	strefa 2	strefa 3	tk. okołozrazikowa	śródbłonki
KON	0,8	0,8	0,8	0,0	3,0
MI	2,4	2,2	2,4	0,0	3,0
MI+L1	0,8	0,6	0,6	0,0	2,4
MI+L2	0,6	0,6	0,6	0,0	2,6

Tabela 6. Średnie wartości sygnału reakcji immunohistochemicznej przyznanej wybranym strukturom wątroby (w skali 0-3) barwienie na łańcuch ciężkiej ferrytyny

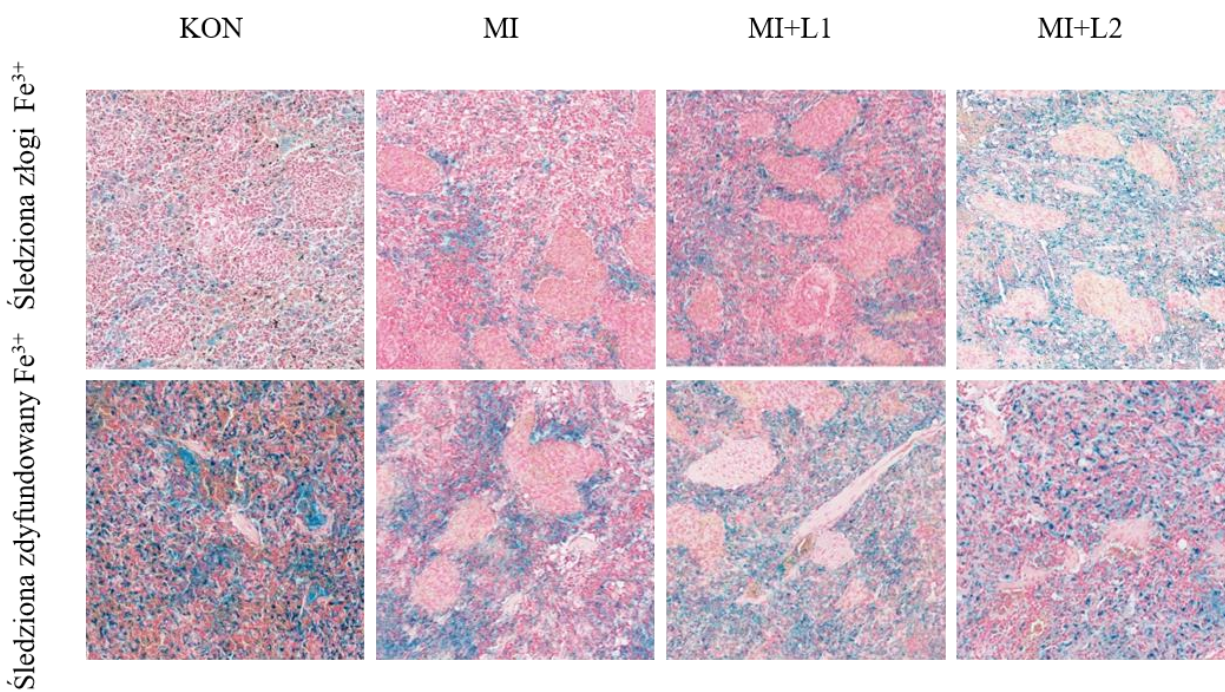
4.8.3. Żelazo, łańcuch lekki i ciężki ferrytyny – śledziona



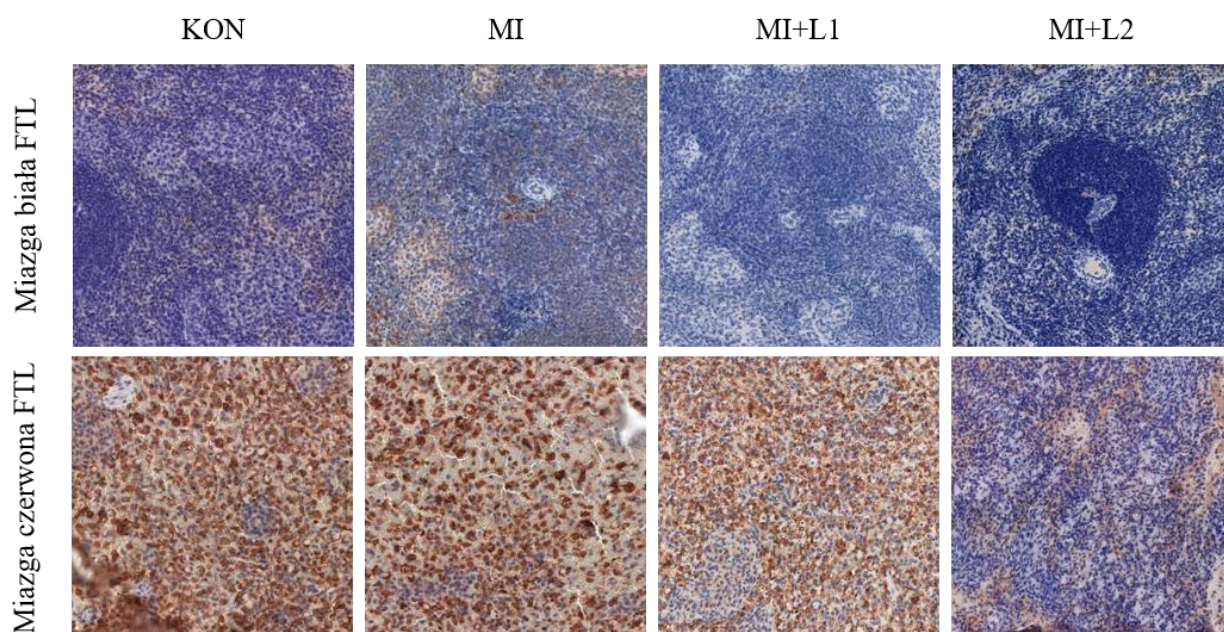
R

yc. 36. Wyniki pomiaru sygnału z barwienia błękitem pruskim w preparatach ze śledziona.

Błękit pruski w formie złożeń w mięszu wątroby wykazał zróżnicowanie między grupami (Kruskal-Wallis, $p < 0,0001$). Porównanie między grupami testem Dunna potwierdziło różnice pomiędzy grupą KON a grupami: MI ($p = 0,0002$), MI+L1 ($p < 0,0001$) oraz MI+L2 ($p = 0,0203$). Analiza statystyczna testem Kruskala-Wallisa wykazała także istotne statystycznie zróżnicowanie między grupami w pomiarze zdyfundowanego błękitu pruskiego w wątrobie ($p < 0,0001$). Porównania między grupami wskazało różnice pomiędzy KON a MI ($p < 0,0001$), KON a MI+L1 ($p < 0,0001$) oraz pomiędzy KON a MI+L2 ($p < 0,0001$).



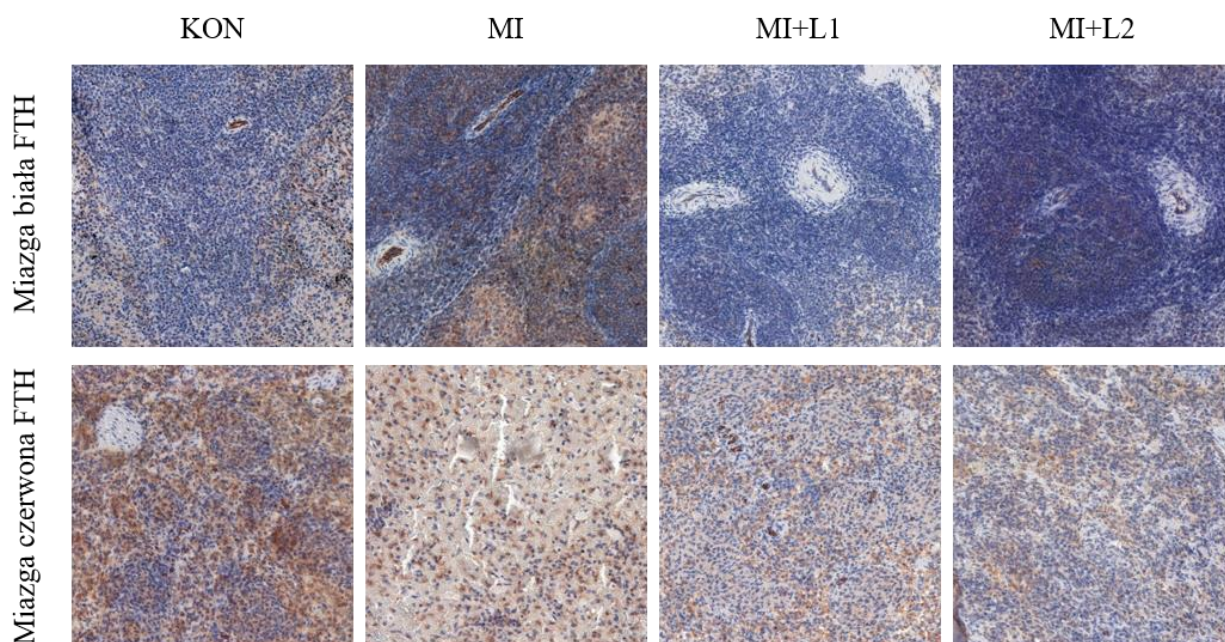
Ryc. 37. Układ przedstawiający przykładowe zdjęcia z preparatów odzwierciedlające procent powierzchni sygnału błękitu pruskiego w preparatach ze śledziony w czterech badanych grupach.



Ryc. 38. Układ przykładowych zdjęć z reakcją immunohistochemiczną na łańcuch lekki ferrytyny dla poszczególnych grup badania w preparatach ze śledziony. Wyniki uzyskane dla tych zdjęć są przybliżone do median wyników grup.

	Śledziona FTL			
	sygnał ogólnie	miazga czerwona	miazga biała	torebka
KON	2,83	3,00	2,00	0,67
MI	2,60	3,00	2,40	0,20
MI+L1	2,00	2,80	1,40	0,00
MI+L2	1,20	1,60	0,40	0,00

Tabela 7. Średnie wartości sygnału reakcji immunohistochemicznej przyznanej wybranym strukturom śledziony (w skali 0-3) barwienie na łańcuch lekki ferrytyny



Ryc. 39. Układ przykładowych zdjęć z reakcją immunohistochemiczną na łańcuch ciężki ferrytyny dla poszczególnych grup badania w preparatach ze śledziony. Wyniki uzyskane dla tych zdjęć są przybliżone do median wyników grup.

	Śledziona FTH				
	sygnał ogólnie	miazga czerwona	miazga biała	torebka	śródbłonki
KON	1,5	1,5	1,0	0,0	3,0
MI	2,4	2,4	1,2	0,0	3,0
MI+L1	1,8	2,0	0,3	0,0	2,0
MI+L2	0,8	1,2	0,6	0,2	2,2

Tabela 8. Średnie wartości sygnału reakcji immunohistochemicznej przyznanej wybranym strukturom śledziony (w skali 0-3) barwienie na łańcuch ciężki ferrytyny.

5. Dyskusja

5.1. Ocena modelu zwierzęcego MI

U wszystkich świń udało się skutecznie wyindukować zawał serca, choć rozmiar obszaru zawału nie był identyczny, co można tłumaczyć osobniczym zróżnicowaniem rozdziału zamykanej tętnicy i gęstości lub obecności unaczynienia obocznego. Świnie nie prezentowały klinicznie objawów niewydolności serca, ale badania echokardiograficzne potwierdzały obecność blizny pozawałowej, która powodowała postępujące pogorszenie czynności komory lewej, wyrażające się istotnym spadkiem frakcji skracania i frakcji wyrzutowej. W badaniu pośmiertnym potwierdzono obecność blizny zawałowej w oczekiwanym obszarze. Analizowane parametry echokardiograficzne nie wykazywały istotnych różnic pomiędzy grupą zawałową MI (terapia placebo) a grupami z eksperymentalną terapią komórkami macierzystymi (MI+L1, MI+L2). Oczekiwano, że terapia komórkowa poprawi czynność skurczową serca, ale tak się nie stało. Natomiast zgodnie z oczekiwaniami markery uszkodzenia mięśnia sercowego nie były podniesione ani w badaniu po 28 dniach, ani w badaniu po 3 miesiącach. W doświadczeniu zostały wykorzystane standardowe markery: troponina I oraz czynnik peptydu natiuretycznego typu B (BNP). Stężenie troponiny I gwałtownie wzrasta w pierwszych godzinach po zawale, ale zwykle już po tygodniu powraca do normy [Adams 1993, Morrow 2007]. Podwyższone stężenie BNP utrzymuje się dłużej niż troponin, zwykle do 2-3 tygodni [Durak-Nalbantić 2012]. Prawidłowe stężenie obu markerów uszkodzenia kardiomiocytów niewątpliwie świadczy iż zastosowana metoda intramiokardialnego podawania komórek macierzystych nie spowodowała zwiększenia urazu mięśnia sercowego u świń z zawałem serca, a rozwijająca się dysfunkcja komory lewej nie spowodowała jeszcze istotnego przeciążenia miokardium. Nie stwierdzono też obecności arytmii, co było ważne w kontekście wcześniejszych badań wspomnianych we wstępie, w których wykazano że terapia MI komórkami macierzystymi stwarza wiele okoliczności sprzyjających rozwojowi zaburzeń rytmu [Almeida 2015, Pak 2003]. W medycynie człowieka nie ma jednomyślności w ocenie efektów terapii komórkowych w zawale serca. Część autorów przedstawia tę strategię terapeutyczną jako zachęcającą [Schneider 2008, Lang 2017], z drugiej strony jednak analizy obejmujące dużą liczbę pacjentów poddają w wątpliwość skuteczność w zakresie poprawy funkcji skurczowej lewej komory [Carbone 2021].

Podejrzewano, że obszar martwicy pozawałowej stanowi zbyt niekorzystne warunki siedliskowe, aby komórki prekursorowe dla kardiomiocytów mogły w nim przeżyć i dojrzeć. Dlatego w opisywanym przez nas modelu użyto dodatkowo komórek mezechymalnych, mających stworzyć korzystne warunki środowiskowe do przeżycia przeszczepianych komórek prekursorowych kardiomiocytów. Uznaje się, że komórki mezenchymalne (MSC) nie wykazują własności immunogennych, stąd nawet przeszczep allogeniczny nie wymagał immunosupresji [Musiał-Wysocka 2019]. W tym wypadku zastosowano wspierającą terapię immunosupresyjną.

5.2. Ocena odległych efektów MI na parametry gospodarki żelazowej w krwi: TIBC, Fe⁺³ i TSAT

Dla oceny statusu żelaza wykorzystuje się zazwyczaj trzy parametry oznaczane w surowicy krwi: TIBC, stężenie żelaza oraz TSAT [Kasvosve 2002]. Istnieją doniesienia łączące ostre niedokrwienie mięśnia sercowego z ich wzrostem. Badanie Chakraborty i wsp. przeprowadzone w Bangladeszu opisuje istotnie wyższe poziomy TIBC, żelaza w surowicy oraz TSAT u pacjentów z MI względem grupy kontrolnej złożonej z osób zdrowych [Chakraborty 2013]. Natomiast w dużym, kohortowym porównaniu statusu żelaza u chorych z chorobą wieńcową przeprowadzonym przez Guo i wsp. wykazano przeciwnie, że poziomy żelaza w surowicy były obniżone u chorych pacjentów [Guo 2022]. Jednak w badaniu Guo udział wzięli pacjenci z chorobą niedokrwinną serca, która jeszcze nie doprowadziła do ostrego MI, stąd mogą wynikać niezgodności pomiędzy wynikami badań. Poza tym Guo i wsp. wskazują na wiele czynników zakłócających wyniki gospodarki żelazem tj. różnice genetyczne, nawyki żywieniowe, rozmiar próby, i in., których wpływu nie uwzględniano podczas analizy wyników. W prezentowanym przez nas badaniu większość czynników zakłócających udało się wyeliminować. Wszystkie zwierzęta były jednakowej rasy, w jednakowym wieku, nie chorowały wcześniej, ani nie miały chorób współistniejących czy terapii, żywione były w identyczny sposób i utrzymywane były w identycznych warunkach środowiskowych. Nie wykazano żadnych istotnych statystycznie różnic w parametrach opisujących status żelaza, ani w badaniu po miesiącu, ani w badaniu po 3 miesiącach od MI. Co prawda widoczna była różnica pomiędzy grupą MI a grupą MI+L2 w pierwszym pomiarze żelaza surowicy, ale duży rozrzut wartości w innych grupach spowodował brak istotności statystycznej, więc pomimo znacznych różnic

średnich wartości nie można tej obserwacji jednoznacznie zinterpretować.. W obu grupach leczonych eksperymentalnie MSC wykazano niski poziom białka hepcydyny, co sprzyja utrzymaniu wysokiego poziomu żelaza z surowicy krwi. Ta obserwacja z pewnością wymaga dalszych badań, ze względu na jej potencjalne znaczenie kliniczne i fakt, że hepcydyna ze względu na mały rozmiar nie jest łatwa do analizy pod względem technicznym. Analiza parametrów gospodarki żelazowej w surowicy w niniejszym modelu pozwala sądzić, że systemowy status żelaza nie ulega długoterminowemu zakłóceniu po wystąpieniu incydentu ostrego niedokrwienia mięśnia sercowego. Leczenie MI poprzez intrakardialne podawanie komórek macierzystych również nie zakłóca systemowego statusu żelaza.

5.3. Żelazo, ferrytyna i hemosyderyna w tkankach

Status żelaza i ferrytyny w narządach obwodowych, tj. w nerce, wątrobie i śledzionie nie był jeszcze obiektem badań w odniesieniu do odległego wpływu przebytego incydentu ostrej niewydolności serca. Jak wspomniano wcześniej, dodatkowo przeanalizowano wpływ terapii MI przy użyciu intramiokardialnego podania komórek macierzystych.

Każdy z badanych narządów odgrywa rolę w gospodarce żelazowej, każdy z nich także jest pod wpływem zaburzeń ze strony układu sercowo-naczyniowego. Żelazo magazynowane jest w tkankach w dwóch głównych formach: w ferrytynie (FT) i hemosyderynie. Hemosyderyna jest kompleksem białkowym, który jest nierozpuszczalny w wodzie i denaturuje się pod wpływem wysokiej temperatury. FT natomiast jest rozpuszczalna w wodzie i jest odporna na działanie temperatury. Takie własności są wykorzystywane do rozdziału FT i hemosyderyny [Saito 2014]. Pomiar w ekstraktach z homogenatów dokonywany był po obróbce termicznej próbek, w związku z tym zawierał żelazo magazynowane w ferrytynie. Ponieważ zaobserwowano iż w różnych tkankach występują różne fizjologiczne proporcje pomiędzy FTL i FTH, to wykonano oznaczenia dla obu tych izoform ferrytyny. Ponieważ interesujące dla nas było nie tylko jak zmienia się całkowita ilość FT, ale również czy dochodzi do zmian proporcji FTL i FTH. Stwierdzono, że ilość żelaza (Fe^{3+} , FTL i FTH) w ekstraktach z homogenatu tkankowego nerek nie wykazały dużego zróżnicowania między badanymi grupami. Jedynie u zwierząt leczonych komórkami macierzystymi (MI+L1, MI+L2) poziom białka FTH był istotnie wyższy niż

w grupie kontrolnej. Ze względu na budowę anatomiczną i funkcję w nerkach wyróżnia się dwa odrębne obszary: korę i rdzeń nerki. Postanowiono więc dokonać odrębnej analizy dla obu obszarów. Wynik tych badania wskazał, że wzrost FTH dotyczy przede wszystkim kory nerek. U świń po przebytych MI widoczna była również zmiana stosunku obu izoform ferrytyny, na korzyść FTH. Najwyraźniej było to widoczne w grupie MI+L2. Aby ocenić całość żelaza w tkankach (ferrytyny i hemosyderyny) wykonane zostało barwienie preparatów histologicznych błękitem pruskim. Większość żelaza wybarwionego błękitem pruskim uznaje się za hemosyderynę, głównie zlokalizowaną w lizosomach w postaci granul [Ghadially 1991]. Ferrytyna jest natomiast opisywana w barwieniu na żelazo jako bardziej rozproszone zabarwienie nadające niebieskawy odcień cytoplazmie komórek [Lefkowitch 2010]. Ocenę preparatów immunohistochemicznych przeprowadzono na dwa sposoby. Początkowo analizowano lokalizację sygnału w strukturach tkanki i dokonano wzrokowej, półilościowej oceny jego siły. Drugą metodą było wykonanie wysokiej jakości zdjęć preparatów, które następnie oceniano przy użyciu oprogramowania komputerowego w celu ilościowej oceny sygnału. Okazało się, że detekcja sygnału błękitu pruskiego w nerce była na zbyt niskim poziomie, poniżej 1% powierzchni w trybie zliczania złożeń oraz poniżej 6% powierzchni w trybie zliczania barwnika zdyfundowanego. Przy tak niskim poziomie sygnału zwiększa się wpływ czynników zakłócających, tj. zmienność osobnicza czy niejednorodne rozmieszczenie żelaza w tkance na preparacie. Wyniki które uzyskano w oparciu analizę komputerową były rozbieżne z poprzednimi oznaczeniami wykonanymi w homogenatach tkankowych. Już wcześniej podważano tezę o wyższości ilościowej analizy komputerowej nad tradycyjną analizą wzrokową [Cregger 2006]. W pracy Libard i wsp. autorzy wskazują, że istnieje wiele czynników, które mogą wpłynąć na wynik badań immunohistochemicznych. Należą do nich na przykład rodzaj utrwalacza i czas utrwalania, parafina, opóźnienie pośmiertne i czas przechowywania. Nie bez znaczenia jest także grubość skrawka [Libard 2019]. Dodatkowo, metoda immunohistochemiczna jest przydatna do wykrywania obecności oraz ewentualnie do oznaczeń półilościowych a nie ilościowych. Jest to metoda uznawana szczególnie w analizie jakościowej [Valarmathi 2020], natomiast do wykrywania i ilościowego oznaczania białek w złożonych mieszaninach biologicznych bardziej wartościową metodą jest western blotting [Rabilloud 2010]. Z powyższych powodów do oceny ilościowej wykorzystano wyniki western blottingu, a wzrokowo oceniano rozmieszczenie reakcji immunohistochemicznej (co

odzwierciedlało zróżnicowanie dystrybucji FTL i FTH w obrębie tkanek). W nerkach intensywny sygnał FTL uzyskano w kanalikach krętych bliższych i dalszych, z przewagą tych pierwszych. Umiarkowany sygnał odnotowano w kłębuszkach (nie u wszystkich osobników), torebkach Bowmana i w rdzeniu narządu. Ocena wizualna sugerowała silniejszy sygnał dla FTL w grupach KON oraz MI. Reakcja immunohistochemiczna na FTH widoczna była w nerce najsilniej w kłębuszkach nerkowych, torebkach Bowmana i śródbłonkach naczyń krwionośnych. Silniejszy sygnał był dzięki temu po stronie kory nerki. Kanaliki kręte bliższe i dalsze także dawały pozytywne zabarwienie, mniej sygnału FTL było jednak w kanalikach krętych dalszych.

Analiza statystyczna ilości Fe^{3+} , FTL i FTH w homogenatach z wątroby wykazała że ilość Fe^{3+} oraz FTH były istotnie wyższe dla wszystkich grup MI względem grupy kontrolnej. Największa różnica (ośmiokrotny wzrost) dotyczyła grupy MI+L2. W tej grupie stwierdzono również istotnie silniejszy sygnał FTL. Barwienie tkanki wątroby błękitem pruskim potwierdziło istotnie wyższe poziomy żelaza dla wszystkich grup MI względem grupy kontrolnej. Różnica dotyczyła zarówno złogów, jak i barwnika zdyfundowanego w cytoplazmie. Akhtar i wsp. w badaniu przeprowadzonym na szczurach wykazują, że takrolimus (podawany świnom z obu grup leczonych komórkami macierzystymi) może sprzyjać przeładowaniu hepatocytów żelazem [Akhtar 2020]. Ma to się wiązać ze zmianą ekspresji kluczowych białek metabolizmu żelaza. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki sugerują, że takrolimus nie wywarł istotnej różnicy w tym aspekcie. Podobny wysoki poziom żelaza obserwowano w grupie MI, która nie otrzymywała tego leku. Wydaje się zatem, że już pojedynczy incydent ostrego niedokrwienia serca powoduje długotrwałe zwiększenie magazynowania żelaza (Fe^{3+}) w ferrytynie. Tą hipotezę potwierdza fakt, że w barwieniu błękitem pruskim silniejsze sygnały wykryto w formie barwnika zdyfundowanego, choć ilość złogów żelaza również się zwiększyła. Brak było sygnału FTL z tkanki łącznej okołozrazikowej oraz nie obserwowano różnic między poszczególnymi strefami zrazików. Dla FTH w wątrobie sygnał był bardzo niewielki. Pozytywne zabarwienie dawały tutaj także śródbłonki naczyń krwionośnych. W ocenie wizualnej silniejszym sygnałem wyróżniała się grupa MI.

Pomiary dotyczące śledziona pokazują znikome zróżnicowanie między grupami w zakresie ilości Fe^{3+} , FTL i FTH w homogenacie tkankowym. Ilość FTH w śledzionie jest całkowicie niezmienna, natomiast ilość FTL widocznie wzrasta. W grupie MI+L1 średnio trzykrotnie

w stosunku do kontroli, jednak duży rozrzut danych spowodował, że nawet tak duża różnica nie była istotna statystycznie. Podobne wyniki uzyskano po wykonaniu analizy ilości żelaza. Spośród tych trzech oznaczeń jedyna istotna statystycznie różnica została potwierdzona dla Fe^{3+} pomiędzy grupą KON a grupą MI+L1. Analiza preparatów barwionych błękitem pruskim wykazuje jednak istotnie wyższy poziom żelaza w tkankach pochodzących od wszystkich grup zawałowych. Co ciekawe wzrost w grupach leczonych: MI+L1 oraz MI+L2 był istotnie statystycznie silniejszy niż sygnał w grupie MI. Ten wzrost ilości żelaza nie ma odbicia w wyższym poziomie FT u tych grup. To może sugerować, że wzrasta ilość atomów żelaza w już istniejących nanoklatkach FT oraz że w śledzienie główną formą magazynowania żelaza jest hemosyderyna. Tą ostatnią hipotezę potwierdza fakt silniejszego sygnału w postaci złogów, niż barwnika zdyfundowanego. Wydaje się że zastosowany rodzaj terapii sprzyja zwiększonemu magazynowaniu żelaza w śledzienie. Ze względu na anatomiczne i czynnościowe zróżnicowanie śledziony na miążgę białą i czerwoną przeanalizowano odrębnie sygnał immunohistochemiczny w obu części śledziony. Większa siła sygnału FT (FTL silniejszy niż FTH), stwierdzono głównie w miążdze czerwonej, co wynika z głównej aktywności tej części w obrocie żelaza. U większości osobników sygnały dały się także znaleźć w miążdze białej. W miążdze czerwonej sygnał FTL był silniejszy w grupach KON oraz MI niż w grupach leczonych komórkami macierzystymi.

5.4. Hepcydyna w tkankach

Hepcydyna została uznana za główne białko regulujące metabolizm żelaza. Występuje w trzech głównych izoformach: hepcydyna-25, -22 i -20, z których hepcydyna-25 jest uważany za główny fizjologiczny czynnik w homeostazie żelaza [Addo 2016]. Hepcydyna jest produkowana przez hepatocyty głównie w odpowiedzi na szlaki zależne od żelaza (wielkość zasobów żelaza). Innym ważnym regulatorem ekspresji hepcydyny są sygnały zapalne. Działają one poprzez cytokiny, takie jak na przykład interleukina-6 (IL-6), która aktywuje receptor IL-6 (IL-6R). Efektem jego pobudzenia jest pobudzenie szlaku kinazy janusowej i aktywatora transkrypcji JAK2/STAT3. STAT 3 wiąże się z promotorem genu HAMP powodując zwiększoną ekspresję hepcydyny [Wrighting 2006]. Poza pozytywnymi regulatorami hepcydyny istnieje także szereg negatywnych regulatorów które obniżają jej ekspresję. W oznaczeniu

hepcydyny-25 w tkance wątroby metodą western blotting, które było elementem niniejszej pracy sygnały badanego białka były niższe dla grup leczonych, z różnicą istotną statystycznie między grupą KON a grupą MI+L1. Różnica między grupą KON a grupą MI+L2 była bliska osiągnięcia różnicy statystycznie istotnej ($p=0,0638$). Wydaje się więc, że zastosowana terapia komórkowa istotnie (niemal dziesięciokrotnie) zmniejsza ekspresję hepcydyny w wątrobie względem grupy KON. W niewydolności serca dysregulacje hepcydyny mogą mieć dwojaką postać. Z jednej strony, w przypadku ostrego niedokrwienia mięśnia sercowego poziom hepcydyny wątrobowej może być zwiększony. Źródłem tej sytuacji są aktywowane makrofagi i proces zapalny. W dalszych stadiach choroby i w postępującej niewydolności serca poziom hepcydyny może spadać. Jest to odpowiedź na niedokrwistość oraz spadek ilości biologicznie dostępnego żelaza w hepatocytach [Kasztura 2022]. Sytuacja taka wywiera także bezpośredni wpływ na gospodarkę żelazem w sercu – spada ekspresja ferroportyny, kardiomiocyty starają się w ten sposób utrzymać swoje zapasy żelaza [Vela 2018]. Istotną rolę pełni także hepcydyna lokalna, znajdująca się w narządzie. Wykazano, że wzrost ekspresji hepcydyny w stanie po ostrym niedokrwieniu mięśnia sercowego może mieć negatywny wpływ na regenerację tkanki narządu a implantacja komórek szpikowych od myszy pozbawionych hepcydyny ($Hamp^{-/-}$) lub od myszy ze specyficzną delecją hepcydyny w komórkach mieloidalnych ($LysM^{CRE/+}/Hamp^{f/f}$) wiązało się z poprawieniem funkcji serca [Zlatanova 2019]. Kolejnym szlakiem regulacji hepcydyny, który mógł zostać zmieniony w badanym modelu była hipoksja. Podobnie jak w przypadku ekspresji hepcydyny, parametry funkcji serca – frakcja skracania oraz frakcja wyrzutowa były istotnie niższe w pomiarze w 28 dniu doświadczenia dla grup badanych w porównaniu z grupą kontrolną, co może sugerować wpływ hipoperfuzji na status hepcydyny. Zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych hipoksja jest sygnałem mobilizującym dla erytropoezy, daje zatem zielone światło dla absorpcji żelaza i jego dalszego przetworzenia w szpiku kostnym. Dzieje się to między innymi poprzez wyciszenie aktywności hepcydyny. Ze względu na wcześniejsze doświadczenia dotyczące problemów z oznaczeniem poziomu białka hepcydyny w surowicy krwi świń nie zdecydowano się na takie pomiary. Innym zagadnieniem, które należy poruszyć w przypadku statusu hepcydyny w niniejszym modelu jest terapia immunosupresyjna, która towarzyszyła eksperymentalnym terapiom komórkowym. Stosowano doustnie takrolimus w dawce 0,1 mg/kg m.c. dwa razy dziennie. Istnieją doniesienia łączące terapie immunosupresyjne z występowaniem anemii [Sánchez Fructuoso 2007]. W przypadku

takrolimusu związek ten może wpływać na gospodarkę żelazem bezpośrednio, ale także pośrednio poprzez erytrocyty [Delijewski 2023]. Zasugerowano także, że wpływ takrolimusu na status żelaza w organizmie ma ścisły związek z szeregiem zjawisk zachodzących w wątrobie. Wykryto, że u szczurów, którym podano doustnie takrolimus w dawce 12 mg/kg m.c. dochodzi do wzrostu ekspresji hepcydyny w 6 i 12 godzinie po podaniu, podobnie wzrasta ekspresja transferyny i receptora transferyny, a także łańcucha lekkiego i ciężkiego ferrytyny. U tych szczurów obserwowano także akumulację złogów żelaza w wątrobie – w hepatocytach, przestrzeniach zatokowych oraz obszarach wrotnych [Akhtar 2020]. Wyniki pomiaru hepcydyny w wątrobie w niniejszym modelu są wobec tego niezgodne z badaniami przeprowadzonymi u szczurów. Zgodne wyniki obserwowano jednak w oznaczeniach żelaza oraz łańcucha lekkiego i ciężkiego ferrytyny w homogenatach tkanki wątroby oraz preparatach histologicznych barwionych błękitem pruskim – ekspresja ferrytyny była wyższa w grupach, które dostawały takrolimus i terapie komórkowe, podobnie jak ilość żelaza. Trudno jednak o pewność, że to właśnie takrolimus był przyczyną takiego stanu rzeczy ponieważ jego dawka była istotnie mniejsza niż we wspomnianym badaniu z udziałem szczurów. Znacznie różnił się także czas pozyskania danych – u szczurów obserwowano reakcję w przebiegu ostrym – kilka punktów czasowych do 48h po pojedynczym podaniu substancji, w niniejszym modelu natomiast pomiarów dokonywano po długim okresie obserwacji. Najwięcej zmian w badaniu wpływu takrolimusu na status żelaza u szczurów miało miejsce w 6 i 12 godzinie po podaniu leku a większość z badanych parametrów nie różniła się istotnie statystycznie względem kontroli po 24 godzinach badania. Podobne wyniki in vivo otrzymano w doświadczeniu z udziałem myszy, obserwowano wzrost ekspresji hepcydyny po podskórnym podaniu takrolimusu w dawce 10 mg/kg m.c. w szóstej godzinie badania [Colucci 2017]. W godzinie osiemnastej ekspresja hepcydyny nie różniła się istotnie od grupy kontrolnej. Także w wypadku tego badania wnioski skupiają się na szybkiej reakcji po pojedynczym podaniu wysokiej dawki takrolimusu i nie badają odległych skutków chronicznego podawania mniejszych dawek. W naszym modelu stosowane było identyczne leczenie, jak stosowane jest u ludzi, dlatego świnię leczone otrzymywały aspirynę. Terapia przeciwplatekowa może mieć wpływ na status żelaza, ponieważ kilka wcześniejszych badań wskazuje na wpływ aspiryny na szlaki związane z gospodarką żelazową, w tym na hepcydynę [Xu 2015, Li 2016]. Badania te zostały jednak przeprowadzone na liniach komórkowych mikrogleju BV-2 utrzymywanych w warunkach procesu zapalnego

poprzez inkubację z lipopolisacharydem (LPS), co ogranicza możliwość bezpośredniego łączenia zaobserwowanych mechanizmów z modelem ostrego niedokrwienia mięśnia sercowego u świni. Niemniej jednak w badaniach tych potwierdzono, że aspiryna obniża poziom hepcydyny w komórkach mikrogleju poprzez hamowanie szlaku IL6-JAK2-STAT3. Część tych wątpliwości rozprasza analiza wyniku uzyskanego w grupie MI bez leczenia komórkowego i immunosupresyjnego. Nie jest on istotnie różny od grupy kontrolnej, jednak pomiary w tej grupie były mniej homogenne niż w pozostałych grupach. Oznacza to, że w grupie MI znajdowały się także osobniki o niższych wartościach względnego sygnału hepcydyny, podobnych do tych z grup z terapią komórkową i immunosupresyjną. Wskazuje to na fakt, że sam incydent ostrego niedokrwienia mięśnia sercowego, może spowodować spadek hepcydyny a zastosowana terapia może ten wpływ nasilać.

5.5. Wnioski

1. Ostry incydent niedokrwienia serca (MI) nie powoduje długotrwałych zaburzeń w systemowym statusie żelaza (w stężeniu Fe^{+3} , całkowitej zdolności wiązania żelaza oraz nasycenia ferrytyny w surowicy). Oznacza to, że MI nie towarzyszą ogólnoustrojowe zaburzenia gospodarki żelazem, które mogłyby wykryć klinicznie lub stosując badania laboratoryjne ukierunkowane na ocenę homeostazy żelaza w organizmie.
2. MI powoduje długotrwały wzrost zasobów żelaza w wątrobie i śledzionie, wzrost stężenia podjednostek lekkich ferrytyny (FTL) w wątrobie oraz wzrost stężenia podjednostek ciężkich ferrytyny (FTH) w korze nerki i wątrobie. Oznacza to, że mimo braku ogólnoustrojowych zaburzeń żelaza, w nerce, wątrobie i śledzionie można zaobserwować różnice dotyczące gospodarki żelazem, które towarzyszą MI i przybierają formę magazynowania większej ilości żelaza oraz większej ekspresji łańcucha lekkiego czy ciężkiego ferrytyny.
3. Terapia MI przy użyciu komórek macierzystych podawanych intramiokardialnie, z towarzyszącą terapią takrolimusem i aspiryną powoduje spadek ekspresji hepcydyny w wątrobie.

4. Konieczne są dalsze, bardziej złożone badania, których celem będzie ocena znaczenia klinicznego zmian w gospodarce żelazowej towarzyszących ostremu niedokrwieniu mięśnia sercowego oraz weryfikacja, czy badania w modelu zwierzęcym znajdują przełożenie na medycynę człowieka.

Spis rycin

Ryc. 1. Wpływ niewydolności serca na funkcje nerek, wątroby i śledziony.....	13
Ryc. 2. Świnia przygotowana do procedury indukcji zawału serca.	16
Ryc. 3. Schemat przedstawiający strefy zawału mięśnia sercowego.....	17
Ryc. 4. Badanie elektrokardiograficzne świni	18
Ryc. 5. Zależność czasowa profilów wybranych markerów zawału serca u ludzi	19
Ryc. 6. Badanie echokardiograficzne świni z eksperymentalnie wyindukowanym zawałem serca	20
Ryc. 7. Ocena czynności skurczowej i rozkurczowej komory lewej przy użyciu dopplera tkankowego.....	22
Ryc. 8. Drogi podania komórek macierzystych w zawale serca.....	26
Ryc. 9. System NOGA.....	27
Ryc. 10. System NOGA. Mapa elektrofizjologiczna obrazująca obszar obniżonej kurczliwości lewej komory	28
Ryc. 11. Hemoproteiny i ich rola w organizmie.....	33
Ryc. 12. Ogólny schemat homeostazy żelaza.....	34
Ryc. 13. Schemat procentowego nasycenia transferyny (TSAT).....	36
Ryc. 14. Regulacja syntezy hepcydyny	38
Ryc. 15. Badanie echokardiograficzne reprezentatywnej świni.	52
Ryc. 16. Wykresy przedstawiające uśrednione pomiary frakcji skracania z ochyleniami standardowymi dla badanych grup.	53
Ryc. 17. Wykresy przedstawiające uśrednione pomiary frakcji wyrzutowej z ochyleniami standardowymi dla badanych grup.	54
Ryc. 18. Wykresy przedstawiające zmianę frakcji skracania oraz frakcji wyrzutowej u poszczególnych osobników z podziałem na grupy.....	54
Ryc. 19. Badanie angiograficzne podczas wykonywania modelu zawałowego	56
Ryc. 20. Badanie sekcyjne świni z eksperymentalnie wywołanym zawałem serca	57
Ryc. 21. Wykresy przedstawiające uśrednione pomiary troponiny dla badanych grup oraz wartość pomiarów dla poszczególnych osobników.....	57
Ryc. 22. Wykresy przedstawiające wyniki pomiarów BNP-26.....	58

Ryc. 23. Wyniki pomiarów TIBC, poziomu żelaza w surowicy oraz TSAT	59
Ryc. 24. Wyniki pomiarów żelaza oraz łańcucha lekkiego i ciężkiego ferrytyny w korze i rdzeniu nerki.....	61
Ryc. 25. Wyniki pomiarów żelaza oraz łańcucha lekkiego i ciężkiego ferrytyny w tkance wątroby.....	62
Ryc. 26. Wyniki pomiarów żelaza oraz łańcucha lekkiego i ciężkiego ferrytyny w tkance śledziony.....	63
Ryc. 27. Wyniki pomiaru ilości białka hepacydyny w wątrobie.....	64
Ryc. 28. Wyniki barwienia na żelazo błękitem pruskim preparatów z nerek.....	65
Ryc. 29. Układ przedstawiający przykładowe zdjęcia z preparatów odzwierciedlające procent powierzchni sygnału błękitu pruskiego w korze i rdzeniu nerki w czterech badanych grupach.....	66
Ryc. 30. Układ przykładowych zdjęć z reakcją immunohistochemiczną na łańcuch lekkie	68
Ryc. 31. Układ przykładowych zdjęć z reakcją immunohistochemiczną na łańcuch ciężki ferrytyny dla poszczególnych grup badania w korze i rdzeniu nerki.....	68
Ryc. 32. Wyniki pomiaru sygnału z barwienia błękitem pruskim w preparatach z wątroby.....	70
Ryc. 33. Układ przedstawiający przykładowe zdjęcia z preparatów odzwierciedlające procent powierzchni sygnału błękitu pruskiego w preparatach z wątroby w czterech badanych grupach.....	70
Ryc. 34. Układ przykładowych zdjęć z reakcją immunohistochemiczną na łańcuch lekkie ferrytyny dla poszczególnych grup badania w preparatach z wątroby.....	71
Ryc. 35. Układ przykładowych zdjęć z reakcją immunohistochemiczną na łańcuch ciężki ferrytyny dla poszczególnych grup badania w preparatach z wątroby.....	72
Ryc. 36. Wyniki pomiaru sygnału z barwienia błękitem pruskim w preparatach ze śledziony.....	73
Ryc. 37. Układ przedstawiający przykładowe zdjęcia z preparatów odzwierciedlające procent powierzchni sygnału błękitu pruskiego w preparatach ze śledziony w czterech badanych grupach.....	74
Ryc. 38. Układ przykładowych zdjęć z reakcją immunohistochemiczną na łańcuch lekkie ferrytyny dla poszczególnych grup badania w preparatach ze śledziony.....	75
Ryc. 39. Układ przykładowych zdjęć z reakcją immunohistochemiczną na łańcuch ciężki ferrytyny dla poszczególnych grup badania w preparatach ze śledziony.....	76

Spis tabel

Tabela 1. Frakcja wyrzutowa u pacjentów z zawałem leczonym komórkami macierzystymi....	30
Tabela 2. Przeciwciała zastosowane w metodzie western blotting.....	46
Tabela 3. Średnie wartości sygnału reakcji immunohistochemicznej przyznanej wybranym strukturom nerki (FTL).....	68
Tabela 4. Średnie wartości sygnału reakcji immunohistochemicznej przyznanej wybranym strukturom nerki (FTH)	69
Tabela 5. Średnie wartości sygnału reakcji immunohistochemicznej przyznanej wybranym strukturom wątroby (FTL).....	71
Tabela 6. Średnie wartości sygnału reakcji immunohistochemicznej przyznanej wybranym strukturom wątroby (FTH)	72
Tabela 7. Średnie wartości sygnału reakcji immunohistochemicznej przyznanej wybranym strukturom śledziony (FTL).....	75
Tabela 8. Średnie wartości sygnału reakcji immunohistochemicznej przyznanej wybranym strukturom śledziony (FTH)	76

Piśmiennictwo

1. Abushouk, A. I., Salem, A. M. A., Saad, A., Afifi, A. M., Afify, A. Y., Afify, H., Salem, H. S. E., Ghanem, E., & Abdel-Daim, M. M. (2019). Mesenchymal Stem Cell Therapy for Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy: Potential Mechanisms, Governing Factors, and Implications of the Heart Stem Cell Debate. *Frontiers in pharmacology, 10*, 635. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00635>
2. Adams, J. E., 3rd, Abendschein, D. R., & Jaffe, A. S. (1993). Biochemical markers of myocardial injury. Is MB creatine kinase the choice for the 1990s?. *Circulation, 88*(2), 750–763. <https://doi.org/10.1161/01.cir.88.2.750>
3. Addo, L., Ikuta, K., Tanaka, H., Toki, Y., Hatayama, M., Yamamoto, M., Ito, S., Shindo, M., Sasaki, Y., Shimonaka, Y., Fujiya, M., & Kohgo, Y. (2016). The three isoforms of hepcidin in human serum and their processing determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-tandem MS). *International journal of hematology, 103*(1), 34–43. <https://doi.org/10.1007/s12185-015-1885-y>
4. Akhtar, T., Ali, G., & Sheikh, N. (2020). Immunosuppressant-Induced Oxidative Stress and Iron: A Paradigm Shift from Systemic to Intrahepatic Abnormalities. *Oxidative medicine and cellular longevity, 2020*, 8675275. <https://doi.org/10.1155/2020/8675275>
5. Almeida, S. O., Skelton, R. J., Adigopula, S., & Ardehali, R. (2015). Arrhythmia in stem cell transplantation. *Cardiac electrophysiology clinics, 7*(2), 357–370. <https://doi.org/10.1016/j.ccep.2015.03.012>
6. Alnuwaysir, R. I. S., Hoes, M. F., van Veldhuisen, D. J., van der Meer, P., & Grote Beverborg, N. (2021). Iron Deficiency in Heart Failure: Mechanisms and Pathophysiology. *Journal of clinical medicine, 11*(1), 125. <https://doi.org/10.3390/jcm11010125>
7. Alvarez, A. M., & Mukherjee, D. (2011). Liver abnormalities in cardiac diseases and heart failure. *The International journal of angiology : official publication of the International College of Angiology, Inc, 20*(3), 135–142. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1284434>

8. Amaral, E. P., Costa, D. L., Namasivayam, S., Riteau, N., Kamenyeva, O., Mittereder, L., Mayer-Barber, K. D., Andrade, B. B., & Sher, A. (2019). A major role for ferroptosis in *Mycobacterium tuberculosis*-induced cell death and tissue necrosis. *The Journal of experimental medicine*, *216*(3), 556–570. <https://doi.org/10.1084/jem.20181776>
9. Avni, T., Leibovici, L., & Gafter-Gvili, A. (2012). Iron supplementation for the treatment of chronic heart failure and iron deficiency: systematic review and meta-analysis. *European journal of heart failure*, *14*(4), 423–429. <https://doi.org/10.1093/eurjhf/hfs017>
10. Beltrami, A. P., Barlucchi, L., Torella, D., Baker, M., Limana, F., Chimenti, S., Kasahara, H., Rota, M., Musso, E., Urbanek, K., Leri, A., Kajstura, J., Nadal-Ginard, B., & Anversa, P. (2003). Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*, *114*(6), 763–776. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00687-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00687-1)
11. Bertrand, M. L., & Harris, D. C. (1979). Insensitivity of the ferritin iron core to heat treatment. *Experientia*, *35*(3), 300–301. <https://doi.org/10.1007/BF01964311>
12. Bezkorovainy, A. (1980) Chemistry and Biology of Iron Storage. *Biochemistry of Nonheme Iron*; Springer US: Boston, MA, 207–269.
13. Bolger, A. P., Bartlett, F. R., Penston, H. S., O'Leary, J., Pollock, N., Kaprielian, R., & Chapman, C. M. (2006). Intravenous iron alone for the treatment of anemia in patients with chronic heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*, *48*(6), 1225–1227. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2006.07.015>
14. Bolli, R., & Kahlon, A. (2020). Time to end the war on cell therapy. *European journal of heart failure*, *22*(5), 893–897. <https://doi.org/10.1002/ejhf.1767>
15. Budaj, A. Beręsewicz, A., i in. : Ischemic Heart Disease. W: Gajewski P, Szczeklik A. Interna Szczeklika 2019. Wyd. 10. Kraków: Medycyna Praktyczna; 2019, s.168-226.
16. Camaschella, C., & Pagani, A. (2018). Advances in understanding iron metabolism and its crosstalk with erythropoiesis. *British journal of haematology*, *182*(4), 481–494. <https://doi.org/10.1111/bjh.15403>
17. Camelliti, P., Borg, T. K., & Kohl, P. (2005). Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovascular research*, *65*(1), 40–51. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.08.020>

18. Carbone, R. G., Monselise, A., Bottino, G., Negrini, S., & Puppo, F. (2021). Stem cells therapy in acute myocardial infarction: a new era?. *Clinical and experimental medicine*, 21(2), 231–237. <https://doi.org/10.1007/s10238-021-00682-3>
19. Chakraborty, P. K., Hoque, M. R., Paul, U. K., & Husain, M. F. (2013). Body iron status among acute myocardial infarction patients. *Mymensingh medical journal : MMJ*, 22(3), 460–464.
20. Chifman, J., Laubenbacher, R., & Torti, S. V. (2014). A systems biology approach to iron metabolism. *Advances in experimental medicine and biology*, 844, 201–225. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2095-2_10
21. Chimenti, C., Kajstura, J., Torella, D., Urbanek, K., Heleniak, H., Colussi, C., Di Meglio, F., Nadal-Ginard, B., Frustaci, A., Leri, A., Maseri, A., & Anversa, P. (2003). Senescence and death of primitive cells and myocytes lead to premature cardiac aging and heart failure. *Circulation research*, 93(7), 604–613. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000093985.76901.AF>
22. Chong, J. J., & Murry, C. E. (2014). Cardiac regeneration using pluripotent stem cells--progression to large animal models. *Stem cell research*, 13(3 Pt B), 654–665. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2014.06.005>
23. Cohn, J. N., Tognoni, G., & Valsartan Heart Failure Trial Investigators (2001). A randomized trial of the angiotensin-receptor blocker valsartan in chronic heart failure. *The New England journal of medicine*, 345(23), 1667–1675. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa010713>
24. Colucci, S., Pagani, A., Pettinato, M., Artuso, I., Nai, A., Camaschella, C., & Silvestri, L. (2017). The immunophilin FKBP12 inhibits hepcidin expression by binding the BMP type I receptor ALK2 in hepatocytes. *Blood*, 130(19), 2111–2120. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-04-780692>
25. Cregger, M., Berger, A. J., & Rimm, D. L. (2006). Immunohistochemistry and quantitative analysis of protein expression. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 130(7), 1026–1030. <https://doi.org/10.5858/2006-130-1026-IAQAOP>
26. Damman, K., & Testani, J. M. (2015). The kidney in heart failure: an update. *European heart journal*, 36(23), 1437–1444. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv010>

27. Delijewski, M., Bartoń, A., Maksym, B., & Pawlas, N. (2023). The Link between Iron Turnover and Pharmacotherapy in Transplant Patients. *Nutrients*, *15*(6), 1453. <https://doi.org/10.3390/nu15061453>
28. Denu, R. A., Nemcek, S., Bloom, D. D., Goodrich, A. D., Kim, J., Mosher, D. F., & Hematti, P. (2016). Fibroblasts and Mesenchymal Stromal/Stem Cells Are Phenotypically Indistinguishable. *Acta haematologica*, *136*(2), 85–97. <https://doi.org/10.1159/000445096>
29. Desmoulière, A., Darby, I. A., & Gabbiani, G. (2003). Normal and pathologic soft tissue remodeling: role of the myofibroblast, with special emphasis on liver and kidney fibrosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, *83*(12), 1689–1707. <https://doi.org/10.1097/01.lab.0000101911.53973.90>
30. Dickstein, K., Cohen-Solal, A., Filippatos, G., McMurray, J. J., Ponikowski, P., Poole-Wilson, P. A., Strömberg, A., van Veldhuisen, D. J., Atar, D., Hoes, A. W., Keren, A., Mebazaa, A., Nieminen, M., Priori, S. G., Swedberg, K., & ESC Committee for Practice Guidelines (CPG) (2008). ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *European heart journal*, *29*(19), 2388–2442. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehn309>
31. Dixon, J. A., & Spinale, F. G. (2009). Large animal models of heart failure: a critical link in the translation of basic science to clinical practice. *Circulation. Heart failure*, *2*(3), 262–271. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.108.814459>
32. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, *8*(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
33. Durak-Nalbantić, A., Džubur, A., Dilić, M., Pozderac, Z., Mujanović-Narančić, A., Kulić, M., Hodžić, E., Resić, N., Brdjanović, S., & Zvizdić, F. (2012). Brain natriuretic

- peptide release in acute myocardial infarction. *Bosnian journal of basic medical sciences*, 12(3), 164–168. <https://doi.org/10.17305/bjbms.2012.2470>
34. Duran, J. M., Taghavi, S., Berretta, R. M., Makarewich, C. A., Sharp Iii, T., Starosta, T., Udeshi, F., George, J. C., Kubo, H., & Houser, S. R. (2012). A characterization and targeting of the infarct border zone in a swine model of myocardial infarction. *Clinical and translational science*, 5(5), 416–421. <https://doi.org/10.1111/j.1752-8062.2012.00432.x>
 35. Engeli, S., Negrel, R., & Sharma, A. M. (2000). Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 35(6), 1270–1277. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.35.6.1270>
 36. French, J. K., & White, H. D. (2004). Clinical implications of the new definition of myocardial infarction. *Heart (British Cardiac Society)*, 90(1), 99–106. <https://doi.org/10.1136/heart.90.1.99>
 37. Ghadially, F. N., & Lalonde, J. M. (1991). A comparison of the atomic composition of siderosomes (haemosiderin) in cryosections of unfixed frozen tissues and Epon-embedded tissues. *Journal of submicroscopic cytology and pathology*, 23(3), 365–371.
 38. Ghafourian, K., Shapiro, J. S., Goodman, L., & Ardehali, H. (2020). Iron and Heart Failure: Diagnosis, Therapies, and Future Directions. *JACC. Basic to translational science*, 5(3), 300–313. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2019.08.009>
 39. Gheorghide, M., Follath, F., Ponikowski, P., Barsuk, J. H., Blair, J. E., Cleland, J. G., Dickstein, K., Drazner, M. H., Fonarow, G. C., Jaarsma, T., Jondeau, G., Sendon, J. L., Mebazaa, A., Metra, M., Nieminen, M., Pang, P. S., Seferovic, P., Stevenson, L. W., van Veldhuisen, D. J., Zannad, F., ... European Society of Intensive Care Medicine (2010). Assessing and grading congestion in acute heart failure: a scientific statement from the acute heart failure committee of the heart failure association of the European Society of Cardiology and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine. *European journal of heart failure*, 12(5), 423–433. <https://doi.org/10.1093/eurjhf/hfq045>
 40. Giallourakis, C. C., Rosenberg, P. M., & Friedman, L. S. (2002). The liver in heart failure. *Clinics in liver disease*, 6(4), 947–ix. [https://doi.org/10.1016/s1089-3261\(02\)00056-9](https://doi.org/10.1016/s1089-3261(02)00056-9)

41. Girerd N. (2022). The growing importance of heart failure in myocardial infarction. *International journal of cardiology*, 352, 100–101. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2022.01.068>
42. Gneccchi, M., Zhang, Z., Ni, A., & Dzau, V. J. (2008). Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circulation research*, 103(11), 1204–1219. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.176826>
43. Guo, S., Mao, X., Li, X., & Ouyang, H. (2022). Association between iron status and incident coronary artery disease: a population based-cohort study. *Scientific reports*, 12(1), 17490. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-22275-0>
44. Gyöngyösi, M., Winkler, J., Ramos, I., Do, Q. T., Firat, H., McDonald, K., González, A., Thum, T., Díez, J., Jaisser, F., Pizard, A., & Zannad, F. (2017). Myocardial fibrosis: biomedical research from bench to bedside. *European journal of heart failure*, 19(2), 177–191. <https://doi.org/10.1002/ejhf.696>
45. Halliday, J. W., & Searle, J. (1996). Hepatic iron deposition in human disease and animal models. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 9(2), 205–209. <https://doi.org/10.1007/BF00144626>
46. Harjola, V. P., Mullens, W., Banaszewski, M., Bauersachs, J., Brunner-La Rocca, H. P., Chioncel, O., Collins, S. P., Doehner, W., Filippatos, G. S., Flammer, A. J., Fuhrmann, V., Lainscak, M., Lassus, J., Legrand, M., Masip, J., Mueller, C., Papp, Z., Parissis, J., Platz, E., Rudiger, A., ... Mebazaa, A. (2017). Organ dysfunction, injury and failure in acute heart failure: from pathophysiology to diagnosis and management. A review on behalf of the Acute Heart Failure Committee of the Heart Failure Association (HFA) of the European Society of Cardiology (ESC). *European journal of heart failure*, 19(7), 821–836. <https://doi.org/10.1002/ejhf.872>
47. Harrison, P. M., & Arosio, P. (1996). The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochimica et biophysica acta*, 1275(3), 161–203. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(96\)00022-9](https://doi.org/10.1016/0005-2728(96)00022-9)
48. Harvey, JW. Iron metabolism and its disorders. In: Kaneko, JJ, Harvey, JW, Bruss, ML, editors. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6th ed. Burlington, Massachusetts: Elsevier. 2008, s. 259–285.

49. Hastings, C. L., Roche, E. T., Ruiz-Hernandez, E., Schenke-Layland, K., Walsh, C. J., & Duffy, G. P. (2015). Drug and cell delivery for cardiac regeneration. *Advanced drug delivery reviews*, *84*, 85–106. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.08.006>
50. Hatzistergos, K. E., Takeuchi, L. M., Saur, D., Seidler, B., Dymecki, S. M., Mai, J. J., White, I. A., Balkan, W., Kanashiro-Takeuchi, R. M., Schally, A. V., & Hare, J. M. (2015). cKit+ cardiac progenitors of neural crest origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(42), 13051–13056. <https://doi.org/10.1073/pnas.1517201112>
51. Henrion, J., Schapira, M., Luwaert, R., Colin, L., Delannoy, A., & Heller, F. R. (2003). Hypoxic hepatitis: clinical and hemodynamic study in 142 consecutive cases. *Medicine*, *82*(6), 392–406. <https://doi.org/10.1097/01.md.0000101573.54295.bd>
52. Hiraiwa, H., Okumura, T., & Murohara, T. (2022). The cardiosplenic axis: the prognostic role of the spleen in heart failure. *Heart failure reviews*, *27*(6), 2005–2015. <https://doi.org/10.1007/s10741-022-10248-4>
53. Hiraiwa, H., Okumura, T., & Murohara, T. (2022). The cardiosplenic axis: the prognostic role of the spleen in heart failure. *Heart failure reviews*, *27*(6), 2005–2015. <https://doi.org/10.1007/s10741-022-10248-4>
54. Hu, H., & Shen, L. (2021). Drug-coated balloons in the treatment of acute myocardial infarction (Review). *Experimental and therapeutic medicine*, *21*(5), 464. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.9895>
55. Huang, C., Zhang, X., Ramil, J. M., Rikka, S., Kim, L., Lee, Y., Gude, N. A., Thistlethwaite, P. A., Sussman, M. A., Gottlieb, R. A., & Gustafsson, A. B. (2010). Juvenile exposure to anthracyclines impairs cardiac progenitor cell function and vascularization resulting in greater susceptibility to stress-induced myocardial injury in adult mice. *Circulation*, *121*(5), 675–683. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.902221>
56. Jankowska, E. A., Kasztura, M., Sokolski, M., Bronisz, M., Nawrocka, S., Oleśkowska-Florek, W., Zymliński, R., Biegus, J., Siwołowski, P., Banasiak, W., Anker, S. D., Filippatos, G., Cleland, J. G., & Ponikowski, P. (2014). Iron deficiency defined as depleted iron stores accompanied by unmet cellular iron requirements identifies patients

- at the highest risk of death after an episode of acute heart failure. *European heart journal*, 35(36), 2468–2476. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu235>
57. Jensen E. C. (2013). Quantitative analysis of histological staining and fluorescence using ImageJ. *Anatomical record* (Hoboken, N.J. : 2007), 296(3), 378–381. <https://doi.org/10.1002/ar.22641>
 58. Jugdutt B. I. (2003). Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: when is enough enough?. *Circulation*, 108(11), 1395–1403. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000085658.98621.49>
 59. Kang, H. J., Kang, W. S., Hong, M. H., Choe, N., Kook, H., Jeong, H. C., Kang, J., Hur, J., Jeong, M. H., Kim, Y. S., & Ahn, Y. (2015). Involvement of miR-34c in high glucose-insulted mesenchymal stem cells leads to inefficient therapeutic effect on myocardial infarction. *Cellular signalling*, 27(11), 2241–2251. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.07.024>
 60. Kasvosve, I., & Delanghe, J. (2002). Total iron binding capacity and transferrin concentration in the assessment of iron status. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 40(10), 1014–1018. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2002.176>
 61. Kasztura, M., Kiczak, L., Paślawska, U., Bania, J., Janiszewski, A., Tomaszek, A., Zacharski, M., Noszczyk-Nowak, A., Paślawski, R., Tabiś, A., Kuroпка, P., Dzięgiel, P., & Ponikowski, P. (2022). Hemosiderin Accumulation in Liver Decreases Iron Availability in Tachycardia-Induced Porcine Congestive Heart Failure Model. *International journal of molecular sciences*, 23(3), 1026. <https://doi.org/10.3390/ijms23031026>
 62. Kim, M. C., Kim, Y. S., Kang, W. S., Lee, K. H., Cho, M., Hong, M. H., Lim, K. S., Jeong, M. H., & Ahn, Y. (2017). Intramyocardial Injection of Stem Cells in Pig Myocardial Infarction Model: The First Trial in Korea. *Journal of Korean medical science*, 32(10), 1708–1712. <https://doi.org/10.3346/jkms.2017.32.10.1708>
 63. Knovich, M. A., Storey, J. A., Coffman, L. G., Torti, S. V., & Torti, F. M. (2009). Ferritin for the clinician. *Blood reviews*, 23(3), 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2008.08.001>
 64. Kolanowski, T., & Kurpisz, M. (2010). Indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste--geneza, problemy oraz perspektywy wykorzystania w terapii chorób serca

- [Induced pluripotential stem cells--perspectives of clinical application in cardiovascular diseases]. *Kardiologia polska*, 68 Suppl 5, S412–S417.
65. Korolnek, T., & Hamza, I. (2014). Like iron in the blood of the people: the requirement for heme trafficking in iron metabolism. *Frontiers in pharmacology*, 5, 126. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00126>
 66. Koukoulas, K., Lygoura, V., Kartalidis, P., Gatselis, N. K., Petinaki, E., Dalekos, G. N., & Simos, G. (2022). Hepcidin as a Sensitive and Treatment-Responsive Acute-Phase Marker in Patients with Bacteremia: A Pilot Study. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 12(6), 1404. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12061404>
 67. Lang, C. I., Wolfien, M., Langenbach, A., Müller, P., Wolkenhauer, O., Yavari, A., Ince, H., Steinhoff, G., Krause, B. J., David, R., & Glass, Ä. (2017). Cardiac Cell Therapies for the Treatment of Acute Myocardial Infarction: A Meta-Analysis from Mouse Studies. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 42(1), 254–268. <https://doi.org/10.1159/000477324>
 68. Latini, R., Maggioni, A. P., Flather, M., Sleight, P., & Tognoni, G. (1995). ACE inhibitor use in patients with myocardial infarction. Summary of evidence from clinical trials. *Circulation*, 92(10), 3132–3137. <https://doi.org/10.1161/01.cir.92.10.3132>
 69. Lefer, D. J., & Marbán, E. (2017). Is Cardioprotection Dead?. *Circulation*, 136(1), 98–109. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.027039>
 70. Lefkowitz, Jay H. (2010). *Scheuer's Liver Biopsy Interpretation*, 8th ed. Saunders.
 71. Li, W. Y., Li, F. M., Zhou, Y. F., Wen, Z. M., Ma, J., Ya, K., & Qian, Z. M. (2016). Aspirin down Regulates Hepcidin by Inhibiting NF-κB and IL6/JAK2/STAT3 Pathways in BV-2 Microglial Cells Treated with Lipopolysaccharide. *International journal of molecular sciences*, 17(12), 1921. <https://doi.org/10.3390/ijms17121921>
 72. Libard, S., Cerjan, D., & Alafuzoff, I. (2019). Characteristics of the tissue section that influence the staining outcome in immunohistochemistry. *Histochemistry and cell biology*, 151(1), 91–96. <https://doi.org/10.1007/s00418-018-1742-1>
 73. Lisboa P. E. (1971). Experimental hepatic cirrhosis in dogs caused by chronic massive iron overload. *Gut*, 12(5), 363–368. <https://doi.org/10.1136/gut.12.5.363>

74. Loncar, G., Obradovic, D., Thiele, H., von Haehling, S., & Lainscak, M. (2021). Iron deficiency in heart failure. *ESC heart failure*, 8(4), 2368–2379. <https://doi.org/10.1002/ehf2.13265>
75. López, B., González, A., Ravassa, S., Beaumont, J., Moreno, M. U., San José, G., Querejeta, R., & Díez, J. (2015). Circulating Biomarkers of Myocardial Fibrosis: The Need for a Reappraisal. *Journal of the American College of Cardiology*, 65(22), 2449–2456. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2015.04.026>
76. Lynch, S., Pfeiffer, C. M., Georgieff, M. K., Brittenham, G., Fairweather-Tait, S., Hurrell, R. F., McArdle, H. J., & Raiten, D. J. (2018). Biomarkers of Nutrition for Development (BOND)-Iron Review. *The Journal of nutrition*, 148(suppl_1), 1001S–1067S. <https://doi.org/10.1093/jn/nxx036>
77. Mathiasen, A. B., Qayyum, A. A., Jørgensen, E., Helqvist, S., Kofoed, K. F., Haack-Sørensen, M., Ekblond, A., & Kastrup, J. (2020). Bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment in patients with ischaemic heart failure: final 4-year follow-up of the MSC-HF trial. *European journal of heart failure*, 22(5), 884–892. <https://doi.org/10.1002/ejhf.1700>
78. McDonagh, T. A., Metra, M., Adamo, M., Gardner, R. S., Baumbach, A., Böhm, M., Burri, H., Butler, J., Čelutkienė, J., Chioncel, O., Cleland, J. G. F., Coats, A. J. S., Crespo-Leiro, M. G., Farmakis, D., Gilard, M., Heymans, S., Hoes, A. W., Jaarsma, T., Jankowska, E. A., Lainscak, M., ... ESC Scientific Document Group (2021). 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *European heart journal*, 42(36), 3599–3726. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab368>
79. McDonagh, T., Damy, T., Doehner, W., Lam, C. S. P., Sindone, A., van der Meer, P., Cohen-Solal, A., Kindermann, I., Manito, N., Pfister, O., Pohjantähti-Maaroos, H., Taylor, J., & Comin-Colet, J. (2018). Screening, diagnosis and treatment of iron deficiency in chronic heart failure: putting the 2016 European Society of Cardiology heart failure guidelines into clinical practice. *European journal of heart failure*, 20(12), 1664–1672. <https://doi.org/10.1002/ejhf.1305>
80. McNulty, K., & Janes, S. M. (2012). Stem cells and pulmonary fibrosis: cause or cure?. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 9(3), 164–171. <https://doi.org/10.1513/pats.201201-010AW>

81. Miyazaki, E., Kato, J., Kobune, M., Okumura, K., Sasaki, K., Shintani, N., Arosio, P., & Niitsu, Y. (2002). Denatured H-ferritin subunit is a major constituent of haemosiderin in the liver of patients with iron overload. *Gut*, *50*(3), 413–419. <https://doi.org/10.1136/gut.50.3.413>
82. Morrow, D. A., Cannon, C. P., Jesse, R. L., Newby, L. K., Ravkilde, J., Storrow, A. B., Wu, A. H., Christenson, R. H., & National Academy of Clinical Biochemistry (2007). National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: Clinical characteristics and utilization of biochemical markers in acute coronary syndromes. *Circulation*, *115*(13), e356–e375. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.182882>
83. Musiał-Wysocka, A., Kot, M., & Majka, M. (2019). The Pros and Cons of Mesenchymal Stem Cell-Based Therapies. *Cell transplantation*, *28*(7), 801–812. <https://doi.org/10.1177/0963689719837897>
84. Naigamwalla, D. Z., Webb, J. A., & Giger, U. (2012). Iron deficiency anemia. *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne*, *53*(3), 250–256.
85. Nemeth, E., Valore, E. V., Territo, M., Schiller, G., Lichtenstein, A., & Ganz, T. (2003). Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood*, *101*(7), 2461–2463. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-10-3235>
86. Obagi, A., & Schoenfeld, M. (2021). Successful Percutaneous Balloon Angioplasty in a Patient Presenting With STEMI and Acute Intracranial Hemorrhage. *Cureus*, *13*(5), e15166. <https://doi.org/10.7759/cureus.15166>
87. Ohno, Y., Hanawa, H., Jiao, S., Hayashi, Y., Yoshida, K., Suzuki, T., Kashimura, T., Obata, H., Tanaka, K., Watanabe, T., & Minamino, T. (2015). Liver congestion in heart failure contributes to inappropriately increased serum hepcidin despite anemia. *The Tohoku journal of experimental medicine*, *235*(1), 69–79. <https://doi.org/10.1620/tjem.235.69>
88. Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S. M., Li, B., Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., Bodine, D. M., Leri, A., & Anversa, P. (2001). Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, *410*(6829), 701–705. <https://doi.org/10.1038/35070587>

89. Oswald, J., Boxberger, S., Jørgensen, B., Feldmann, S., Ehninger, G., Bornhäuser, M., & Werner, C. (2004). Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 22(3), 377–384. <https://doi.org/10.1634/stemcells.22-3-377>
90. Pak, H. N., Qayyum, M., Kim, D. T., Hamabe, A., Miyauchi, Y., Lill, M. C., Frantzen, M., Takizawa, K., Chen, L. S., Fishbein, M. C., Sharifi, B. G., Chen, P. S., & Makkar, R. (2003). Mesenchymal stem cell injection induces cardiac nerve sprouting and increased tenascin expression in a Swine model of myocardial infarction. *Journal of cardiovascular electrophysiology*, 14(8), 841–848. <https://doi.org/10.1046/j.1540-8167.2003.03124.x>
91. Paslawska, U., Gajek, J., Kiczak, L., Noszczyk-Nowak, A., Skrzypczak, P., Bania, J., Tomaszek, A., Zacharski, M., Sambor, I., Dziegiel, P., Zysko, D., Banasiak, W., Jankowska, E. A., & Ponikowski, P. (2011). Development of porcine model of chronic tachycardia-induced cardiomyopathy. *International journal of cardiology*, 153(1), 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2010.08.033>
92. Piperno A. (1998). Classification and diagnosis of iron overload. *Haematologica*, 83(5), 447–455.
93. Powell, L. W., George, D. K., McDonnell, S. M., & Kowdley, K. V. (1998). Diagnosis of hemochromatosis. *Annals of internal medicine*, 129(11), 925–931. https://doi.org/10.7326/0003-4819-129-11_part_2-199812011-00002
94. Prabhu S. D. (2018). THE CARDIOSPLENIC AXIS IS ESSENTIAL FOR THE PATHOGENESIS OF ISCHEMIC HEART FAILURE. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, 129, 202–214.
95. Przyklenk, K., Vivaldi, M. T., Schoen, F. J., Malcolm, J., Arnold, O., & Kloner, R. A. (1986). Salvage of ischaemic myocardium by reperfusion: importance of collateral blood flow and myocardial oxygen demand during occlusion. *Cardiovascular research*, 20(6), 403–414. <https://doi.org/10.1093/cvr/20.6.403>
96. Quaini, F., Urbanek, K., Beltrami, A. P., Finato, N., Beltrami, C. A., Nadal-Ginard, B., Kajstura, J., Leri, A., & Anversa, P. (2002). Chimerism of the transplanted heart. *The New England journal of medicine*, 346(1), 5–15. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa012081>
97. Querejeta, R., López, B., González, A., Sánchez, E., Larman, M., Martínez Ubago, J. L., & Díez, J. (2004). Increased collagen type I synthesis in patients with heart failure of

- hypertensive origin: relation to myocardial fibrosis. *Circulation*, *110*(10), 1263–1268. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000140973.60992.9A>
98. Quyyumi, A. A., Vasquez, A., Kereiakes, D. J., Klapholz, M., Schaer, G. L., Abdel-Latif, A., Frohwein, S., Henry, T. D., Schatz, R. A., Dib, N., Toma, C., Davidson, C. J., Barsness, G. W., Shavelle, D. M., Cohen, M., Poole, J., Moss, T., Hyde, P., Kanakaraj, A. M., Druker, V., ... Losordo, D. W. (2017). PreSERVE-AMI: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial of Intracoronary Administration of Autologous CD34+ Cells in Patients With Left Ventricular Dysfunction Post STEMI. *Circulation research*, *120*(2), 324–331. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.308165>
 99. Rabilloud, T., Chevallet, M., Luche, S., & Lelong, C. (2010). Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. *Journal of proteomics*, *73*(11), 2064–2077. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.05.016>
 100. Reimer, K. A., Lowe, J. E., Rasmussen, M. M., & Jennings, R. B. (1977). The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation*, *56*(5), 786–794. <https://doi.org/10.1161/01.cir.56.5.786m>,
 101. REIN H. (1951). Die Beeinflussung von Coronaroder Hypoxie-bedingten Myokar-Insuffizienzen durch Milzund Leber [The role of the spleen and liver in coronary or hypoxic myocardial insufficiency]. *Pflugers Archiv fur die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere*, *253*(4-5), 435–458. <https://doi.org/10.1007/BF00370032>
 102. Roell, W., Lewalter, T., Sasse, P., Tallini, Y. N., Choi, B. R., Breitbach, M., Doran, R., Becher, U. M., Hwang, S. M., Bostani, T., von Maltzahn, J., Hofmann, A., Reining, S., Eiberger, B., Gabris, B., Pfeifer, A., Welz, A., Willecke, K., Salama, G., Schrickel, J. W., ... Fleischmann, B. K. (2007). Engraftment of connexin 43-expressing cells prevents post-infarct arrhythmia. *Nature*, *450*(7171), 819–824. <https://doi.org/10.1038/nature06321>
 103. Rota, M., Padin-Iruegas, M. E., Misao, Y., De Angelis, A., Maestroni, S., Ferreira-Martins, J., Fiumana, E., Rastaldo, R., Arcarese, M. L., Mitchell, T. S., Boni, A., Bolli, R., Urbanek, K., Hosoda, T., Anversa, P., Leri, A., & Kajstura, J. (2008). Local activation or implantation of cardiac progenitor cells rescues scarred infarcted myocardium improving cardiac function. *Circulation research*, *103*(1), 107–116. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.178525>

104. Saito H. (2014). METABOLISM OF IRON STORES. *Nagoya journal of medical science*, 76(3-4), 235–254.
105. Sánchez Fructuoso, A., Calvo, N., Moreno, M. A., Giorgi, M., & Barrientos, A. (2007). Study of anemia after late introduction of everolimus in the immunosuppressive treatment of renal transplant patients. *Transplantation proceedings*, 39(7), 2242–2244. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2007.06.032>
106. Schneider, C., Krause, K., Jaquet, K., Geidel, S., Malisius, R., Boczor, S., Rau, T., Zienkiewicz, T., Hennig, D., & Kuck, K. H. (2008). Intramyocardial transplantation of bone marrow-derived stem cells: ultrasonic strain rate imaging in a model of hibernating myocardium. *Journal of cardiac failure*, 14(10), 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2008.08.005>
107. Schultheiss, P. C., Bedwell, C. L., Hamar, D. W., & Fettman, M. J. (2002). Canine liver iron, copper, and zinc concentrations and association with histologic lesions. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 14(5), 396–402. <https://doi.org/10.1177/104063870201400506>
108. Scirica B. M. (2010). Acute coronary syndrome: emerging tools for diagnosis and risk assessment. *Journal of the American College of Cardiology*, 55(14), 1403–1415. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.09.071>
109. Sepesy, L. M., Center, S. A., Randolph, J. F., Warner, K. L., & Erb, H. N. (2006). Vacuolar hepatopathy in dogs: 336 cases (1993-2005). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 229(2), 246–252. <https://doi.org/10.2460/javma.229.2.246>
110. Severino, P., D'Amato, A., Pucci, M., Infusino, F., Adamo, F., Birtolo, L. I., Netti, L., Montefusco, G., Chimenti, C., Lavalle, C., Maestrini, V., Mancone, M., Chilian, W. M., & Fedele, F. (2020). Ischemic Heart Disease Pathophysiology Paradigms Overview: From Plaque Activation to Microvascular Dysfunction. *International journal of molecular sciences*, 21(21), 8118. <https://doi.org/10.3390/ijms21218118>
111. Shi, W. Y., & Smith, J. A. (2018). Role of Coronary Artery Bypass Surgery in Acute Myocardial Infarction. In T. J. Watson (Eds.) et. al., *Primary Angioplasty: A Practical Guide*. (pp. 211–221). Springer.

112. Singh, S. S., Kim, D., & Mohler, J. L. (2005). Java Web Start based software for automated quantitative nuclear analysis of prostate cancer and benign prostate hyperplasia. *Biomedical engineering online*, 4, 31. <https://doi.org/10.1186/1475-925X-4-31>
113. Skrzypek, A., Mostowik, M., Szeliga, M., Wilczyńska-Golonka, M., Dębicka-Dąbrowska, D., & Nessler, J. (2018). Chronic heart failure in the elderly: still a current medical problem. *Folia medica Cracoviensia*, 58(4), 47–56.
114. Soundararajan, M., & Kannan, S. (2018). Fibroblasts and mesenchymal stem cells: Two sides of the same coin?. *Journal of cellular physiology*, 233(12), 9099–9109. <https://doi.org/10.1002/jcp.26860>
115. Suzuki, Y., Yeung, A. C., & Ikeno, F. (2011). The representative porcine model for human cardiovascular disease. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2011, 195483. <https://doi.org/10.1155/2011/195483>
116. Swirski, F. K., Nahrendorf, M., Etzrodt, M., Wildgruber, M., Cortez-Retamozo, V., Panizzi, P., Figueiredo, J. L., Kohler, R. H., Chudnovskiy, A., Waterman, P., Aikawa, E., Mempel, T. R., Libby, P., Weissleder, R., & Pittet, M. J. (2009). Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science (New York, N.Y.)*, 325(5940), 612–616. <https://doi.org/10.1126/science.1175202>
117. Tang, J. N., Cores, J., Huang, K., Cui, X. L., Luo, L., Zhang, J. Y., Li, T. S., Qian, L., & Cheng, K. (2018). Concise Review: Is Cardiac Cell Therapy Dead? Embarrassing Trial Outcomes and New Directions for the Future. *Stem cells translational medicine*, 7(4), 354–359. <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0196>
118. Tang, X. L., Rokosh, G., Sanganalmath, S. K., Yuan, F., Sato, H., Mu, J., Dai, S., Li, C., Chen, N., Peng, Y., Dawn, B., Hunt, G., Leri, A., Kajstura, J., Tiwari, S., Shirk, G., Anversa, P., & Bolli, R. (2010). Intracoronary administration of cardiac progenitor cells alleviates left ventricular dysfunction in rats with a 30-day-old infarction. *Circulation*, 121(2), 293–305. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.871905>
119. Thannickal, V. J., Zhou, Y., Gaggar, A., & Duncan, S. R. (2014). Fibrosis: ultimate and proximate causes. *The Journal of clinical investigation*, 124(11), 4673–4677. <https://doi.org/10.1172/JCI74368>

120. Thygesen, K., Alpert, J. S., White, H. D., Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction, Jaffe, A. S., Apple, F. S., Galvani, M., Katus, H. A., Newby, L. K., Ravkilde, J., Chaitman, B., Clemmensen, P. M., Dellborg, M., Hod, H., Porela, P., Underwood, R., Bax, J. J., Beller, G. A., Bonow, R., Van der Wall, E. E., ... Al-Attar, N. (2007). Universal definition of myocardial infarction. *Circulation*, *116*(22), 2634–2653. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.187397>
121. Tippairote, T., Bjørklund, G., Peana, M., & Roytrakul, S. (2021). The Proteomics Study of Compounded HFE/TF/TfR2/HJV Genetic Variations in a Thai Family with Iron Overload, Chronic Anemia, and Motor Neuron Disorder. *Journal of molecular neuroscience : MN*, *71*(3), 545–555. <https://doi.org/10.1007/s12031-020-01676-8>
122. Toma, C., Pittenger, M. F., Cahill, K. S., Byrne, B. J., & Kessler, P. D. (2002). Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*, *105*(1), 93–98. <https://doi.org/10.1161/hc0102.101442>
123. Usmanov, R. I., Zueva, E. B., Silverberg, D. S., & Shaked, M. (2008). Intravenous iron without erythropoietin for the treatment of iron deficiency anemia in patients with moderate to severe congestive heart failure and chronic kidney insufficiency. *Journal of nephrology*, *21*(2), 236–242.
124. Valarmathi, M. (Ed.). (2020). *Muscle Cells - Recent Advances and Future Perspectives*. IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.77689
125. van Klarenbosch, B. R., Chamuleau, S. A. J., & Teske, A. J. (2019). Deformation imaging to assess global and regional effects of cardiac regenerative therapy in ischaemic heart disease: A systematic review. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, *13*(10), 1872–1882. <https://doi.org/10.1002/term.2937>
126. Vela D. (2018). Balance of cardiac and systemic hepcidin and its role in heart physiology and pathology. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, *98*(3), 315–326. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2017.111>
127. Vlaar, P. J., de Smet, B. J., & Zijlstra, F. (2007). DES or BMS in acute myocardial infarction?. *European heart journal*, *28*(22), 2693–2694. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehm474>

128. Vogt, A. S., Arsiwala, T., Mohsen, M., Vogel, M., Manolova, V., & Bachmann, M. F. (2021). On Iron Metabolism and Its Regulation. *International journal of molecular sciences*, 22(9), 4591. <https://doi.org/10.3390/ijms22094591>
129. Wallach-Dayana, S. B., Golan-Gerstl, R., & Breuer, R. (2007). Evasion of myofibroblasts from immune surveillance: a mechanism for tissue fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(51), 20460–20465. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705582104>
130. Weaver, M. E., Pantely, G. A., Bristow, J. D., & Ladley, H. D. (1986). A quantitative study of the anatomy and distribution of coronary arteries in swine in comparison with other animals and man. *Cardiovascular research*, 20(12), 907–917. <https://doi.org/10.1093/cvr/20.12.907>
131. Wendelboe, A. M., & Raskob, G. E. (2016). Global Burden of Thrombosis: Epidemiologic Aspects. *Circulation research*, 118(9), 1340–1347. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306841>
132. Wessling-Resnick M. (2018). Crossing the Iron Gate: Why and How Transferrin Receptors Mediate Viral Entry. *Annual review of nutrition*, 38, 431–458. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-082117-051749>
133. White, F. C., Roth, D. M., & Bloor, C. M. (1986). The pig as a model for myocardial ischemia and exercise. *Laboratory animal science*, 36(4), 351–356.
134. Wojakowski, W., Tendera, M., Cybulski, W., Zuba-Surma, E. K., Szade, K., Florczyk, U., Kozakowska, M., Szymula, A., Krzych, L., Paslowska, U., Paslawski, R., Milewski, K., Buszman, P. P., Nabialek, E., Kuczmik, W., Janiszewski, A., Dziegiel, P., Buszman, P. E., Józkwicz, A., & Dulak, J. (2012). Effects of intracoronary delivery of allogenic bone marrow-derived stem cells expressing heme oxygenase-1 on myocardial reperfusion injury. *Thrombosis and haemostasis*, 108(3), 464–475. <https://doi.org/10.1160/TH12-05-0303>
135. Wrighting, D. M., & Andrews, N. C. (2006). Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood*, 108(9), 3204–3209. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-06-027631>
136. Writing Group Members, Mozaffarian, D., Benjamin, E. J., Go, A. S., Arnett, D. K., Blaha, M. J., Cushman, M., Das, S. R., de Ferranti, S., Després, J. P., Fullerton, H. J.,

- Howard, V. J., Huffman, M. D., Isasi, C. R., Jiménez, M. C., Judd, S. E., Kissela, B. M., Lichtman, J. H., Lisabeth, L. D., Liu, S., ... Stroke Statistics Subcommittee (2016). Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, *133*(4), e38–e360.
<https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000350>
137. Xu, Y. X., Du, F., Jiang, L. R., Gong, J., Zhou, Y. F., Luo, Q. Q., Qian, Z. M., & Ke, Y. (2015). Effects of aspirin on expression of iron transport and storage proteins in BV-2 microglial cells. *Neurochemistry international*, *91*, 72–77.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2015.10.014>
138. Zannad, F., Alla, F., Dousset, B., Perez, A., & Pitt, B. (2000). Limitation of excessive extracellular matrix turnover may contribute to survival benefit of spironolactone therapy in patients with congestive heart failure: insights from the randomized aldactone evaluation study (RALES). Rales Investigators. *Circulation*, *102*(22), 2700–2706.
<https://doi.org/10.1161/01.cir.102.22.2700>
139. Zheng, S. X., Weng, Y. L., Zhou, C. Q., Wen, Z. Z., Huang, H., Wu, W., Wang, J. F., & Wang, T. (2013). Comparison of cardiac stem cells and mesenchymal stem cells transplantation on the cardiac electrophysiology in rats with myocardial infarction. *Stem cell reviews and reports*, *9*(3), 339–349. <https://doi.org/10.1007/s12015-012-9367-6>
140. Zlatanova, I., Pinto, C., Bonnin, P., Mathieu, J. R. R., Bakker, W., Vilar, J., Lemitre, M., Voehringer, D., Vaulont, S., Peyssonnaud, C., & Silvestre, J. S. (2019). Iron Regulator Hepcidin Impairs Macrophage-Dependent Cardiac Repair After Injury. *Circulation*, *139*(12), 1530–1547.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.034545>