

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

Nediljko Pivac

**UTJECAJ BISOPROLOLA I KARVEDILOLA TE MALIH DOZA
ADRENALINA NA VELIČINU SLEZENE I SREDNJI VOLUMEN
TROMBOCITA**

Doktorska disertacija

Split, lipanj 2011.

Rad je izrađen u Zavodu za integrativnu fiziologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu te Klinici za unutarnje bolesti KBC Split.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Darija Baković Kramarić

Rad sadrži: 68 stranica

4 tablice

6 slika

*Zahvalan sam na iznimnoj suradnji, podršci i pomoći pri izradi ove disertacije prijateljima i kolegama iz **Zavoda za integrativnu fiziologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu***

*Posebnu zahvalnost dugujem mojoj mentorici **prof. dr. sc. Dariji Baković Kramarić** na vođenju pri izradi ove disertacije, potpori, strpljenu i razumijevanju*

Danijelu, Velimiru, Silvani

1.	SADRŽAJ	1
2.	POPIS KRATICA	3
3.	UVOD	4
3.1.	Utjecaj kontrakcije slezene na broj krvnih stanica u perifernoj cirkulaciji	4
3.2.	Uloga hepatokavalnog sfinktera u regulaciji pražnjenja spleničkog skladišta	6
3.3.	Srednji volumen trombocita, slezena i kardiovaskularne bolesti	8
3.4.	Blokatori betaadrenergičkih receptora	11
3.4.1.	Bisoprolol	13
3.4.2.	Karvedilol	14
3.4.3.	Mjesto betaadrenergičkih blokatora u liječenju arterijske hipertenzije	15
3.5.	Adrenalin	16
3.6.	Problematika istraživanja	19
3.7.	Hipotetska podloga navedenih ciljeva istraživanja	19
4.	METODE I ISPITANICI	21
4.1.	Protokol studije 1.	21
4.2.	Protokol studije 2.	23
5.	REZULTATI	28
5.1.	Studija 1.	28
5.2.	Studija 2.	35
6.	RASPRAVA	42

6.1.	Utjecaj bisoprolola i karvedilola na veličinu slezene i srednji volumen trombocita	42
6.2.	Uloga hepatokavalnog sfinktera u pražnjenju spleničkog skladišta	45
7.	ZAKLJUČCI	50
8.	SAŽETAK	51
9.	SUMMARY	53
10.	LITERATURA	55
11.	KRATKI ŽIVOTOPIS	68

2. POPIS KRATICA

MPV	srednji volumen trombocita, engl. <i>mean platelet volume</i>
cAMP	ciklički adenzin monofosfat, engl. <i>cyclic adenosine monophosphate</i>
ISA	parcijalna agonistička aktivnost, engl. <i>intrinsic sympathomymetic activity</i>
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina. engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
SD	standardna devijacija, engl. <i>standard deviation</i>
SE	standardna pogreška, engl. <i>standard error</i>
VTI	vremenski integral brzina, engl. <i>velocity time integral</i>
SV	udarni volumen srca, engl. <i>stroke volume</i>
CO	minutni volumen srca, engl. <i>cardiac output</i>
TPR	ukupni periferni otpor, eng. <i>total peripheral resistance</i>
MAP	srednji arterijski tlak, engl. <i>mean arterial pressure</i>
MSNA	mišićna simpatička živčana aktivnost, engl. <i>muscle sympathetic nerve activity</i>

3. UVOD

3.1. Utjecaj kontrakcije slezene na broj krvnih stanica u perifernoj cirkulaciji

Ljudska slezena je najveći limfni organ u organizmu i sudjeluje u obrambenim funkcijama organizma kao mjesto proliferacije limfocita te imunološkog nadzora i odgovora. Prenatalno je hematopoetski organ, dok poslije rođenja sudjeluje primarno u skladištenju, otklanjanju i uništenju istrošenih krvnih stanica te u recikliranju željeza i globina. Služi kao spremnik krvi jer sadrži eritrocite, leukocite i trombocite, koji se u uvjetima stresa, kao posljedica kontrakcije slezene autotransfundiraju u sistemsku cirkulaciju. Smještena je između devetog i dvanaestog lijevog rebra te fundusa želuca i ošita, a obično je dužine 13-15 cm, širine 8-10 cm i oko 4 cm debljine, a teška je oko 150 g. Sastavljena je od potpornog vezivnog tkiva koje se sastoji od tanke fibroelastične ovojnice (oko 1,5 mm) od koje prema unutrašnjosti polaze trabekule, između kojih je jedinstveni funkcionalni parenhim kojeg čine crvena i bijela pulpa. Crvena pulpa se sastoji od terminalnih ogranaka centralne arterije, spleničkih sinusa i vena, dok bijelu pulpu čine uglavnom limfociti, a sve je prožeto mrežom retikularnih stanica i niti. U slezeni je uskladišteno oko 200-250 ml guste krvi, čiji je hematokrit dvostruko veći od onog u perifernoj cirkulaciji i iznosi oko 80%.¹ Na slezenu otpada oko 5% minutnog volumena srca, što je oko deset puta više po gramu tkiva nego u skeletnim mišićima, a gotovo je jednak protoku u srčanom mišiću. Inervacija slezene potječe od gornjeg mezenteričkog i celijačnog ganglija čije živčane niti ulaze u slezenu uz spleničku arteriju i većina njih (oko 98%) pripada simpatičkom živčanom sustavu.² Slezena je među najgušće inerviranim organima simpatičkim živčanim sustavom, primjerice nekoliko puta više od jetre i pluća.

Premda je u prošlosti vladalo mišljenje da slezena ne može mijenjati volumen, u novije vrijeme su imunohistokemijskim bojanjem otkriveni kontraktilni proteini, ne samo u krvnim žilama, ovojnici i trabekulama nego i u retikularnim stanicama bijele pulpe, te u stanicama sinusa crvene pulpe, koji su odgovorni za promjenu volumena slezene iznutra, a ne samo kontrakcijom kapsule slezene.³ Do promjene veličine slezene dolazi pod utjecajem katekolamina koji se pojačano luče u raznim stresnim situacijama. Oni djeluju preko $\alpha_1, \alpha_2, \beta_1$ i β_2 adrenergičkih receptora koji se nalaze u ovojnici i krvnim žilama

slezene.⁴ Donedavno se smatralo da je kontrakcija slezene pasivni proces, izazvan smanjenim protokom kroz spleničku arteriju, pod utjecajem simpatičkog živčanog sustava, što dovodi do kolapsa slezene.⁵ Međutim, Baković i sur. su pokazali da se kontrakcija slezene događa na samom početku apneje, uz nepromijenjen protok kroz spleničku arteriju, što ukazuje da je u pitanju aktivan, a ne pasivan proces.⁶ Kontrakcijom slezene pod utjecajem adrenergičke stimulacije za vrijeme tjelovježbe, ronjenja ili apneje dolazi do istiskivanja krvi u sistemsku cirkulaciju.^{5,6,7} Općenito je prihvaćena mogućnost autotransfuzije veće količine eritrocita slezeninom kontrakcijom u sistemsku cirkulaciju tijekom stresa, što povećava oksigenacijski transport krvi. To omogućuje duže trajanje zarona kod nekih vodenih sisavaca, kao što je morska medvjedica^{8,9}, ili poboljšanje aerobnoga kapaciteta kod nekih trkaćih životinja, kao što su konj i pas.^{10,11} Primjerice, u konja i pasa je zapaženo značajno smanjenje volumena slezene tijekom napora, uz porast hemoglobina i hematokrita u perifernoj krvi, dok do porasta nije došlo ukoliko su životinje bile splenektomirane, što ukazuje na ulogu slezene kao važnog skladišta krvi.^{10,11} Slično je opaženo i u zdravih dobrovoljaca u kojih je tijekom opterećenja na biciklergometru došlo do značajnog smanjenja veličine slezene, uz porast hematokrita i hemoglobina u perifernoj krvi.^{12,13} Osim porasta broja eritrocita, opažen je i povećan broj leukocita u zdravih osoba i drugih sisavaca, tijekom tjelovježbe ili infuzije katekolamina.^{8,14,15,16} Štoviše, Ojiri i suradnici su našli značajan porast eritrocita i leukocita, ali ne i trombocita u perifernoj krvi psa, nakon davanja adrenalina, koji je izostao nakon privremenog izdvajanja slezene iz sistemske cirkulacije, kratkotrajnim podvezivanjem spleničke arterije i vene.¹⁶ Baković i suradnici su također dokazali brzi porast koncentracije leukocita i eritrocita i kontrakciju slezene tijekom ponavljanih apneja s licem uronjenim u hladnu vodu, u profesionalnih ronilaca i netreniranih ispitanika, dok to nije bio slučaj u splenektomiranih osoba.¹⁷ Zanimljivo i pomalo neočekivano, ni u jednoj skupini ispitanika nije došlo do povećanja koncentracije trombocita, što bi ukazivalo da slezena nije izmjenljivi spremnik za ovu vrstu krvnih stanica. Međutim, naknadnom analizom podataka je utvrđeno da su u prve dvije skupine ispitanika trombociti bili većeg volumena u odnosu na one splenektomiranih osoba, pa su autori zaključili da je nepromijenjena koncentracija trombocita u perifernoj krvi rezultat izbacivanja velikih trombocita iz slezene u zamjenu za manje, koje je preuzela slezena.¹⁸

U istom istraživanju, kod splenektomiranih osoba nisu se mijenjali veličina ni broj trombocita, što očito ukazuje na ulogu slezene kao skladišta velikih trombocita. Slične promjene krvnih stanica u perifernoj krvi su pokazali Ojiri i suradnici na psima tijekom infuzije adrenalina; međutim, nisu obraćali pozornost na veličinu trombocita.¹⁶ Postoje i oprečni rezultati; primjerice kada je u zdravih osoba tijekom tjelovježbe ili davanja adrenalina zabilježen porast sve tri loze krvnih stanica.^{15,19} Takve razlike u rezultatima istraživanja mogle bi biti posljedica različitih načina, odnosno jačine podražaja slezene na kontrakciju, koja dovode do istiskivanja krvnih stanica. Do sada nije sasvim poznat točan mehanizam istiskivanja krvnih stanica iz slezene, ali se pretpostavlja da su oni različiti za određene krvne stanice.⁵ S obzirom na kompleksnu građu slezene te da su dokazani završeci simpatičkih živaca u blizini krvnih žila i kontraktilnih proteina, vjerojatno se slezena ne prazni samo pod utjecajem katekolamina preko adrenoreceptora u ovojnici nego i aktivacijom simpatičkih živaca iznutra.^{3,5} Kako odjeljci slezene pretežito sadržavaju različite krvne stanice, to se tijekom različitih podražaja istiskuju različite vrste stanica, ovisno o vrsti i jačini podražaja (npr. tjelovježba, apneja, farmakološki poticaj).⁵ Poznato je da trombociti podrijetlom iz slezene imaju za oko 20% veći volumen od cirkulirajućih trombocita te da je njihovo srednje vrijeme prolaska kroz slezenu traje oko deset minuta i značajno je duže nego za eritrocite, koje iznosi oko jednu minutu.⁵ To upućuje na to da su nakon ulaska u slezenu trombociti zarobljeni, što povećava spleničko skladište krvi, koje nije izmjenjivo osim ako podražaj nije dovoljno jak, što apneja, za razliku od tjelovježbe, vjerojatno nije.¹⁷

3.2. Uloga hepatokavalnog sfinktera u regulaciji pražnjenja spleničkog skladišta

Mnogim kopnenim sisavcima i onima koji žive u vodi, slezena služi kao važna pričuva krvi dok su u stanju mirovanja. Za vrijeme tjelesnog napora ili ronjenja dolazi do kontrakcije slezene i istiskivanja krvi u sistemsku cirkulaciju, što poboljšava aerobne sposobnosti i omogućuje dulji zaron.^{8,14} Opaženo je da se tijekom kontrakcije slezene

tuljana nakon davanja adrenalina istiskuje gusta krv, čiji hematokrit u spleničkoj veni iznosi oko 90%, uz značajan porast hematokrita u perifernoj cirkulaciji.¹⁴ Kako se radi o vrlo viskoznoj krvi, istiskivanje cijelog volumena iz slezene tijekom kontrakcije moglo bi bitno opteretiti kardiovaskularni sustav. Međutim, velika količina krvi koja se na taj način istisne iz slezene zadržava se u jetrenim sinusima (venama) i može iznositi oko 20% ukupnog tjelesnog volumena krvi.¹⁴ Iako se maksimalna kontrakcija slezene u tuljana javila unutar tri minute od primjene adrenalina, vršni porast hematokrita u perifernoj cirkulaciji je zabilježen tek nakon 15-25 minuta.⁸ Postavilo se pitanje odgođenog porasta hematokrita u odnosu na kontrakciju slezene, a odgovor su dali u svom istraživanju Thornton i sur.⁹ Dokazali su kod morskih medvjedica, koje imaju veliki splenički rezervoar krvnih stanica, da se brzom kontrakcijom slezene za vrijeme zarona istovremeno pune jetreni sinusi, čime su potvrdili njihovu funkcionalnu povezanost sa slezenom.⁹ Nadalje, opazili su odgođeni porast hematokrita u perifernoj krvi, koji je nastao znatno kasnije u odnosu na kontrakciju slezene, koja se dogodila na samom početku zarona, a što su objasnili zadržavanjem krvi istisnute iz slezene u sinusima jetre. Zadržavanje krvi u jetrenim sinusima i njezino postupno propuštanje omogućuje sfinkter koji je smješten u donjoj šupljoj veni, u razini kranijalnog dijela ošita i pod utjecajem je freničkog živca.²⁰ Njegovim povremenim opuštanjem za vrijeme ronjenja propušta se oksigenirana krv iz hepatalnih sinusa u donju šuplju venu, što omogućuje duži zaron u vodenih sisavaca. Ovaj mehanizam je odgovoran za veći sadržaj kisika u venskoj nego u arterijskoj krvi, a sam fenomen je poznat kao Elsnerov paradoks.²¹ Istraživanja na leševima ljudi pokazala su da je stijenka jetrenih vena zadebljana na samom ušću u donju šuplju venu. Histološkom analizom su ustanovili da se zadebljanje sastoji od tri sloja, a čine ga uzdužne i polukružne mišićne, kolagene i elastične niti, koje se isprepleću s onima u stijenci donje šuplje vene i zajedno čine sfinkterski mehanizam koji ima važnu fiziološku ulogu u regulaciji jetrene cirkulacije.^{22,23} U ljudi je također dokazano da kontrakcija slezene potaknuta tjelovježbom, apnejom ili davanjem adrenalina uzrokuje porast hematokrita i hemoglobina.^{17,24,25} Međutim, istraživači nisu obraćali pozornost na dinamiku njihovog porasta u perifernoj krvi.

Ljudska slezena sadrži oko 250 ml guste krvi, čiji hematokrit iz spleničke vene iznosi oko 80%, što znači da se u slezeni nalazi oko 8% ukupnih eritrocita u tijelu, a to je mala

količina u odnosu na 50%-ni sadržaj u nekih kopnenih i vodenih sisavaca.^{8,14,26} Oko 20-25% porasta perifernog hematokrita za vrijeme tjelovježbe pripisuje se eritrocitima istisnutim iz slezene,^{12,13} što govori da je slezena vrlo važan organ u povećavanju aerobnog kapaciteta. Također, u slezeni je uskladišteno 1/3 ukupne količine trombocita u tijelu i oko 40% leukocita.

Budući se radi o vrlo viskoznoj krvi, istiskivanje iz slezene za vrijeme kontrakcije moglo bi bitno povećati viskoznost periferne krvi i time pridonijeti povećanju rizika od trombotskih komplikacija. Kakvu ulogu u sprječavanju takvih događaja imaju jetreni sinusi, odnosno vene jetre i hepatokavalni sfinkter u ljudi, za sada nije poznato. Da bih razjasnio moguću ulogu hepatokavalnog sfinktera u nakupljanju krvi u jetri koja je istisnuta iz slezene nakon njezine kontrakcije kod ljudi, ultrazvučno sam pratio promjene veličine slezene i jetrene vene, nakon infuzije adrenalina. Nadalje, budući da je slezena skladište reaktivnih trombocita velikog volumena, radio sam analizu hematoloških parametara iz periferne krvi nakon infuzije adrenalina. Također sam određivao dinamiku promjena hematokrita, leukocita, ukupnog broja trombocita kao i udjela velikih trombocita u perifernoj krvi.

3.3. Srednji volumen trombocita, slezena i kardiovaskularne bolesti

Ključnu ulogu u nastanku ateroskleroze krvnih žila i njezinih trombotskih, odnosno ishemijskih komplikacija kao što su akutni infarkt miokarda, nestabilna pektoralna angina i ishemijski moždani udar, imaju trombociti.^{27,28} Međutim, sve je jasnije kako ateroskleroza nije jednostavan, pasivni proces, već zapravo vrlo složen kronični upalni proces koji se može pretvoriti u akutni klinički incident, posebno u akutni koronarni sindrom, u podlozi kojeg je najčešće ruptura aterosklerotskog plaka i posljedična ishemija.^{29,30} Središnju ulogu u cijelom procesu ima aktivacija trombocita, te posljedična adhezija i agregacija na endotel krvne žile, potom aktivacija koagulacijskog niza uz stvaranje trombocitno-fibrinskog ugruška.^{31,32} Poznato je da se trombociti u osoba s povišenim arterijskim tlakom razlikuju morfološki i biokemijski od onih u normotoničara, te da su skloniji adheziji i agregaciji.³³ Dosadašnja istraživanja dokazala su kako veličina

trombocita, mjerenja kao “srednji volumen trombocita” (engl. *mean platelet volume*, MPV) značajno korelira s njihovom reaktivnošću.³⁴ Veći trombociti pokazuju znatno veću metaboličku i enzimsku aktivnost, imaju veću intracelularnu količinu tromboksana A₂, kao i povećanu koncentraciju prokoagulacijskih proteina na površini stanice (P selectin, GpIIb/IIIa), a time i veći protrombotski potencijal od manjih trombocita.³⁵⁻³⁸ Prema novijim istraživanjima postoji pozitivna veza između veličine trombocita, rizika nastanka i težine akutnih ishemijskih koronarnih i cerebrovaskularnih događaja.^{38,39,40} Veći volumen trombocita je uočen i u osoba s povećanim kardiovaskularnim rizikom kao što su oni sa hiperkolesterolemijom,⁴¹ šećernom bolesti,⁴² arterijskom hipertenzijom⁴³ i pretilošću,⁴⁴ što sugerira zajednički mehanizam u nastanku kardiovaskularnih bolesti. Štoviše, veći srednji volumen trombocita je opažen i u hipertoničara u kojih nije očuvan dnevni ritam tlaka, odnosno u kojih izostaje noćni pad tlaka,⁴⁵ te u onih sa oštećenjem ciljnih organa,⁴⁶ a poznato je da su upravo ti bolesnici skloni nepovoljnom kardiovaskularnom ishodu.⁴⁷ U mnogim studijama koje su objavljene posljednjih godina uočena je značajna povezanost između srednjeg volumena trombocita i kardiovaskularnih bolesti, od angine pektoris,⁴⁸ akutnog infarkta miokarda^{49,50} i ishemijskog moždanog udara,⁵¹ kao i ranih komplikacija nakon intervencija na koronarnim žilama, u vidu okluzije ugrađenih stentova.^{52,53} Prema najnovijim istraživanjima, veličina trombocita je direktno povezana ne samo s nastankom infarkta miokarda i restenozama nakon perkutane koronarne intervencije nego i sa bitno većom smrtnosti nakon infarkta miokarda.⁵⁴ S druge strane, poznato je da povećani volumen trombocita usko korelira s ostalim pokazateljima aktivacije trombocita, kao što su pojačana agregacija i sinteza β-tromboglobulina te očitovanje adhezijskih molekula.⁵⁵ Stoga se u posljednje vrijeme posebna pažnja poklanja pronalaženju dodatnih informacija vezanih uz fiziologiju trombocita, procjenu njihove aktivnosti i razvoj antitrombotične terapije. Postoji cijeli niz različitih pokazatelja koji se koriste za procjenu aktivnosti trombocita, od kojih su mnogi komplicirani i vrlo skupi postupci.⁵⁶ Iako je tehnika određivanja srednjeg volumena trombocita ustanovljena još prije 30-ak godina,⁵⁷ tek je u novije vrijeme prepoznat kao dijagnostički i prognostički pokazatelj nastanka kardiovaskularnih bolesti.⁵⁸ Dakle, određivanje veličine trombocita procjenjivanjem njihovog srednjeg volumena jednostavna je i vrlo dostupna metoda za iznimno dobru

procjenu funkcije trombocita, koja ne zahtijeva posebnu aparaturu, izučeno osoblje, kao ni utrošak vremena i materijalnih sredstava. Glavno skladište trombocita kod ljudi je slezena, koja sadrži oko 1/3 ukupne količine trombocita koji se otpuštaju u cirkulaciju u različitim stanjima povišenog tonusa simpatičkog živčanog sustava.^{59,60} Dosadašnja istraživanja su dokazala kako upravo trombociti uskladišteni u slezeni imaju za oko 20% veći volumen od onih u perifernoj cirkulaciji,^{61,62,63} a poznato je da 98% od ukupnog porasta broja trombocita nakon tjelovježbe potječe upravo iz slezene, kako u zdravih osoba, tako i u bolesnika s koronarnom bolesti.^{64,65,66} Zamijećeno je da nakon tjelovježbe dolazi do porasta broja velikih trombocita u perifernoj krvi što se objašnjava njihovim istiskivanjem iz slezene, tijekom njezine kontrakcije.⁶⁷ Sličan porast veličine, ali ne i broja trombocita dokazali su Baković i sur. u profesionalnih ronilaca i zdravih osoba za vrijeme ponavljanih apneja, što nije bio slučaj u splenektomiranih osoba.¹⁷ Stoga, slezena kao glavno skladište velikih, reaktivnih trombocita, može imati važnu ulogu u nastanku akutnih koronarnih događaja, osobito u uvjetima stresa. Kontrakcija slezene i posljedični porast krvnih stanica u perifernoj cirkulaciji je posredovan podraživanjem adrenergičkih receptora, od kojih se u čahuri ljudske slezene nalaze četiri vrste – α_1 , α_2 , β_1 i β_2 receptori.^{4,67} Istraživanja su pokazala da podraživanje α adrenergičkih receptora uzrokuje kontrakciju i smanjenje broja trombocita u slezeni, uz posljedični porast u perifernoj cirkulaciji, dok podraživanje β adrenergičkih receptora ima suprotan učinak.⁶⁸ S druge strane, postoje dokazi da selektivni (metoprolol) i neselektivni betablokatori (propranolol) uzrokuju porast trombocita u perifernoj krvi, što se tumači smanjenjem volumena slezene zbog inhibicije njezine relaksacije ovim lijekovima.^{69,70} Nadalje, Punda i sur. su dokazali povoljniji učinak neselektivnog (propranolol) od selektivnog (atenolol) betablokatora na agregaciju trombocita, što bi mu dalo stanovitu prednost u liječenju hipertoničara, osobito onih s povećanim kardiovaskularnim rizikom.⁷¹ Stoga je cilj prve studije bio utvrditi učinak dvaju beta adrenergičkih blokatora, bisoprolola i karvedilola na veličinu slezene, ukupni broj i srednji volumen trombocita u perifernoj krvi, u novootkrivenih, neliječenih hipertoničara, prije i nakon testa opterećenja. Pretpostavka je bila da će karvedilol uzrokovati slabiju kontrakciju slezene i manji porast broja i srednjeg volumena trombocita u perifernoj krvi u odnosu na bisoprolol zbog dodatnog blokiranja α receptora u kapsuli slezene, koji su odgovorni za njezinu kontrakciju. Stoga, klinički

gledano, moglo bi se očekivati manje kardiovaskularnih komplikacija u hipertoničara liječenih karvedilolom nego u onih liječenih bisoprololom.

3.4. Blokatori betaadrenergičkih receptora

Riječ je o heterogenoj skupini kompeticijskih antagonista katekolamina na razini beta-receptora izvršnih tkiva. Odavno je poznato da postoje beta₁ i beta₂ receptori dok su novija istraživanja dokazala i postojanje beta₃ receptora. Sva tri podtipa receptora stimuliraju adenilat ciklazu i tako povećavaju unutarstaničnu koncentraciju cAMP-a, dok se bitno razlikuju po smještaju i učinku. Beta₁ receptori se uglavnom nalaze u srcu, gdje su odgovorni za pozitivni inotropni i kronotropni učinak, dok su beta₂ receptori odgovorni za opuštanje glatkih mišića u brojnim organima, u prvom redu bronha i krvnih žila, gdje uzrokuju bronhodilataciju i vazodilataciju. Beta₃ receptori se uglavnom nalaze u masnom tkivu gdje stimuliraju lipoproteinsku lipazu i tako dovode do lipolize. Dok su beta₁ i beta₃ receptori znatno osjetljiviji na noradrenalin, beta₂ receptori su osjetljiviji na adrenalin. Sintetizirano je više od tisuću spojeva koji se odlikuju kompeticijskim antagoniziranjem betareceptora, ali je samo njih tridesetak ušlo u kliničku praksu. Najčešće se koriste u liječenju arterijske hipertenzije, koronarne bolesti, zatajenja srca i različitih aritmija te u stanjima kao što su hiperkinetski sindrom, hipertireoza ili hipertrofijska kardiomiopatija. Među raspoloživim agensima postoje izvjesne farmakodinamske (membranska aktivnost, parcijalna agonistička aktivnost, kardioselektivnost) i farmakokinetičke (liposolubilnost, hidrosolubilnost, učinak prvog prolaza kroz jetru) razlike.^{72,73,74} **Membranska aktivnost** podrazumijeva kočenje brzog transmembranskog utoka natrija koju posjeduju propranolol, oksprenolol, pindolol i karvedilol, koja se javlja tek pri vrlo visokim, klinički iznimno primjenjivim dozama, dok je pri terapijskim koncentracijama praktički zanemariva. Prednost ovih spojeva bi bila u potencijalno većem antiaritmičkom učinku, a nedostatak uz kardiodepresivnosti. **Parcijalna agonistička aktivnost** (engl. *intrinsic sympathomimetic activity ili ISA*) podrazumijeva inhibiciju, ali i stimulaciju beta receptora. Posjeduju je alprenolol, oksprenolol i pindolol. Opaža se pri niskom adrenergičkom tonusu (npr. u mirovanju) ili pri visokim dozama. Moguća prednost ovih lijekova je u manjoj pojavnosti bradikardije, bronhospazma i sindroma ustezanja. S druge strane, pripisuje im se nepovoljan učinak na postinfarktну protekciju i smanjenje

smrtnosti bolesnika sa zatajenjem srca.⁷⁵ **Kardioselektivnost** ukazuje na intenzivnije blokiranje beta₁ nego beta₂ receptora te ima nešto veće kliničko značenje. Očekivati je bolji antihipertenzivni učinak kardioselektivnih, a posebice visoko kardioselektivnih betablokatora (bisoprolol, npr.) u odnosu na neselektivne. Prednost prema potonjim im je svakako i manji nastanak nuspojava, kao što su bronhospazam i hladni udovi. Međutim, valja napomenuti da je kardioselektivnost ovih lijekova relativna jer se ona gubi pri višim dozama.⁷⁶ **Liposolubilnost** betablokatora predstavlja njihovu topivost u mastima, koja utječe na bioraspoloživost i prodiranje u središnji živčani sustav, što može dovesti do povoljnijeg učinka na migrenu, ali i učestalijih nuspojava (noćne more, npr.). Imaju kraći poluvijek, opsežno se metaboliziraju u jetri i izlučuju putem žuči. Kumuliraju pri zatajenju jetre pa im dozu treba prilagoditi. Ovu osobinu posjeduju propranolol, metoprolol, timolol, oksprenolol i nebivolol. **Hidrosolubilni** betablokatori su atenolol i sotalol. Manje se metaboliziraju, a većim dijelom izlučuju mokraćom u nepromijenjenom obliku. Imaju duži poluvijek i izazivaju manje nuspojava sa strane središnjeg živčanog sustava. Kumuliraju pri bubrežnoj insuficijenciji pa im u tom slučaju treba smanjiti dozu.

U novije su vrijeme u upotrebi agensi koji uz beta₁ i beta₂ blokiraju i alfa₁ receptore, pa tako postižu vazodilatacijski učinak. Pripadaju trećoj generaciji betablokatora za razliku od prve (neselektivni) ili druge generacije (selektivni) betablokatora. U ovu skupinu pripadaju neselektivni betablokatori labetalol, karvedilol i bucindolol te kardioselektivni nebivolol, koji uz blokadu beta₁ receptora, postiže vazodilatacijski učinak pojačanom sintezom dušikovog oksida.⁷⁷ Blokatori betaadrenergičkih receptora su skupina lijekova vrlo dobre podnošljivosti, a tek u oko 3-5% bolesnika izazivaju nuspojave, čija se učestalost može smanjiti pravilnim odabirom i doziranjem.⁷⁸ Najčešće se spominje izazivanje bronhospazma u bolesnika s bronhalnom astmom, hladni udovi zbog periferne vazokonstrikcije, smetnje atrioventrikulskog provođenja, centralni učinci (noćne more, depresija) te prikrivanje znakova hipoglikemije u bolesnika s inzulin ovisnom šećernom bolesti (tremor, tahikardija), ako su u pitanju neselektivni betablokatori. Ne bi ih trebalo davati bolesnicima s bronhalnom astmom, bradikardijom, atrioventrikulskim smetnjama provođenja i teškom depresijom. Međutim, ovi lijekovi se mogu davati bolesnicima s kroničnom opstruktivskom bolesti pluća,

perifernom opstruktivskom arteriopatijom kao i šećernom bolesti, ali uz dodatnu pozornost.⁷⁸

3.4.1. Bisoprolol

Riječ je o visoko selektivnom betablokatoru čiji je afinitet prema β_1 adrenergičkom receptoru oko 120 puta veći nego prema β_2 receptoru, dok je, primjerice, taj odnos za srodni mu metoprolol oko 75:1. Ima osobine hidrofilnog i lipofilnog lijeka, što mu omogućava povoljan farmakokinetički profil. Ne posjeduje membransku ni parcijalnu agonističku aktivnost. Nakon peroralne primjene absorbira se gotovo u cijelosti, uz minimalni učinak prvog prolaza kroz jetru pa mu se bioraspodjelivost kreće oko 90%. Tek se oko 30% lijeka veže o proteine plazme, polovica lijeka se metabolizira u jetri, a druga polovica izlučuje bubregom u nepromijenjenom obliku.⁷⁹ Poluvijek eliminacije iz plazme je oko 10-12 sati i tek neznatno se mijenja pri zatajenju jetre ili bubrega, tako da u tim stanjima nije potrebno podešavati dozu lijeka.⁸⁰ Povoljan farmakokinetički profil ga čini pogodnim za jednokratno doziranje pa se obično u liječenju arterijske hipertenzije daje u dozi 5-10 mg, iako se spominju i doze do 20 mg. Farmakološki gledano, bolji antihipertenzivni učinak se očekuje od selektivnih betaadrenergičkih blokatora u odnosu na neselektivne koji blokiranjem i β_2 receptora uzrokuju perifernu vazokonstrikciju, zbog neoponirane blokade α_1 adrenergičkih receptora. Bisoprolol se dvadesetak godina koristi u liječenju arterijske hipertenzije,⁸¹ a nešto kraće vrijeme u liječenju koronarne bolesti⁸¹ i zatajenja srca.⁸² Dokazan mu je dobar učinak na sniženje sistoličkog i dijastoličkog tlaka tijekom 24 sata, kako u starijih tako i u mlađih hipertoničara, uz sličan ili čak nešto bolji od srodnika⁸³⁻⁸⁶, a sličan je učinku ostalih vrsta antihipertenziva.⁸¹ S obzirom na visoki stupanj kardioselektivnosti bisoprolola očekuje se manja pojavnost nuspojava tijekom njegove primjene kao i metaboličkih otklona, u prvom redu hiperglikemije i hiperlipidemije, u odnosu na neselektivne betablokatore.

3.4.2. Karvedilol

To je neselektivni beta adrenergički blokator s dodatnim vazodilatacijskim učinkom koji nastaje zbog blokiranja α_1 adrenergičkih receptora. Podjednako djeluje na β_1 i β_2 receptore, dok je učinak na α_1 receptore deset puta manji, a na α_2 receptore je praktički zanemariv.⁸⁷ Pripisuju mu se i svojstva antagonista kalcija, ali samo pri visokim koncentracijama, što izgleda nije bitno za njegov antihipertenzivni učinak. Za razliku od drugih betablokatora ovaj lijek posjeduje antioksidacijski i antiproliferacijski učinak, što bi klinički moglo biti od osobite važnosti.⁸⁷ Posjeduje membransku, ali ne i parcijalnu agonističku aktivnost. Nakon peroralne primjene u potpunosti se apsorbira i maksimalnu koncentraciju u plazmi postiže za 1-2 sata, podjednako u hipertoničara i zdravih osoba, a procesi se usporavaju ako se lijek uzima sa hranom, što ne utječe na njegov konačni učinak.⁸⁸ Poslije oralne primjene podliježe učinku prvog prolaza kroz jetru, pa mu je bioraspodjelivost tek oko 25%, a kako je izrazito topiv u mastima, volumen distribucije mu je relativno velik. U velikoj mjeri se (oko 98%) veže za proteine plazme, uglavnom albumine, dok mu je plazmatski poluvijek 7-10 sati.⁸⁸ Metabolizira se u jetri, a inaktivni metaboliti se izlučuju putem žuči, manji dio mokraćom, a tek zanemariva količina (oko 2%) se izlučuje nepromijenjena mokraćom.⁸⁹ U starijih osoba i u onih s oštećenjem funkcije jetre smanjen je klirens pa je u tih osoba potreban oprez u propisivanju ovog lijeka, dok kod bubrežnih bolesnika farmakokinetika nije bitno poremećena pa dozu nije potrebno podešavati.^{90,91} Karvedilol se zadnjih dvadesetak godina uspješno koristi u liječenju arterijske hipertenzije, a učinak je bio podjednak s onim u srodnika i ostalih antihipertenziva.^{92,93} U bolesnika s teškim stupnjem zatajenja srca, ishemijskog i neishemijskog podrijetla, karvedilol je značajno smanjio ukupnu i kardiovaskularnu smrtnost pa je uz još neke betablokatore nezaobilazan u liječenju tih stanja.^{94,95} Također mu je dokazan povoljan učinak u liječenju bolesnika s disfunkcijom lijeve klijetke nakon infarkta miokrada,⁹⁶ a značajnu ulogu ima i u liječenju bolesnika sa stabilnom anginom pektoris.⁹⁷ Povoljan antihipertenzivni učinak karvedilola u bolesnika s blagom i umjerenom hipertenzijom je postignut uglavnom u rasponu doza 25-50 mg. Nije opažena razlika u djelotvornosti između jednokratnog i dvokratnog uzimanja lijeka, a kontrola tlaka je kod oba načina liječenja bila trajna tijekom 24 sata i podjednaka učinku ostalih

vrsta antihipertenziva.⁹³ Pogodan je za liječenje u kombinaciji s tiazidskim diureticima i antagonistima kalcijevih kanala s kojima postiže aditivni antihipertenzivni učinak, dok to nije slučaj s inhibitorima konvertaze angiotenzina i antagonistima angiotenzinskih receptora.⁹² Za razliku od većine betablokatora koji mogu poremetiti glukoregulaciju i metabolizam lipoproteina, izgleda da je karvedilol metabolički neutralan, što mu daje stanovitu prednost prema srodnicima.^{92,98}

3.4.3. Mjesto betaadrenergičkih blokatora u liječenju arterijske hipertenzije

Iako se betablokatori oko četiri desetljeća koriste u liječenju arterijske hipertenzije, točan mehanizam njihovog antihipertenzivnog učinka nije posve jasan. Niži udarni volumen srca, smanjeno otpuštanje noradrenalina iz simpatičkih živaca, pad sekrecije renina iz jukstaklomerulskih stanica bubrega i rjeđa simpatička izbijanja te smanjenje centralne vazomotorne aktivnosti, samo su neki od pretpostavljenih mehanizama.^{74,78} Povoljniji antihipertenzivni učinak se može očekivati od selektivnih betablokatora, s obzirom na to da manje povećavaju perifernu žilnu rezistenciju od neselektivnih. Međutim, zadnjih godina se iznose prijeporna mišljenja o učinkovitosti ovih lijekova, osobito u primarnoj prevenciji srčanožilnih komplikacija u hipertoničara.⁹⁹⁻¹⁰⁴ Naime, rezultati metaanaliza više randomiziranih studija pokazali su slabiju djelotvornost ovih lijekova u prevenciji srčanožilnih komplikacija, navlastito moždanog udara u starijih bolesnika.^{101,102} Ta se pojava pokušava objasniti razlikom u hemodinamici hipertenzije: u starijih je adrenergički tonus niži, tlak pulsa veći, a minutni volumen manji pa su i očekivani učinci blokiranja β adrenergičkih receptora slabiji.¹⁰⁰ Nadalje, čak i uz jednako sniženje srednjeg arterijskog tlaka izmjereno na periferiji, betablokatori povećavaju tlak pulsa i nedostavno snižavaju tenziju u velikim krvnim žilama starijih osoba, što pogoduje makrovaskularnim komplikacijama.¹⁰⁵ Međutim, Khan i sur. su ustanovili da betablokatori u mlađih hipertoničara snižavaju ukupni srčanožilni rizik, čak i više od drugih antihipertenziva, što nije bio slučaj u starijih osoba.¹⁰⁴ Većina se podataka iz spomenutih istraživanja odnosila na najčešće propisivani betablokator atenolol. Postavlja se pitanje bi li isti rezultati bili postignuti i s drugim srodnicima, navlastito novijim agensima poput bisoprolola, karvedilola i nebivolola.¹⁰⁶ Međutim, najnovije analize podataka iz istraživanja na velikom broju mladih i starijih hipertoničara su ipak potvrdile podjednaku učinkovitost

svih pet osnovnih kategorija antihipertenziva na prevenciju srčanožilnih komplikacija.¹⁰⁷ Stoga se povoljan učinak ovih lijekova na smanjenje kardiovaskularnih komplikacija u prvom redu tumači odgovarajućim sniženjem tlaka, a ne pleotropnim osobinama samih lijekova. Stoga betablokatori mogu biti lijekovi prvog izbora za mlađe hipertoničare, a u slučaju apsolutnih indikacija (koronarna bolest, zatajenje srca), ili u kombinaciji s drugim antihipertenzivima, treba ih propisati svim hipertoničarima, ukoliko nema kontraindikacija za njihovu primjenu.^{106,108} Ipak, ne preporuča ih se propisivati starijim osobama te onima s visokim rizikom nastanka šećerne bolesti (osobe s oštećenom tolerancijom glukoze ili metaboličkim sindromom), osobito ne u kombinaciji s diureticima.^{108,109} U tom pravcu bi stanovitu prednost trebali imati beta blokatori s vazodilatacijskim djelovanjem (karvedilol i nebivolol) ili visoko selektivni beta₁ blokator (bisoprolol npr.).

3.5. Adrenalin

Pripada skupini endogenih katekolamina koji djeluje na α i β adrenergičke receptore tkiva koje inervira simpatički živčani sustav, osim znojnih žlijezda i krvnih žila lica.¹¹⁰ Beta adrenergički učinak postiže aktivacijom enzima adenil ciklaze na unutrašnjoj strani stanične membrane te tako povećava intracelularnu koncentraciju cikličkog AMP-a, drugog glasnika, dok mu je alfa adrenergički učinak rezultat inhibicije istog enzima.¹¹⁰

Glavni se učinci adrenalina očituju na srcu, bronhima, krvnim žilama te nekim drugim organima i sustavima. Kada se daje u malim dozama, uzrokuje dilataciju krvnih žila u mišićima stimulacijom β_2 receptora, dok veće doze uzrokuju perifernu vazokonstrikciju podraživanjem α receptora, koji su manje osjetljivi na adrenalin od beta receptora. Stoga male doze adrenalina (0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) mogu uzrokovati pad arterijskog tlaka zbog veće osjetljivosti vazodilatacijskih β u odnosu na vazokonstriksijske α receptore.¹¹⁰ Farmakološke doze uzrokuju veći porast sistoličkog nego dijastoličkog tlaka, koji se čak može sniziti, uz porast tlaka pulsa, dok još veće doze (>10 $\mu\text{g}/\text{min}$) uzrokuju porast sistoličkog i dijastoličkog tlaka.¹¹⁰ Porast tlaka je rezultat pozitivnog inotropnog i kronotropnog djelovanja adrenalina i povećanja perifernog otpora koji nastaje zbog vazokonstrikcije krvnih žila kože, sluznica, bubrega i u određenom stupnju vena, podraživanjem alfa adrenergičkih receptora. Temeljni učinak na krvne žile je preko

arteriola i prekapilarnih sfinktera, a krvne žile pojedinih sustava odgovaraju na različite načine, konstrikcijom ili dilatacijom, i tako utječu na preraspodjelu krvotoka. Dok se pod utjecajem adrenalina protok kroz kožu smanjuje, u skeletnim mišićima se on povećava zbog podražaja vazodilatacijskih β_2 receptora koji ovdje prevladavaju vazokonstriksijske α receptore. S obzirom na to da ne prolazi krvno-moždanu barijeru, adrenalin nema izravnog utjecaja na hemodinamiku mozga, a jedino je može mijenjati djelujući na promjene sustavnog arterijskog tlaka. Pod utjecajem adrenalina se smanjuje protok kroz bubrege zbog vazokonstrikcije u svim segmentima uz smanjeno izlučivanje elektrolita, ali se zbog podraživanja β_1 receptora u stanicama jukstaglomorulskog aparata povećano izlučuje renin. Povećavaju se i tlakovi u plućnim krvnim žilama, a visoke doze adrenalina mogu uzrokovati plućni edem zbog povećanog filtracijskog tlaka, odnosno povećane propusnosti plućnih kapilara. Protok kroz koronarne krvne žile se također povećava pod utjecajem adrenalina i to zbog relativno dužeg trajanja diastole srca i povećanog tlaka u aorti te zbog utjecaja adenosina nastalog u miocitima tijekom pojačanih metaboličkih procesa. Učinak adrenalina na srce se temelji uglavnom na podraživanju β_1 receptora, što dovodi do pozitivnog inotropnog i kronotropnog učinka; povećava se minutni volumen srca i potrošnja kisika, povećan je rad srca uz smanjenje učinkovitosti. Pri višim dozama adrenalina povećava se iritabilnost srčanog mišića, osobito u slučaju izloženosti nekim lijekovima, kao što su opći anestetici i digitalis, te u slučaju postojanja ishemijske bolesti srca. Najčešće su u pitanju ventrikulske ekstrasistole, ali mogu nastati multifokalna ventrikulska tahikardija i fibrilacija klijetki. Stimulacijom β_2 receptora adrenalin opušta mišiće bronha i tako dovodi do bronhodilatacije, osobito u bolesnika s bronhalnom astmom. Dodatni bronhodilatacijski učinak u ovih bolesnika adrenalin postiže jer sprječava izlučivanje posrednika upale iz mastocita te smanjuje bronhalnu sekreciju posredovanu alfa receptorima. Adrenalin može smanjiti volumen plazme potičući izlazak tekućine u izvanstanični prostor i tako povećati hemokoncentraciju i koncentraciju proteina plazme, osobito u stanjima hipotenzije, šoka ili u anesteziranih osoba, ali je to malo vjerojatno ako se primjenjuje farmakološka doza u zdravih osoba.¹¹⁰ Od metaboličkih učinaka adrenalina najveću pozornost privlači njegovo dijabetogeno djelovanje do kojeg dolazi zbog poticanja glikogenolize, povećanog lučenja glukagona, smanjenog lučenja inzulina, koji nastaju zbog inhibicije α_2 receptora i podraživanja β_2

receptora. Također se smanjuje periferna iskoristivost glukoze, dijelom zbog smanjenog lučenja inzulina, a dijelom zbog direktnog učinka adrenalina na mišiće. Može doći i do porasta slobodnih masnih kiselina u serumu zbog pojačane lipolize nastale zbog stimulacije β_3 receptora u masnom tkivu i aktivacije enzima lipoproteinske lipaze. Na sličan način može uzrokovati povećanu koncentraciju ukupnog i kolesterola velike gustoće te fosfolipida u krvi. Adrenalin se ne resorbira nakon peroralne primjene jer se brzo razgrađuje procesima oksidacije i konjugacije u sluznici probavnog sustava. Nakon supkutane primjene resorpcija je usporena zbog lokalne vazokonstrikcije, a dodatno može biti usporena u stanjima hipotenzije i šoka. Poslije endotrahealnog davanja resorbira se tek oko 10% ukupne doze, a tek je nešto više pri oralnoj inhalaciji, kada treba biti oprezan zbog mogućih sistemskih djelovanja, osobito pri višim dozama. Nakon intramuskularne primjene resorpcija je potpuna uz brzi nastanak učinka koji je pri intravenskoj primjeni trenutačan. U organizmu se brzo razgrađuje, tako da mu plazmatski poluvijek iznosi tek 2-3 minute.¹¹¹ Razgrađuju ga enzimi katekol-o-metiltransferaza i monoaminoooksidaza koji se uglavnom nalaze u jetri i živčanim završecima. Glavni metaboliti koji nisu aktivni su metanefrini i vanilmandelična kiselina, a izlučuju se mokraćom, dok se tek neznatna količina adrenalina izlučuje nepromijenjena. Adrenalin se najčešće koristi u bolesnika s alergijskim reakcijama, a lijek je izbora u najtežim kao što je anafilaksija. Ranije se često koristio u liječenju bolesnika s bronhospazmom, ali su ga potisnuli selektivni agonisti betaadrenergičkih blokatora, no ipak se koristi u najtežim slučajevima. Uz ostale mjere reanimacije, lijek je izbora u bolesnika sa zastojem srca kao što su fibrilacija klijetki, asistolija ili elektromehanička disocijacija. Obično se daje 0,1-0,5 mg potkožno ili intramuskularno, a može se ponoviti nakod 10-15 minuta ako izostane učinak. U teškim stanjima kao što su anafilaktička reakcija i zastoj srca daje se intravenskim putem, obično 1 mg razrijeđen u 10 ml 0,9% NaCl tijekom 5-10 minuta, ovisno o kliničkom odgovoru može se nastaviti davanje trajnom infuzijom u dozi 1-4 $\mu\text{g}/\text{min}$. Adrenalin može uzrokovati glavobolju, strah, palpitacije, tremor, nemir i znojenje, a u bolesnika s organskom bolešću srca stenokardiju, poremetnje ritma pa i fibrilaciju klijetki. Rijetka je pojava znatnije povišenje arterijskog tlaka i intrakranijsko krvarenje.

3.6. Problematika istraživanja

1. Prema dosadašnjim spoznajama nije poznat učinak dugotrajne primjene selektivnih i neselektivnih betablokatora na veličinu slezene te ukupan broj i volumen trombocita u hipertoničara. Cilj ovog istraživanja je usporediti učinak bisoprolola i karvedilola na veličinu slezene te na broj i volumen trombocita u perifernoj krvi u novootkrivenih hipertoničara.

2. Nejasna je uloga jetrenih vena i hepatokavalnog sfinktera kod ljudi u sprječavanju naglog porasta krvnih stanica u perifernoj krvi, nakon kontrakcije slezene pod utjecajem adrenergičke stimulacije. Također, u dosadašnjim istraživanjima nije rasvijetljen utjecaj adrenergičke stimulacije na broj i veličinu trombocita u perifernoj cirkulaciji. Cilj ovog istraživanja je bio utvrditi učinak malih doza adrenalina na promjene veličine slezene i jetrenih vena, hepatalni protok krvi te broj i volumen trombocita u perifernoj cirkulaciji, kao i dinamiku promjena krvnih stanica u perifernoj krvi. Također je cilj bio procijeniti je li kontrakcija slezene potaknuta infuzijom malih doza adrenalina posljedica periferne humoralne stimulacije ili aktivacije simpatičkog živčanog sustava zbog smanjenog podraživanja baroreceptora usljed snižavanja srednjeg arterijskog tlaka.

3.7. Hipotetska podloga navedenih ciljeva istraživanja

Predložena disertacija se bavi istraživanjem promjena srednjeg volumena trombocita u perifernoj krvi nakon simpatičkog podražaja slezene na kontrakciju te moguće inhibicije relaksacije primjenom selektivnog i neselektivnog blokatora beta adrenergičkih receptora. Ciljevi istraživanja su:

1. Procijeniti učinak liječenja selektivnim (bisoprolol) i neselektivnim (karvedilol) blokatorima beta adrenergičkih receptora na promjenu volumena slezene u uvjetima povišenog tonusa simpatikusa. Kako kapsula slezene sadrži α i β receptore, kojima se posreduje kontrakcija odnosno relaksacije slezene, istražili smo kako inhibicija relaksacije selektivnom i neselektivnom blokadom adrenergičkih receptora utječe na udio velikih trombocita u sistemske cirkulaciji hipertoničara, u mirovanju i nakon tjelevoježbe. Hipoteza je da će manju kontrakciju slezene kao i porast broja i veličine trombocita u

prifernoj krvi uzrokovati neselektivni $\alpha_1\beta_1\beta_2$ blokator (karvedilol) u odnosu na selektivni β_1 blokator (bisoprolol) zbog dodatne blokade α receptora na kapsuli slezene, koji su odgovorni za njezinu kontrakciju.

2. Odrediti ulogu kontraktilnih elemenata na ušću hepatalnih vena u donju šuplju venu tijekom kontrakcije slezene. Kako se radi o vrlo viskoznoj krvi bogatoj eritrocitima, leukocitima, a osobito trombocitima, naša je pretpostavka da navedeni sfinkterski mehanizam kontrolirano propušta krv iz jetrenih vena u donju šuplju venu nakon kontrakcije slezene. Pretpostavka je da će kontrakcija slezene nakon infuzije adrenalina dovesti do punjenja, odnosno širenja jetrenih vena, a potom kontroliranog, odgođenog propuštanja krvi iz jetrenih vena u donju šuplju venu posredstvom hepatokavalnog sfinktera. Stoga će porast udjela velikih trombocita u ukupnom broju nastati s određenim vremenskim odmakom, u odnosu na samu kontrakciju slezene. Naime, budući da je slezena glavno skladište trombocita, a da u uvjetima povišenog tonusa simpatikusa dolazi do njezine kontrakcije uz ispražnjavanje sadržaja u sistemsku cirkulaciju, jasno se nameće pitanje porasta udjela velikih, agregabilnijih trombocita u navedenim uvjetima. Hipoteza je da će kontrakcija slezene potaknuta infuzijom adrenalina uzrokovati porast srednjeg volumena trombocita u perifernoj krvi, a s obzirom na postojanje hepatokavalnog sfinktera to će se dogoditi s određenim vremenskim odmakom.

4. METODE I ISPITANICI

4.1. Protokol studije 1.

Za provođenje studije dobiveno je odobrenje Etičkog povjerenstva KBC Split, a neposredno prije početka ispitivanja svi su ispitanici potpisali informirani pristanak.

U istraživanju je sudjelovalo osamnaest bolesnika s novootkrivenom arterijskom hipertenzijom i devet zdravih ispitanika iste dobi, čije demografske i kliničke osobine prikazuje tablica 1. Nisu bili uključeni hipertoničari sa sekundarnom hipertenzijom, šećernom bolesti, opstruktivskom bolesti pluća, metaboličkim sindromom i oštećenjem bubrega, kao i oni koji imaju neku drugu bolest koja zahtijeva dodatno medikamentno liječenje. Arterijska hipertenzija je definirana vrijednostima tlaka 140/90 do 179/109 mm Hg (I. i II. stupanj), izmjerenim u dva navrata tijekom dva tjedna. Tlak je mjereno sfingomanometrom u sjedećem položaju, na dominantnoj ruci u tri navrata, a u izračun sam uzimao prosječnu vrijednost zadnjih dvaju mjerenja.

Ciljni parametri istraživanja su bili promjene veličine slezene, broja trombocita i srednjeg volumena trombocita, prije početka liječenja bisoprololom i karvedilolom te nakon 15-og i 30-og dana liječenja; spomenute parametre sam provjeravao prije i nakon testa opterećenja. Nakon što je ustanovljena arterijska hipertenzija, ispitanici su bili upućeni u laboratorij na ergometrijsko testiranje oko 30 minuta prije planiranog početka testiranja zbog prilagodbe na laboratorijske uvjete. Svi ispitanici su bili natašte i nisu koristili crnu kavu, alkohol i cigarete u prethodnih dvanaest sati. Ispitivanja su rađena u jutarnjim satima, a dnevno je testiran jedan ispitanik.

Ergometrijsko testiranje je rađeno svim ispitanicima prema protokolu po Bruceu, prije početka liječenja, a hipertoničarima još nakon 15-og i 30-og dana liječenja bisoprololom i karvedilolom. Testiranje je započeto na traci koja se kretala brzinom 2,74 km/sat uz nagib od 10% u prvom stupnju. U trominutnim intervalima se nagib trake povećavao za 2%, a brzina je iznosila 4,0 u drugom, 5,4 u trećem i 6,7 km/h u četvrtom stupnju. Testiranje je provedeno na uređaju RAM 770 treadmill (RAM, Padova, Italy), dok je elektrokardiogram trajno praćen pomoću uređaja ZAN 800 ECG (Meßgeräte, Berlin, Germany). Vrijeme opterećenja sam određivao prema dobi ispitanika, odnosno postignutoj submaksimalnoj frekvenciji bila (85%) koja je predviđena za dob. Arterijski krvni tlak

sam mjerio neinvazivno, auskultacijskom metodom (1. i 5. faza Korotkowljevih šumova) s manšetom instrumenata postavljenom na nadlakticu dominantne ruke. Srednji arterijski tlak izračunao sam pomoću formule: dijastolički tlak + 1/3 tlaka pulsa.

Sva ultrazvučna mjerenja je radio isti liječnik (s iskustvom u ultrazvučnoj abdominalnoj dijagnostici) ultrazvučnom sondom 1,5-3,3 MHz na uređaju Vivid 3, GE, Milwaukee, WI, USA, i nije znao koji lijek ispitanici uzimaju. Petnaest minuta prije početka mjerenja ispitanici su mirno ležali u položaju supinacije. Snimanja su rađena za vrijeme kratke apneje tijekom blagog inspirija, sondom položenom u lijevi deseti međurebreni prostor. Slike su pohranjene na tvrdom disku ultrazvučnoga računala i naknadno su obrađivane, a korišten je software spomenutog računala. Ista je osoba premjerala duljinu i širinu slezene u tri navrata, a ponavljana mjerenja su bila postojana u 1 mm razlike. Kao krajnji rezultat mjerenja uzeta je srednja vrijednost triju mjerenja, a potom su poprečni presjek i volumen slezene izračunati prema formuli koju je u svom istraživanju koristio Koga¹¹² gdje je: površina slezene = 0,8 x uzdužni promjer slezene x poprečni promjer slezene /100; volumen slezene = (7,5 x površina slezene) – 77,6. Uzorkovanje krvi je napravljeno u sjedećem položaju ispitanika, a određivani su ukupni broja trombocita, srednji volumena trombocita, ukupni proteini i albumini. Uzorci krvi su uzeti u standardizirane epruvete s etilendiaminotetraacetatom (EDTA) antikoagulansom i pohranjeni su na sobnoj temperaturi. Analiza krvi je napravljena unutar dva sata nakon uzorkovanja, zbog poznatog učinka EDTA-e na blago povećanje srednjeg volumena trombocita tijekom vremena.¹¹³ Uzorkovanje krvi je također bilo urađeno prije i neposredno nakon testa opterećenja. Kompletna krvna slika i MPV su određivani na uređaju Abbot Cell-Dyne 4000 (Abbot Park, Illinois, USA), ukupni proteini su analizirani biuretskom metodom (Analyser 2700, Olympus, Hamburg, Germany), dok je koncentracija albumina određivana fotometrijskim metodom na uređaju Olympus system reagent 2700, Hamburg, Germany. S obzirom na to da tijekom tjelovježbe dolazi do porasta arterijskog tlaka i posljedičnog gubitka određene količine intravaskularne tekućine, serumsku koncentraciju trombocita sam korigirao za nastalu promjenu volumena plazme, koristeći promjene u ukupnoj koncentraciji proteina kao pokazatelje promjene volumena plazme.¹⁷ Nakon završetka testa opterećenja, ultrazvučnih mjerenja i uzorkovanja krvi, ispitanici su dobili upute o uzimanju lijekova i dijetetskim mjerama.

Randomizirano im je propisan bisoprolol 5 mg ili karvedilol 25 mg u jednoj dozi, uz uputu da lijekove uzimaju u jutarnjim satima u približno isto vrijeme. Potom su zamoljeni doći na kontrolni pregled i nastavak istraživanja za petnaest, odnosno trideset dana, kada će se provjeriti i suradljivost glede uzimanja lijekova te eventualne nuspojave.

Statistička analiza podataka. Svi su podaci izraženi kao prosječne vrijednosti \pm standardna pogreška. Razina $p < 0,05$ je izabrana za ustanovljavanje statističke značajnosti kod svih analiza. Za uspoređivanje istraživanih parametara, prije i nakon antihipertenzivnog liječenja, koristio sam neparametrijsku Friedmanovu analizu varijance, zbog maloga uzorka ($n=18$, $n=9$). U slučaju statistički značajnih promjena, nastavljena je daljnja pojedinačna usporedba varijabli, a korišten je neparametrijski Wilcoxonov test. Sve statističke analize su rađene pomoću Statistica 6.0 softwarea (Statsoft, Tulsa, USA).

4.2. Protokol studije 2.

Svi eksperimentalni postupci u ovom istraživanju su urađeni u skladu s Helsinškom deklaracijom, a za provođenje studije dobiveno je odobrenje Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu. Neposredno prije početka istraživanja svim ispitanicima sam detaljno objasnio način provođenja istraživanja kao i moguće rizike, a potom su svi potpisali informirani pristanak.

U istraživanju su sudjelovala devetorica zdravih muškaraca prosječne dobi $25,9 \pm 2,5$ godina (srednja vrijednost \pm SD), prosječne težine $92,2 \pm 10$ kg (srednja vrijednost \pm SD), visine $188,7 \pm 5$ cm (srednja vrijednost \pm SD) i svi su bili nepušači.

Istraživanje je provedeno u klimatiziranim uvjetima laboratorija za kliničku fiziologiju pri temperaturi prostorije $22-25^{\circ}\text{C}$ i vlažnosti zraka $25-45\%$. Ispitanici su došli u laboratorij 45 minuta prije početka istraživanja zbog detaljnog objašnjenja postupaka tijekom provedbe studije te prilagodbe na laboratorijske uvjete. Svi ispitanici su bili natašte i nisu koristili crnu kavu, alkohol i cigarete u prethodnih dvanaest sati. Ispitivanja su rađena u jutarnjim satima, a dnevno je testiran jedan ispitanik.

Trideset minuta prije početka ispitivanja ispitanicima je postavljen kateter u desnu kubitalnu venu zbog davanja infuzije adrenalina, a drugi u lijevu kubitalnu venu zbog uzorkovanja krvi. Tijekom istraživanja ispitanici su bili u ležećem položaju supinacije.

Adrenalin je primijenjen trajnom infuzijom (Infusomat Brown Melsunger A6, Germany) u fiziološkoj otopini (1‰ Adrenaline-HCl, Parke-Davis, jedna ampula od 1 ml u 250 ml 0,9% NaCl), u početnoj dozi 0,06 µg/kg/min, tijekom šest minuta, a u dozi 0,12 µg/kg/min, iduće tri minute, odnosno do maksimalne kontrakcije slezene.

Uzorkovanje krvi za određivanje kompletne krvne slike, srednjeg volumena trombocita te ukupnih proteina i albumina je rađeno prije početka i neposredno nakon završetka infuzije adrenalina te nakon 1., 5., 10. i 20. minute nakon završetka infuzije. Uzorci krvi su uzeti u standardizirane epruvete s etilendiaminotetraacetatom (EDTA) antikoagulansom i pohranjeni su na sobnoj temperaturi. Analiza krvi je napravljena unutar dva sata nakon uzorkovanja, zbog poznatog učinka EDTA-e na blago povećanje srednjeg volumena trombocita tijekom vremena.¹¹³ Kompletna krvna slika i MPV su određivani na uređaju ADVIA 120 Haematology System (Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY), ukupni proteini su analizirani biuretskom metodom (Analyser 2700, Olympus, Hamburg, Germany), dok je koncentracija albumina određivana fotometrijskim metodom na uređaju Olympus system reagent 2700, Hamburg, Germany. Obzirom na to da tijekom primjene adrenalina dolazi do gubitka određene količine intravaskularne tekućine, koncentraciju trombocita, leukocita i eritrocita sam korigirao za nastalu promjenu volumena plazme, koristeći promjene u ukupnoj koncentraciji proteina kao pokazatelje promjene volumena plazme.¹¹⁰ Sva ultrazvučna mjerenja radio je isti liječnik (s iskustvom u ultrazvučnoj abdominalnoj dijagnostici) ultrazvučnom sondom 1,5-3,3 MHz na uređaju Vivid 3, GE, Milwaukee, WI, SAD. Trideset minuta prije početka mjerenja ispitanici su mirno ležali u položaju supinacije. Snimanja su rađena za vrijeme kratke apneje tijekom blagog inspirija, sondom položenom u lijevi deseti međurebreni prostor. Slike su pohranjene na tvrdomu disku ultrazvučnoga računala i naknadno su obrađivane, a korišten je software spomenutog računala. Ista je osoba premjeravala duljinu i širinu slezene u tri navrata, a ponavljana mjerenja su bila postojana u 1 mm razlike. Kao krajnji rezultat mjerenja uzeta je srednja vrijednost tri mjerenja, a potom sam poprečni presjek i volumen slezene izračuno prema formuli koju je u svom istraživanju koristio Koga.¹¹² Volumen slezene je određivan neposredno prije početka infuzije adrenalina, potom svake minute tijekom infuzije te nakon 1., 5., 10. i 20. minute nakon završetka infuzije. Promjer srednje jetrene vene i brzina protoka u njoj su mjereni na udaljenosti 4-6 cm od ušća u donju šuplju venu, za

vrijeme apneje u plitkom inspiriju tijekom pet sekundi (kako bi se izbjegao učinak respiracije na mjerenja protoka kroz jetrene vene), koliko je trajala spektralna analiza protoka krvi kroz jetrenu venu. Mjerenja su rađena prije početka infuzije adrenalina, nakon devete minute, kada je uočena maksimalna kontrakcija slezene, te nakon 1., 5., 10. i 20. min nakon završetka infuzije adrenalina. Protok krvi kroz hepatalnu venu izračunao sam koristeći formulu: $\text{Protok krvi} = k \cdot \text{VTI} \cdot r^2 \cdot \text{SF}$;

gdje je k faktor korekcije dobiven iz eksperimentalnih istraživanja na svinjama i podrazumijeva kako protok krvi kroz vene nema ravan već, paraboličan profil brzina;^{114,115} VTI je vremenski integral brzina izračunat ispod krivulje Dopplerskog protoka tijekom određenog vremenskog perioda; r^2 je površina žile; SF je srčana frekvencija.

Tijekom istraživanja svim je ispitanicima neprekidno, neinvazivno mjeren arterijski tlak i frekvencija bila uz pomoć manžete fotopletismometra (Finometar, Finapress Medical System, Arhem, Netherlands), smještene na srednjem prstu nedominantne ruke, koje je položaj stalno bio u razini srca. Tijekom ispitivanja trajno je praćen elektrokardiogram (ECG, Bioamb, ADInstruments, Castle Hill, Australia). Arterijska zasićenost kisikom (SaO_2) je praćena pulsni oksimetrom (Poet II, Criticare Systems, Waukesha, SAD) s probom uređaja postavljenom na srednji prst dominantne ruke. Analogni signali arterijskog tlaka, frekvencije bila i saturacije kisika su putem analogno-digitalnog pretvarača (PowerLab 16S data acquisition system, ADInstruments Castle Hill, Australia) pretvarani u digitalni oblik te neprekidno snimani i pohranjivani na tvrdi disk osobnog računala, od početka do kraja istraživanja. Srednji arterijski tlak je uz pomoć programa Power Lab izračunavan iz neprekidnog zapisa tlaka.

Iz neprekidnog zapisa arterijskog tlaka, arterijski pulsni val je analiziran metodom koja iz pulsni vala izračunava promjene udarnog volumena lijeve klijetke srca (engl. *stroke volume*, SV). Za izračun udarnog volumena koristio sam Wesselingovu metodu izračuna, koristeći računalni Modelflow program. Ovaj model temelji se na nelinearnom, 3-elementnom modelu koji izračunava ulazni otpor aorte.¹¹⁶ Izmjereni udarni volumen je provjeravan pomoću vrijednosti udarnog volumena srca izmjenog ultrazvukom (1,5-3,3 MHz sonda, Vivid 3 Expert, GE, Milwaukee, WI, SAD) parasternalnim pristupom.

Minutni volumen srca (engl. *cardiac output*, CO) je računat kao produkt udarnog volumena srca i srčane frekvencije, dok je ukupni periferni otpor (engl. *total peripheral resistance*, TPR) izračunat kao kvocijent srednjeg arterijskog tlaka i minutnog volumena srca. U trojice ispitanika je primijenjen nešto detaljniji protokol. U njih je uz promjene volumena slezene mjerena i periferna mišićna simpatička aktivnost (engl. *muscle sympathetic nerve activity*, MSNA), kao odgovor na davanje adrenalina, koja je pokazatelj periferne simpatičke aktivnosti. MSNA je mjerena neposredno prije početka davanja adrenalina te svakih trideset sekundi do završetka i tijekom dvadeset minuta nakon prestanka infuzije, paralelno s mjerenjima veličine slezene te hemodinamskih pokazatelja (srednji arterijski tlak, udarni i minutni volumen). Snimanje aktivnosti više jedinica postganglijskih simpatičkih neurona se izvodilo nakon uvođenja unipolarne mikroeletrode napravljene od volframa u desni peronealni živac, pomoću tehnike mikroneurografije.¹¹⁷ Dobiveni signal je pojačan 100.000 puta te naknadno pojasno filtriran (granične frekvencije su iznosile 0,7-2,0 kHz), potom ispravljen i integriran koristeći 0,1 s kao vremensku konstantu (662C-4, Nerve traffic analysis system, Bioengineering, The University of Iowa, USA). Zapis je naposljetku digitaliziran koristeći frekvenciju uzorkovanja od 1 kHz te pohranjen u računalo za kasniju analizu, koristeći programsku aplikaciju Chart (ADInstruments, verzija 5.5.6.7.). Izbijanja mišićne simpatičke živčane aktivnosti su detektirana koristeći sljedeće kriterije: (1) omjer signal – šum >2; (2) očekivano trajanje latencije izbijanja; (3) očekivano trajanje izbijanja (prekratko trajanje = artefakt, predugo trajanje = kožna simpatička živčana aktivnost); (4) izuzeće ekstrasistola. Mišićna simpatička živčana aktivnost je kvantificirana kao učestalost izbijanja u jednoj minuti (frekvencija izbijanja) i kao broj izbijanja na 100 otkucaja srca (incidencija izbijanja). Nadalje, također su izračunati amplituda i površina ispod krivulje svakog izbijanja. Ukupna vrijednost mišićne simpatičke živčane aktivnosti je određena kao zbroj površina ispod krivulje svih izbijanja u jednoj minuti.

Statistička analiza podataka. Svi su podaci izraženi kao prosječne vrijednosti \pm standardna pogreška. Razina $p < 0,05$ je izabrana za ustanovljavanje statističke značajnosti kod svih analiza. Za uspoređivanje istraživanih parametara, prije i nakon davanja adrenalina, koristio sam neparametrijsku Friedmanovu analizu varijance, zbog maloga

uzorka (n=9) . U slučaju statistički značajnih promjena, nastavljena je daljnja pojedinačna usporedba varijabli, a korišten je neparametrijski Wilcoxonov test. Sve statističke analize su rađene pomoću statističkog programa Statistica 6.0 (Statsoft, Tulsa, USA). Vremenski smjer promjena volumena slezene u odgovoru na infuziju adrenalina koreliran je s posljedičnim promjenama promjera jetrene vene. No, budući da ove vrijednosti „grupe“ ponavljanih mjerenja na istom ispitaniku nisu bile pogodne za jednostavnu metodu linearne regresije, korištena je metoda linearne regresije u prvom stupnju (usporedba relativnih promjena volumena slezene i relativnih promjena promjera jetrene vene), a potom multiple regresije (individualni podatci o promjenama volumena slezene i promjera jetrene vene u različitim vremenima tijekom i nakon infuzije adrenalina (1., 5., 10. i 20. min)).

5. REZULTATI

5.1. Studija 1.

Svi ispitanici su uspješno završili ispitivanje, tijekom kojeg nisu zabilježeni neželjeni učinci lijekova. Ispitanici iz skupine koja je uzimala bisoprolol bili su neznačajno teži od onih iz kontrolne skupine i onih koji su koristili karvedilol, dok nije bilo razlike u ostalim antropometrijskim, hematološkim i kliničkim osobinama (tablica 1).

Tablica 1. Demografske i kliničke osobine ispitanika

	Kontrola (n=9)	Bisoprolol (n=9)	Karvedilol (n=9)
Dob (godine)	48±5	47±9	46±10
Visina (cm)	181±8	181±7	182±6
Težina (kg)	86±15	93,9	86±4
ST (mm Hg)	125±13	156±7	161±10
DT (mm Hg)	80±7	104±5	99±7
Bilo (otk/min)	85±9	89±15	86±9
Kolesterol (mmol/l)	6,3±1,5	5,8±0,6	6,1±1,5
Trigliceridi (mmol/l)	1,7±0,9	3,2±1,7	2,4±2,9
LDL-C (mmol/l)	4,0±1,2	3,6±0,5	3,9±0,9
HDL-C (mmol/l)	1,5±0,3	1,1±0,2	1,2±0,4
Pušač (%)	33,3	22,2	22,2

Podatci su prikazani kao srednja vrijednost±SD

ST, sistolički tlak; DT, dijastolički tlak

Na samom početku ispitivanja srednji arterijski tlak je bio sličnih vrijednosti u obje skupine hipertoničara kao i frekvencija bila u sve tri skupine ispitanika. Prije početka uzimanja lijekova, nakon opterećenja je došlo do sličnog porasta srednjeg arterijskog tlaka i ubrzanja bila, kako u hipertoničara, tako i u ispitanika iz kontrolne skupine (tablica 2). Nakon 15-og i 30-og dana liječenja opaženo je slično sniženje srednjeg arterijskog tlaka i

usporenje frekvencije bila u hipertoničara liječenih kako bisoprololom, tako i karvedilolom (tablica 2).

Tablica 2. Vrijeme opterećenja, srednji arterijski tlak i frekvencija bila prije i nakon opterećenja, za vrijeme prvog posjeta te nakon 15 i 30 dana

	Kontrola (n=9)	Bisoprolol (n=9)	Karvedilol (n=9)
Prvi posjet			
Vrijeme opterećenja (min)	9,4±0,8	8,6±1,4	8,4±1,7
SAT (mm Hg)			
Prije opterećenja	95±8	122±5	120±7
Nakon opterećenja	111±3	134±5	134±11
Bilo (otk/min.)			
Prije opterećenja	85±9	88±11	89±15
Nakon opterećenja	156±13	156±11	156±11
Petnaesti dan			
Vrijeme opterećenja (min)		9,1±0,9	9,1±1,1
SAT (mm Hg)			
Prije opterećenja		103±6	107±6
Nakon opterećenja		117±10	119±10
Bilo (otk/min.)			
Prije opterećenja		79±11	81±11
Nakon opterećenja		133±13	137±15
Trideseti dan			
Vrijeme opterećenja (min)		9,0±0,9	89±0,9
SAT (mm Hg)			
Prije opterećenja		102±4	104±8
Nakon opterećenja		113±9	117±12
Bilo (otk/min.)			
Prije opterećenja		73±6	77±5
Nakon opterećenja		131±8	137±9

Podatci su prikazani kao srednja vrijednost±SD
SAT, srednji arterijski tlak

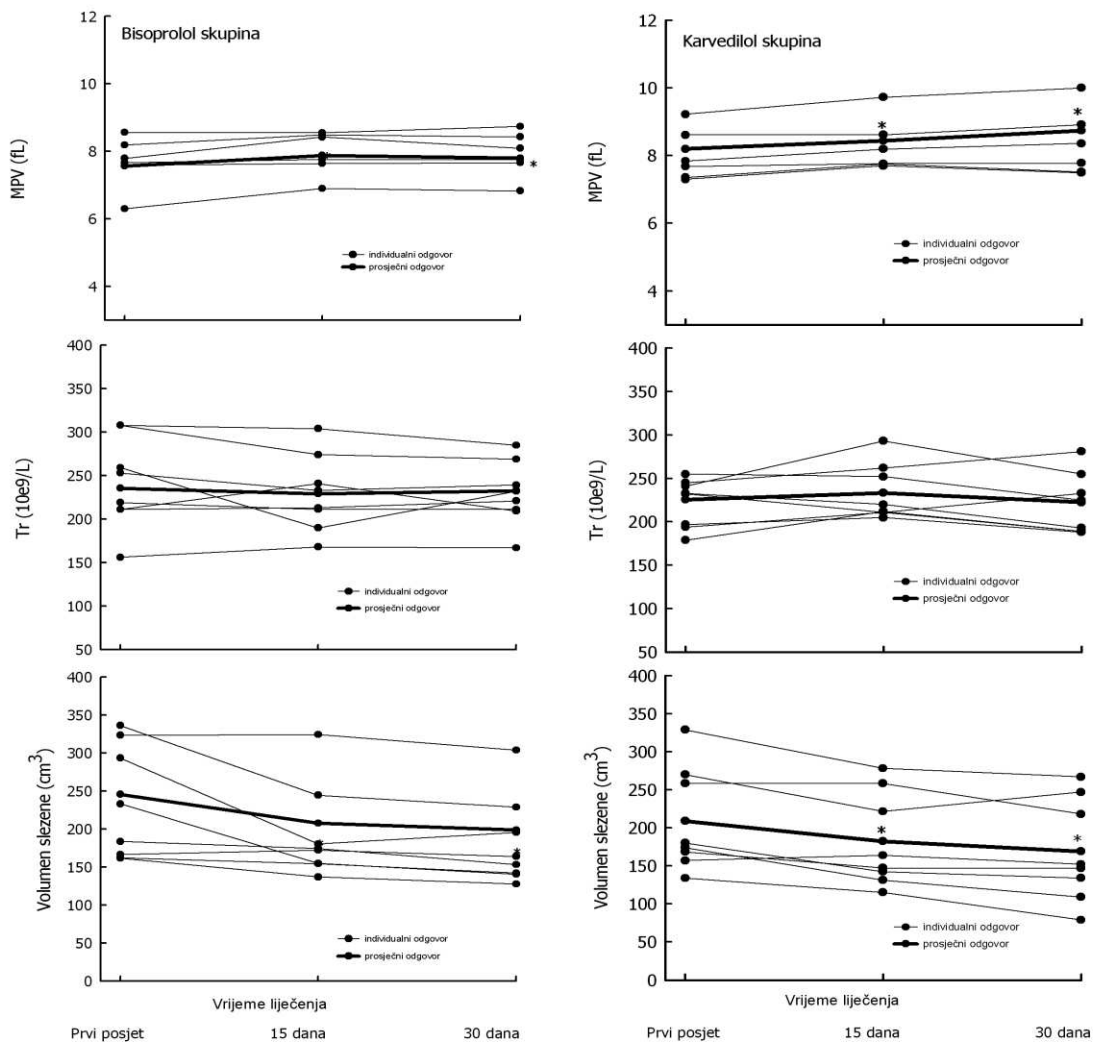
Odgovor na liječenje u mirovanju

Kretanje promjena srednjeg volumena i broja trombocita u perifernoj krvi te volumena slezene u mirovanju tijekom liječenja bisoprololom i karvedilolom prikazano je na slici 1. U hipertoničara koji su liječeni bisoprololom opažen je porast srednjeg volumena trombocita prije testa opterećenja, nakon petnaest dana liječenja za 4,1% ($p=0,028$), dok je taj porast nakon trideset dana iznosio 3,17% ($p=0,018$; 95% CI 1,0-5,3%) u odnosu na vrijednosti prije liječenja (slika 1a). Podjednak porast je zabilježen i u ispitanika koji su uzimali karvedilol; petnaestog dana liječenja srednji volumen trombocita je bio veći za 2,9% ($p=0,027$), a poslije tridesetog dana za 6,6% ($p=0,017$) u odnosu na početnu vrijednost (slika 1b). S druge strane, broj trombocita u perifernoj krvi prije opterećenja nije se bitnije mijenjao tijekom liječenja bisoprololom i karvedilolom (slika 1a i b). Volumen slezene je petnaesti dan u ispitanika liječenih bisoprololom bio za 15,5% ($p=0,021$), a trideseti dan za 19,2% ($p=0,08$) manji u odnosu na početne vrijednosti (slika 1a). U onih ispitanika koji su liječeni karvedilolom, zabilježeno je slično smanjenje volumena slezene koje je iznosilo 12,9% i 20,3% ($p=0,025$ i $p=0,012$) nakon petnaestog i tridesetog dana liječenja i nije se razlikovalo od onog u ispitanika koji su liječeni bisoprololom (slika 1b).

Odgovor na liječenje nakon opterećenja

Učinak opterećenja na broj trombocita u perifernoj krvi i volumen slezene bio je različit od onog prije liječenja, kako u ispitanika liječenih bisoprololom, tako i u onih liječenih karvedilolom. Prije liječenja srednji volumen trombocita je slično porastao u sve tri skupine ispitanika nakon testa opterećenja: 2,52% ($p=0,008$) u kontrolnoj skupini, 2,64% ($p=0,025$) u onih koji će uzimati bisoprolol i 2,32% ($p=0,017$) koji će uzimati karvedilol. Također je opažen i porast broja trombocita u perifernoj krvi, podjednako u sve tri skupine ispitanika (tablica 3). S druge strane, petnaestog i tridesetog dana liječenja, nakon opterećenja je zabiljeжан značajan porast broja trombocita, podjednako u obje skupine

ispitanika, ali u isto vrijeme nije došlo do porasta srednjeg volumena trombocita, kako u onih liječenih bisoprololom, tako i u onih liječenih karvedilolom (tablica 3).



Slika 1. Kretanje promjena MPV-a, broja trombocita i volumena slezene poslije 15 i 30 dana liječenja a) bisoprololom i b) karvedilolom.

Tablica 3. Broj i srednji volumen trombocita prije i poslije opterećenja, za vrijeme prvog posjeta te nakon 15 i 30 dana

	Kontrola (n=9)	Bisoprolol (n=9)	Karvedilol (n=9)
Prvi posjet			
MPV (fl)			
Prije opterećenja	7,9±0,8	7,6±0,7	8,2±0,9
Poslije opterećenja	8,1±0,9**	7,8 ±0,7*	8,4±0,8*
Broj trombocita (×10 ⁹ /l)			
Prije opterećenja	205±35	236±51	226±28
Poslije opterećenja	232±33**	265±55*	252±32**
Nakon 15 dana			
MPV (fl)			
Prije opterećenja		7,9±0,6†	8,4±0,8†
Poslije opterećenja		8,0±0,6	8,5±0,8
Broj trombocita (×10 ⁹ /l)			
Prije opterećenja		229±44	233±33
Poslije opterećenja		268±55**	259±33
Nakon 30 dana			
MPV (fl)			
Prije opterećenja		7,8±0,6†	8,7±0,9†
Poslije opterećenja		7,9±0,7	8,9±0,8
Broj trombocita (×10 ⁹ /l)			
Prije opterećenja		235±36	222±35
Poslije opterećenja		268±38**	243±35**

Podatci su prikazani kao srednja vrijednost±SD

*p<0,05, **p<0,01 u odnosu na vrijednosti prije opterećenja

†p<0,05 u odnosu na vrijednosti prije opterećenja za vrijeme prvog posjeta

Na samom početku ispitivanja, prije uzimanja lijekova, volumen slezene se značajno smanjio nakon opterećenja u sve tri skupine ispitanika: u kontrolnoj za 37% (p=0,008), u skupini koja će uzimati bisoprolol za 32,1% (p=0,008) i u onih koji će uzimati karvedilol za 27% (p=0,02). Nakon petnaest dana liječenja, bisoprolol je uzrokovao dodatno

smanjenje volumena slezene za 16,3% (p=0,02), a karvedilol za 15,4% (p=0,01). Nakon mjesec dana liječenja bisoprololom volumen slezene se smanjio za 18% (p=0,01), a u onih liječenih karvedilolom za 14,2% (p=0,017) u odnosu na vrijednosti u mirovanju (tablica 4).

Tablica 4. Volumen slezene prije i poslije opterećenja, za vrijeme prvog posjeta te nakon 15 i 30 dana

	Kontrola (n=9)	Bisoprolol (n=9)	Karvedilol (n=9)
Volumen slezene (cm ³)			
Prvi posjet			
Prije opterećenja	218±60	246±81	209±68
Poslije opterećenja	137±29**	167±72**	153±58*
Nakon 15 dana			
Prije opterećenja		208±73†	182±62†
Poslije opterećenja		174±67*	154±60*
Nakon 30 dana			
Prije opterećenja		198±74††	169±67†
Poslije opterećenja		163±65*	145±69*

Podatci su prikazani kao srednja vrijednost ± SD

*p<0,05, **p<0,01 u odnosu na vrijednosti prije opterećenja

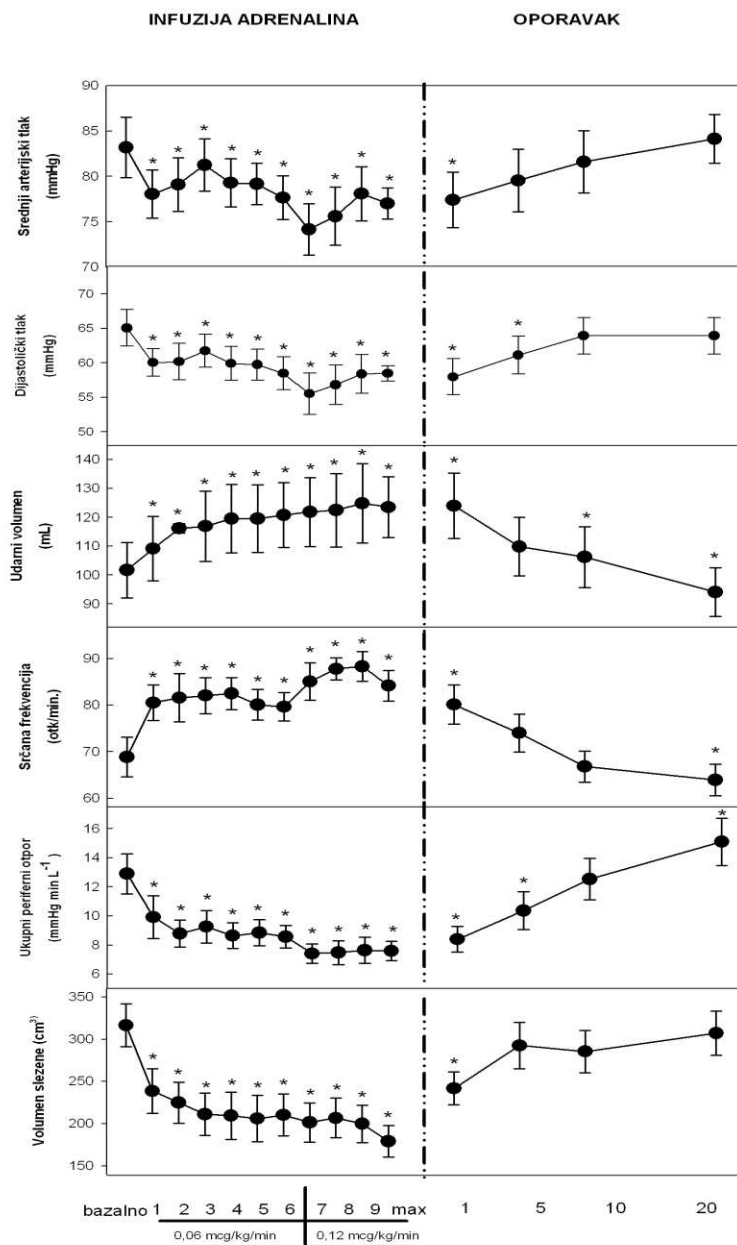
†p<0,05, ††p<0,01 u odnosu na vrijednosti prije opterećenja za vrijeme prvog posjeta

5.2. Studija 2.

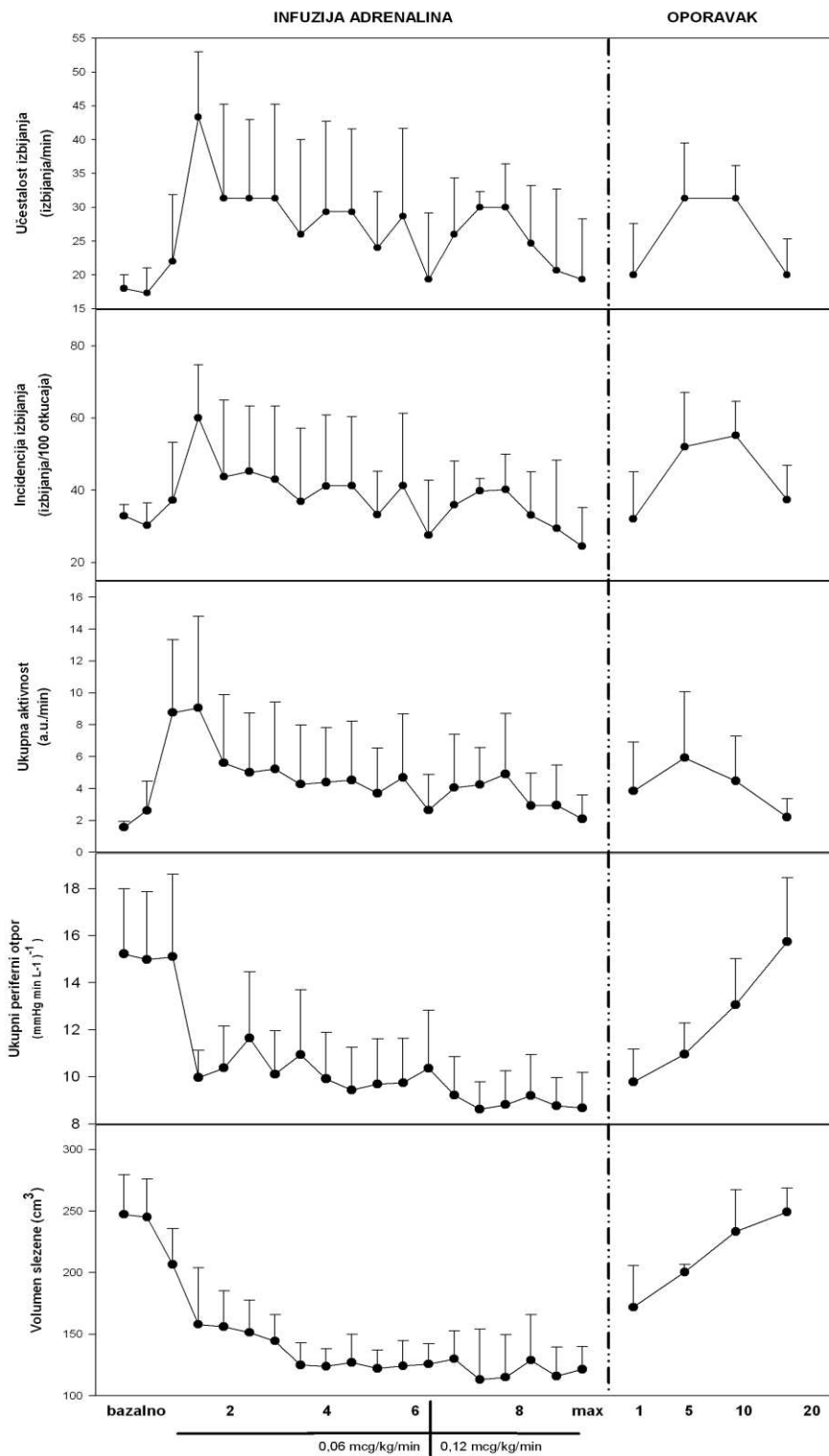
Svi ispitanici su uspješno završili protokol studije, a tijekom ispitavanja nisu zabilježene nuspojave. Kretanje srednjeg arterijskog tlaka, dijastoličkog tlaka, udarnog i minutnog volumena te frekvencije bila, ukupnog perifernog otpora i volumena slezene tijekom primjene adrenalina prikazani su na slici 2.

Promjene volumena slezene. Volumen slezene se nakon devet minuta davanja adrenalina (šest minuta u dozi 0,06 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min.}$, iduće tri minute u dozi 0,12 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min.}$) smanjio za 36% ($p=0,008$). Najveći dio od ukupnog smanjenja volumena slezene (oko 30%, $p=0,008$) je nastao već tijekom prve dvije minute od početka infundiranja adrenalina. Vrijeme oporavka, odnosno relaksacije slezene nakon završetka infuzije, trajalo je nešto duže, pa je za početne vrijednosti volumena slezene bilo potrebno oko dvadeset minuta (slika 2). U troje ispitanika koji su posebno testirani, smanjenje volumena slezene je zamjećeno već nakon tridesetak sekundi od početka davanja adrenalina, a već nakon dvije minute infuzije adrenalina volumen slezene se smanjio za oko 30%. Na kraju devete minute primjene adrenalina zabilježeno je maksimalno smanjenje volumena slezene za oko 40% u odnosu na početnu vrijednost (slika 3).

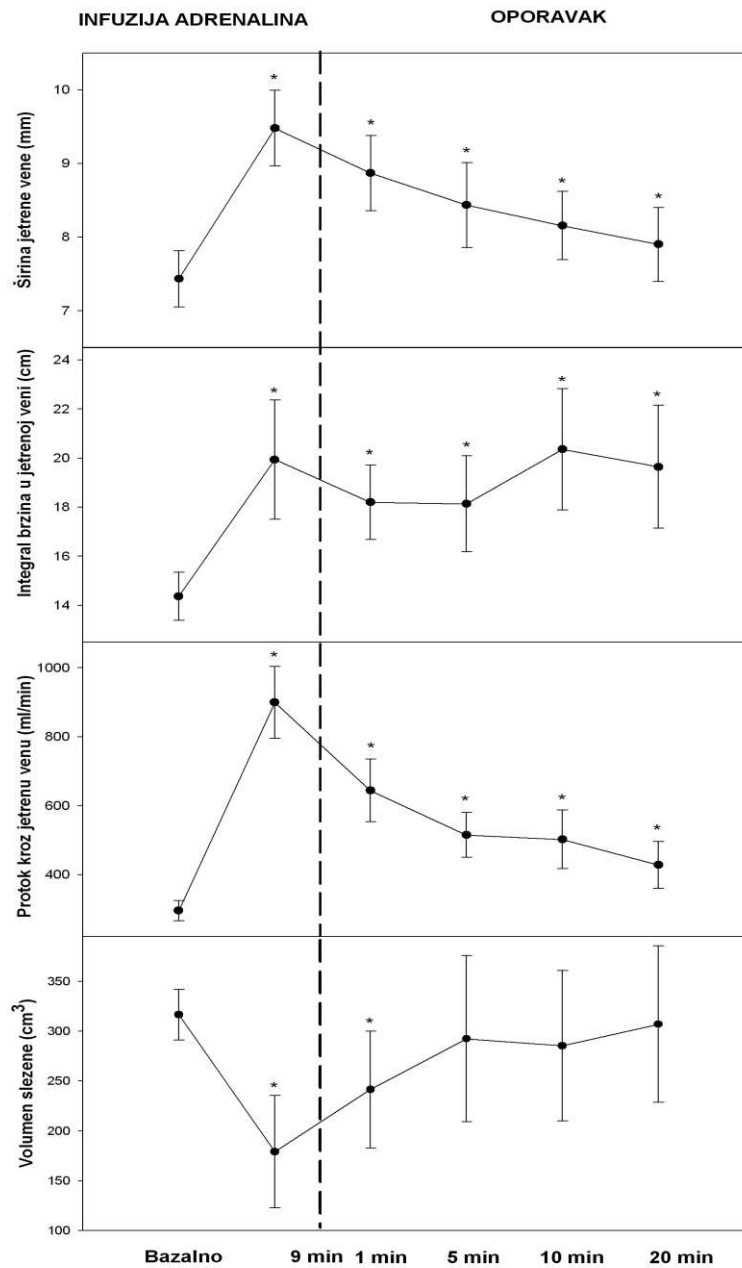
Promjer i protok kroz jetrene vene. Nakon devet minuta infuzije adrenalina protok krvi kroz jetrene vene je porastao za oko 20% ($p=0,02$). Tijekom 20 minuta praćenja, po prekidu infuzije adrenalina, protok kroz jetrenu venu je bio kontinuirano značajno povećan. Promjer hepatalne vene povećao za oko 27% ($p=0,02$) u odnosu na početne vrijednosti, što se održalo i nakon dvadeset minuta od završetka infuzije (slika 4).



Slika 2. Kretanje srednjeg arterijskog tlaka, dijastoličkog tlaka, udarnog volumena srca, frekvencije bila, ukupnog perifernog otpora i volumena slezene (srednja vrijednost±SE) prije, za vrijeme i nakon infuzije adrenalina. *p<0,05 u odnosu na početne vrijednosti.



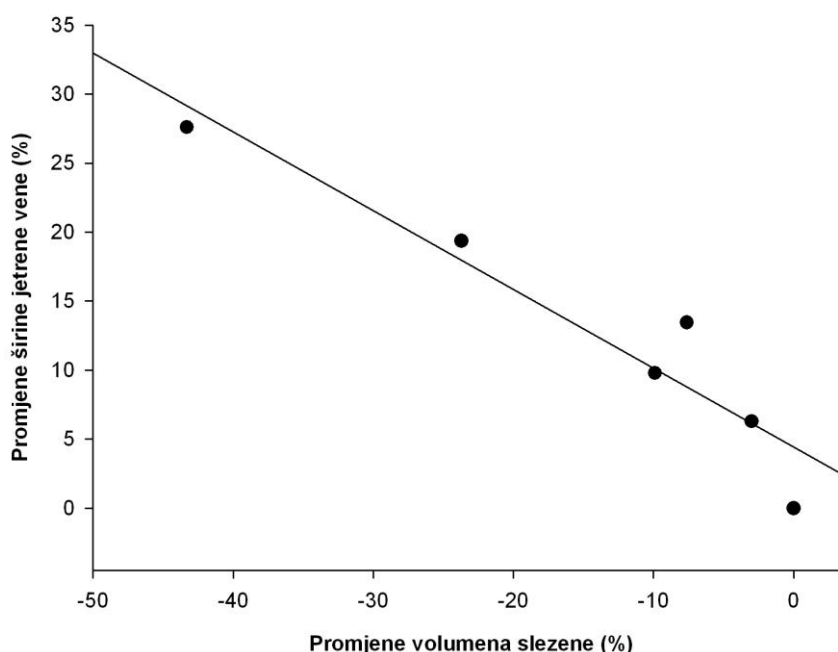
Slika 3. Odgovor periferne mišićne simpatičke aktivnosti (frekvencija izbijanja, učestalost izbijanja i ukupna aktivnost), ukupnog perifernog otpora i volumena slezene (srednja vrijednost±SE) prije, za vrijeme i nakon infuzije adrenalina u dvoje (MSNA) i troje (ukupni periferni otpor i volumen slezene) ispitanika.



Slika 4. Kretanje promjena širine jetrene vene, vremenskog integrala brzina, protoka kroz jetrenu venu i volumena slezene (srednja vrijednost±SE) prije, za vrijeme, nakon infuzije adrenalina i tijekom oporavka.

* $p < 0,05$ u odnosu na početne vrijednosti

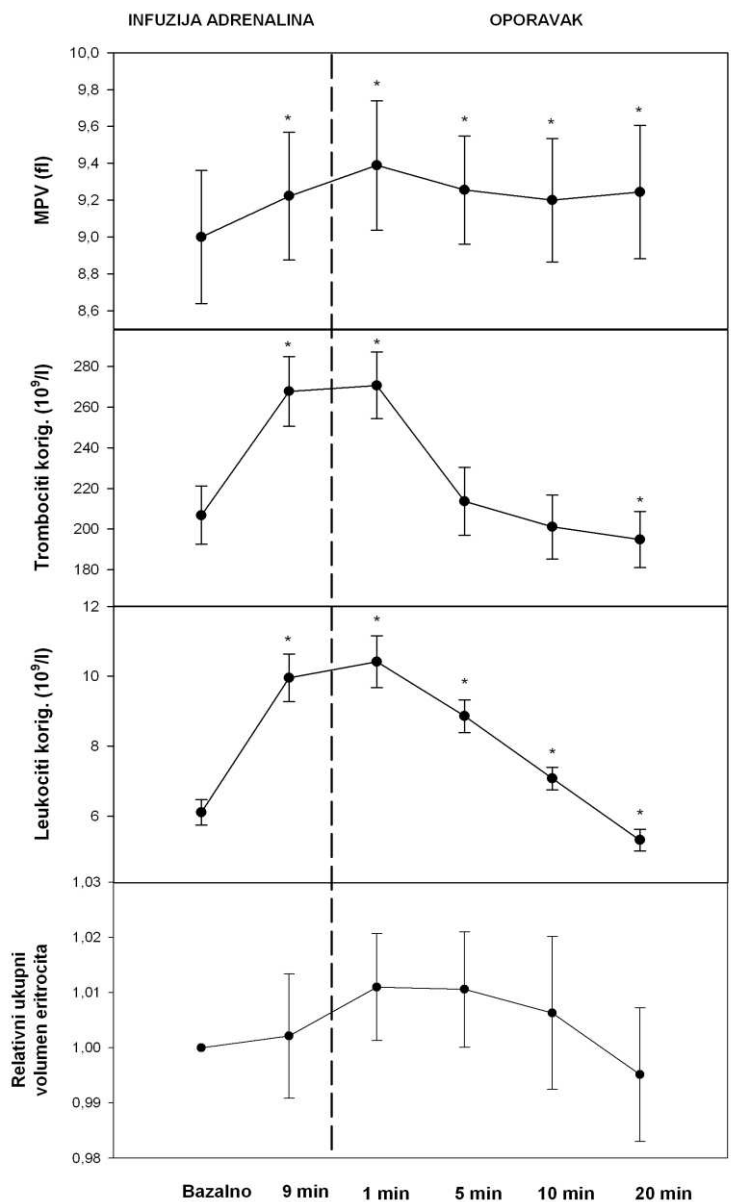
Zabilježena je značajna korelacija između smanjenja volumena slezene i povećanja promjera jetrene vene tijekom primjene adrenalina ($R^2=0,94$, $p=0,006$, slika 5), što ukazuje na nakupljanje krvi iz slezene u jetrenim venama.



Slika 5. Korelacija između relativnih promjena promjera jetrene vene i volumena slezene tijekom infuzije adrenalina.

Hematološke promjene. Srednji volumen trombocita je značajno porastao ($p=0,01$) nakon devete minute infuzije adrenalina, dok je najveći porast zabilježen na kraju prve minute po završetku infuzije (4,3%, $p=0,007$). I nakon dvadeset minuta oporavka volumen trombocita je bio znatno viši od početnih vrijednosti (slika 6). Ukupan broj trombocita u perifernoj krvi korigiran za promjene volumena plazme je znatno porastao nakon devete minute primjene adrenalina, a najveći porast je opažen na kraju prve minute oporavka

($p=0,007$). Nasuprot povišenim vrijednostima srednjeg volumena trombocita, opažen je pad broja trombocita nakon pete minute oporavka, a znatno niže vrijednosti verificirane su na kraju dvadesete minute od završetka infuzije adrenalina ($p=0,01$), što prikazuje slika 6. Broj leukocita u perifernoj krvi korigiran za promjene volumena plazme znatno je porastao nakon devete minute primjene adrenalina, a vršni porast je zabilježen nakon prve minute oporavka ($p=0,007$). Slično kao i broj trombocita, broj leukocita je počeo opadati u petoj minuti oporavka, a najniže vrijednosti je dostigao dvadeset minuta nakon završetka infuzije adrenalina, koje su bile niže od početnog broja ($p=0,07$; slika 6). Dinamika promjena volumena eritrocita je bila slična onoj trombocita i leukocita, ali nije bila statistički značajna (slika 6).



Slika 6. Promjene MPV-a, broja trombocita, leukocita i volumena crvenih krvnih stanica (srednja vrijednost \pm SE) prije, za vrijeme, nakon infuzije adrenalina i tijekom oporavka. * $p < 0,05$ u odnosu na početne vrijednosti

Kardiopulmonalni pokazatelji. Na kraju prve minute od početka primjene adrenalina zabilježeno je sniženje srednjeg arterijskog tlaka za ~6% ($p=0,02$), koji se nastavio smanjivati do kraja devete minute, kada je sniženje iznosilo 7,2% ($p=0,01$) od početne vrijednosti. Pet minuta nakon završetka infuzije adrenalina srednji arterijski tlak dostigao je početne vrijednosti. Slično tome, snizio se i dijastolički tlak ~7,7% ($p=0,01$) već u prvoj minuti primjene adrenalina, koji se postupno normalizirao nakon desete minute od završetka infuzije. Frekvencija bila je porasla oko 16% ($p=0,01$) u drugoj minuti infuzije adrenalina, a maksimalni porast od 22% ($p=0,007$) zabilježen je tijekom primjene veće doze adrenalina (0,12 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) krajem devete minute, dok se na početne vrijednosti vratila pet minuta nakon završetka davanja adrenalina. Udarni volumen srca se stalno povećavao tijekom davanja adrenalina i na kraju devete minute bio je veći ~18,5% ($p=0,007$) od početnog. Nakon završetka infuzije zabilježen je postupni pad udarnog volumena koji je u desetoj i dvadesetoj minuti oporavka bio niži ~7% ($p=0,02$) od početne vrijednosti. Ukupni periferni otpor se smanjio ~41% ($p=0,01$) do kraja infuzije adrenalina, a 30% ($p=0,01$) ukupnog sniženja opaženo je već nakon prve dvije minute primjene adrenalina.

Mišićna simpatička živčana aktivnost. U podskupini od tri ispitanika trajno je mjerena mišićna simpatička živčana aktivnost, a zapis odlične kvalitete je zabilježen u njih dvojice. Prosječna bazalna frekvencija izbijanja MSNA iznosila je 19 ± 4 u minuti, uz incidenciju od 35 ± 7 izbijanja/100 otkucaja srca. Po započinjanju intravenske infuzije adrenalina, učestalost izbijanja, frekvencija izbijanja i ukupna vrijednost MSNA počeli su rasti dostižući vršnu vrijednost u 90-oj sekundi infuzije adrenalina. Najviši zabilježeni porast ukupne vrijednosti aktivacije mišićnog simpatičkog sustava iznosio je približno 500% prema početnim (slika 3). Svi kvantifikacijski parametri MSNA ostali su povišeni za vrijeme trajanja infuzije. Po prestanku infuzije adrenalina MSNA se počela normalizirati dostižući bazalnu vrijednost nakon 20 minuta od prestanka infuzije (slika 3).

6. RASPRAVA

6.1. Utjecaj bisoprolola i karvedilola na veličinu slezene i srednji volumen trombocita

U ovom istraživanju sam dokazao da je liječenje blokatorima betaadrenergičkih receptora (karvedilol i bisoprolol) u novootkrivenih hipertoničara uzrokovalo smanjenje volumena slezene uz usporedno povećanje MPV-a u perifernoj krvi. Iako se porast MPV-a za 3-7% čini naizgled malen, on odgovara porastu od prosječno 20% porasta ukupne mase velikih trombocita (>90 percentile volumena distribucije), što je opaženo u ispitanika obje skupine. Podjednak porast MPV-a kao i smanjenje volumena slezene su opaženi u bolesnika liječenih selektivnim betablokatorom (bisoprolol) i neselektivnim uz dodatnu alfa blokadu (karvedilol), što ukazuje da je njihov dominantan učinak ipak na β_1 adrenergičke receptore, smještene u ovojnici, krvožilju i parenhimu slezene. Disfunkcija trombocita je nedvojbeno jedan od razloga većeg kardiovaskularnog pobola i smrtnosti u hipertoničara,¹¹⁸ osobito u svjetlu spoznaje da je većina komplikacija arterijske hipertenzije trombotske, a ne hemoragijske naravi.³³ Veći MPV, koji je nedvojbeni čimbenik rizika za nastanak trombotskih komplikacija, opažen je u hipertoničara, osobito onih visokorizičnih sa ostećenjima ciljnih organa i u kojih nije održan dnevni ritam tlaka.^{45,46,119} To svakako može pridonijeti nastanku trombotskih komplikacija u tih bolesnika, pa se nameće pitanje koji je izvor velikih trombocita u hipertoničara? Glavno skladište trombocita kod ljudi je slezena, koja sadrži trećinu od ukupne količine trombocita u organizmu, a otpuštaju se u perifernu cirkulaciju u različitim stanjima povišenog adrenergičkog tonusa.^{59,62,63} Također je poznato da upravo trombociti iz slezene imaju veći volumen za oko 20% od onih u perifernoj cirkulaciji.⁶¹ Način na koji se smanjuje volumen slezene utjecajem različitih podražaja, uz posljedično istiskivanje velikih trombocita u perifernu cirkulaciju, i dalje je prijeporan. Naime, kontrakcija slezene se može dogoditi zbog centralno ili refleksno potaknute stimulacije simpatičkog živčanog sustava kao i mehaničkom kompresijom te humoralnom stimulacijom. Palada i sur. su pokazali da aktivna kontrakcija slezene u profesionalnih ronilaca nastaje unutar tri sekunde od početka apneje, što znači da splahnhički žilni bazen reagira puno brže na

podražaj simpatičkog živčanog sustava od ostalih krvnih sustava (skeletnog i mišićnog npr.).¹²⁰ Također, Baković i sur. su utvrdili da je kontrakcija slezene u odgovoru na apneje aktivan, a ne pasivan proces.⁶ Postoje dokazi da podraživanje alfa adrenergičkih receptora uzrokuje kontrakciju slezene i istiskivanje trombocita u perifernu cirkulaciju, dok podraživanje betaadrenergičkih receptora uzrokuje opuštanje slezene, što dovodi do nakupljanja trombocita u njoj i smanjenja broja u perifernoj cirkulaciji.^{19,70,121} Tkivna raspodjela beta adrenergičkih receptora u ovojnici i parenhimu slezene je i dalje prijeporna. Hellgren i sur. su pokazali da se ti receptori u izobilju nalaze kako u srcu, bubrezima, posteljici i štitnjači, tako i u slezeni.¹²² Stoga se korištenjem betablokatora u liječenju arterijske hipertenzije može značajno utjecati na preraspodjelu velikih trombocita između slezene i periferne krvi. Ovo istraživanje je pokazalo kako se veličina slezene u bolesnika s arterijskom hipertenzijom značajno smanjila poslije mjesec dana liječenja beta blokatorima, vjerojatno zbog inhibicije njezine relaksacije. To je dovelo do povećanja srednjeg volumena trombocita u perifernoj krvi zbog istiskivanja velikih trombocita iz slezene. Iako karvedilol ima i osobine alfa blokatora, nije spriječio kontrakciju slezene, što upućuje na dominantan učinak na promjenu volumena slezene preko betaadrenergičkih receptora. To barem djelomice može pridonijeti povećanom riziku nastanka kardiovaskularnih komplikacija u hipertoničara liječenih beta blokatorima, na što su ukazali i rezultati najnovijih sustavnih pregleda istraživanja u kojima su ovi lijekovi bili korišteni.^{101,102} Naime, ti su rezultati pokazali slabiju djelotvornost ovih lijekova od ostalih vrsta antihipertenziva u primarnoj prevenciji srčanožilnih komplikacija, navlastito moždanog udara u starijih hipertoničara.^{101,102} Na to je još prije desetak godina upozorio Messerli,⁹⁹ a prihvaćeno je tada i u smjernicama Hrvatskog društva za hipertenziju.¹⁰⁹ Međutim, nakon toga su kanadski autori u sustavnom pregledu ishoda antihipertenzivnog liječenja ustanovili da betablokatori u mlađih hipertoničara snižavaju ukupni srčanožilni rizik, čak i više od drugih antihipertenziva, što nije bio slučaj u hipertoničara starijih od 60 godina.¹⁰⁴ Valja spomenuti da se većina podataka iz spomenutih istraživanja odnosila na najčešće propisivani betablokator atenolol.^{100,103} Stoga se postavlja pitanje bi li isti rezultati bili postignuti i s drugim srodnicima, različitih farmakodinamskih osobina, osobito novijim agensima poput bisoprolola, karvedilola i nebivolola.⁶² Međutim, u ovom istraživanju su sudjelovali ispitanici mlađi od 60 godina, a korišteni su upravo noviji beta

blokatori, bisoprolol i karvedilol. U nekim ranijim istraživanjima je proučavan akutni učinak kardioselektivnog (metoprolol) i nekardioselektivnog (propranolol) betablokatora na kinetiku spleničkih trombocita u zdravih dobrovoljaca, u kojima je opaženo povećanje broja trombocita u perifernoj krvi, podjednako u obje skupine ispitanika. Međutim, u tim ispitivanjima nisu određivali srednji volumen trombocita i veličinu slezene.⁶⁹ Kako da porasta broja trombocita nije došlo u splenektomiranih ispitanika, autori su zaključili da je davanje selektivnog i neselektivnog betablokatora uzrokovalo otpuštanje trombocita iz slezene i povećanje njihovog broja u perifernoj krvi.⁶⁹ S druge strane, Freden i sur. su pokazali kako je davanje betaadrenergičkog agonista (isoprenalin) u zdravih dobrovoljaca uzrokovalo smanjenje broja trombocita u perifernoj krvi, koje je izostalo ukoliko su ispitanici prethodno primali neselektivni betablokator propranolol.⁷⁰ Punda i sur. su dokazali povoljniji učinak neselektivnog (propranolol) u odnosu na selektivni (atenolol) betablokator na agregaciju trombocita u bolesnika sa arterijskom hipertenzijom, što mu daje stanovitu prednost u liječenju tih bolesnika, osobito onih s povećanim kardiovaskularnim rizikom.⁷¹ U ovoj studiji je liječenje novootkrivenih hipertoničara betablokatorima dovelo do smanjenja volumena slezene, uz popratni porast srednjeg volumena trombocita u perifernoj krvi, što može pridonijeti većem riziku nastanka kardiovaskularnih komplikacija u tih bolesnika. Međutim, ukupni broj trombocita u perifernoj krvi se nije mjenjao, što je pomalo neočekivano, obzirom na to da slezena sadrži oko trećine ukupnog broja trombocita u tijelu.^{59,62,63} Slično tome, Baković i sur. su u profesionalnih ronilaca i zdravih osoba tijekom ponavljanih apneja zamijetili porast eritrocita i leukocita u perifernoj krvi tijekom kontrakcije slezene; međutim, broj trombocita se nije mjenjao.¹⁷ Naknadnom analizom podataka su otkrili da je tijekom apneje uz kontrakciju slezene, značajno porastao srednji volumen trombocita u perifernoj krvi,¹⁸ što je bio slučaj i u ovom istraživanju. S obzirom na nepromijenjenu koncentraciju i povećan volumen trombocita u perifernoj krvi, može se pretpostaviti da je došlo do istiskivanja velikih trombocita iz slezene tijekom kontrakcije uz inhibiciju relaksacije pod utjecajem betablokatora, uz zadržavanje manjih trombocita u slezeni. Ipak, način na koji se vrši izmjena trombocita između slezene i periferne cirkulacije tijekom adrenergičke stimulacije ili blokade i dalje je nejasan.

U ovom su istraživanju broj i srednji volumen trombocita u perifernoj krvi značajno porasli poslije opterećenja samo prije početka liječenja bisoprololom i karvedilolom. Međutim, petnaestog i tridesetog dana liječenja, MPV se nije bitnije mijenjao poslije opterećenja, dok je broj trombocita značajno porastao uz smanjenje volumena slezene. Važno je napomenuti da je MPV prije opterećenja, nakon petnaestog i tridesetog dana liječenja bio značajno veći, a volumen slezene manji u odnosu na početne vrijednosti, što ukazuje na inhibiranu kompletnu relaksaciju slezene pod djelovanjem betablokatora. U istom razdoblju liječenja, nakon opterećenja, slezena se kontrahirala daleko manje nego što je to bio slučaj prije liječenja bisoprololom i karvedilolom, vjerojatno kao posljedica već smanjenog volumena slezene pod utjecajem betablokatora. Možda je upravo to razlog što MPV nije porastao tijekom opterećenja ni u jednoj skupini ispitanika za vrijeme liječenja betablokatorima.

U ovoj studiji sam pokazao da liječenje hipertoničara betaadrenergičkim blokatorima uzrokuje smanjenje volumena slezene uz popratni porast srednjeg volumena trombocita, ali bez promjene ukupnog broja trombocita u perifernoj krvi. Porast udjela velikih trombocita u sistemske cirkulaciji može pridonijeti povećanju rizika nastanka kardiovaskularnih komplikacija u tih bolesnika.

6.2. Uloga hepatokavalnog sfinktera u pražnjenju spleničkog skladišta krvi

Ovo je prvo istraživanje koje je pokazalo da adrenalin u maloj dozi dovodi do kontrakcije slezene i do porasta broja trombocita i MPV-a u perifernoj krvi. To potvrđuje dosadašnje spoznaje da je slezena skladište velikih trombocita koji se istiskuju u perifernu cirkulaciju pod utjecajem različitih adrenergičkih podražaja. Nakon kontrakcije slezene i istiskivanja velikih trombocita iz slezene, prestankom adrenergičkog podražaja, nastala je faza relaksacije slezene i preuzimanja trombocita manjeg volumena iz periferne cirkulacije. Upravo zahvaljujući takvom odnosu promjene volumena slezene i kinetike trombocita u perifernoj cirkulaciji je zapažen obrnut odnos ukupnog broja i srednjeg volumena eritrocita, što je u skladu s dosadašnjim istraživanjima.^{48,52,53} Iako je značajna kontrakcija slezene nastala već nakon dvije minute od početka primjene adrenalina, maksimalni porast broja krvnih stanica i MPV-a je opažen tek u prvoj minuti po završetku infuzije

adrenalina, tj. s odgodom od osam minuta koliko je proteklo od 30% smanjenja volumena. Do takvog zakašnjelog porasta je došlo vjerojatno zbog zadržavanja krvi istisnute iz slezene tijekom infuzije adrenalina, u jetrenim venama. Na to ukazuje jaka povezanost između smanjenja volumena slezene i proširenja jetrenih vena, u kojima se zadržala krv, vjerojatno pod utjecajem hepatokavalnog sfinktera. Istraživanja na ljudskim leševima su pokazala da je stijenka hepatalnih vena zadebljana na samom ušću u donju šuplju venu. To zadebljanje uglavnom čine mišićne, elastične i kolagene niti koje se isprepleću s onima iz zida donje šuplje vene zajedno čineći sfinkterski mehanizam, koji ima važnu fiziološku ulogu u regulaciji jetrene cirkulacije.^{22,23} Hepatokavalni sfinkter regulira otpuštanje vrlo viskozne, oksigenirane krvi iz jetrenih vena u sistemsku cirkulaciju. Na taj se način kontroliranim propuštanjem guste krvi sprječava naglo opterećenje kardiovaskularnog sustava. Thornton i sur.⁹ su dokazali da se tijekom kontrakcije slezene kod morskih medvjedica za vrijeme zarona istovremeno pune hepatalni sinusi, dok porast hematokrita u perifernoj kasni dvadesetak minuta. Zaključili su da je za takvo, kontrolirano ispuštanje krvi iz jetrenih vena u donju šuplju venu odgovoran hepatokavalni sfinkter.

Ovo je prvo istraživanje koje je proučavalo moguću fiziološku ulogu hepatokavalnog sfinktera za vrijeme adrenergičke stimulacije u ljudi. Kako ljudska slezena sadrži tek 200-250 ml guste krvi, vjerojatno je tako veliki porast protoka krvi kroz jetrene vene rezultat mobilizacije krvi i iz ostalih abdominalnih skladišta krvi pod utjecajem adrenalina, a ne samo iz slezene.

Mnoga istraživanja su dokazala da stimulacija simpatičkog živčanog sustava dovodi do kontrakcije slezene i posljedičnog istiskivanja krvi u jetrene vene.^{5,6,7} S druge strane, veliki srednji volumen trombocita je neovisni predskazatelj nepovoljnog ishoda u osoba s preboljelim infarktom miokarda. Štoviše, povećan srednji volumen trombocita u tih osoba je direktno povezan s veličinom infarkta, zatajenjem srca i nastankom muralnih tromba.⁴⁹ Nedvojbeno je da slezena ima veliku ulogu u skladištenju velikih trombocita koji se otpuštaju u sistemsku cirkulaciju u stanjima povišenog adrenergičkog tonusa, što je od osobite važnosti u stanjima koja prati visoka simpatička aktivnost, kao što su akutni koronarni sindrom, sindrom prestanka disanja u snu, zatajenje srca i metabolički sindrom. Nadalje, neki antihipertenzivi (diuretici, ACE inhibitori, antagonisti angiotenzinskih receptora) dovode do povećanja aktivnosti simpatičkog živčanog sustava, što svakako

može imati nepovoljne učinke na kardiovaskularni sustav (disfunkcija endotela, apoptoza, aritmije srca, hipertrofija lijeve klijetke, npr.).^{123,124} Štoviše, kontrakcijom slezene pod utjecajem povišenog tonusa simpatičkog živčanog sustava dolazi do istiskivanja trombocita velikog srednjeg volumena u perifernu cirkulaciju, pogoršavajući prognozu kardiovaskularnog ishoda. Stoga, liječenje arterijske hipertenzije adrenergičkim blokatorima može imati nepovoljan učinak zbog poticanja kontrakcije slezene i posljedičnog istiskivanja trombocita velikog srednjeg volumena u perifernu cirkulaciju. U prvom istraživanju ove doktorske disertacije pokazalo se da je liječenje blagih i umjerenih hipertoničara bisoprololom i karvedilolom, tijekom mjesec dana uzrokovalo trajnu kontrakciju slezene uz povećanje srednjeg volumena trombocita u perifernoj krvi, što svakako može povećati rizik za nastanak aterotrombotskog događaja.¹²⁵

Ovo istraživanje je pokazalo da je slezena dinamičko skladište velikih trombocita koji su neovisni predskazatelj trombotskih događaja. Odgođeni i postupni porast srednjeg volumena trombocita u perifernoj krvi nakon kontrakcije slezene nastaje zbog zadržavanja krvi u jetrenim venama i postupnog ispuštanja u donju šuplju venu, što kontrolira hepatokavalni sfinkter.

U ovoj studiji sam također pokazao da male doze adrenalina potiču brzu kontrakciju slezene uz istovremeni porast periferne mišićne simpatičke aktivnosti. Male doze adrenalina (0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) uzrokuju pad srednjeg arterijskog tlaka zbog veće osjetljivosti vazodilatacijskih β_2 receptora od vazokonstriktorskih α_2 receptora.¹¹⁰ To dovodi do smanjenog podraživanja baroreceptora i brze aktivacije centralnog simpatičkog živčanog sustava te brze i masivne kontrakcije slezene, ukazujući na slezenu kao sastavni dio simpatičkog živčanog sustava. Prema dosadašnjim spoznajama, učinak katekolamina na promjenu volumena slezene je posredovan α i β adrenergičkim receptorima na način da podraživanje α receptora uzrokuje kontrakciju, a podraživanje β receptora relaksaciju slezene.^{68,69,126} Međutim, u ovom istraživanju, adrenalin je, iako primjenjen u maloj dozi koja uglavnom stimulira β adrenoreceptore, uzrokovao masivno smanjenje volumena slezene za oko 40% od početne vrijednosti. Važno je naglasiti da se glavnina smanjenja volumena slezene (oko 30%) dogodila unutar dvije minute od početka infuzije adrenalina. Ovaj neočekivano veliki i brzi odgovor slezene na stimulaciju β adrenoreceptora govori protiv perifernih posrednika u kontrakciji slezene, a podržava pretpostavku da vodeću

ulogu u regulaciji volumena slezene ima centralna simpatička aktivacija. Dosadašnje spoznaje o djelovanju katekolamina na volumen slezene preko α i β adrenoreceptora su temeljene na posrednim dokazima, procjenom broja trombocita u perifernoj krvi, a ne direktnim mjerenjem promjene volumena slezene.¹²⁷ Na taj je način, bez praćenja popratnih hemodinamskih promjena, prikrivena izvorna fiziologija promjene veličine slezene u odgovoru na različite podražaje. U dvoje ispitanika kod kojih je napravljeno dodatno mjerenje periferne simpatičke aktivnosti (MSNA), periferna simpatička aktivnost se povećala na samom početku infuzije adrenalina, uz istovremenu kontrakciju slezene i sniženje srednjeg arterijskog tlaka. To dodatno potvrđuje pretpostavku da se slezena kontrahira kao posljedica porasta tonusa simpatičkog sustava zbog smanjenog podraživanja baroreceptora nakon infuzije malih doza adrenalina, što ukazuje na centralno posredovanu povratnu spregu u regulaciji volumena slezene. Baković i sur. su pokazali da kontrakcija slezene u profesionalnih ronilaca nastaje na samom početku apneje, uz nepromijenjen protok kroz spleničku arteriju, što ukazuje na aktivan, a ne pasivan proces, odnosno da kontrakcija slezene nije nastala zbog smanjenog protoka kroz spleničku arteriju zbog povećanog simpatičkog tonusa.⁶ Slično tome, Palada i sur. su u istraživanju kod profesionalnih ronilaca također zaključili da je kontrakcija slezene uzrokovana smanjenim podraživanjem baroreceptora zbog sniženog arterijskog tlaka i udarnog volumena srca tijekom primjene gliceriltrinitrata.¹²⁰ Važnost razumijevanja fiziologije slezene potječe iz njezine uloge skladišta krvnih stanica. Naime, poznato je da se leukociti i trombociti nakupljaju u ljudskoj slezeni u znatno većoj količini nego eritrociti.^{59,128} Kontrakcijom slezene na podražaj simpatičkog živčanog sustava dolazi do porasta leukocita u perifernoj krvi, čime se objašnjava nastanak leukocitoze u osoba izloženih stresu, što nije bio slučaj u splenektomiranih osoba.¹⁷ Brzi nastanak kontrakcije slezene za vrijeme apneje uz porast broja leukocita u perifernoj krvi ukazuje na postojanje centralno posredovanog mehanizma koji regulira promjene volumena slezene. Srednji volumen trombocita u ljudskoj slezeni je oko 20% veći od onog u perifernoj cirkulaciji.⁶¹ S druge strane, dokazano je da veći trombociti imaju znatno veću metaboličku i enzimsku aktivnost, veću intracelularnu aktivnost tromboksana A₂, kao i povećanu koncentraciju prokoagulacijskih proteina na površini stanice (P selectin, GpIIb/IIIa), a time i veći protrombotski potencijal od manjih trombocita.^{34,35,36} Nedavna istraživanja su dokazala

jaku povezanost između velikog srednjeg volumena trombocita i trombotskih događaja, kao što su akutni koronarni sindrom i ishemijski moždani udar.^{38,39,40} S obzirom na to da je poznato kako upravo ta stanja prati povećana aktivnost simpatičkog živčanog sustava, sam po sebi se nameće zaključak da zbog centralno posredovane kontrakcije slezena može biti važan izvor velikih trombocita, čime se povećava rizik nastanka trombotskih incidenata.¹⁸ Također je poznato da u bolesnika sa sindromom prestanka disanja u snu, srednji volumen trombocita je veći nego u zdravih osoba, te su te osobe sklonije nastanku kardiovaskularnih komplikacija, kao što su infarkt miokarda, moždani udar i nagla smrt.¹²⁹ Mnoga istraživanja su pokazala da tijekom različitih adrenergičkih podražaja dolazi do kontrakcije slezene uz porast endogenih katekolamina; međutim, istraživači nisu obraćali pozornost na vrijeme i dinamiku tog porasta, odnosno na brzinu kontrakcije slezene. Rezultati ovog istraživanja govore da je brza kontrakcija slezene rezultat aktivacije centralnog simpatičkog živčanog sustava. Međutim, nema dokaza da je možda i porast endogenih katekolamina u isto vrijeme, preko alfa receptora doveo do kontrakcije slezene. Ipak, vjerojatnije je da je viša razina katekolamina odgovorna za naknadnu, prolongiranu kontrakciju slezene, kao odgovor na različite podražaje. Da bi se to razjasnilo, u narednim istraživanjima će biti nužno pratiti koncentraciju endogenih katekolamina, usporedno s kontrakcijom slezene na različite adrenergičke podražaje. U tom pogledu, ograničenje ovog istraživanja je izostanak praćenja razina adrenalina u krvi tijekom intravenske infuzije, što bi možda dalo konačan odgovor na to pitanje.

Ovo istraživanje je pokazalo da se značajna kontrakcija slezene javlja na samom početku primjene niske doze adrenalina uz istovremeni pad srednjeg arterijskog tlaka i porast periferne simpatičke aktivnosti, što ukazuje na slezenu kao sastavni dio simpatičkog živčanog sustava za vrijeme stresnih situacija.

7. ZAKLJUČCI

1. Liječenje arterijske hipertenzije selektivnim i neselektivnim betablokatorom uzrokuje trajnu kontrakciju slezene uz posljedični porast srednjeg volumena trombocita u perifernoj krvi, što može imati nepovoljan učinak na nastanak trombotskih događaja.
2. Slezena je dinamičko skladište velikih trombocita koji se istiskuju u perifernu cirkulaciju pod utjecajem različitih adrenergičkih podražaja.
3. Odgođeni i postupni porast srednjeg volumena trombocita u perifernoj krvi, nakon kontrakcije slezene i povećani protok kroz vene jetre, nastaje zbog postupnog ispuštanja krvi u donju šuplju venu, pod kontrolom hepatokavalnog sfinktera.
4. Kontrakcija slezene nastaje na samom početku primjene infuzije niske doze adrenalina, uz istovremeni pad srednjeg arterijskog tlaka i porast periferne simpatičke živčane aktivnosti, što potvrđuje da je slezena sastavni dio centralnog simpatičkog odgovora za vrijeme stresnih situacija.
5. Aktivacija simpatičkog živčanog sustava tijekom liječenja nekim vrstama antihipertenziva, zbog kontrakcije slezene i povećanja broja velikih trombocita u perifernoj krvi, može imati nepovoljne učinke na kardiovaskularni sustav, što svakako treba imati na umu pri odabiru najboljeg načina liječenja.

8. SAŽETAK

U ljudskoj slezeni je uskladišteno oko 30% ukupnih trombocita u tijelu. Oni imaju veći volumen i protrombotsku moć od onih u perifernoj cirkulaciji, u koju se ispuštaju u stanjima povećanog adrenergičkog tonusa. Cilj ovoga istraživanja je bio: 1) usporediti učinak bisoprolola i karvedilola na veličinu slezene, te na broj i volumen trombocita u perifernoj krvi u novootkrivenih hipertoničara, 2) utvrditi učinak malih doza adrenalina na promjene veličine slezene, širinu jetrenih vena i protok krvi kroz njih, 3) utvrditi dinamiku promjena u perifernoj krvnoj slici, s obzirom na ulogu hepatalnog sfinktera na ušću vena jetre u donju šuplju venu, 4) procijeniti je li kontrakcija slezene potaknuta infuzijom malih doza adrenalina posljedica periferne humoralne stimulacije ili aktivacije simpatičkog živčanog sustava zbog smanjenog podraživanja baroreceptora.

Osamnaest novootkrivenih hipertoničara i devet zdravih osoba su na početku istraživanja uradili test opterećenja po Bruce-ovu protokolu, a prije i nakon toga je ultrazvukom izmjeren volumen slezene te su uzeti uzorci krvi za analizu broja i srednjeg volumena trombocita. Potom su hipertoničari nakon randomizacije bili liječeni bisoprololom 5 mg/dan (n=9) ili karvedilolom 25 mg/dan (n=9) tijekom mjesec dana, a spomenuta mjerenja su bila ponovljena 15-og i 30-og dana liječenja, prije i nakon testa opterećenja.

Nakon petnaest i trideset dana liječenja, zapaženo je značajno smanjenje volumena slezene uz porast srednjeg volumena trombocita u perifernoj krvi, podjednako u obje skupine ispitanika. Smanjenje volumena slezene nakon testa opterećenja kao i porast broja i srednjeg volumena trombocita je uočen samo prije početka liječenja, dok su bili znatno manji nakon petnaestog i tridesetog dana liječenja bisoprololom i karvedilolom. Iz istraživanja proizlazi da liječenje arterijske hipertenzije selektivnim ili neselektivnim betablokatorom uzrokuje kontrakciju slezene i posljedični porast srednjeg volumena trombocita u perifernoj cirkulaciji, što može povećati rizik nastanka trombotskih događaja. Devetorici mladih zdravih muškaraca je primijenjena infuzija adrenalina u maloj dozi (0,06-0,12 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) tijekom devet minuta uz trajno, neinvazivno mjerenje hemodinamskih parametara. Izmjereni su volumen slezene, promjer i protok kroz jetrene vene te periferna krvna slika, prije i na kraju infuzije te u 1., 5., 10. i 20. minuti nakon

završetka infuzije. Trojici ispitanika je za vrijeme infuzije adrenalina i tijekom dvadeset minuta oporavka trajno mjerena periferna mišićna simpatička aktivnost, kao pokazatelj periferne simpatičke aktivnosti. Neposredno nakon početka infuzije adrenalina značajno se smanjio volumen slezene za 36% ($p=0,008$), uz povećanje promjera jetrene vene i protoka krvi kroz nju. U isto vrijeme je došlo do pada srednjeg arterijskog tlaka i ukupne periferne rezistencije uz porast frekvencije bila, udarnog volumena srca i mišićne simpatičke živčane aktivnosti. Maksimalan porast srednjeg volumena trombocita registrira se tek u 1. min oporavka i ostaje značajno povećan cijelo vrijeme praćenja (20 minuta po prestanku infuzije adrenalina), dok je ukupni broj trombocita u perifernoj krvi rastao do pete minute oporavka, a potom se bilježi pad njihovog broja do kraja oporavka. Iako se kontrakcija slezene javila neposredno nakon početka infuzije adrenalina, broj krvnih stanica na periferiji, uključujući i velike trombocite se povećao tek u prvoj minuti oporavka, dakle sa zakašnjenjem od devet minuta. Istovremeno, maksimalni porast protoka i širine jetrenih vena uočeni su u prvoj minuti oporavka, što potvrđuje da se istisnuta krv iz slezene zadržava jetrenim venama uz kontrolu hepatokavalnog sfinktera.

Ovo istraživanje je pokazalo da je slezena skladište velikih trombocita koji imaju veliku protrombotsku moć. Njihovo otpuštanje u perifernu cirkulaciju pod različitim adrenergičkim podražajima kontrolira hepatokavalni sfinkter na ušću jetrenih vena u donju šuplju venu.

Kako se kontrakcija slezene javila na samom početku primjene adrenalina uz istovremeni pad srednjeg arterijskog tlaka i porast periferne simpatičke aktivnosti, to potvrđuje da je slezena sastavni dio simpatičkog živčanog sustava za vrijeme stresnih situacija, a da je manje pod utjecajem perifernih posrednika.

9. SUMMARY

The spleen contains approximately one-third of all the body's platelets. These platelets are relatively larger and haemostatically more active than platelets in the systemic circulation and can be released into the systemic circulation by stimulation of α -adrenoceptors or inhibition of β -adrenoceptors. The purpose of this study was: 1) to evaluate the effects of two beta-blockers, bisoprol and carvedilol, on mean platelet volume (MPV) and spleen size in hypertensive patients at rest and after exercise, 2) to test whether changes in peripheral platelet count and MPV in conjunction with changes in spleen volume and hepatic vein blood flow occur after a low dose of epinephrine intravenous infusion in healthy young men, 3) to investigate dynamics of transhepatic passage of large platelets in order to test the hypothesis that cavo-hepatic venous junctions (sphincters) control this process in man, 4) to answer whether the reduction in spleen size in response to epinephrine infusion is a consequence of peripheral humoral stimulation or neurally mediated mechanism by downloading of baroreceptors.

Blood pressure, heart rate, platelet count, MPV and spleen volume were measured in 18 newly diagnosed hypertensive patients, as well as in nine healthy control subjects, subjected to treadmill exercise test at their first visit and, for the hypertensive group, after 15 and 30 days of treatment with the selective β_1 -adrenoceptor antagonist bisoprolol 5 mg/day (n=9) or the nonselective α_1 -, β_1 - and β_2 -adrenoceptor antagonist carvedilol 25 mg/day (n=9). Increases in resting MPV values with concomitant decreases in spleen volume were found after 15 and 30 days treatment with either bisoprolol or carvedilol. The pronounced decrease in splenic volume after exercise and the increased MPV and platelet counts seen at first visit were halved after 15 and 30 days of treatment with either drug. We conclude that in hypertensive patients treated with either selective or non-selective beta-blockers, the spleen contracts and MPV increases, which may increase the risk of atherothrombosis.

We undertook the continuous ultrasonic measurements of spleen volume in response to intravenous infusion of low doses of epinephrine (0.06 and 0.12 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) with simultaneous continuous noninvasive measurements of hemodynamic parameters and peripheral blood count in nine healthy young subjects. For further understanding of

possible neurally mediated spleen contraction, in subgroup of three subjects, we also continuously measured muscle sympathetic nerve activity (MSNA), as an index of peripheral sympathetic activation. We found a massive spleen contraction (~30%, $p=0.008$) at the onset of epinephrine infusion, in parallel with simultaneous decreases in MAP, TPR and an increase in HR, SV and MSNA. The number of total platelets increased in response to spleen contraction in a sequence with MPV until the 5th min of recovery when we observed decline in platelets count while the MPV remained significantly elevated until the end of recovery. Massive spleen contraction (~40%) has been achieved already during second min of epinephrine infusion, but the maximum of total platelets, leucocytes, RBCV and MPV increase was observed at 1st min of recovery, indicating the time delay of 8 mins until the spleen content, including large platelets, reached peripheral blood. Concomitantly, maximal increase in hepatic vein width and velocity time integral were observed in 1st min of recovery, suggesting a shift of splenic blood into an area of hepatic veins most likely controlled by cavo-hepatic sphincters.

The results of this study showed that the spleen is a dynamic reservoir of the large platelets recognized as a strong independent factor of thrombosis. The spleen contraction is followed by dilatation of hepatic veins and delayed increased in peripheral MPV suggesting a shift of splenic blood into an area of hepatic veins most likely controlled by cavo-hepatic sphincters. This rapid splenic response to stimulation of β - adrenoreceptors argues against peripheral triggers and together with observed increase in MSNA favors the idea about spleen as a constitutive part of the sympathetic nervous system during stressful situations.

10. LITERATURA

1. MacDonald IC, Schmidt EE, Groom AC. The high splenic hematocrit: a rheological consequence of red cell flow through the reticular meshwork. *Microvasc Res* 1991;42: 60-76.
2. Felten DL, Felten SY, Carlson SL, Olschovka JA, Livnat S. Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue. *J Immunol* 1985;135:755-65.
3. Pinkus GS, Warhol MJ, O'Connor EM, Etheridge CL, Fujiwara K. Immunohistochemical localization of smooth muscle myosin in human spleen, lymph node, and other lymphoid tissues. *Am J Pathol* 1986;123:440-53.
4. Ayers AB, Davies DN, Withrington PG. Responses of the isolated, perfused human spleen to sympathetic stimulation, catecholamines and polypeptides. *Br J Pharmacol* 1972;44:17-30.
5. Allsop P, Peters AM, Stuttle AWJ, Deenmamode M, Gwilliam ME, Myers MJ, Hall GM. Intrasplenic blood cell kinetics in man before and after brief maximal exercise. *Clin Sci* 1992;83:47-54.
6. Baković D, Valić Z, Eterović D, Vuković I, Obad A, Marinović-Terzić I, Dujčić Ž. Spleen volume and blood flow response to repeated breath-hold apneas. *J Appl Physiol* 2003;95:1460-6.
7. Schagatay E, Andersson JP, Hallen M, Palsson B. Selected contribution: role of spleen emptying in prolonging apneas in humans. *J Appl Physiol* 2001;90:1623-9.
8. Hurford W E, Hochachka PW, Schneider RC, Guyton KP, Stanek KS, Zapol DG i sur. Splenic contraction, catecholamine release, and blood volume redistribution during diving in the Weddell seal. *J Appl Physiol* 1996;80:298-306.

9. Thornton SJ, Spielman DM, Pelc NJ, Block WF, Crocker DC, Costa DP i sur. Effects of forced diving on the spleen and hepatic sinus in northern elephant seal pups. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9413-8.
10. Thomas DP, Fregin GF. Cardiorespiratory and metabolic responses to treadmill exercise in the horse. *J Appl Physiol* 1981;50:864-8.
11. Vatner SF, Higgins CB, Millard RW, Franklin D. Role of the spleen in peripheral vascular response to severe exercise in the untethered dogs. *Cardiovasc Res* 1974;8:276-82.
12. Laub M, Hvid-Jacobsen K, Hovind P, Kanstrup, Christensen NJ, Nielsen SL. Spleen emptying and venous hematocrit in humans during exercise. *J Appl Physiol* 1993;74:1024-6.
13. Flamm SD, Taki J, Moore R, Lewis SF, Keech F, Maltais F i sur. Redistribution of regional and organ blood volume and effect on cardiac function in relation to upright exercise intensity in healthy human subjects. *Circulation* 1990;81:1550-9.
14. Cabanac A, Folkow LP, Blix AS. Volume capacity and contraction control of the seal spleen. *J Appl Physiol* 1997;82:1989-94.
15. Stewart IB, Warburton DER, Hodges NH, Lyster DM, McKenzie DC. Cardiovascular and splenic response to exercise in humans. *J Appl Physiol* 2003;94:1619-26.
16. Ojiri Y, Noguchi K, Shiroma N, Matsuzaki T, Sakanashi M, Sakanashi M. Uneven changes in circulating blood cell counts with adrenergic stimulation to the canine spleen. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002;29:53-9.
17. Baković D, Eterović D, Saratlija-Novaković Ž, Palada I, Valić Z, Bilopavlović N, Dujčić Ž. Effect of human splenic contraction on variation in circulating blood cell counts. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2005;32:944-51.
18. Baković D, Eterović D, Palada I, Valić Z, Dujčić Ž. Does breath-holding increase the risk of a thrombotic event? *Platelets* 2008;19:314-5.

19. Wadenvik H, Kutti J. The effect of an adrenaline infusion on the splenic blood flow and intrasplenic platelet kinetics. *Br J Haematol* 1987;67:187-92.
20. Harrison RJ, Tomlinson JDW. Observations on the venous system in certain Pinnipedia and Cetacea. *Proc Zool Soc Lond* 1956;126:205-33.
21. Elsner RW, Scholander PF, Craig AB, Dimond EG, Irving L, Pilson K i sur. A venous blood oxygen reservoir in the diving elephant seal. *Physiologist* 1964;7:124.
22. Gibson JB. The hepatic veins in man and their sphincter mechanisms. *J Anat* 1959;93:368-79.
23. Cavalcanti JS, Andrade LP, Moreira IE, Rietra PH, Oliveira ML. A morphological and functional study of the cavo-hepatic junction in the human. *Surg Radiol Anat* 1995;17:311-4.
24. Hurford WE, Hong SK, Park YS, Ahn DW, Shiraki K, Mohri M, Zapol WM. Splenic contraction during breath-hold diving in the Korean ama. *J Appl Physiol* 1990;69:932-6.
25. Kjeldsen SE, Weder AB, Egan B, Neubig R, Zweifler AJ, Julius S. Effect of circulating epinephrine on platelet function and hematocrit. *Hypertension* 1995;25:1096-105.
26. Thomas DP, Fregin GF. Cardiorespiratory and metabolic responses to treadmill exercise in the horse. *J Appl Physiol* 1981;50:864-8.
27. Wagner DD, Burger PC. Platelets in inflammation and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:2131-7.
28. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med* 2002;8:1227-34.
29. Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Eng J Med* 1999;340:115-26.
30. Tiong AY, Brieger D. Inflammation and coronary artery disease. *Am Heart J* 2005; 150:11-8.

31. Vorchheimer DA, Becker R. Platelets in atherothrombosis. *Mayo Clin Proc* 2006;81:59-68.
32. Massberg S, Shulz C, Gawaz M. Role of platelets in the pathophysiology of acute coronary syndrome. *Semin Vasc Med* 2003;3:147-62.
33. Nadar S, Lip GYH. The prothrombotic state in hypertension and the effects of antihypertensive treatment. *Curr Pharm Des* 2003;9:1715-32.
34. van der Loo B, Martin JF. A role for changes in platelet production in the cause of acute coronary syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:672-97.
35. Thompson CB, Love DG, Quinn PG, Valeri CR. Platelet size does not correlate with platelet age. *Blood* 1983;62:487-94.
36. Martin JF, Shaw T, Heggie J, Penington DG. Measurement of the density of human platelets and its relationship to volume. *Br J Haematol* 1983;54:337:52.
37. Kamath S, Blann AD, Lip GY. Platelet activation: assessment and quantification. *Eur Heart J* 2001;22:1561-71.
38. Butterworth RJ, Bath PM. The relationship between mean platelet volume, stroke subtype and clinical outcome. *Platelets* 1998;9:359-64.
39. Khandekar MM, Khurana AS, Deshmukh SD, Kakrani AL, Katdare AD, Inamdar AK. Platelet volume indices in patients with coronary artery disease and acute myocardial infarction: an Indian scenario. *J Clin Pathol* 2006; 59:146-9.
40. Greisenegger S, Endler G, Hsieh K, Tentschert S, Mannhalter C, Lalouschek W. Is elevated mean platelet volume associated with a worse outcome in patients with acute ischaemic cerebrovascular events? *Stroke* 2004;35:1688-91.
41. Pathansali R, Smith N, Bath P. Altered megakaryocyte-platelet haemostatic axis in hypercholesterolaemia. *Platelets* 2001;12:292-7.

42. Papanas N, Symeonidis G, Maltezos E, Mavridis G, Karavageli E, Vosnakidis T i sur. Mean platelet volume in patients with type 2 diabetes mellitus. *Platelets* 2004;15:475-8.
43. Nadar S, Blann AD, Lip GY. Platelet morphology and platelet indices of platelet activation in essential hypertension: effects of amlodipine based antihypertensive therapy. *Ann Med* 2004;36:552-7.
44. Coban E, Ozdogan M, Yazicioglu G, Akcıt F. The mean platelet volume in patients with obesity. *Int J Clin Pract* 2005;59:981-2.
45. Inanc T, Kaya G, Yarlioglu M, Ardic I, Ozdogru I, Dogan A i sur. The mean platelet volume in patients with non-dipper hypertension compared to dippers and normotensives. *Blood Press* 2010;19:81-5.
46. Nadar SK, Blann AD, Kamath S, Beevers DG, Lip GY. Platelet indexes in relation to target organ damage in high-risk hypertensive patients. A substudy of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial (ASCOT). *J Am Coll Cardiol* 2004;44:415-22.
47. Seo HS, Kang TS, Park S, Choi EY, Ko YG, Choi D i sur. Non-dippers are associated with adverse cardiac remodeling and dysfunction. *Int J Cardiol* 2006;112:171-7.
48. Pizzulli L, Yang A, Martin JF, Luderitz B. Changes in platelet size and count in unstable angina compared to stable angina or non-cardiac chest pain. *Eur Heart J* 1998;19:80-4.
49. Glud T, Schmidt EB, Kristensen SD, Arnfred T. Platelet number and volume during myocardial infarction in relation to infarct size. *Acta Med Scand* 1986;220:401-5.
50. Varol E, Icli A, Ozadin M, Erdogan D, Arslan A. Mean platelet volume is elevated in patients with myocardial infarction with normal coronary arteries, as in patients with myocardial infarction with obstructive coronary artery disease. *Scand J Clin Lab Invest* 2009;69:570-4.
51. O'Malley T, Langhorne P, Elton RA, Stewart C. Platelet size in stroke patients. *Stroke* 1995;26:995-9.

52. Huczek Z, Kochman J, Filipiak KJ, Horszczaruk GJ, Grabowski M, Piatkowski R i sur. Mean platelet volume on admission predicts impaired reperfusion and long-term mortality in acute myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:284-90.
53. Yang A, Pizzulli L, Lüderitz B. Mean platelet volume as marker of restenosis after percutaneous transluminal angioplasty in patients with stable and unstable angina pectoris. *Thromb Res* 2006;117:371-7.
54. Chu SG, Becker RC, Berger PB, Bhatt DL, Eikelboom JW, Konkle B i sur. Mean platelet volume as a predictor of cardiovascular risk: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost* 2010;8:148-56.
55. Bath PM, Butterworth RJ. Platelet size: measurement, physiology and vascular disease. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1996;7:157-61.
56. Martin JF, Shaw T, Heggie J, Penington DG. Measurement of the density of human platelets and its relationship to volume. *Br J Haematol* 1983;54:337-52.
57. Hunt FA. A rapid method for assessing megathrombocytes: its application to thrombocytotic and acquired thrombocytopenic states. *Pathology* 1976;8:47-55.
58. Boos CJ, Lip GY. Assessment of mean platelet volume in coronary artery disease – what does it mean ? *Thromb Res* 2007;120:11-3.
59. Aster R. Pooling of platelets in the spleen: role in the pathogenesis of „hypersplenic“ thrombocytopenia. *J Clin Invest* 1966;45:645-57.
60. Branahog I, Weinfeld A, Roos B. The exchangeable splenic platelet pool studied with epinephrine infusion in idiopathic thrombocytopenic purpura and in patients with splenomegaly. *Br J Haematol* 1973;25:239-48.
61. Chamberlain KG, Tong M, Penington DG. Properties of the exchangeable splenic platelets released into circulation during exercise-induced thrombocytosis. *Am J Haematol* 1990;34:161-8.

62. Freedman ML, Karpatkin S. Elevated platelet count and megathrombocyte number in sickle cell anaemia. *Blood* 1975;46:579-82.
63. Freedman M, Altszuler N, Karpatkin S. Presence of a nonsplenic platelet pool. *Blood* 1977;50:419-25.
64. Schmidt KG, Rasmussen JW. Exercise-induced changes in the in vivo distribution of ¹¹¹In-labelled platelets. *Scand J Haematol* 1984;32:159-66.
65. Jensen PN, Glud TK, Arnfred T. Platelet number and platelet volume in healthy young men during exercise and changes in posture. *Scand J Clin Lab Invest* 1984;44:735-8.
66. Yilmaz MB, Saricam E, Biyikoglu SF, Guray Y, Guray U, Sasmaz H, Korkmaz S. Mean platelet volume and exercise stress test. *J Thromb Thrombolysis* 2004;17:115-20.
67. Stewart IB, McKenzie DC. The human spleen during physiological stress. *Sports Med* 2002;32:361-9.
68. Freden K, Lundborg P, Vilen L, Kutti J. The peripheral platelet count in response to adrenergic alpha and beta-1-receptor stimulation. *Scand J Haematol* 1978;21:427-32.
69. Kutti J, Freden K, Melberg PE, Lundborg P. The exchangeable splenic platelet pool in response to selective adrenergic beta-1-receptor blockade. *Br J Haematol* 1977;37:277-82.
70. Freden K, Vilen L, Lundborg P, Olsson LB, Kutti J. The peripheral platelet count and the isoprenaline-induced splenic platelet pooling in response to beta-adrenoreceptor blockade. *Scand J Haematol* 1979;23:245-50.
71. Punda A, Polić S, Rumboldt Z, Bagatin J, Marković V, Lukin A. Effects of atenolol and propranolol on platelet aggregation in moderate essential hypertension: randomized crossover trial. *Croat Med J* 2005;46:219-24.
72. Frishman W. Clinical pharmacology of the new beta blocking drugs. Part 1. Pharmacodynamic and pharmacokinetic properties. *Am Heart J* 1979;19:663-70.

73. Frishman W. β -adrenoreceptor antagonists: new drugs and new indications. *N Engl J Med* 1981; 305:505-6.
74. Rumboldt Z. Racionalni izbor beta-adrenergičkog blokatora. U: Rumboldt Z, ur. *Odabrana poglavlja iz terapije*. Split: Jedinica za znanstveni rad, 1992;144-8.
75. Freemantle N, Cleland J, Young P. β -blockade after myocardial infarction: systematic review and meta-regression analysis. *Br Med J* 318:1730-7.
76. McDevitt DG. Pharmacologic aspects of cardioselectivity in a betablocking drugs. *Am J Cardiol* 1987;59:10-2.
77. Bowman AJ, Chen CP, Ford GA. Nitric oxide mediated venodilatator effects of nebivolol. *Br J Clin Pharmacol* 1994;38:199-204.
78. Lopez-Sendon J, Swedberg K, McMurray J, Tamargo J, Maggioni AP, Dargie H i sur. Expert consensus document on β -adrenergic receptor blockers. The Task Force on beta-blockers of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2004;25:1341-62.
79. Leopold G, Pabst J, Bühring KU. Basic pharmacokinetics of bisoprolol, a new highly β_1 selective adrenoreceptor antagonist. *J Clin Pharmacol* 1986;26:616-21.
80. Kirch W, Rose I, Demers HG, Leopold G, Pabst J, Ohnhaus EE. Pharmacokinetics of bisoprolol during repeated oral administration to healthy volunteers and patients with kidney or liver disease. *Clin Pharmacokinet* 1987;13:110-17.
81. Johns TE, Lopez LM. Bisoprolol: is this just another beta-blocker for hypertension or angina? *Ann Pharmacother* 1995;29:403-14.
82. CIBIS-II Investigators and Committees. The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS II): a randomized trial. *Lancet* 1999;353:9-13.
83. Bühler FR, Berglund G, Anderson OK, Brunner HR, Scherrer U, van Brummelen P i sur. Double-blind comparison of the cardioselective β blockers bisoprolol and atenolol

- in hypertension: the bisoprolol multicentre international study (BIMS). *J Cardiovasc Pharmacol* 1986;11:122-7.
84. Neutel JM, Smith DH, Ram CV, Lefkowitz MP, Kazempour MK, Weber MA. Comparison of bisoprolol with atenolol for systemic hypertension in four population groups (young, old, black and nonblack) using ambulatory blood pressure monitoring. *Am J Cardiol* 1993;72:41-6.
 85. Czuriga I, Rieicansky I, Bodnar J, Fulop J, Kruzics V, Kristof E, Edes I. Comparison of the new cardioselective beta-blocker nebivolol with bisoprolol in hypertension: the Nebivolol Bisoprolol Multicenter Study (NEBIS). *Cardiovasc Drug Ther* 2003;17:257-63.
 86. Davidov ME, Singh SP, Vlachakis ND, Blumenthal JB, Simon JS, Bryzinsky BS i sur. Bisoprolol, a once-a-day beta-blocking agent for patients with mild to moderate hypertension. *Clin Cardiol* 1990;17:263-8.
 87. Feuerstein GZ, Ruffolo RR Jr. Carvedilol: a novel multiple action antihypertensive agent with antioxidant activity and the potential for myocardial and vascular protection. *Eur Heart J* 1995;16:38-42.
 88. Morgan T. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of carvedilol. *Clin Pharmacokinet* 1994;26:335-46.
 89. Neugebauer G, Neubert P. Metabolism of carvedilol in man. *Eur J Drug Pharmacokinet* 1991;16:257-60.
 90. Neugebauer G, Gabor M, Reiff K. Pharmacokinetics and bioavailability of carvedilol in patients with liver cirrhosis. *Drugs* 1988;36:148-54.
 91. Kramer BK, Ress KM, Erley CM, Risler T. Pharmacokinetic and blood pressure effects of carvedilol in patients with chronic renal failure. *Eur J Clin Pharmacol* 1992;43:85-8.
 92. Hanson L, Hemmelmann A. Carvedilol in the treatment of hypertension – a review of the clinical data base. *Scand Cardiovasc J* 1998;47:67-80.

93. Moser M, Frishman W. Results of therapy with carvedilol, a β blocker vasodilator with antioxydant properties, in hypertensive patients. *Am J Hypertens* 1998;11:15-22.
94. Packer M, Bristwo MR, Cohn JN, Colucci WS, Fowler MB, Gilbert EM, Shusterman NH. The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. *N Engl J Med* 1996;334:1349-55.
95. Packer M, Coats AJS, Fowler MB, Katus HA, Krum H, Mohacsi P i sur. Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure. *N Engl J Med* 2001;344:1651-8.
96. Dargie HJ. Effect of carvedilol on outcome after myocardial infarction in patients with left-ventrivar dysfunction: the CAPRICORN randomized trial. *Lancet* 2003;362:7-13.
97. Task Force of the European Society of Cardiology. Management of stable angina pectoris. *Eur Heart J* 1997;18:394-413.
98. Bakris GL, Fonseca V, Katholi RE, McGill JB, Messerli FH, Phillips RA i sur. GEMINI investigators. Metabolic effects of carvedilol vs metoprolol in patients with type 2 diabetes mellitus and hypertension: a randomized controlled trial. *JAMA* 2004;292:2227-36.
99. Messerli FH, Grossman E, Goldbourt U. Are β -blockers efficacious as first-line for hypertension in elderly ? A systematic review. *JAMA* 1998;279:1903-7.
100. Carlberg B Samuelsson O, Lindholm LH. Atenolol in hypertension: is it a wise choice? *Lancet* 2004;364:1684-9.
101. Lindholm LH, Carlberg B, Samuelsson O. Beta-blockers in primary hypertension: do age and type of beta blocker do matter? *J Hypertens* 2006;24:2143-5.
102. Bradley HA, Wijsonge CS, Volmink JA, Mayosi BM, Opie LH. How strong is the evidence for use of beta-blockers as first-line therapy for hypertension? Systematic review and meta-analysis. *J Hypertens* 2006;24:2131-41.

103. Wiysonge CS, Bradley H, Mayosi BM, Maroney R, Mbewu A, Opie LH, Volmink J. Beta-blockers for hypertension. *Cochrane Database Syst Rev* 2007.
104. Khan N, McAlister FA. Re-examining the efficacy of beta blockers for the treatment of hypertension: a meta-analysis. *Can Med Assoc J* 2006;174:1737-42.
105. The CAFE investigators. Differential impact of blood-pressure lowering drugs on central aortic pressure and clinical outcomes: principal results of the Conduit Artery Function Evaluation (CAFE) study. *Circulation* 2006;113:1213-25.
106. Rumboldt Z. Mjesto betaadrenergičkih blokatora u suvremenom liječenju arterijske hipertenzije. *Liječ Vjesn* 2007;129:237-40.
107. Law MR, Morris JK, Wald NJ. Use of blood pressure lowering drugs in the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of 147 randomised trials in the context of expectations from prospective epidemiological studies. *Br Med J* 2008;338:1245-53.
108. Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Zanchetti A, Cifkova R, Fagard R i sur. A 2007 guidelines fo the menagement of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens* 2007;25:1105-87.
109. Rumboldt Z. Hrvatske smjernice suzbijanja arterijske hipertenzije iz 1999.: osvrt nakon godine dana. *Liječ Vjesn* 2000;122:155-9.
110. Westfall TC, Westfall DP. Endogenous catecholamines. U: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL, ur. *Goodman's & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. New York: McGraw-Hill, 2006:243-7.
111. Ferreira SH, Vane JR. Half-lives of peptides and amines in the circulation. *Nature* 1967;215:1237-40.
112. Koga T. Correlation between sectional area of the spleen by ultrasonic tomography and actual volume of the removed spleen. *J Clin Ultrasound* 1979;7:119-20.

113. Thompson CB, Diaz DD, Qinn PG, Lapins M, Kurtz SR, Valeri CR. The role of anticoagulation in the measurement of platelets volumes. *Am J Clin Pathol* 1983;80:327-32.
114. Meierhenrich R, Gauss A, Vandenesch P, Georgieff M, Poch B, Schutz W. The effects of intraabdominally insufflated carbon dioxide on hepatic blood flow during laparoscopic surgery assessed by transesophageal echocardiography. *Anesth Analg* 2005;100:340-7.
115. Schutz W, Meierhenrich R, Trager K, Gauss A, Radermacher P, Georgieff M. Is it feasible to monitor total hepatic blood flow by use of transesophageal echography? An experimental study in pigs. *Intensive Care Med* 2001;27:580-5.
116. Jellema WT, Wesseling KH, Groeneveld AB, Stoutenebeek CP, Thijs LG, van Lieshout JJ. Continuous cardiac output in septic shock by simulating a model of the aortic input impedance: a comparison with bolus injection thermodilution. *Anesthesiology* 1999;90:1317-28.
117. Hagbarth KE, Vallbo AB. Pulse and respiratory grouping of sympathetic impulses in human muscle-nerves. *Acta Physiol Scand* 1968;74:96-108.
118. Nyrop M, Zweifler AJ. Platelet aggregation in hypertension and the effects of antihypertensive treatment. *J Hypertens* 1988;6:263-9.
119. Boos CJ, Beevers GD, Lip GY. Assessment of platelet activation indices using the ADVIATM 120 amongst 'high-risk' patients with hypertension. *Ann Med* 2007; 39:72-8.
120. Palada I, Eterović D, Obad A, Baković D, Valić Z, Ivančev V i sur. Spleen and cardiovascular function during short apneas in divers. *J Appl Physiol* 2007;103: 1958-63.
121. Wadenvik H, Kutti J. The effect of an isoprenaline infusion on the splenic blood flow and intrasplenic platelet kinetics. *Eur J Haematol* 1987;39:7-13.

122. Hellgren I, Sylven C, Magnusson Y. Study of the beta₁ adrenergic receptor expression in human tissues: Immunological approach. *Biol Pharm Bull* 2000; 23:700-3.
123. Grassi G, Seravalle G, Turri C, Bolla GB, Mancia G. Short versus long-term effects of different dihydropyridines on sympathetic and baroreflex function in hypertension. *Hypertension* 2003;41:558-62.
124. Fu Q, Zhang R, Witkowski S, Arbab-Zadeh A, Prasad A, Okazaki K, Levine BD. Persistent sympathetic activation during chronic antihypertensive therapy. A potential mechanism for long term morbidity. *Hypertension* 2005;45:513-21.
125. Baković D, Pivac N, Eterović D, Palada I, Valić Z, Pauković-Sekulić B, Dujčić Ž. Changes in platelet size and spleen volume in response to selective and non-selective β-adrenoreceptor blockade in hypertensive patients. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009;36:441-6.
126. Olsson LB, Kutti J, Lundborg P, Freden K. The peripheral platelet count in response to intravenous infusion of isoprenaline. *Scand J Haematol* 1976;17:213-6.
127. Harker LA, Finch CA. Thrombokinetics in man. *J Clin Invest* 1969;48:963-74.
128. Thompson CB, Jakubowski JA, Qinn PG, Deykin D, Valeri CR. Platelet size as a determinant of platelet function. *J Lab Clin Med* 1983;101:205-13.
129. Parish JM, Somers VK. Obstructive sleep apnea and cardiovascular disease. *Mayo Clin Proc* 2004;79:1036-46.

11. KRATKI ŽIVOTOPIS

Rođen sam 13. srpnja 1957. godine u Zavojanima, općina Vrgorac. Osnovnu školu sam završio u Dragljanima, a opću gimnaziju u Vrgorcu. Studij medicine upisujem na Medicinskom fakultetu u Zagreb 1975. g. kojeg sam završio u srpnju 1980. godine. Nakon pripravničkog staža u Općoj bolnici Split, do prosinca 1985. g. sam radio kao liječnik primarne zdravstvene zaštite u Domu zdravlja Vrgorac, a tada započinjem specijalizaciju iz Interne medicine u Općoj bolnici u Splitu. Specijalistički ispit sam položio u siječnju 1990. godine. Poslijediplomski studij iz kliničke farmakologije sam upisao 1987., a završni ispit sam položio 1993. godine. Akademski stupanj magistra medicinskih znanosti postigao sam u veljači 1996. godine, kada sam obranio tezu "Usporedba diuretskih učinaka endovenoskog bolusa i kontinuirane infuzije furosemida u dekompenziranih srčanih bolesnika". Od 1990. radim kao odjelni liječnik u Internoj klinici KBC Split, a 1. travnja 2009. godine sam imenovan na mjesto pročelnika Odjela za kliničku farmakologiju i toksikologiju. Aktivno sam sudjelovao u projektima "Izučavanje etiopatogeneze, dijagnostike i terapije arterijske hipertenzije" i "Pristup nagloj srčanoj smrti". Dana 18. veljače 2003. godine mi je dodijeljen naslov primarijus, a 19. veljače 2007. godine priznat mi je status iz uže specijalnosti kardiologije. Od 1990. godine aktivno sudjelujem u nastavi u vidu seminara i vježbi za studente Medicinskog fakulteta u Splitu, a od 1997. do 2001. godine kao naslovni asistent u Katedri za internu medicinu, za predmet Interna medicina. Bio sam aktivni sudionik na više domaćih i međunarodnih kongresa i objavio sam oko pedeset znanstvenih, stručnih i nastavnih radova od kojih su njih devet citirani u Current Contents. Redoviti sam član Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatske liječničke komore, Hrvatskog društva za hipertenziju i Hrvatskog kardiološkog društva.