

Sesja I

PIĄTEK 21.10, 8.30–9.55

KANAŁY JONOWE, RECEPTORY, TRANSDUKCJA SYGNAŁÓW

1

Spadek aktywności ATP-azy wapniowej sarkolemy w toku pozawałowej przebudowy serca szczura

Urszula Mackiewicz, Michał Mączewski, Bohdan Lewartowski

Zakład Fizjologii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

Obieg jonów Ca^{2+} w kardiomiocytach to proces niezmiernie ważny dla funkcji mięśnia sercowego. Wszelkie jego zaburzenia mają bezpośredni wpływ na siłę i kinetykę skurczu i rozkurczu kardiomiocytów i na ich czynność elektryczną, co przekłada się na sprawność hemodynamiczną serca i predyspozycję do arytmii. Badania ostatnich lat wykazały, że obieg Ca^{2+} w komórkach przerastającego i niewydolnego mięśnia sercowego jest zaburzony w wyniku zmiany funkcji i/lub ekspresji białek realizujących ten proces. Brak jest jednak badań aktywności sarkolemalnej ATP-azy (PMCA), transportującej Ca^{2+} odkomórkowo i częściowo odpowiedzialnej za rozkurcz miocytu. Ponadto PMCA ma wpływ na wiele wewnątrzkomórkowych sygnałów (np. hamowanie nNOSu lub kalcyneuryny i związanego z nią szlaku NFAT). Celem naszej pracy było zbadanie aktywności PMCA podczas pozawałowej przebudowy mięśnia sercowego.

Metody: Komórki izolowano z lewej komory serca szczura 1 tydzień, 1 miesiąc i 3 miesiące po zawale lub po operacji pozornej. Rejestrowano przebieg zmian wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} (sygnał wapniowy) przy użyciu sondy fluorescencyjnej INDO-1 oraz skurcze komórek. Wskaźnikiem aktywności PMCA był jej udział w odkomórkowym transporcie Ca^{2+} mierzonym szybkością opadania sygnału wapniowego wywołanego podaniem kofeiny na tle płynu $0Na_0Ca$.

Wyniki: U zwierząt po zawale zaobserwowano bardzo znaczny i postępujący w czasie spadek aktywności PMCA odpowiednio o 26,9%, 48,3% i 66,7% 1 tydzień, 1 miesiąc i 3 miesiące po zawale w porównaniu ze zwierzętami pozornie operowanymi. Ponadto zaobserwowano wzrost amplitudy sygnału wapniowego u zwierząt 1 i 3 miesiące po zawale odpowiednio o 47,1% i 45,5% oraz towarzyszący mu wzrost zawartości Ca^{2+} w siateczce sarkoplazmatycznej odpowiednio o 61,9% i 58,3%.

Wnioski: Zmniejszenie szybkości usuwania Ca^{2+} wynikające ze spadku aktywności PMCA może umożliwiać zwiększony wychwyt Ca^{2+} przez siateczkę i tym samym prowadzić do

wzrostu amplitudy sygnału, czego następstwem jest wzrost siły skurczu. Może być to próba adaptacji przeżywających zawal komórek do zwiększonej pracy wynikającej ze zmniejszonej liczby żywych miocytów lewej komory.

2

Przewodnictwo kanałów K^+ zależnych od ATP w komórkach serca świnki morskiej w warunkach stresu hipotonicznego

Ivan Kocić¹, Jacek Petruszewicz¹, Yuji Hirano², Masayasu Hiraoka²¹Katedra i Zakład Farmakologii, Akademia Medyczna, Gdańsk²Pracownia Chorób Serca, Naukowy Instytut Medyczny, Uniwersytet Medyczny, Tokio, Japonia

Wstęp: Wiadomo, że w warunkach niedokrwienia dochodzi do zmian ciśnienia osmotycznego środowiska, w którym znajdują się komórki serca. Obniżenie ciśnienia osmotycznego (stres hipotoniczny) powoduje istotne i szybkie zmiany aktywności wielu kanałów jonowych komórek serca [1]. Aktywność kanałów K^+ zależnych od ATP (K_{ATP}) w warunkach stresu hipotonicznego nie jest jeszcze dobrze zbadana [2, 3]. Celem niniejszej pracy było porównanie przewodnictwa kanałów K_{ATP} w środowisku izo- i hipotonicznym.

Metodyka: Doświadczenia przeprowadzono na izolowanych miocytach komór serca świnek morskich obojga płci. Do pomiarów prądu jonowego zastosowano metodę patch clamp w konfiguracji *voltage clamp* na całej komórce. Ciśnienie osmotyczne regulowano za pomocą manitolu, przy czym stres hipotoniczny powodowano zmniejszeniem osmolarności o około 100 mOsm. Kanały K_{ATP} aktywowano za pomocą rilmakalimu (0,1 i 0,3 μM). Po uzyskaniu stabilnego efektu w warunkach izotonicznych, zmniejszono ciśnienie osmotyczne płynu perfuzyjnego i mierzono prąd jonowy spowodowany rilmakalimem i blokowany przez glibenklamid.

Wyniki: Przewodnictwo kanałów K_{ATP} mierzone jako wzrost prądu w stosunku do zmian potencjału w punkcie 0 mV, w warunkach izotonicznych wyniosło $10,5 \pm 1,5$ nS w obecności 0,1 μM rilmakalimu i $13,4 \pm 3$ nS w obecności 0,3 μM tego aktywatora. Obniżenie ciśnienia osmotycznego zwiększyło w sposób statystycznie znamieny przewodnictwo kanałów K_{ATP} do $20,4 \pm 1,4$ nS przy 0,1 μM ($P < 0,01$, $N = 6$) i $22,1 \pm 2,9$ nS przy 0,3 μM ($P < 0,01$, $N = 6$).

Wnioski: Nasze wyniki sugerują, że stres hipotoniczny zwiększa częstość otwierania kanałów K_{ATP} w obecności rilmakalimu.

Piśmiennictwo

1. Kocić I, Hirano Y, Hiraoka M. Ionic basis for membrane potential changes induced by hypoosmotic stress in guinea-pig ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 2001; 51: 59-70.

2. Priebe L, Beuckelmann DJ. Cell swelling causes the action potential duration to shorten in guinea-pig ventricular myocytes by activating IKATP. *Pflugers Arch* 1998; 436: 894-8.
3. Kocic I, Hirano Y, Hiraoka M. Hypotonic stress increases efficacy of rilimakalim, but not pinacidil, to activate ATP-sensitive K(+) current in guinea pig ventricular myocytes. *J Pharmacol Sci* 2004; 95: 189-95.

3

Wpływ kannabinoidów na receptory nikotynowe włókien współczulnych unerwiających serce szczura

Urszula Baranowska¹, Manfred Göthert², Grzegorz Godlewski¹, Barbara Malinowska¹

¹Zakład Fizjologii Doświadczalnej, Akademia Medyczna, Białystok

²Instytut Farmakologii i Toksykologii, Uniwersytet w Bonn, Niemcy

Anandamid jest endogennym agonistą receptorów kannabinoidowych. Do jego uwolnienia dochodzi między innymi we wstrząsie kardiogenym, septycznym i krwotocznym. Jak wykazano na oocytach *Xenopus*, związek ten w sposób niezależny od receptorów kannabinoidowych CB₁ hamuje funkcję podjednostki $\alpha 7$ receptorów nikotynowych dla acetylocholiny. Powyższego działania nie wykazują natomiast syntetyczni agoniści receptorów kannabinoidowych w tym CP 55940 [1]. Biorąc pod uwagę, że w receptorach nikotynowych zwojów autonomicznego układu nerwowego wykazano obecność podjednostek $\alpha 7$.

Cel: Sprawdzenie w warunkach *in vivo*, czy kannabinoidy modyfikują funkcję receptorów nikotynowych włókien nerwowych układu współczulnego, unerwiających serce szczura.

U szczurów odrzędzonych, poddanych obustronnej wago-tomii, zarówno dożylna iniekcja nikotyny (0,5-1 $\mu\text{mol/kg}$) podawanej w obecności atropiny (3 $\mu\text{mol/kg}$), jak i stymulacja elektryczna (1 Hz, 1 ms, 50 V przez 10 s) przedzwojowych włókien współczulnych unerwiających serce powodowała porównywalne wzrosty częstości skurczów serca (HR) o około 60 uderzeń/min. Stymulowany elektrycznie wzrost HR był hamowany przez CP 55940 (1 $\mu\text{mol/kg}$), natomiast nie był modyfikowany przez stabilny analog anandamidu – metanandamid (1 $\mu\text{mol/kg}$). Maksymalny efekt CP 55940 (ok. 40%) osiągnięty w 5. min utrzymywał się przez co najmniej 30 min. Działanie to było osłabiane przez AM 251 (3 $\mu\text{mol/kg}$) antagonistę receptorów kannabinoidowych CB₁. Stymulowany za pośrednictwem nikotyny wzrost HR był zmniejszany przez metanandamid (1 $\mu\text{mol/kg}$). Hamujący wpływ metanandamidu nasilał się w czasie (maksymalny efekt wynoszący ok. 50% został osiągnięty w 50 min) i nie był blokowany przez AM 251 (3 $\mu\text{mol/kg}$).

Na podstawie uzyskanych wyników można przypuszczać, że endogenne kannabinoidy modulują funkcję receptorów nikotynowych w warunkach *in vivo*. Ponadto potwierdziliśmy istnienie presynaptycznych hamujących receptorów kannabinoidowych CB₁ na zakończeniach włókien współczulnych unerwiających serce.

Piśmiennictwo

1. Oz M, Zhang L, Ravindran A, et al. Differential effects of endogenous and synthetic cannabinoids on $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor-mediated responses in *Xenopus* Oocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 310: 1152-60.

4

Wpływ zabiegu kardiologicznego na degranulację neutrofilii krwi obwodowej dzieci z wrodzoną wadą serca

Jarosław Paśnik¹, Krzysztof Zeman¹, Jerzy Arendarczyk¹, Agnieszka Cywińska-Bernas¹, Wojciech Mazurowski¹, Zbigniew Baj², Jadwiga A. Moll³, Andrzej Sysa³, Jacek Moll⁴

¹Klinika Pediatrii, Kardiologii Prewencyjnej i Immunologii Wieku Rozwojowego, Uniwersytet Medyczny, Łódź

²Zakład Patofizjologii i Immunologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny, Łódź

³Klinika Kardiologii, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki, Łódź

⁴Klinika Kardiologii, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki, Łódź

Wstęp: W rozwoju powikłań zapalnych po zabiegu kardiologicznym podkreśla się rolę zjawiska sekwestracji neutrofilii w krążeniu płucnym. W trakcie degranulacji komórki te uwalniają duże ilości enzymów proteolitycznych, co może prowadzić do zaburzeń narządowych.

Cel: Ocena degranulacji neutrofilii krwi obwodowej dzieci z wrodzoną wadą serca podczas i po zabiegu kardiologicznym.

Materiał i metody: Badaniem objęto 27 dzieci w wieku 5–27 mies., poddanych zabiegowi operacyjnemu z krążeniem pozaustrojowym (CPB) – grupa CPB i 14 dzieci w wieku 11–49 mies. po zabiegu bez CPB – grupa CS. Oceniano ekspresję wskaźników degranulacji neutrofilii: cząsteczek CD11b i CD66b, a także stężenia produktów degranulacji tych komórek: metaloproteinazy-9 (MMP-9) i sekrecyjnego inhibitora proteaz (SLPI). Dodatkowo oceniano stężenie innego inhibitora proteaz: angiogeniny (ANG). Badania były wykonywane: przed znieczuleniem, na starcie CPB (zabiegu kardiologicznego – grupa CS), 30 min po rozpoczęciu CPB, po zakoń-

czeniu CPB (po zakończeniu zabiegu – grupa CS), po 4 i po 48 godz. od zakończenia CPB.

Wyniki: W obu grupach badanych wykazano istotny wzrost ekspresji cząstek CD11b i CD66b po rozpoczęciu zabiegu. Obserwowano wzrost stężenia MMP-9 w osoczu krwi obwodowej dzieci 24 godz. po zakończeniu CPB w obu grupach badanych. W grupie dzieci z CPB stężenie badanej proteinazy pozostało podwyższone 48 godz. po zabiegu. W obu grupach stężenie SLPI uległo obniżeniu po zakończeniu zabiegu. W grupie dzieci z CPB wykazano obniżenie stężenia ANG po 4 godz. od zakończenia zabiegu.

Wnioski: Rezultaty badań potwierdzają, że zabieg kardiologiczny wpływa na degranulację neutrofilów i aktywność uwalnianych w jej trakcie enzymów. Rola badanych proteinaz i ich inhibitorów w rozwoju powikłań zapalnych po zabiegu kardiologicznym u dzieci wymaga dalszych badań.

Praca finansowana w ramach badań własnych UM nr 502-15-277 i grantu KBN nr 2 P05E 081 27

5

Acute hypoxia stimulates fatty acid transport by regulating subcellular distribution of FAT/CD36 and FABPpm

Adrian Chabowski^{1,2}, Jan Górski¹, Arend Bonen²

¹Department of Physiology, Medical University, Białystok

²Department of Human Biology and Nutritional Sciences, University of Guelph

Recent studies have demonstrated that protein-mediated LCFA transport across plasma membranes is a highly regulated process involving changes in sarcolemmal content of fatty acid transporters (FAT/CD36 and FABPpm). Specifically, in cardiac myocytes, insulin and contraction like stimuli (AICAR) induced translocation of FAT/CD36 from an intracellular pool to the plasma membranes. In contrast, FABPpm can be recruited to the plasma membranes only by AICAR stimulation but not by insulin. In these studies there was an increase in LCFA transport, which was associated with an increase in only plasmalemmal FAT/CD36, as well as plasmalemmal FAT/CD36 and FABPpm, while the total expression of these proteins was not altered. As far as we are aware, there is no information in the literature, concerning the redistribution of any fatty acid transporters under hypoxic conditions in either cardiac myocytes or in intact perfused hearts.

In this study, we investigated the acute effect of hypoxia on LCFA transport in isolated cardiac myocytes as well as in intact perfused hearts from male Sprague Dawley rats (200-250 g). Incubation of cardiac myocytes under hypoxic conditions induced redistribution of FAT/CD36 from an intracellular pool (LDM) (-25%, $P < 0.05$) to the plasma

membranes (PM) (+54%, $P < 0.05$). We also observed a hypoxia-induced increase in FABPpm at the PM (+56%, $P < 0.05$) and a concomitant FABPpm reduction in the LDM (-24%, $P < 0.05$). In intact, Langendorff perfused hearts, hypoxia induced the translocation of both FAT/CD36 and FABPpm to the PM (+66% and +61%, respectively, $P < 0.05$), with a concomitant decline in FAT/CD36 and FABPpm in the LDM (-24% and -23%, $P < 0.05$). Importantly, the increased plasmalemmal content of these transporters was associated with increases in the initial rates of palmitate uptake into cardiac myocytes (+40%, $P < 0.05$). Similarly, the hypoxia stimulation increased parallel to the palmitate incorporation into intracellular (DAG, PL, TG, ceramide) lipid pools in intact perfused hearts.

6

Działanie rozkurczowe atypowego kannabidiolu w izolowanych tętnicach płucnych człowieka

Hanna Kozłowska¹, Marta Baranowska¹, Mirosław Kozłowski², Eberhard Schlicker³, Barbara Malinowska¹

¹Zakład Fizjologii Doświadczalnej, Akademia Medyczna, Białystok

²Klinika Torakochirurgii, Akademia Medyczna, Białystok

³Instytut Farmakologii i Toksykologii, Uniwersytet w Bonn, Niemcy

Jak wykazano w ostatnich latach, uwalniany we wstrząsie krwotocznym, septycznym i kardiogenym endogenny kannabinoid anandamid obniża ciśnienie krwi m.in. za pośrednictwem wciąż niezidentyfikowanych receptorów śródbłonkowych. Receptor ten pobudzany jest także przez atypowy kannabidiol (abn-cbd) – związek pozbawiony powinowactwa do receptorów kannabinoidowych CB₁/CB₂ oraz właściwości psychotycznych. Udowodniono, że abn-cbd obniżał ciśnienie krwi u myszy, powodował rozkurcz izolowanej aorty królika i tętnicy krezkowej szczura oraz migrację komórek śródbłonka żyły pępowinowej człowieka [1].

Cel: Zbadanie wpływu abn-cbd na czynność skurczową izolowanych tętnic płucnych podsegmentarnych człowieka. Tętnice pobierano z miejsc położonych dystalnie od guza w trakcie resekcji od pacjentów operowanych z powodu niedrobnokomórkowego raka płuca. Efekt relaksujący abn-cbd oceniano na naczyniach kurczonych serotoniną (5-HT; 1 μM) lub K⁺ (60 μM). Zależnie od stężenia abn-cbd (0,1–100 μM) rozkurczał tętnicę płucną człowieka skurczoną 5-HT ($pD_2 = 4,82 \pm 0,11$; $E_{max} = 116,2 \pm 7,8\%$; $n = 10$). Działanie to było zależnie od stężenia osłabiane przez blokujący śródbłonkowe receptory dla anandamidu kannabidiol (3 i 10 μM). Efekt abn-cbd nie był zmieniony pod wpływem podanych razem inhibitora syntazy tlenu azotu – L-NAME (300 μM) i cyklooksyge-

nazy – indometacyny ($10 \mu\text{M}$). Krzywa stężenie-efekt dla abn-cbd była przesunięta w prawo pod wpływem mechanicznego usunięcia śródbłonka (równolegle zanotowano spadek E_{max} do 70%) oraz w obecności nieselektywnego blokera kanałów potasowych (K_{Ca}) – tetraetylammonium ($300 \mu\text{M}$). W naczyniach z zachowanym śródbłonkiem skurczonych K^+ ($60 \mu\text{M}$) efekt rozkurczowy abn-cbd wynosił maksymalnie 40%.

Podsumowanie: Kannabidiol rozkurcza izolowane tętnice płucne człowieka prawdopodobnie za pośrednictwem śródbłonkowych receptorów dla anandamidu. Wstępne wyniki wskazują, że powyższe działanie abn-cbd związane jest z aktywacją kanałów potasowych (K_{Ca}), a niezależne od tlenu azotu i prostacykliny.

Piśmiennictwo

1. Begg M, Pacher P, Batkai S, et al. Evidence for novel cannabinoid receptors. *Pharmacol Ther* 2005; 106: 133-45.
-