

SESJA VI PIĄTEK 21.10, 17.45–19.10 EKSPERYMENTALNE MODELE CHOROÓB UKŁADU KRĄŻENIA

28

Melatonina zwiększa zawartość kolagenu w bliźnie po zawale serca, badania *in vivo* i *in vitro*

Jacek Drobnik¹, Alicja Szczepanowska¹, Sławomir Olczak¹,
Donata Słowińska¹, Dariusz Tosik², Hieronim Bartel²,
Lucjusz Jakubowski², Ryszard Dąbrowski²

¹Zakład Patofizjologii, Katedra Patofizjologii,
Uniwersytet Medyczny, Łódź

²Zakład Histologii i Ultrastruktury Tkanek,
Uniwersytet Medyczny, Łódź

Dotychczasowe badania wskazują, że melatonina (MLT) może wywierać regulacyjny wpływ na zawartość kolagenu w bliźnie po zawale serca. Stosowanie egzogennej MLT powodowało wzrost poziomu kolagenu w obszarze gojenia, natomiast pinealektomia obniżała zawartość tego białka w bliźnie. Podawanie MLT pinealektomizowanym szczurom nie normalizowało w pełni poziomu kolagenu w obszarze zawału.

Celem obecnej pracy jest określenie dawki MLT, która normalizuje poziom kolagenu w sercu pinealektomizowanych zwierząt. Ponadto, zamierzamy sprawdzić, czy badany hormon szyszynki może zmieniać poziom kolagenu w warunkach hodowli komórek pobranych z blizny pozawałowej lub mięśnia sercowego szczurów bez zawału.

Badania wykonano na szczurach szczepu Wistar. Zawał serca wywołano poprzez podwiązanie lewej tętnicy wieńcowej. Pinealektomię chirurgiczną wykonano przy pomocy metody Kuszaka i Rodina. Natomiast farmakologiczne zablokowanie czynności szyszynki uzyskano poprzez wieczorne, dożwonne podanie metoprololu w dawce 0,2 mg/100 g m.c. Pinealektomizowane zwierzęta otrzymywały wieczorne wstrzyknięcia MLT w dawkach 60 µg, 120 µg i 240 µg/100 g m.c. W grupie kontrolnej wstrzykiwano 2% roztwór etanolu w dawce 0,1 ml/100 g m.c. W drugiej części doświadczenia pobrano w warunkach jałowych blizny lub niezmienny mięsień sercowy zwierząt po operacji pozorowanej, celem uzyskania hodowli komórek. Komórki identyfikowano przy pomocy mikroskopii elektronowej. Po 3. pasażu badano wpływ różnych stężeń MLT (10^{-7} M- 10^{-15} M). MLT rozpuszczano w etanolu lub DMSO. Poziom kolagenu w hodowlach tkankowych lub bliźnach określano przy pomocy metody Woessnera.

MLT podawana pinealektomizowanym szczurom normalizowała poziom kolagenu w bliźnie we wszystkich stosowa-

nych dawkach. Hodowane komórki z blizny pozawałowej zostały zidentyfikowane jako miofibroblasty (wrzecionowaty kształt komórek, obecność w strefie przybłonowej pasm o strukturze włóknikowej, biegnących wzdłuż komórek oraz towarzyszących im okrągłych lub owalnych pęcherzykowatych struktur mogących odpowiadać kawolom). Komórki te charakteryzowały się obecnością morfologicznych wykładników intensywnej biosyntezy białka (euchromatyczne jądro, rozbudowana ergastoplazma, skondensowane mitochondria i ziarnistości wydzielnicze). Natomiast komórki pobrane z mięśnia zwierząt bez zawału określono jako fibroblasty. MLT stosowana w warunkach *in vitro* obniżała ilość komórek w hodowli oraz powodowała wzrost poziomu białka kolagenowego w obu grupach komórek. Hormon szyszynki nie powodował zmian szybkości gojenia w warunkach *in vitro*.

Wnioski: Obecna praca dowodzi udziału szyszynki w regulacji poziomu zawartości kolagenu w bliźnie po zawale serca. Melatonina jest hormonem szyszynki odpowiedzialnym za opisany efekt. Działanie melatoniny może wynikać z bezpośredniego wpływu hormonu na miofibroblasty w bliźnie przez pobudzenie syntezy kolagenu.

Praca finansowana przez Ministerstwo Nauki i Informatyki, grant nr 3P05A 005 24

29

Zwolnienie częstości wyładowań tkanki rozrusznika serca pod wpływem wyciągów z układu podwzgórzowo-przysadkowego

A. Gorąca, B. Walkowiak, K. Bałczewska, S. Lipińska,
W. Z. Traczyk

Katedra Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej,
Zakład Fizjologii Układu Krążenia, Uniwersytet Medyczny, Łódź

Wcześniej przeprowadzone badania wykazały obecność czynnika zwalniającego pracę serca w płynie inkubującym tylny płąt przysadki mózgowej [1].

Celem obecnej pracy było wyizolowanie czynnika kardio-depresyjnego z układu podwzgórzowo-przysadkowego szczura. Doświadczenia przeprowadzono na 226 szczurach rasy Wistar wyhodowanych w zwierzętarni UM w Łodzi. Zwierzęta zabijano przez dekapitację, wyizolowano podwzgórze i tylne płaty przysadek mózgowych. Wyizolowane struktury mózgowe homogenizowano w zakwaszonej wodzie podwójnie destylowanej w 4°C, następnie odwirowano (wirówka BECKMAN rotor SW 60-kątowy, 20 min, 27000 obr./min, temp. 4°C). Supernatant zlano, zliofilizowano i rozdzielono chromatograficznie na kolumnie C8. Aktywność kardio-depresyjną otrzymanych frakcji oznaczono na izolowanej tkance rozrusznika serca dwudniowego szczura. W tym celu wyizolowano uszko prągowate przedsiönka serca dwudniowego szczura i umieszczono

je w specjalnej komorze o objętości 100 μ L w płynie Ringer-Locka o temp. 20–22°C. Płyn stale powoli przepływał przez komorę w ilości 0,25 mL/min. 15–30 min po umieszczeniu uszka w komorze, kiedy preparat kurczył się w stałym rytmie, wprowadzano do komory frakcje w objętości 20 μ L. Aktywność bioelektryczną spontanicznie depolaryzującej tkanki rozrusznika serca rejestrowano przy użyciu EKG i automatycznie przetwarzano, postępując się specjalnie opracowanym programem komputerowym. Zmiany częstotliwości wyładowań tkanki rozrusznika były analizowane przez komputer i wyrażone jako procent największego zwolnienia w stosunku do kontroli. Różnice w częstotliwości skurczów uszka przed i pod wpływem podawanych próbek oceniano na podstawie testu t-Studenta. Każda próbka była oznaczana na 6 preparatach.

Frakcje od 3 do 8 z kolumny C-8 powodowały zwolnienie częstotliwości skurczów o około 62%. Aktywne frakcje połączono, a następnie rozdzielono na kolumnie TSK 400, zbierając 1-ml frakcje. Wyizolowano 4 frakcje (8–12) powodujące zwolnienie częstotliwości skurczów tkanki rozrusznika o około 66%. Aktywne frakcje poddano rechromatografii na kolumnie C-8 i ponownie oznaczono ich aktywność kardiodepresyjną. Frakcje 8–9 powodowały zwolnienie częstotliwości wyładowań tkanki rozrusznika o około 64%.

Wniosek: W homogenatach z podwzgórz i tylnych płątów przysadek szczurów występuje czynnik/czynniki zwalniające częstość skurczów serca.

Badania Finansowane z grantu KBN 507-11-255

Piśmiennictwo

1. Gorąca A, Walkowiak B. Partial purification and identification of cardiodepressant factor from the posterior pituitary lobe in rats. *J Physiol Pharmacol* 2000; 51: 137-50.

30

Odpowiedź nacynia na mechaniczne uszkodzenie podczas zabiegu angioplastyki. Model zwierzęcy stenozы w naczyniu tętniczym zdrowym oraz naczyniu tętniczym zwierzęcia z wywołaną cukrzycą

Joanna Łoś^{2,3}, Mirosław Tyrpień³, Ewa Jędrzejczyk³, Katarzyna Zapołka-Zielińska³, Natalia Jamróz³, Adam Sokal^{1,3}

¹ Katedra i Kliniczny Oddział Kardiologii, Śląska Akademia Medyczna, Śląskie Centrum Chorób Serca, Zabrze

² Katedra i Klinika Kardiologii, Śląska Akademia Medyczna, Śląskie Centrum Chorób Serca, Zabrze

³ Pracownia Kardiologii Doświadczalnej, Śląskie Centrum Chorób Serca, Zabrze

Angioplastyka wieńcowa (PTCA) jest zabiegiem polegającym na mechanicznym poszerzeniu lub udrożnieniu zwężonej lub zamkniętej tętnicy wieńcowej. Pomimo zastosowania stentów uwalniających leki, zwężenie naczyń w miejscu poszerzenia, określane mianem restenozы, stanowi nadal czynnik istotnie ograniczający długotrwałą skuteczność angioplastyki wieńcowej.

Restenozа jest złożonym procesem patologicznym, w wyniku którego dochodzi do zmniejszenia światła tętnicy poprzez przerost śródbłonna oraz warstwy mięśniowej. Przerost ten jest spowodowany przez rozrost komórek mięśni gładkich naczyń (VSMC) w warstwie mięśniowej, jak również ich migrację do śródbłonna naczyń w miejscu interwencji. Jednocześnie dochodzi do zwiększenia zawartości macierzy międzykomórkowej w obu warstwach.

Cukrzyca jest poważnym czynnikiem ryzyka dla wszystkich chorych, którzy przebyli zabieg PTCA. Jak wykazano w wielu doniesieniach, częstość występowania restenozы u tych chorych kształtuje się na poziomie od 49% do 71%.

Celem pracy jest ocena zmian w ścianie tętnicy szyjnej wspólnej na modelu zwierzęcym poprzez określenie odpowiedzi naczyń na uszkodzenie. Oceniony został stopień zniszczenia śródbłonna, pogrubienie błony wewnętrznej naczynia, tzw. neointymy, zmiana średnicy naczynia, typ i nasilenie nacieku zapalnego oraz stopień endotelializacji w miejscu interwencji.

Badanie przeprowadzono na modelu zwierzęcym z wykorzystaniem zdrowych szczurów rasy Wistar oraz szczurów z wywołaną cukrzycą (przy zastosowaniu streptozotocyny), u których tętnica szyjna wspólna poddana została zabiegowi standardowego rozprężania balonu do angioplastyki. Badane zwierzęta podzielono na trzy grupy w zależności od okresu obserwacji – 7, 14 lub 28 dni.

Oceny stopnia zwężenia naczyń w różnych punktach czasowych dokonywano za pomocą programu IAMETER (stworzonego na potrzeby badania). Stopień proliferacji określano poprzez znakowanie komórek bromohexyurydyną (BrdU) na 24 godz. przed pobraniem tętnicy. Oznaczano indeks proliferacji w celu określenia częstości replikacji oraz czasowej i przestrzennej migracji komórek ściany naczynia w miejscu uszkodzenia.

Dokonano oceny histopatologicznej tętnicy w 7., 14. i 28. dobie po zabiegu. Oceniano stopień uszkodzenia śródbłonna, nacieki zapalne, stopień endotelializacji w miejscu uszkodzenia, nasilenie stenozы w miejscu uszkodzenia. Określano stopień proliferacji komórek.

Działanie mechaniczne jest silnym czynnikiem uszkadzającym naczynie i wyzwalającym proces naprawczy, prowadzący do zwężenia światła w miejscu przeprowadzenia zabiegu angioplastyki.

31

Rola ośrodkowego układu angiotensynergicznego i nitrergicznego w hipertensyjnej odpowiedzi na interleukinę-1 β

Marcin Ufnal, Magdalena Dudek, Tymoteusz Żera, Ewa Szczepańska-Sadowska

Katedra i Zakład Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej, Akademia Medyczna, Warszawa

Wyniki badań wskazują, że poziom stężenia cytokin w surowicy krwi może być uważany za czynnik rokowniczy w przebiegu pozawałowej niewydolności układu krążenia. Dobrze udokumentowana jest także rola cytokin w przebiegu procesu zapalnego, który towarzyszy arteriosklerozie. W ostatnich latach pojawiły się informacje o oddziaływaniu cytokin, a zwłaszcza interleukiny-1 β (IL-1 β) na ośrodkową regulację układu krążenia. Celem niniejszej pracy było zbadanie roli mózgowego układu angiotensynergicznego oraz nitrergicznego w odpowiedzi hemodynamicznej na ośrodkową infuzję IL-1 β .

Metodyka: Badania były prowadzone na szczurach Sprague Dawley. W czasie 2 tygodni poprzedzających wykonanie pomiarów zwierzęta zostały poddane implantacji kaniuli do komory bocznej mózgu oraz założeniu cewnika do aorty brzusznej. Pomiar ciśnienia tętniczego (MAP) oraz częstości skurczów serca (HR) były wykonywane na zwierzętach czuwających, metodą bezpośrednią, po dwóch dniach od ostatniego zabiegu operacyjnego. Rejestracja pomiarów odbywała się przez 15 min w warunkach podstawowych oraz podczas 60-minutowej, dokomorowej infuzji badanych związków. Wykonane zostały następujące serie badań: Seria 1. (kontrola) – infuzja soli fizjologicznej 5 μ l/godz., Seria 2. – infuzja IL-1 β 100 ng/godz., Seria 3. – jednoczesna infuzja IL-1 β 100 ng/godz. oraz antagonisty receptorów AT1 dla angiotensyny II (losartan) 10 μ g/godz., Seria 4. – jednoczesna infuzja IL-1 β 100 ng/godz. oraz inhibitora syntazy tlenu azotu L-NAME (ester metylowy N ω -nitro-L-argininy) 1000 ng/godz.

Wyniki: W Serii 2., podczas dokomorowej infuzji IL-1 β uzyskano wzrost MAP, bez zmian HR. Efekt ten obserwowano pomiędzy 30. i 50. min infuzji. Jednoczesna infuzja IL-1 β oraz losartanu nie wywołała istotnych zmian MAP. W Serii 4. (łączna infuzja IL-1 β oraz L-NAME) uzyskano istotnie większy oraz bardziej długotrwały wzrost MAP niż ten obserwowany w czasie infuzji tylko IL-1 β .

Wnioski: Ośrodkowa infuzja IL-1 β wywołuje przejściowy wzrost ciśnienia tętniczego. Otrzymane wyniki wskazują na istotną rolę ośrodkowego układu angiotensynergicznego w hipertensyjnej odpowiedzi na IL-1 β . Zahamowanie syntezy tlenu azotu w czasie infuzji IL-1 β skutkowało wzmocnieniem oraz wydłużeniem czasu trwania wzrostu MAP. Wskazuje to na istotną kontrregulującą rolę tlenu azotu w przeciwdziałaniu hipertensyjnej odpowiedzi na IL-1 β .

32

Wpływ pola magnetycznego niskiej częstotliwości na ciśnienie tętnicze krwi

E. Ciejką, A. Gorąca

Katedra Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej, Zakład Fizjologii Układu Krążenia, Uniwersytet Medyczny, Łódź

Badania dotyczące zachowania się ciśnienia tętniczego krwi pod wpływem pola magnetycznego niskiej częstotliwości nie są jednoznaczne.

Celem obecnego badania była ocena zachowania się ciśnienia tętniczego krwi (skurczowego i rozkurczowego) u zwierząt doświadczalnych pod wpływem zmiennego pola magnetycznego. Doświadczenia przeprowadzono na szczurach samcach rasy Wistar wyhodowanych w zwierzętarni Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Szczurom w narkozie uretanowej wypreparowano żyłę udową oraz tętnicę szyjną wspólną lewą i wprowadzono do niej w kierunku dosercowym kaniulę połączoną z czujnikiem. Pomiar skurczowego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego krwi przeprowadzono metodą bezpośrednią, w tętnicy szyjnej wspólnej za pomocą miernika ciśnienia tętniczego DPC-1 /MCBS (producent: Hiperon). Zestaw do pomiaru i rejestracji ciśnienia tętniczego krwi składał się z miernika DPC-1, czujnika, kaniuli polietylenowej wprowadzanej do naczynia krwionośnego oraz komputera. Wartości ciśnienia rejestrowano bezpośrednio na dysku twardym.

Doświadczenia przeprowadzono na dwóch grupach zwierząt. W grupie I rejestrowano skurczowe i rozkurczowe ciśnienie tętnicze przed ekspozycją na zmienne pole magnetyczne i w 5 min po zakończeniu ekspozycji. W II grupie zwierzętom ekspozycją na działanie pola magnetycznego podawano dożylnie siarczan atropiny, propranolol lub indometacynę. Parametry zmiennego pola magnetycznego: częstotliwość 40 Hz, indukcja 7 mT, kształt pola prostokątny, czas ekspozycji 20 min w aplikatorze o średnicy 300 mm.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że wystawienie zwierząt na działanie zmiennego pola magnetycznego powodowało obniżenie ciśnienia skurczowego i rozkurczowego krwi. Obserwowane różnice były istotne statystycznie ($p < 0,05$). Po iniekcji dożylniej propranololu, atropiny lub indometacyny nie zaobserwowano zmian ciśnienia tętniczego krwi. Uzyskane wyniki mogą sugerować, że spadek ciśnienia tętniczego krwi pod wpływem zmiennego pola magnetycznego nie odbywa się za pośrednictwem receptorów β -adrenergicznych, cholinergicznym oraz prostaglandyn.

Badania były finansowane z działalności statutowej UM 503-179-1

33

Badanie wpływu niskoenergetycznego promieniowania laserowego na parametry hemodynamiczne izolowanego perfundowanego serca szczurzego poddanego niedokrwieniu

D. Biały¹, M. Skrzypiec-Spring², J. Arkowski¹,
M. Wawrzyńska¹, B. Grotthus², J. Kwiatkowska²,
A. Szeląg², W. Mazurek¹

¹Katedra i Klinika Kardiologii, Akademia Medyczna, Wrocław

²Katedra i Zakład Farmakologii, Akademia Medyczna, Wrocław

Wstęp i założenia: Naprawa mięśnia sercowego po okresie niedokrwienia jest procesem złożonym, obejmującym różnorodne składniki stanu zapalnego, przebudowę macierzy pozakomórkowej oraz odpowiedź miocytów na niedokrwienie. Wykazano, że niskoenergetyczne promieniowanie laserowe może modulować przemiany biochemiczne zachodzące w komórkach. W poniższej pracy badano wpływ niskoenergetycznego promieniowania laserowego na parametry hemodynamiczne izolowanego serca szczura poddanego niedokrwieniu.

Metodyka: Serca szczurze poddane zostały perfuzji tlenowej przez 25 minut, następnie 20-minutowemu niedokrwieniu, uzyskanemu poprzez wstrzymanie podawania płynu infuzyjnego. Grupa badana poddana została napromienianiu światłem lasera o długości 672 nm i gęstości energii 100 J/cm². Po okresie niedokrwienia serca perfundowane były przez kolejne 30 min. Grupy kontrolne poddawane były perfuzji bez niedokrwienia z naświetleniem i bez naświetlania światłem lasera oraz perfuzji z 20-min niedokrwieniem bez naświetlania światłem lasera. W trakcie badania rejestrowano częstotliwość akcji serca, ciśnienie skurczowe w lewej komorze serca oraz prędkość przepływu buforu. Obliczenia statystyczne wykonano za pomocą analizy ANOVA.

Wyniki: Czynność serc wyrażono wzorem [ciężnienie x częstotliwość rytmu serca/1000] (RPP). W grupie niepoddawanej naświetlaniu światłem lasera po okresie niedokrwienia RPP był istotnie niższy w porównaniu do grupy kontrolnej perfundowanej tlenowo. Czynność serc w grupie poddawanej naświetlaniu światłem lasera po okresie niedokrwienia nie różniła się w sposób istotny statystycznie od grupy kontrolnej perfundowanej tlenowo.

Wnioski: Wyniki powyższego eksperymentu sugerują korzystny wpływ naświetlania niskoenergetycznego na mięsień sercowy poddany niedokrwieniu.

34

Czynność fragmentów ludzkiego mięśnia sercowego w okresie reoksygenacji modyfikowanej ingerencją w układ tlenkowo-azotowy

Tomasz Roleder¹, Marcin Malinowski², Krzysztof S. Gołba¹,
Marek A. Deja², Jolanta Biernat¹, Stanisław Woś

¹Katedra i Klinika Kardiologii, Śląska Akademia Medyczna, Katowice

²II Katedra i Klinika Kardiologii, Śląska Akademia Medyczna, Katowice

Cel: Ocena wpływu donora tlenu azotu (NO): S-nitro-N-acetylo penicylaminy (SNAP) oraz nieselektywnego inhibitora syntazy NO: N-metylo-L-argininy (L-NMMA) na czynność niedotlenionych fragmentów ludzkiego mięśnia sercowego w okresie reoksygenacji.

Materiał i metody: Badanie prowadzono na fragmentach mięśniówki prawego przedsionka, pobranych w czasie zabiegu pomostowania naczyń wieńcowych, u pacjentów bez cech niewydolności serca. Fragmenty poddawano niedotlenieniu (60') i reoksygenacji (60'). W połowie preparatów okres niedotlenienia poprzedzono protokołem hartowania przez niedokrwienie (HPN): 5' niedotlenienia/10'reoksygenacji – grupa HPN, pozostałe fragmenty w tym czasie poddane były standardowym warunkom inkubacji – grupa nonHPN. Pierwsze 15' reoksygenacji modyfikowano poprzez dodanie w tym czasie do kąpielii tkankowej SNAP lub L-NMMA. Każdorazowo badanie przeprowadzano na 2 beczkach, gdzie jedna z nich stanowiła kontrolę. W okresie przed niedotlenieniem i w czasie reoksygenacji rejestrowano parametry czynności skurczowej: amplituda (A_{max}), prędkość i czas narastania skurczu (+dV/dT i Tr) oraz parametry czynności rozkurczowej: prędkość i czas relaksacji (-dV/dT, Tf) oraz czas do 20%, 50% i 80% relaksacji (odpowiednio: Tpk20, Tpk50, Tpk80). Wyniki przedstawiano jako % wartości przed okresem niedotlenienia (średnia±SEM).

Wyniki: W grupie HPN podanie L-NMMA wywołuje opóźlenie czynności skurczowej w całym okresie reoksygenacji – A_{max} : 79±3% vs 88±3%[#], +dV/dT: 45±2% vs 55±2%[#] oraz opóźnienie czynności rozkurczowej w pierwszych 5' reoksygenacji – dV/dT: 50±3% vs 62±3%^{*}, Tf: 107±4% vs 95±4%^{*}, Tpk20: 109±3% vs 98±3%^{*}, Tpk50: 110±4% vs 97±4%^{*}. W grupie nonHPN L-NMMA powoduje poprawę czynności skurczowej i rozkurczowej w całym okresie reoksygenacji – A_{max} : 96±3% vs 81±3%[#], +dV/dT: 52±2% vs 44±2%^{**}, -dV/dT: 67,9±2,6% vs 53,6±2,6%[#], Tf: 95±4% vs 116±4%[#]. Podanie SNAP w obydwu grupach powoduje poprawę czynności skurczowej – A_{max} : 87±1% vs 79±1%^{*}, +dV/dT: 61±2% vs 41±2%^{*}, Tr10–90: 88±1% vs 93±1%^{*} oraz nasila efekt HPN – A_{max} : 41±5% vs 33±5%^{*}. (*p<0,05; **p<0,01; #p<0,001).

Podsumowanie wyników: Donor tlenu azotu podawany na początku reoksygenacji wykazuje ochronny wpływ na czynność skurczową mięśniówki ludzkiego serca oraz nasila działanie ochronne HPN. Zahamowanie aktywności syntazy tlenu azotu zmniejsza efekt ochronny HPN na jej czynność skurczową i rozkurczową, natomiast samodzielnie zmniejsza niedokrwienno-reperfuzyjne opóźlenie czynności skurczowej i rozkurczowej.