



***XXII Sympozjum
Sekcji Kardiologii Eksperymentalnej
Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego
oraz
Komitetu Nauk Fizjologicznych i
Farmakologicznych Polskiej Akademii Nauk***

Gdańsk, 26-28 październik 2017



KOMITET ORGANIZACYJNY:

R.T. Smoleński
E.M. Słomińska
B. Kutryb-Zajac
P. Żukowska
M. Toczek
M. Zabielska
I. Pelikant-Małecka
P. Jabłońska
A. Bulińska

Dane kontaktowe organizatorów: rt.smolenski@gmail.com, eslom@gumed.edu.pl

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY



Miejsce obrad:

Hotel Renusz

ul. Nadwiślańska 56, Wyspa Sobieszewska
80-680 Gdańsk
Tel: +48 58 308 07 86



Sponsorzy:

MERCK



kamush[®].com
LABORATORY PRODUCTS

ANIMA  LAB
wyposażenie zwierzętarni i laboratoriów • modele zwierzęce

Program

26.10.2017 godz. 18-21 (spotkanie i rejestracja)		
27.10.2017		
9.00 – 9.10	Otwarcie Sympozjum Prof. dr hab. Marcin Gruchała, Rektor GUMed	
	Sesja 1 – Przewodniczący: Prof. dr. hab. Andrzej Beręsewicz	
9.10 – 9.40	Nowoczesne narzędzia genetyki w kardiologii.	Maciej Borowiec
9.40 – 10.10	The aldosterone prothrombotic action as a result of genomic and nongenomic hormone effects on haemostasis.	A. Gromotowicz-Popławska, M. Aleksiejczuk, J. Szemraj, E. Chabielska
10.10 – 10.30	Wpływ leków przeciwplatektywnych z grupy inhibitorów receptora nukleotydowego P2Y ₁₂ na gojenie się uszkodzeń śródbłonna naczyniowego w modelu in vitro imitującym uraz po angioplastyce wieńcowej (PCI).	K. Korybalska, K. Karpiński, J. Grzelczak, N. Czepulis, J. Witowski
10.30 – 10.50	Antithrombotic potential of tormentil extract.	N. Marcińczyk, D. Jarmoc, A. Leszczyńska, A. Zakrzaska, K. Kramkowski, J. Strawa, A. Gromotowicz-Popławska, E. Chabielska, M. Tomczyk
10.50 -11.20	Przerwa kawowa	
	Sesja 2 – Przewodniczący: Prof dr hab. Ewa Chabielska	
11.20 – 11.50	Nowe trendy w kardiologii eksperymentalnej	Maciej Kurpisz
11.50 – 12.10	Wpływ twardości podłoża na zawartość kolagenu hodowli fibroblastów pobranych z przedsionków serca.	M. Gałdużyńska, A. Krzywińska, J. Drobnik
12.10 – 12.30	Wpływ wieku i płci na częstość występowania komorowych zaburzeń rytmu serca w szczurzym modelu ostrego niedokrwienia lewej komory.	M. Kępska, J. Bierła, A. Paterek, J. Kołodziejczyk, E. Czarnowska, M. Mączewski, U. Mackiewicz
12.30 – 12.50	Prewencja zjawisk artymogennych w pozawałowym sercu szczurzym.	A. Rugowska, M. Maczewski, U. Mackiewicz, K. Chojnacka, K. Bednarek-Rajewska, P. Majewski, N. Rozwadowska, M. Kurpisz
12.50 – 13.10	Wpływ zabiegu izolacji ujść żył płucnych metodą krioablacji balonowej na częstość nawrotów migotania przedsionków u osób z nieprawidłową masą ciała - obserwacje wstępne.	J. Budzianowski, K. Korybalska
13.10 – 14.20	Obiad	
	Sesja 3 Przewodniczący: Prof dr hab. Stefan Chłopicki	
14.20 – 14.40	Hartowanie na odległość ludzkiej mięśniówki serca.	M. Piekarska, M. Deja
14.40 – 15.00	The impact of <i>in vitro</i> cell culture duration on the maturation of human cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells of	J. Lewandowski, N. Rozwadowska, T.J. Kolanowski, A. Malcher, A. Zimna, A.

	myogenic origin.	Rugowska, M. Kurpisz
15.00 – 15.20	Influence of iron carboxymaltose on cardiomyocytes isolated from failing rat hearts.	A. Paterek, M. Kępska, J. Kołodziejczyk, U. Mackiewicz, M. Mączewski
15.20 – 15.40	The effect of spontaneous activity and ACE-I therapy on cardiac function and angiotensin profile in murine model of heart failure.	U. Tyrankiewicz, M. Olkowicz, T. Skórka, M. Jablonska, A. Orzylowska, A. Bar, M. Gonet, K. Jasinski, J.A. Zoladz, R.T. Smolenski, S. Chlopicki
15.40 – 16.00	Tissue-specific promoter based reporter systems for high-throughput screening of small molecules.	K. Fiedorowicz, A. Zimna, A. Malcher, K. Nowicka-Bauer, T.J. Kolanowski, N. Rozwadowska, M. Kurpisz
16.00 – 16.20	Effect of miR-195 inhibitor on the myoblasts properties from human skeletal muscle.	M. Nowaczyk, A. Malcher, A. Zimna, W. Łabędź, Ł. Kubaszewski, N. Rozwadowska, M. Kurpisz
16.20 – 16.40	Przerwa kawowa	
	Sesja 4. Przewodniczący: Prof. dr hab. Marek Deja	
16.40 – 17.00	Rola receptorów CB ₁ i GPR55 w czynności skurczowo-rozkurczowej izolowanych tętnic płucnych człowieka i szczura.	O. Karpińska, M. Baranowska-Kuczko, M. Kłoz, H. Kozłowska
17.00 – 17.20	Upośledzenie funkcji kanału BK _{Ca} w warunkach krótkotrwałej hiponatremii prowadzi do zniesienia rozkurczu tętnicy środkowej mózgu szczura w odpowiedzi na kwasicę.	M. Aleksandrowicz, E. Koźniewska
17.20 – 17.40	Analysis of cardiac mitochondrial function in genetic model of atherosclerosis.	A. Bulińska, I. Pelikant-Matecka, M. Zabielska, B. Kutryb-Zajac, RT. Smoleński, E. Słomińska
17.40 – 18.00	Identyfikacja elementów w sekwencji obrazów z mikroskopu konfokalnego.	M. Kaja, T. Buchner, M. Aleksiejczuk, A. Gromotowicz-Popławska, K. Kramkowski
18.00 – 19.00	Sesja posterowa	
19.00 - ...	Kolacja	
28.10.2017		
	Sesja 5/ Sesja Sekcji Puryn i Pirymidyn Polskiego Towarzystwa Biochemicznego . Przewodniczący: Prof. dr hab. Maciej Kurpisz	
9.00 – 9.20	Vascular adenosine deaminase in endothelial activation, inflammation and atherosclerosis.	B. Kutryb-Zajac, P. Zukowska, A. Jasztal, E. Sucajtys-Szulc, L. Mateuszuk, M. Ziebielska, M. Serocki, R. Bartoszewski, EM. Słomska, S. Chlopicki, RT. Smolenski
9.20 - 9.40	NAD metabolism alterations in Aortic Stenosis.	P. Jablonska, P. Zukowska, B. Kutryb - Zajac, R. Lango, J. Rogowski, RT. Smolenski, EM. Słomska
9.40 – 10.00	Myocardial injury and overload among amateur marathon runners as indicated by changes in cardiovascular biomarkers' concentrations.	E. Lewicka, AM. Kaleta, A. Dąbrowska-Kugacka, Z. Lewicka-Potocka, G. Raczak
10.00 – 10.20	Reactivity of isolated young porcine coronary	M. S. Majewski, A. Rynkiewicz

	arteries to cholinergic and adrenergic drugs.	W. Grzegorzewski, M. Gajęcka, M. Gajęcki
10.20 – 10.40	Cardiac mitochondria nucleotide pool and its role in post-ischemic adenosine production.	<u>M. A. Zabielska</u> , A. Bulinska, I. Pelikant- Malecka, E. M. Słomińska, R. T. Smolenski.
10.40 – 11.00	An altered nucleotide metabolism as a novel mechanism leading to Huntington disease related cardiomyopathy	<u>M. Toczek</u> , D. Zielonka, P. Zukowska, J.T. Marcinkowski, Barbara Kutryb-Zajac, E. Słominska, M. Isalan ^c , M. Mielcarek ,R. T. Smolenski
11.00 - 11.20	Multiomics platform for analysis of biological samples.	<u>L. Nowicki</u>
11.20-...	Zakończenie konferencji – nagroda za najlepsze wystąpienie ustne Kawa	

SESJA POSTEROWA

1	Acute aldosterone administration increases vascular permeability in rat skin.	M. Aleksiejczuk, A. Gromotowicz-Popławska, J. Dzieciol, E. Chabielska
2	Wpływ jednorazowego podania inhibitora rozkładu endokannabinoidów URB597 na układ krążenia u szczurów z nadciśnieniem DOCA-salt.	M. Toczek, E. Grzęda, K. Mińczuk, R. Kossakowski, B. Malinowska
3	Wpływ diety o wysokiej podaży NNKT i o niskim ŁG na profil lipidowy pacjentów z hipercholesterolemią rodzinną.	K. Mironiuk, Z. Kochan
4	Is plant-based diet beneficial for cardiovascular system?	P. Gogga, A. Śliwińska, E. Wrona, S. Małgorzewicz
5	Antithrombotic effect of HNO donors.	D. Jarmoc, A. Leszczyńska, N. Marcińczyk, P. Czajkowski, A. Sikora, K. Kramkowski
6	Antiplatelet effect of carvedilol in intravital real time laser-induced thrombosis in mice.	P. Czajkowski, N. Marcińczyk, D. Jarmoc, A. Leszczyńska, K. Kramkowski
7	The effect of CORM-A1, NaNO ₂ and indomethacin on mice breast cancer cells (4T1-iRFP) metastases formation in the liver and lungs.	A. Leszczynska, N. Marcinczyk, D. Jarmoc, P. Czajkowski, K. Kramkowski
8	Gut microbiota in hypertensive overweight and obese subjects	J. Karbowska, A. Janczy, Z. Kochan, Sylwia Małgorzewicz
9	Serum levels of vitamin D in relation to dietary intake and supplementation of vitamin D in patients with familial hypercholesterolaemia	N. Szupryczyńska, A. Wojda, M. Pajkowski, M. Lipiński, K. Chlebus, R. T. Smoleński, Z. Kochan
10	Ocena nawyków żywieniowych pacjentów z hipercholesterolemią rodzinną	A. Wojda, N. Szupryczyńska, M. Pajkowski, K. Chlebus, Z. Kochan

WYSTĄPIENIA USTNE

M. Borowiec

Katedra i Zakład Genetyki Klinicznej Uniwersytet Medyczny w Łodzi

email: Maciej.borowiec@umed.lodz.pl

Wykład obejmuje najnowsze doniesienia z zakresu diagnostyki chorób i zespołów kardiologicznych, w szerokim jej ujęciu identyfikując zarówno podłoże choroby jak i możliwości terapeutyczne. Problemy przedstawiane w wykładzie dotyczą genetycznego podłoża choroby. Możliwości identyfikacji, zakresu prowadzonej diagnostyki oraz jej celowości. Identyfikacja zmian oraz możliwości interpretacyjne uzyskanego wyniku lub „predykcyjne” (przewidujące, konsultacyjne) mające wpływ na postępowanie z pacjentem od strony diagnostycznej i terapeutycznej np. wpływ na dobór terapii lub weryfikuje (zmienia) już wdrożoną terapię u pacjenta jak i chorych członków rodziny.

Jednocześnie uzyskiwany wynik identyfikacji podłoża genetycznego w kolejnych etapach postępowania klinicznego – diagnostycznego w odniesieniu do pacjenta jak i jego rodziny mają duże znaczenie w poradnictwie genetycznym i prognostycznym, nie jednokrotnie drastycznie wpływając na podjęcie ważkich decyzji rodzinno prawnych.

Wykład ma na celu również przybliżenie problemu współczesnej genetyki i jej wykorzystania w laboratoriach specjalistycznych zarówno od strony diagnostycznej jak i naukowej oraz uwidocznienia problemu doboru odpowiednich narzędzi biologii molekularnej w identyfikacji problemu od strony „genetyki molekularnej”. Interpretacja wyniku, jego potwierdzenie i udokumentowanie stanowi na chwilę obecną również duży problem a przedstawienie go w formie czytelnej dla lekarza klinicysty, błędy takiego procesu również są poruszane w powyższym wykładzie. Zaprezentowane zostaną również przykładowe wyniki i interpretacja z zaznaczeniem problemów różnic fenotypowych obrazu klinicznego.

THE ALDOSTERONE PROTHROMBOTIC ACTION AS A RESULT OF GENOMIC AND NONGENOMIC HORMONE EFFECTS ON HAEMOSTASIS

A. Gromotowicz-Poplawska¹, M. Aleksiejczuk¹, J. Szemraj², E. Chabielska¹

¹*Department of Biopharmacy, Medical University of Białystok, Poland*

²*Department of Medical Biochemistry, Medical University of Łódź, Poland*

email: anna.gromotowicz@umb.edu.pl

Aim: A strong correlation between raised aldosterone (ALDO) level and increased risk of cardiovascular events associated with thrombotic disorders has been provided. Although, only few studies suggested that aldosterone may have a prothrombotic potential. Bearing in mind those limited data, we aimed to investigate a direct effect of aldosterone on thrombotic process and particular components of haemostasis. Moreover, we attempted to determine the mechanism of aldosterone action in haemostasis, thus we evaluated the role of mineralocorticoid receptor (MR), glucocorticoid receptor (GR), and angiotensin receptor (AT₁), as well as the involvement of genomic and nongenomic pathways in the hormone effects.

Methods: We performed experiments assessing the effect of acute ALDO administration in arterial and venous models of thrombosis in rats and mice, as well as chronic MR blockade in hypertensive and diabetic rats followed by thrombosis induction. The effect of hormone on platelets, coagulation, fibrinolysis, oxidative stress, nitric oxide (NO) and hemodynamic parameters was investigated. To evaluate the mechanism of ALDO action we used antagonists of MR – eplerenone (EPL), GR – RU-486 and AT₁ – valsartan (VAL). We applied different time of exposure to aldosterone and antagonists to distinguish the genomic and rapid, nongenomic effects of hormone.

Results: The results we obtained were consistent in all studied models of thrombosis, both in acute and chronic experiments. Acute ALDO administration increased thrombus mass and incidences of thrombosis. We observed platelet, coagulation and oxidative stress activation, fibrinolysis and NO impairment, and endothelial dysfunction after ALDO administration, without hemodynamic changes. Moreover, some of these effects occurred within minutes. The acute co-administration of EPL, RU-486 or VAL significantly, although only partially diminished ALDO-induced effects. The chronic MR blockade in hypertensive and diabetic rats showed antithrombotic effect correlated with favorable effects on haemostasis.

Conclusion: Our studies showed that the prothrombotic ALDO action is a result of complex hormone effect on haemostasis. The mechanism is mediated only partially via MR, GR and AT₁ receptors. Acute ALDO effects together with partial effectiveness of used ALDO antagonists may suggest the involvement of nongenomic pathway in the mechanism of ALDO prothrombotic action.

WPŁYW LEKÓW PRZECIWPŁYTKOWYCH Z GRUPY INHIBITORÓW RECEPTORA NUKLEOTYDOWEGO P2Y₁₂ NA GOJENIE SIĘ USZKODZEŃ ŚRÓDBŁONKA NACZYNIOWEGO W MODELU *IN VITRO* IMITUJĄCYM URAZ PO ANGIOPLASTYCE WIĘNCOWEJ (PCI).

K. Korybalska, K. Karpiński, J. Grzelczak, N. Czepulis, J. Witowski

Katedra i Zakład Patofizjologii, Poznański Uniwersytet Medyczny

email: koryb@ump.edu.pl

Wstęp: Przeszkórne interwencje wieńcowe (PCI- *percutaneous coronary intervention*) prowadzą do uszkodzeń śródbłonka naczyniowego, sprzyjając restenozie i zakrzepicy w stencie. Głównym celem kardiologicznych farmakoterapii jest redukcja powikłań sercowo-naczyniowych oraz poprawa funkcji śródbłonka. Leki przeciwplatekcyjne nowej generacji potencjalnie mogą oddziaływać nie tylko na płytki, ale również na inne komórki posiadające receptor nukleotydowy P2Y (komórki nabłonkowe, nowotworowe, śródbłonek, miocyty itp.). Znaczna część wyników dokumentujących korzystny wpływ tej grupy leków, pochodzi z badań klinicznych. Mniej wiemy o ich bezpośrednim wpływie na śródbłonek w warunkach izolowanych, jakim jest hodowla komórkowa.

Celem naszego projektu jest ocena wpływu inhibitorów płytkowego receptora P2Y₁₂ na proces regeneracji śródbłonka w modelu *in vitro*, który imituje uraz po PCI.

Metodyka: Badania przeprowadzono na komórkach śródbłonka HUVEC linii EA.hy926. Komórki inkubowano 24 h w standardowym medium hodowlanym (M199) z wymaganymi suplementami i w obecności leków przeciwplatekcyjnych, w maksymalnych stężeniach wykrywanych we krwi podczas standardowej terapii, dawkami nasycającymi (N) i podtrzymującymi (P) (Ticagrelor - N: 2 µM, P: 1 µM, Prasugrel - N: 2 µM, P: 0,3 µM, Kłopidogrel N: 0,4 µM, P: 0,04 µM). Regenerację po uszkodzeniu przez zadrażnienie monitorowano za pomocą mikroskopii time-lapse i analizy morfometrycznej. Wyniki przedstawiono, jako procent zagojenia rany po 12 h oraz czasu potrzebny do zagojenia rany (średnia ± SD, n= 8 eksperymentów).

Wyniki przedstawia poniższa tabela

	Kontrola	Ticagrelor	Prasugrel	Klopidogrel
% Regeneracji po 24 h				
Dawka nasycająca (N)	95±7	97±3	90±8	93±12
Dawka podtrzymująca (P)		84±13	91±9	91±11
Czas potrzebny do regeneracji, h				
Dawka nasycająca (N)	10,6±3,5	10,2±1,9	11,2±2,0	10,2±2,4
Dawka podtrzymująca (P)		12,9±2,5	11,1±2,9	11,8±2,9

Wnioski. Leki przeciwplatekcyjne z grupy inhibitorów receptora nukleotydowego P2Y₁₂ w stężeniach wykrywanych we krwi podczas standardowej terapii, dawkami nasycającymi i podtrzymującymi, nie zaburzają gojenia się komórek śródbłonka naczyniowego w modelu *in vitro*.

ANTITHROMBOTIC POTENTIAL OF TORMENTIL EXTRACT

N. Marcińczyk¹, D. Jarmoc¹, A. Leszczyńska¹, A. Zakrzewska², K. Kramkowski¹, J. Strawa³, A. Gromotowicz-Popławska¹, E. Chabielska¹, M. Tomczyk³

¹Department of Biopharmacy, Medical University of Białystok, Białystok, Poland ²Department of Biotechnology, School of Medical Science, Białystok, Poland ³Department of Pharmacognosy, Medical University of Białystok, Białystok, Poland

email: nataliamarcinczyk@gmail.com

Aim: The aim of the study was to evaluate the effect of tormentil extract on haemostasis.

Methods: The LC-ESI-MS analysis of obtained extract was performed. Lyophilized tormentil extract was administrated for two weeks to rats in doses of: 100, 200 and 400 mg/kg. The effect of tormentil extract on thrombosis was evaluated in a rat model of electrical-induced thrombosis with blood flow monitoring to estimate the time to carotid artery occlusion. The influence of tormentil extract on platelet activity was assessed *in vivo* with bleeding time test and *ex vivo* in whole blood using collagen-induced aggregation assay as well as dynamic generation of thromboxane test. To evaluate the effect on coagulation system the fibrin generation test was performed and blood coagulation parameters were determined. Parameters of fibrinolysis (t-PA: total concentration and activity, PAI-1: total concentration and activity) as well as bradykinin concentration were assessed with ELISA kits. Furthermore the blood pressure was measured directly in the rat carotid artery. The influence on irreversible platelet activation was assessed intravitaly with confocal microscopy system in ferric chloride induced model of thrombosis in the mouse mesentery vein after two days of tormentil extract administration. The counting of blood cells was based on the volumetric impedance method.

Results: Tormentil extract (400 mg/kg) significantly reduced thrombus weight (0.68 ± 0.05 mg vs VEH 0.98 ± 0.07 mg, $p < 0.01$), shortened time to carotid artery occlusion (16.67 ± 0.19 min vs VEH 12.05 ± 0.71 min, $p < 0.01$) and bleeding time ($96 (85;118)$ s vs VEH $79.5 (73;94)$ s, $p < 0.05$) without hemodynamic changes. Tormentil extract did not affect the collagen-induced aggregation but decreased thromboxane generation in platelets ($54.30 (34.90;92.15)$ pg/mL vs VEH $97.75 (71.08;123.40)$ pg/mL, $p < 0.01$). The activity of t-PA ($0.32 (0.29;0.56)$ ng/mL vs VEH $0.48 (0.43;0.55)$ ng/mL, $p < 0.05$) as well as bradykinin concentration (5299 ± 507 pg/ml vs VEH 10743 ± 1120 pg/ml, $p < 0.01$) were reduced after tormentil extract treatment while PAI-1 total concentration and PAI-1 activity remained unchanged. Tormentil extract enhanced fibrin generation (9.44 ± 0.91 min vs VEH 14.01 ± 1.54 min, $p < 0.01$) but did not influence the blood coagulation parameters and the blood cell count. Area of irreversible activated platelets was decreased ($21591 (15195;25531)$ mm² vs VEH $52765 (43900;89544)$ mm², $p < 0.01$) after two days of treatment.

Conclusions: Tormentil extract exerts antithrombotic action mainly due to the platelet inhibition however its influence on endothelial function needs to be evaluated.

S2.2

MYOCARDIAL INJURY AND OVERLOAD AMONG AMATEUR MARATHON RUNNERS AS INDICATED BY CHANGES IN CARDIOVASCULAR BIOMARKERS' CONCENTRATIONS

E. Lewicka¹, A. M. Kaleta¹, A. Dąbrowska-Kugacka¹, Z. Lewicka-Potocka², G. Raczak¹

¹Department of Cardiology and Cardiac Electrotherapy, Medical University of Gdańsk, Gdańsk, Poland, ²First Department of Cardiology, Medical University of Gdańsk, Gdańsk, Poland.

email: ania.m.kaleta@gmail.com

Aim: The question whether intensive bouts of exercise elicit long-term harmful effect on the cardiovascular system still remains without unambiguous answer. Analysis of the influence of intensive exercise on concentrations and kinetics of cardiac injury and stress biomarkers may bring new insight into this issue. The present study is the first one to investigate the effect of a marathon run on hs-cTnI, H-FABP, NT pro-ANP, BNP, GDF-15 and Galectin-3 concentrations in male amateur runners.

Methods and Results: Two-three weeks prior to marathon (S1), on the finish line (S2) and 2-3 weeks after the marathon (S3) blood samples from 35 participants (aged 39±8 years) were collected in order to analyze biomarkers, hematological and biochemical parameters.

Concentrations of all investigated biomarkers were significantly higher at S2. The greatest rise was observed for hs-cTnI and H-FABP (by 500% and 511% respectively). At S3, all biomarkers' concentrations returned to the baseline values. Absolute values of hematological and biochemical parameters showed a stable trend.

Conclusions: Marathon run causes an acute rise in cardiac biomarkers, which returns to baseline values after 2-3 weeks. Bouts of intensive exercise provoke cardiac injury and overload, which may elicit long-term deleterious cardiovascular effects.

WPŁYW WIEKU I PŁCI NA CZĘSTOŚĆ WYSTĘPOWANIA KOMOROWYCH ZABURZEŃ RYTMU SERCA W SZCZURZYM MODELU OSTREGO NIEDOKRWIENIA LEWEJ KOMORY

M. Kępska¹, J. Biełta², A. Paterek¹, J. Kołodziejczyk¹, E. Czarnowska², M. Mączewski¹, U. Mackiewicz¹

¹Zakład Fizjologii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa, Polska, ²Zakład Patologii, Instytut Pomnik - Centrum Zdrowia Dziecka, Warszawa, Polska

email: marta.kepska@cmkp.edu.pl

Wstęp: Mechanizm arytmii występujących podczas ostrego niedokrwienia mięśnia sercowego jest złożony i nadal słabo poznany. Biorą w nim udział zaburzenia wewnątrzkomórkowego obiegu Ca^{2+} , dyspersja czasu trwania potencjałów czynnościowych w mięśniu sercowym, zaburzenia przewodnictwa międzykomórkowego oraz stopień zwłóknienia mięśnia sercowego istniejący w momencie niedokrwienia. Nieliczne badania wskazują, że wymienione czynniki są zróżnicowane w zależności od płci i wieku, co może sugerować odmienną podatność na arytmie podczas ostrego epizodu wieńcowego i odmienny ich mechanizm.

Cel: Zbadanie czy częstość występowania arytmii podczas ostrego niedokrwienia mięśnia sercowego jest zależna od płci i wieku oraz wskazanie mechanizmów potencjalnych różnic. **Metody:** W trzech grupach wiekowych szczurów obu płci (2 miesiące, 18 miesięcy oraz 26-28 miesięcy) wykonano operację podwiązania gałęzi przedniej zstępującej lewej tętnicy wieńcowej (Zawał) lub wykonano operację pozorowaną (Sham). Przez 6 godzin po operacji zdalnie rejestrowano zapis EKG metodą telemetryczną. Zapisy poddano analizie uwzględniając liczbę wczesnych i późnych dodatkowych pobudzeń komorowych, liczbę i sumaryczny czas trwania epizodów częstoskurczu komorowego i migotania komór. Stosując pięciostopniową skalę oceny incydentów arytmicznych oszacowano ryzyko wystąpienia arytmii. Po upływie 6 godzin od operacji pobierano serca w celu izolacji kardiomiocytów i oceny stopnia zwłóknienia mięśnia sercowego. W izolowanych kardiomiocytach oceniano kurczliwość i parametry wewnątrzkomórkowego obiegu Ca^{2+} .

Wyniki: Największą liczbę wczesnych i późnych pobudzeń dodatkowych oraz epizodów częstoskurczu komorowego i migotania komór odnotowano u samców w najstarszej i średniej grupie wiekowej. Również czas trwania incydentów arytmicznych były w tych grupach najdłuższy. Całkowite ryzyko wystąpienia arytmii było istotnie statystycznie wyższe w tych grupach w porównaniu do samic po zawale i samców operowanych pozornie. W przypadku samic liczba incydentów arytmicznych i czas ich trwania były wyższe po zawale niż po operacji pozorowanej, ale różnice nie osiągnęły istotności statystycznej. U samic liczba i czas trwania epizodów arytmicznych nie były istotnie zależne od wieku. Włóknienie mięśnia sercowego rosło wraz z wiekiem u obu płci. Jednak u zwierząt najstarszych i w wieku średnim było istotnie statystycznie wyższe u samców niż u samic. Nie stwierdziliśmy różnic w stopniu zwłóknienia serca między młodymi samcami i samicami. Amplituda sygnału Ca^{2+} nie różniła się istotnie statystycznie u samic i samców po zawale we wszystkich grupach wiekowych, natomiast szybkość opadania sygnału Ca^{2+} była wolniejsza u samców niż u samic i u samców malała z wiekiem.

Wnioski: Uzyskane wyniki jednoznacznie pokazują, że ryzyko wystąpienia zagrażających życiu arytmii w szczurzym modelu ostrego niedokrwienia lewej komory jest wyższe u samców niż u samic oraz, że ryzyko arytmiczne u samców rośnie z wiekiem. Może to wynikać z większego stopnia zwłóknienia mięśnia sercowego i bardziej nasilonych zaburzeń obiegu jonów Ca^{2+} .

PREWENCJA ZJAWISK ARYTMOGENNYCH W POZAWAŁOWYM SERCU SZCZURZYM

Rugowska A.¹, Maczewski M.², Mackiewicz U.², Chojnacka K.³, Bednarek-Rajewska K.⁴, Majewski P.⁴, Rozwadowska N.¹, Kurpisz M.¹

¹Instytut Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk, ²Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa, ³Zakład Patomorfologii Klinicznej, Szpital Kliniczny im. H. Święcickiego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego, Poznań, ⁴Katedra Patomorfologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego, Poznań

email: anna.rugowska@igcz.poznan.pl

Wstęp: Zjawiska arytmogenne to zaburzenia pracy serca polegające na jego przyspieszeniu, zwolnieniu lub nieregularności rytmu. Arytmia, jako następstwo choroby niedokrwiennej serca jest nierzadko związana z poważnymi konsekwencjami zagrażającymi życiu człowieka. Dotychczasowe próby przywrócenia prawidłowej pracy pozawałowego mięśnia sercowego przez przeszczep komórek mięśni szkieletowych – mioblastów, wykazały, że są one głównym źródłem arytmii ze względu na ich niepełną synchronizację elektrofizjologiczną jak i strukturalną z kardiomiocytami biorczymi. Powodem tego zjawiska jest brak ekspresji białka koneksyny 43 odpowiedzialnego za połączenia szczelinowe (ang. *gap junctions*).

Cel: Celem badań była ocena skuteczności prewencji zjawisk arytmogennych transplantowanych mioblastów wykazujących nadekspresję koneksyny 43 w pozawałowym sercu szczurów laboratoryjnych Wistar.

Metody: Molekularne badania *ex vivo* zostały wykonane na eksplantowanych pozawałowych sercach modelu szczura Wistar pochodzących z trzech grup doświadczalnych: MI+MbCx43, MI+MbWT, MI+0,9%NaCl.

Przeprowadzono analizę ekspresji grupy genów i białek odpowiedzialnych za pobudzenia dodatkowe serca oraz przebudowę komorową (*kcnq1*, *cacna1c*, *ncx1*, *serca2a*, *gata4*, *tgfb1*) we wszystkich grupach szczurów z odpowiednimi interwencjami: (MI+MbCx43, MI+MbWT, MI+0,9% NaCl) po 42 dniach od wywołanego MI.

Wyniki i Wnioski: Badania molekularne *ex vivo* potwierdziły otrzymane wcześniej wyniki z przeprowadzonych doświadczeń *in vivo* na modelu szczurzym. Dokładna analiza ekspresji białek techniką Western blot sprecyzowała, że MbCx43 zmieniają ilość kanałów błonowych w sercu *kcnq1* ($p<0,05$), *cacna1c* ($p<0,05$), *ncx1* ($p<0,001$) w porównaniu z mioblastami 'natywnymi' (MbWT).

Badania wykazały, że terapia pozawałowego mięśnia sercowego mioblastami z nadekspresją koneksyny 43 (MbCx43) w modelu szczurzym, jest skuteczną metodą zmniejszania pobudzeń dodatkowych serca. Ponadto, genetycznie modyfikowane komórki powodują także wzrost ekspresji białka serca2a względem grup: MI+MbWT ($p=0,004$), MI+0.9%NaCl ($p=0,0024$), co jest dobrym dowodem skuteczności zastosowanej terapii naprawy uszkodzonego miokardium.

Finansowanie z Narodowego Centrum Nauki, grant numer: Preludium 2012/07/N/NZ4/02117 oraz z Narodowego Centrum Badań i Rozwoju, grant numer: StrategMed 1/233624/5/NCBR/2014

WPŁYW ZABIEGU IZOLACJI UJŚĆ ŻYŁ PŁUCNYCH METODĄ KRIOABLACJI BALONOWEJ NA CZĘSTOŚĆ NAWROTÓW MIGOTANIA PRZEDSIONKÓW U OSÓB Z NIEPRAWIDŁOWĄ MASĄ CIAŁA - OBSERWACJE WSTĘPNE.

J. Budzianowski¹, K. Korybalska²

¹ Oddział Kardiologiczny, Wielospecjalistyczny Szpital Nowa Sól, Polska ² Katedra i Zakład Patofizjologii, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, Polska

email: jan.budzianowski@gmail.com

Wstęp: Izolacja ujść żył płucnych metodą krioablacji balonowej jest uznaną metodą leczenia pacjentów z migotaniem przedsionków. Stan zapalny, uszkodzenie śródbłonna stanowią kluczowe czynniki prowadzące do nawrotów arytmii po zabiegu krioablacji. Podwyższony BMI jest uznanym czynnikiem ryzyka migotania przedsionków niekorzystnie wpływającym na wyniki zabiegu.

Cel: Ocena wybranych parametrów stanu zapalnego, uszkodzenia kardiomiocytów, oraz parametrów hemostazy u kobiet i mężczyzn z nieprawidłową masą ciała, u których pojawiły się wczesne (do 3 miesięcy) nawroty migotania przedsionków (AF) po zabiegu krioablacji.

Metody: Do badania przystąpiło 99 pacjentów z BMI>25 (35% kobiet) z napadowym i przetrwałym AF, skierowanych na zabieg izolacji ujść żył płucnych metodą krioablacji balonowej. Stężenie CRP, Troponiny T (TnT), izoenzymu kinazy kreatynowej (CK-MB), fibrynogenu i D- dimerów oceniano przed zabiegiem i 24 h po zabiegu. Nawroty AF oceniono po 3 miesiącach po zabiegu za pomocą 24 godzinnego monitorowania Holter-EKG.

Wyniki: Przedstawione są w tabeli 1.

	Kobiety (n = 34)		Mężczyźni (n = 65)	
Wiek, lata	63±7,2		62,4±7,9	
BMI	35,2±5,3		30,9±3,7	
n (%)	AF, 5 (15)	Bez AF, 29 (85)	AF, 12 (18)	Bez AF, 53 (82)
LA (ml)	93,5±38,66	100,7±29,11	116,0±45,9	90,6±35,0*
CRP, delta	+0,66±0,44	+0,63±0,53	+0,80±0,71	+0,72±0,71
TnT, delta	+0,601±0,13	+0,97±0,32**	+0,80±0,37	+1,0±0,50
CK-MB, delta	+14,4±9,8	+21,6±16,3	+10,3±12,5	+21,8±17,2**
D-Dimer, delta	+0,74±1,4	+0,18±0,74	+0,10±0,33	+0,09±0,33
Fibrynogen, delta	-55,4±59,7*	-23,1±44,0*	35,2±58,5	-2,3±52,1*

AF – migotanie przedsionków, LA – lewy przedsionek, delta – różnica przed/po ablacji; * istotność: AF vs. bez AF; **istotność: K vs. M (z AF i bez AF)

Wnioski:

1. Pacjenci bez nawrotów AF charakteryzują się większym uszkodzeniem kardiomiocytów po zabiegu w porównaniu do osób z nawrotami AF.
2. Fibrynogen to jedyny, z obecnie przebadanych parametrów, którego trend zmian po zabiegu jest inny u kobiet i inny u mężczyzn.

HARTOWANIE NA ODLEGŁOŚĆ LUDZKIEJ MIĘŚNIOWKI SERCA

M. Piekarska, M. Deja

Klinika Kardiologii, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Katowice, Polska

email: magdalucynapiekarska@gmail.com

Cel: Celem niniejszej pracy jest określenie czy ludzka mięśnówka serca może być hartowana na odległość. W serii eksperymentów zwierzęcych wykazano, że krótkotrwałe niedokrwienie szeregu tkanek, wywołuje efekt ogólnoustrojowy chroniący przed następowym urazem niedokrwienno-reperfuzyjnym. W piśmiennictwie brak jest doświadczeń *in vitro* dowodzących, że po zastosowaniu protokołu hartowania na odległość ludzka mięśnówka serca wykazuje większą oporność na szkodę niedokrwienno-reperfuzyjną. Do dnia dzisiejszego powstało kilka prac badających wpływ zjawiska hartowania na odległość na funkcję narządów u ludzi; większość z ograniczoną ilością badanych, a ich wyniki pozostają ze sobą w sprzeczności.

Metody: Do badania włączono 120 pacjentów przyjętych do planowej operacji pomostowania aortalno-wieńcowego w krążeniu pozaustrojowym (CABG), którzy wymagali co najmniej 3 pomostów aortalno-wieńcowych. Pacjenci metodą randomizacji byli przydzielani do grupy badanej lub grupy kontrolnej. W dniu operacji, po indukcji znieczulenia, przed nacięciem skóry, przeprowadzany był protokół hartowania, który polegał na 3-krotnym napełnieniu mankietu do ciśnienia umieszczonego na prawym ramieniu do 200 mmHg na okres 5 minut z 5 minutową przerwą. W grupie kontrolnej na kończynę górną zakładano mankiety do pomiaru ciśnienia, ale nie były one napełniane. W trakcie zabiegu przy kaniulacji prawego przedsionka pobierany był fragment uszka prawego przedsionka oraz wykonywano biopsję mięśnia lewej komory serca. W badaniu oceniano: (1) oporność na szkodę niedokrwienno-reperfuzyjną mięśnówki serca *in-vitro*, ocenianą w modelu czynnościowym izolowanej beleczki uszka przedsionka prawego; (2) indukcję apoptozy i stan mitochondriów w mięśnówce uszka przedsionka prawego poddanego protokołowi symulowanego niedokrwienia i reperfuzji *in-vitro* – oceniany przy użyciu metody Western Blot, immunohistochemicznej i TUNEL; (3) wielkość martwicy mięśnia sercowego *in-vivo* w okresie pooperacyjnym ocenianą za pomocą profilu stężenia troponiny T oraz CK-MB w surowicy krwi; (4) czynność skurczową mięśnia sercowego w okresie pooperacyjnym ocenianą za pomocą metody termodilucji oraz na podstawie zapotrzebowania na leki inotropowe oraz wazokonstrykcyjne, (5) indukcję apoptozy w mięśniu sercowym w następstwie operacji kardiologicznej, ocenianą w biopsjach mięśnia lewej komory serca – przy użyciu metody Western Blot, immunohistochemicznej. Po zakończeniu doświadczenia wyniki uzyskane od każdego pacjenta były korelowane: z badaniami klinicznymi, z analizą materiału biopsyjnego mięśnia sercowego oraz analizą beleczek uszka prawego przedsionka.

Wyniki: W trakcie opracowywania.

Wnioski: Potwierdzenie możliwości hartowania na odległość ludzkiej mięśnówki może stanowić punkt odniesienia dla wszystkich dalszych prób klinicznego zastosowania tego zjawiska. Wykazanie braku efektu hartującego może podważyć sensowność prób klinicznego stosowania hartowania na odległość.

THE IMPACT OF IN VITRO CELL CULTURE DURATION ON THE MATURATION OF HUMAN CARDIOMYOCYTES DERIVED FROM INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS OF MYOGENIC ORIGIN

J. Lewandowski, N. Rozwadowska, T. J. Kolanowski, A. Malcher, A. Zimna, A. Rugowska, M. Kurpisz

Institute of Human Genetics, Polish Academy of Sciences, Poznan, Poland

email: e-mail: maciej.kurpisz@igcz.poznan.pl

Introduction: Failing heart needs new therapeutic approach for prevention its further remodeling and hemodynamic capacity. Stem cells might be one of the possibilities due to currently developing stem cells therapies originating through iPSC technology (individually-tailored pluripotent stem cell induction) and then differentiation into virtually unlimited source of cardiomyocytes

Aim of the study: differentiating cardiomyocytes from an individual through iPSC cell technology might not present adequate stage of maturation due to in vitro technology. In normal conditions cardiomyocytes maturation takes place years instead of days. Search for optimal time interval of in vitro culture is at present pursued to find optimal timing for its in vivo application as replacement of structural heart elements

Material and Methods: human myoblasts have been induced to pluripotency by using Sendai virus vector with classical Yanamaka genes. Routine check for pluripotency has been performed and further differentiation carried out using Cardiomyocyte Differentiation Kit to obtain human myoblast-derived/iPSC induced and in vitro matured cardiomyocytes of individual. Two stages of in vitro maturation have been established for 20 and 40 days of in vitro cultures. Morphological observation of cells and mitochondria, protein markers, intracellular calcium turnover, presence of MHC isoform switch as well as troponin I isoform transition have been performed

Conclusions: Stage of 40 days of in vitro maturation seemed to better mimic original cardiomyocyte characteristics in term of sarcomere structure, progressive cellular hypertrophy, development of mitochondria, better contractile performance, elevation of CX43 gene expression, upregulated MHC beta expression and troponin I transition. At present stage there is no singular biomarker for further optimization of cardiomyocyte in vitro maturation

The project supported by the National Centre for Research and Development, Poland; grant number: StrategMed1/233624/5/NCBR/2014

INFLUENCE OF IRON CARBOXYMALTOSE ON CARDIOMYOCYTES ISOLATED FROM FAILING RAT HEARTS

A. Paterek, M. Kępska, J. Kołodziejczyk, U. Mackiewicz, M. Mączewski

Department of Clinical Physiology, Centre of Postgraduate Medical Education, Warsaw, Poland

email: apaterek@cmkp.edu.pl

Aim: The aim of this study was to assess the effect of 4-week intravenous iron supplementation on calcium handling and contractility of cardiomyocytes isolated from post-MI chronic HF rat hearts.

Methods: Rats underwent left anterior descending coronary artery ligation to induce post-myocardial infarction heart failure (HF) or sham operation (Sham). At 4 weeks after surgery animals underwent echocardiographic imaging and only rats with infarcted area $\geq 40\%$ were enrolled in the study. Animals were randomized to one of two subgroups (1) receiving ferric carboxymaltose (FCM, 10 mg/kg body weight, 0.5 ml), 4 weekly injections, (n=10) or (2) receiving saline (n=10). Eight weeks after surgery rats underwent left ventricular catheterization. Subsequently, hearts were excised for cellular studies.

Results: In cardiomyocytes isolated from HF rats amplitude of electrically evoked Ca^{2+} transient increased by about 12%. The rate of Ca^{2+} transient decay was reduced (by $\sim 11\%$) as a result of decreased rate of Ca^{2+} transport by SERCA, NCX and PMCA. We also observed trend towards decreased SR Ca^{2+} content. FCM supplementation prevented abnormalities of Ca^{2+} handling after MI. MI-induced changes of handling parameters in HF+Fe group as compared to Sh+Fe group was not observed.

Cell shortening was recorded in cardiomyocytes stimulated at 1Hz (basal condition) and at 4Hz (more physiological rate for rats). Increased amplitude of cell shortening in HF cardiomyocytes was accompanied by prolongation of contraction and relaxation duration. In HF cardiomyocytes paced at 1Hz, average rate of contraction and relaxation phases was unchanged, while maximal rates were increased. At 4Hz both maximal and average rates of contraction and relaxation was increased. FCM intake had no effect on amplitude or time-course of both contraction and relaxation processes in HF rats. Additionally under basal conditions maximal and average rates of contraction and relaxation were not changed, while at 4 Hz were lower under FCM supplementation. However, it did not result in prolongation of contraction relaxation cycle due to trend toward lower amplitude of cell shortening in HF+Fe group. On the other hand, in Sh rats the time to peak and time to relaxation was longer in iron supplemented than in received saline rats.

Conclusions: Intravenous administration of FCM in the post-MI HF resulted in some mild beneficial effects on cardiomyocytes - prevented impairment of Ca^{2+} handling proteins. Furthermore, such FCM therapy was safe both for Sh and HF rats, i.e. did not cause any cellular abnormalities. This is of particular importance since heart is an organ that is particularly defenseless against iron overload and suffers greatly in all forms of iron overload.

This work was supported by grant from National Science Centre (2015/17/B/NZ5/00292)

THE EFFECT OF SPONTANEOUS ACTIVITY AND ACE-I THERAPY ON CARDIAC FUNCTION AND ANGIOTENSIN PROFILE IN MURINE MODEL OF HEART FAILURE

U. Tyrankiewicz¹, M. Olkowicz^{2,3}, T. Skórka⁴, M. Jablonska⁴, A. Orzylowska⁴, A. Bar¹, M. Gonet⁴, K. Jasinski⁴, J.A. Zoladz⁵, R.T. Smolenski², S. Chlopicki^{1,6}

¹Jagiellonian Centre for Experimental Therapeutics (JCET), Jagiellonian University, Krakow, Poland; ²Department of Biochemistry, Medical University of Gdansk, Gdansk, Poland, ³Department of Biotechnology, Poznan University of Life Sciences, Poznan, Poland, ⁴Department of Magnetic Resonance Imaging, Institute of Nuclear Physics Polish Academy of Sciences, PL-31342 Krakow, Poland; ⁵Department of Muscle Physiology, Chair of Physiology and Biochemistry, Faculty of Rehabilitation, University School of Physical Education, Krakow, Poland, ⁶Chair of Pharmacology, Jagiellonian University Medical College, Krakow, Poland

email: urszula.tyrankiewicz@jcet.eu

Aim: Angiotensin converting enzyme inhibition as well as physical activity have cardioprotective effects, however whether they could act synergistically in course of heart failure (HF) it is still not known. The aim of this work was to analyze the effects of spontaneous physical activity combined or not with ACE-I treatment on cardiac function in Tgαq*44 mice.

Methods: Tgαq*44 mice at the end stage of HF were running spontaneously in spinning wheel, treated with ACE inhibitor (perindopril, 10 mg/kg), or both. Sedentary Tgαq*44 mice at the same age constitute a control group for exercised and treated mice and FVB (healthy controls) served for comparison. Spontaneous running was also applied to the mice at the early stage of HF. After two months all mice were anesthetized, their cardiac performance was assessed by *in vivo* MRI (BioSpec® 9.4 T, Bruker, Germany) and tissue samples were taken for angiotensin profile characterization.

Results: Time spending in spinning wheel not differ between groups, but FVB mice run longer distance and all running groups run faster after 2 months of experiment. At the early stage of HF spontaneous exercise improved cardiac performance (increasing SV, CO, CI). At the end- stage of HF, two months of physical exercise has no influence on cardiac function, but ACE-I treatment preserved inotropic reserve. On the other hand, at the end-stage of HF physical activity improved ACE/ACE 2 balance, as evidenced by increased concentration of plasma alamandine, ang-(1-7), ang-(1-9) and ang-(1-10), and decreased concentration of ang II and ang III. That beneficial effects on ACE 2 pathway was most pronounced in group with combined therapy. Mice treated ACE-I and combined therapy had additionally increased levels of ang-(1-12), ang-(1-10), ang-(1-7), ang-(1-9), and (together with exercised group) decreased concentration of ang II, ang III and decreased ang A in aorta.

Conclusions: Physical activity improved HF at the early, but not at the end-stage of HF. Physical exercise-activated ACE-2 axis and inhibited ACE, thus improved ACE/ACE2 balance in particular in the presence of ACE-I treatment.

TISSUE-SPECIFIC PROMOTER BASED REPORTER SYSTEMS FOR HIGH-THROUGHPUT SCREENING OF SMALL MOLECULES

K. Fiedorowicz, A. Zimna, A. Malcher, K. Nowicka-Bauer, T.J. Kolanowski, N. Rozwadowska, M. Kurpisz

Institute of Human Genetics, Polish Academy of Sciences, Poznan, Poland

email: katarzyna.fiedorowicz@igcz.poznan.pl

Introduction: Heart failure has been a major cause of mortality worldwide. Since heart is not able to regenerate itself, one of the promising strategies is the transplantation of iPS derived cardiomyocytes into the damaged tissue. However, viral based reprogramming approaches used to obtain iPS cells face problems with efficiency, safety and ethical issues. Therefore, the promising solution seems to be an application of small chemical molecules that are highly stable, pure, cost-effective and easy to apply, but so far, this approach has not been successfully used to reprogram human somatic cells. The method universally used to select small molecules from large collections is High Throuhput Screening (HTS).

Aim of study: As the success of positive hits in HTS as it strongly relies on sensitive detection, the first goal of our project was to create highly responsive promoter reporter systems that allows monitoring of reprogramming to as well as differentiation of iPS cells to cardiomyocytes.

Materials and methods: Using lentiviral based technology SoxSRR2-luc-T2A-mcherry reporter was introduced to myoblast cells. In order to verify intensity of luminescent and fluorescent signals, the reprogramming using OSKM lentiviral system was performed. The increase in luciferase was observed already three days after reprogramming initiation. The change in cells morphology, significantly increased luciferase and RFP fluorescent signal which was clearly visible at 7 days after induction. Using the same technology, iPS cells were transduced with lentiviruses carrying ACTC-mcherry and TNNT2-luc-puro-cmv-GFP reporters. The stable and homogeneous iPS GFP cell line was established and differentiated using commercially available protocol. The positive signal from ACTC promoter activation (marker of early stage differentiation) was detected after 10 days from the beginning of procedure. The luminescent signal was observed when TNNT2 expression increased in more mature, beating cardiomyocytes.

Conclusions: Modified myoblasts and iPS cells will be used by fully automated system to screen library of small molecules. The results of the project are expected to provide optimized protocols using small molecules for heart regenerative therapy.

The project is supported by the National Centre for Research and Development, Poland; grant number: STRATEGMED1/233624/5/NCBR/2014.

EFFECT OF MIR-195 INHIBITOR ON THE MYOBLASTS PROPERTIES FROM HUMAN SKELETAL MUSCLE

M. Nowaczyk¹, A. Malcher¹, A. Zimna¹, W. Łabędź², Ł. Kubaszewski², N. Rozwadowska¹, M. Kurpisz¹

¹Institute of Human Genetics, Polish Academy of Sciences, Poznan, Poland ²Department of Orthopedics and Traumatology, W. Dega University Hospital, University of Medical Sciences, Poznan, Poland

email: magdalena.przybyl@igcz.poznan.pl

Introduction: Over the past 15 years, stem cell therapy has attracted considerable interest. There is a consensus that the injection or tissue-based implantation of various stem/precursor cell types (such as myoblasts, mesenchymal cells or induced pluripotent stem cells- iPS) may exert some therapeutic effects. There is a lot of ways to modify the cells for heart regeneration, one of those could be inhibition of some microRNAs, of which expression has been previously reported as a negative factor in myogenesis. Significant evidence has been accumulated in the last few years, showing a fundamental role for miRNAs in the onset of many diseases. In our study we attempted to suppress the miR-195 activity, which is activated in multiple diseases, such as heart failure, cancer or schizophrenia. The miR-195 regulates a plethora of target proteins, which are involved in the cell cycle, proliferation, apoptosis.

Aim of study: The aim of the study was to examine anti-apoptotic and anti-aging effects in *in vitro* cultured skeletal muscles and to improve their ability to form myotubes by suppressing miR-195 expression. We investigated the potential application of circulating miR-195 inhibitor as helping factor in myocardial regeneration studied *in vitro* with help of human myoblasts.

Materials and Methods: Myoblast samples were studied as: non treated 'native' population (WT), population lipofected using oligonucleotide miRNA inhibitor (FAM) and miR-195-treated myoblasts. We examined purity of myoblast population using CD56 marker, fusion index, level of apoptosis, and expression of anti-apoptotic, anti-aging and myogenic genes.

The CD56 myoblast marker was evaluated and was present at about 90% of cells in all analyzed cell populations. Level of apoptosis was lower in miR-195 treated myoblasts compared with FAM inhibitor alone group ($p < 0.001$). Myotubes formation was observed at almost 2-fold higher in the miR-195 treated myoblasts ($p < 0.05$). Possibility of reversal of cell senescence by applied miR-195 inhibitor was observed: decrease the SA- β -galactosidase activity in inh-miR195 group compared to the FAM group ($p < 0.001$). Inhibition of miR-195 caused an increase of expression of anti-apoptotic genes: such as *SOD3*, *FOXO* ($p < 0.05$) and decrease of *SOD1* and *SOD2* ($p < 0.05$).

Conclusions: Thus we have shown the possible application of circulating miR-195 inhibitor as potential factor for myocardial regeneration by using human skeletal myoblasts, that could be a strategy for pre-conditioning of human stem cells of myogenic origin.

Funded by National Science Centre, Poland grant number: 2014/13/B/NZ3/04646

ROLA RECEPTORÓW CB₁ I GPR55 W CZYNNOŚCI SKURCZOWO-ROZKURCZOWEJ IZOLOWANYCH TĘTNIC PŁUCNYCH CZŁOWIEKA I SZCZURA

O. Karpińska, M. Baranowska-Kuczek, M. Kłoz, H. Kozłowska

Zakład Fizjologii i Patofizjologii Doświadczalnej, Uniwersytet Medyczny, Białystok, Polska

email: olga.karpinska1@wp.pl

Cel: Zbadanie zależności między aktywacją receptorów sprzężonych z białkiem G_{q/11}, a aktywacją receptorów CB₁, a także potwierdzenie obecności receptorów GPR55 i zbadanie ich potencjalnej roli w reakcji rozkurczowej w tętnicach płucnych człowieka i szczura.

Metody: Doświadczenia zostały wykonane na izolowanych tętnicach płucnych 1) podsegmentarnych człowieka (materiał otrzymany podczas pneumonektomii lub lobektomii od operowanych z powodu niedrobnokomórkowego raka płuca ($n = 56$; 41 mężczyzn i 15 kobiet w wieku 64.6 ± 1.5 lat) oraz 2) szczurów rasy Wistar ($n = 60$). Badania prowadzono na fragmentach tętnic z zachowanym lub zniszczonym mechanicznie śródbłonkiem z zastosowaniem kąpieli tkankowej. Efekt skurczowy został zbadany z zastosowaniem agonistów receptorów sprzężonych z białkiem G_{q/11}: angiotensyny II (Ang II), analogu tromboksanu A₂ (U46619), fenylefryny i serotoniny. Efekt rozkurczowy pod wpływem lizofosfatydyloinozytolu (LPI, agonisty receptorów GPR55) został zbadany na naczyniach skurczonych uprzednio fenylefryną. Agoniści byli podawani metodą kumulacyjną. Przed sporządzeniem właściwej krzywej stężenie-efekt, badane skrawki były inkubowane przez 30 min. z: antagonistą receptorów CB₁ (AM251), CB₂ (AM630), GPR55 (CID16020046), śródbłonkowego receptora dla anandamidu (AEA, O-1918), inhibitorami biosyntezy endokannabinoidu 2-arachidonyloglicerolu (2-AG, RHC80267), rozkładu 2-AG (JZL184) i AEA, (URB597), inhibitorem syntazy tlenku azotu (L-NAME) oraz cyklooksygenazy (indometacyna), blokerami kanałów potasowych o małym, średnim i dużym przewodnictwie dla jonów wapnia (UCL1684, TRAM34, iberiotoksyna), blokerem receptorów aktywowanych przez proliferatory peroksydomów (GW9662). Wyniki wyrażono jako % skurczu KCl (60 mM) w przypadku reakcji skurczowych i jako % rozkurczu po uprzednim skurczu fenylefryną w przypadku reakcji rozkurczowych. Oznaczenia RT-PCR, Western blot oraz immunohistochemiczne zostały przeprowadzone w celu potwierdzenia obecności poszczególnych receptorów w izolowanych tętnicach płucnych.

Wyniki: Ang II, U46619, fenylefryna i serotonina w zależności od stężenia wywoływały skurcz izolowanych tętnic płucnych. AM251 istotnie nasilił reakcję skurczową wywołaną podaniem U46619 oraz Ang II (ale nie serotoniny i fenylefryny) w tętnicy płucnej z zachowanym śródbłonkiem natomiast nie zaobserwowano takiego efektu po jego mechanicznym usunięciu w porównaniu do grup kontrolnych. JZL184 osłabił efekt skurczowy tętnicy płucnej indukowany Ang II i U46619 i przesunął krzywą stężenie-efekt w prawo, z kolei RHC80267 nasilił ten efekt, przesuwając krzywą w lewo. Zastosowanie zarówno AM630, jak i URB597 nie wpłynęło na przebieg reakcji skurczowej. LPI wywołał zależną od stężenia i czasu relaksację izolowanych tętnic płucnych człowieka z zachowanym śródbłonkiem, która została osłabiona po zastosowaniu antagonistów, inhibitorów lub blokerów: CID16020046, GW9662, O-1918, L-NAME, UCL1684, TRAM-34, iberiotoksyny. Zastosowanie roztworu KCl o wysokim stężeniu, jak też mechaniczne usunięcie śródbłonka również osłabiło reakcję wywołaną podaniem LPI. Zastosowanie AM251 oraz indometacyny nie wpłynęło na przebieg tej reakcji.

Wnioski: Wyniki badań wskazują na występowanie zależności między pobudzeniem receptorów sprzężonych z białkiem G_{q/11} przez substancje kurczące naczynia krwionośne, a aktywacją receptorów CB₁ przez 2-AG w izolowanych tętnicach płucnych szczura i człowieka oraz zaangażowanie receptorów GPR55 w rozkurcz ludzkich tętnic płucnych. Może to wskazywać na protekcyjną rolę układu kannabinergicznego w zapobieganiu nadmiernemu skurczowi tych naczyń w nadciśnieniu płucnym.

UPOŚLEDZENIE FUNKCJI KANAŁU BK_{Ca} W WARUNKACH KRÓTKOTRWAŁEJ HIPONATREMII PROWADZI DO ZNIESIENIA ROZKURCZU TĘTNICY ŚRODKOWEJ MÓZGU SZCZURA W ODPOWIEDZI NA KWASICĘ

M. Aleksandrowicz¹, E. Koźniewska^{1,2}

¹Pracownia Neurochirurgii Doświadczalnej, Zespół Kliniczno-Badawczy Neurochirurgii, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN, Warszawa, Polska, ²Zakład Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa, Polska

email: maleksandrowicz@imdik.pan.pl

Wstęp: Zmniejszenie napięcia naczyń krwionośnych mózgu i wzrost mózgowego przepływu krwi w odpowiedzi na kwasicę stanowi ważny mechanizm regulacyjny zapewniający homeostazę w tym narządzie. Tętnica środkowa mózgu (MCA) szczura ulega rozszerzeniu w kwasicy dzięki aktywacji dwóch typów kanałów potasowych błony komórkowej mięśni gładkich: kanałów o dużej przewodności, zależnych od jonów wapnia (BK_{Ca}) oraz kanałów zależnych od ATP (K_{ATP}). Z badań własnych wynika, że krótkotrwałą, hiposmolalną hiponatremią zmniejsza wrażliwość kanału BK_{Ca} na podanie syntetycznego agonisty NS1619. Hipoteza badawcza postawiona na podstawie powyższych danych zakłada, że w krótkotrwałej, hiposmolalnej hiponatremii dochodzi do upośledzenia fizjologicznej odpowiedzi MCA na kwasicę w mechanizmie związanym z dysfunkcją kanału BK_{Ca}.

Metoda: MCA izolowane z mózgów samców szczurów Wistar umieszczano w komorze arteriografu, wypełnionej buforowaną solą fizjologiczną. Naczynia były perfundowane i poddane działaniu ciśnienia hydrostatycznego (80 mmHg). Zmiany średnicy MCA rejestrowano za pomocą toru wizyjnego złożonego z kamery i monitora. Krótkotrwałą hiposmolalną hiponatremię wywoływano *in vitro* poprzez zmniejszenie stężenia Na⁺ w płynie zewnątrz- i wewnątrznaczyniowym ze 144 mM do 121 mM. Osmolalność tego buforu wynosiła 250 mOsm/kg H₂O. Kwasicę wywoływano obniżając pH z 7,4 do 7,0 w płynie zewnątrznaczyniowym przy pomocy HCl. Badano odpowiedź MCA na: kwasicę, kwasicę na tle inhibitora kanału BK_{Ca} (paksylina, 10⁻⁶) oraz kwasicę na tle aktywatora kanału BK_{Ca} (NS1619, 10⁻⁵ M) lub aktywatora kanału K_{ATP} (pinacidil, 10⁻⁵ M) w warunkach normonatremii i w hiposmolalnej hiponatremii. W kolejnej serii badań, w celu wyjaśnienia ewentualnego udziału hiposmolalności w upośledzeniu odpowiedzi MCA na kwasicę wyrównano osmolalność buforu do 300 mOsm/kg H₂O za pomocą Trisu i HCl, przy zachowaniu obniżonego stężenia Na⁺.

Wyniki: W normonatremii, obniżenie pH w płynie zewnątrznaczyniowym z 7,4 do 7,0 spowodowało rozszerzenie MCA o 33±3% (p<0,001). Odpowiedź ta była znacząco mniejsza (rozszerzenie o 7±2%, p<0,05), po podaniu paksyliny. W hiponatremii, kwasica nie wywołała rozszerzenia MCA, a podanie paksyliny nie zmieniło tego wyniku. Natomiast podanie aktywatora kanału BK_{Ca} w hiponatremii, przywróciło odpowiedź MCA na kwasicę, tzn. obniżenie pH (z 7,4 do 7,0) buforu zewnątrznaczyniowego zawierającego NS1619 prowadziło do rozszerzenia MCA o 28±5% (p<0,001), co nie różniło się od odpowiedzi obserwowanej w normonatremii w warunkach kontrolnych. Podanie aktywatora kanału K_{ATP} w hiponatremii pozostało bez wpływu na zaburzoną odpowiedź MCA na kwasicę. Porównywalne do warunków normonatremii, rozszerzenie MCA w odpowiedzi na kwasicę obserwowano w hiponatremii także wtedy gdy wyrównano osmolalność buforu do 300 mOsm/kg H₂O przy zachowaniu obniżonego stężenia Na⁺.

Wnioski: W krótkotrwałej, hiposmolalnej hiponatremii dochodzi do zniesienia fizjologicznej odpowiedzi tętnicy środkowej mózgu szczura na kwasicę, związanego z

obniżeniem wrażliwości kanałów BK_{Ca} na agonistów. Obserwowane zmiany spowodowane są z obniżeniem osmolalności, a nie z obniżeniem stężenia Na⁺.

S4.3

ANALYSIS OF CARDIAC MITOCHONDRIAL FUNCTION IN GENETIC MODEL OF ATHEROSCLEROSIS

A. Bulińska, I. Pelikant-Matecka, M. Zabielska, B. Kutryb-Zajac, R.T. Smoleński, E. Słomińska

Department of Biochemistry, Medical University of Gdańsk, Poland

email: alicja.bulinska@gmail.com

Aim: Atherosclerosis lead to impairment of mitochondrial function by respiratory chain disorders and excessive production of reactive oxygen species. The aim of the study was to evaluate the effect of experimental atherosclerosis in mice on mitochondrial function.

Methods: The analysis of mitochondrial function in atherosclerosis was performed with mitochondria isolation from mouse hearts with knock-out of genes encoding for ApoE and LDLR(ApoE/LDLR^{-/-}) and wild type (WT) mice. Experimental system examined the transport of electrons in the respiratory chain by adding NAD-dependent substrates (malate, pyruvate) and FCCP (mitochondrial uncoupler) to mitochondria, followed by rotenone, succinate, antimycin and ascorbate enriched with TMPD. The analysis was performed using the Seahorse XFp metabolic flux analyzer, by recording the oxygen consumption rate (OCR). Results are presented as mean ± SEM.

Results: No differences were observed in the transport of electrons in the individual respiratory chain between mitochondria isolated from WT and ApoE/LDLR^{-/-} mice at any of measurement points. However, statistically significant differences were observed between male and female mice after the addition of succinate as a substrate (at 4 measurement point). WT and ApoE/LDLR^{-/-} female hearts mitochondria were characterized by almost twice higher OCR (70.9±4.5 and 60.1±5.1 pmol/min/μg protein) than males (29.7±2.1 and 31.0±3.2 pmol/min/μg protein).

Conclusions: Above results indicate no differences in the flow of electrons in the respiratory chain between mitochondria of atherosclerotic and WT mice. However, the significant differences between male and female heart mitochondria have been demonstrated.

This study was supported by the National Centre for Research and Development (STRATEGMED 1/233226/11/NCBR/2015).

IDENTYFIKACJA ELEMENTÓW W SEKWENCJI OBRAZÓW Z MIKROSKOPU KONFOKALNEGO

M. Kaja¹, T. Buchner¹, M. Aleksiejczuk², A. Gromotowicz-Popławska², K. Kramkowski²,

¹Pracownia Fizyki Układu Krążenia, Wydział Fizyki, Politechnika Warszawska, ²Samodzielna Pracownia Biofarmacji, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

email: buchner@if.pw.edu.pl

Cel: stworzenie programu do wykrywania oraz śledzenia leukocytów oraz innych elementów w sekwencji zdjęć z mikroskopu konfokalnego przedstawiających wypreparowaną żyłę krezkową myszy modyfikowanych genetycznie wykazujących ekspresję białka GFP.

Metody: Do analizy obrazu zbudowano program napisany w języku Python, który korzystał z darmowej biblioteki OpenCV, służącej do analizy obrazu. W pracy wykorzystano algorytmy z tej biblioteki służące do konwersji formatu kodowania kolorów, progowania, odszumiania (metody erozji i poszerzenia) oraz znajdowania konturów. Metody pozwalają na realizację takich zadań badawczych jak:

- 1) Identyfikacja wszystkich obiektów podobnych do wskazanego przez operatora wzorca. Obiekty mogą być dowolnie przeskalowane, odbite lub obrócone względem zaprezentowanego wzorca. Możliwa jest regulacja progu czułości metody
- 2) Śledzenie zmian położenia oraz orientacji poruszającego się obiektu
- 3) Pomiar zmian rozmiaru wybranego obszaru obrazu, charakteryzującego się jednolitym kolorem.

Wyniki: Za pomocą zaimplementowanych w pracy metod udało się zrealizować następujące zadania: 1) Zliczenie wszystkich leukocytów znajdujących się jednocześnie w polu obrazowym, 2) Pomiar położenia i prędkości leukocytów pojawiających się w polu obrazowym w sekwencji obrazów, w funkcji czasu i odległości od zakrzepu, 3) Identyfikacja brzegu zakrzepu i pomiar powierzchni zakrzepu w funkcji czasu. Prawidłowo zidentyfikowano spadek powierzchni zakrzepu w czasie, wykazujący jednak trudne do zinterpretowania oscylacje. Pomiar zmian położenia erytrocytów okazał się niemożliwy, ze względu na to, że przy danej prędkości klatek są widoczne jako smugi, co nie pozwala na prostą ocenę przepływu przez naczynie. Wydaje się natomiast możliwa ocena prędkości przepływu na podstawie długości smugi. Możliwe wydaje się również rozróżnianie ruchu tocznego i postępowego, co jest pośrednią miarą tarcia (lepkości). Wyniki pracy zostały obronione na ocenę bardzo dobrą i opublikowane jako praca inżynierska [1]

Wnioski: Algorytmy analizy elementów w sekwencji obrazów pozwalają na automatyzację takich zadań jak: zliczanie, zmiana położenia, zmiana prędkości, charakter ruchu. Stosowanie ich jest proste i może być realizowana w ramach pracy inżynierskiej. Wpływ na obserwowane wyniki ilościowe mogą mieć przesunięcia preparatu względem płaszczyzny obrazowania, lub inne zjawiska powodujące okresowe zmiany jasności zdjęcia.

[1] inż Magdalena Kaja, *Identyfikacja leukocytów w sekwencji obrazów z mikroskopu konfokalnego*, Praca inżynierska, Wydział Fizyki, Politechnika Warszawska 2017.

VASCULAR ADENOSINE DEAMINASE IN ENDOTHELIAL ACTIVATION, INFLAMMATION AND ATHEROSCLEROSIS

B. Kutryb-Zajac¹, P. Zukowska¹, A. Jaształ², E. Sucajtyś-Szulc³, L. Mateuszuk², M. Zabielska¹, M. Serocki⁴, R. Bartoszewski⁴, E. M. Słomska¹, S. Chłopicki², R. T. Smolenski¹

¹Department of Biochemistry, Medical University of Gdansk (MUG), Poland; ²Jagiellonian Centre for Experimental Therapeutics, Krakow, Poland; ³Department of Nephrology, Transplantology and Internal Medicine, MUG, Poland; ⁴Department of Biology and Pharmaceutical Botany, MUG, Gdansk, Poland

email: b.kutryb-zajac@gumed.edu.pl

Aims: Extracellular nucleotides and adenosine may affect vascular pathologies by controlling inflammation, lipid accumulation and thrombosis. Membrane-bound ecto-enzymes effectively control local concentrations of these metabolites. Our recent studies highlighted that changes in activities of these ecto-enzymes may be related with valve dysfunction and atherosclerosis. Vascular activity of ecto adenosine deaminase (eADA) consistently increased in all these pathologies. This work aimed to investigate cellular sources of eADA in pathological human vessels and to correlate this activity with the markers of endothelial activation and inflammation. Furthermore, the effects of inflammatory factors on eADA activity were tested.

Methods and Results: In humans, immunofluorescence showed that at early stage of pathological process within the vessel during neointima formation, eADA originated from endothelial cells, not from migrating vascular smooth muscle cells. Moreover, co-localization between ADA and CD26 protein was observed, which proves that CD26 could bind eADA on the cell surface. Further studies exhibited that activity of eADA positively correlated with vascular expression of adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1). In later stages of pathological process, eADA also originated from immune infiltrate and correlated with plasma concentration of IL-6. In LPS-treated rats, activity of vascular eADA was increased (control rats: 0.98 ± 0.09 ; LPS-treated rats: 2.00 ± 0.52 nmol/min/cm²) and positively correlated with plasma IL-6 concentration ($r=0.79$, $p<0.01$), while the rate of vascular adenosine production (ecto-5'-nucleotidase activity) correlated negatively with this parameter ($r=-0.76$, $p<0.05$). In IL-6^{-/-} mice, we observed a decreased activity of vascular eADA (WT: 1.75 ± 0.45 ; IL6^{-/-}: 0.99 ± 0.23 nmol/min/cm²; that was reflected by higher concentration of peripheral blood adenosine (WT: 75 ± 18.5 nM; IL6^{-/-}: 92 ± 21 nM).

Conclusions: This study points the role of extracellular adenosine catabolism in endothelial activation and vascular inflammation. Activity of vascular eADA could be considered as a potential marker of early stages vascular pathologies (e.g. atherosclerosis) and as a target for therapy.

This study was supported by National Science Centre of Poland (2014/13/N/NZ4/04471).

NAD METABOLISM ALTERATIONS IN AORTIC STENOSIS

P. Jablonska¹, P. Zukowska, B. Kutryb-Zajac¹, R. Lango², J. Rogowski³, R. T. Smolenski¹, E. M. Slominska¹

¹Department of Biochemistry, Medical University of Gdansk, Gdansk, Poland ²Department of Cardiac Anesthesiology, Medical University of Gdansk, Gdansk, Poland ³Chair and Clinic of Cardiac and Vascular Surgery, Medical University of Gdansk, Poland

email: patrycja.s@gumed.edu.pl

Aim: Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD) is considered as a mediator of multiple major biological processes, including calcium homeostasis, energy metabolism, mitochondrial function, cell death, and aging in various tissues. Aortic stenosis (AS) is the most common valvular heart disease in the developed world, mostly in people over 60 years of age. The purpose of this study was to investigate alterations of NAD metabolites in plasma and changes occurring on the surface of the aortic valve.

Methods: Blood specimens were collected from AS and non-AS patients. The blood was then centrifuged to obtain plasma samples. The concentration of nicotinamide (Nam) metabolites was analyzed using the LC-MS/MS. Aortic valves were obtained during aortic valve replacement (AVR) or Bentall operation and used immediately for experiments. The specific area of fibrosa of valves was exposed to a medium that contained NAD, NMN or Nam and metabolic changes were tracked by HPLC.

Results: The plasma concentration of NAD metabolism final products - N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide (Met2PY) and N-methyl-4-pyridone-5-carboxamide (Met4PY) was significantly lower in the study group in comparison to the control group (0.64 ± 0.04 nmol/l vs. 1.03 ± 0.11 nmol/l, 0.22 ± 0.02 nmol/l vs. 0.31 ± 0.05 nmol/l, respectively). Nicotinamide riboside (NR) concentration was significantly reduced in the group of patients with AS than in the control group (0.50 ± 0.04 nmol/l vs. 0.75 ± 0.12 nmol/l). There was noted a tendency to decreased concentration of nicotinamide in a group of AS patients. An active metabolism of NAD and nicotinamide mononucleotide (NMN) was observed on the surface of human aortic valves. Nam conversion was not detected. The main products of NAD catabolism were NMN, Nam, and NR. In turn, NMN was catabolized to Nam and NR. In humans, the NAD and NMN hydrolysis enzymes activity in the study group was significantly higher than in the control group (0.81 ± 0.07 vs. 0.56 ± 0.10 and 1.12 ± 0.10 vs. 0.71 ± 0.08 nmol/min/cm² respectively).

Conclusions: Nicotinamide metabolite alterations, such as decreased concentrations of NR occurring in aortic stenosis patients may affect disease progression. It has been demonstrated that in patients with aortic stenosis metabolism of NAD and NMN on the aortic valve surface is increased. It may be a consequence of the increased demand for substrates to rebuild the intracellular pool of NAD.

WPŁYW TWARDOŚCI PODŁOŻA NA ZAWARTOŚĆ KOLAGENU W HODOWLI FIBROBLASTÓW POBRANYCH Z PRZEDSIONKÓW SERCA.

M. Gałdyszyńska, A. Krzywińska, J. Drobnik

Zakład Badań Neuropeptydów, Katedra Patologii Ogólnej i Doświadczalnej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Łódź, Polska.

email: jacek.drobnik@umed.lodz.pl

Cel: Regulacja włóknienia serca, a zwłaszcza rola bodźców fizycznych, nie zostały jeszcze szczegółowo poznane. Celem obecnej pracy jest sprawdzenie jak twardość podłoża może wpływać na zawartość kolagenu i ekspresję genów tego białka w hodowlach prowadzonych na podłożach twardych oraz miękkich. Ponadto planujemy zbadać czy w badanych modelach eksperymentalnych zmienia się sekrecja żelatynaz rozkładających białko kolagenowe.

Metody: Komórki IHFC (ABM, Kanada) - linii ludzkich fibroblastów z serca poddano analizie cytometrycznej w celu potwierdzenia obecności podjednostki $\alpha 2$ i $\beta 1$ integryny na ich powierzchni. W komórkach fibroblastów hodowanych na 8% żelach poliakrylamidowych o różnym stopniu twardości (żel twardy zawiera 0.1% bis-akrylamid, a żel miękki 0.06% tej substancji) dokonano oceny poziomu ekspresji genów dla podjednostki $\alpha 2$ integryny, a także dla łańcuchów $\alpha 1$ prokolagenu typu I oraz typu III przy pomocy metody Real-Time PCR. Poziom kolagenu oceniano przy pomocy metody Woessnera. Stężenia metaloproteinazy 2 (MMP-2) oraz metaloproteinazy 9 (MMP-9) badano metodą immunoenzymatyczną.

Wyniki: Otrzymane wyniki potwierdziły obecność podjednostki $\alpha 2$ i podjednostki $\beta 1$ integryny na powierzchni fibroblastów serca. Spadek twardości podłoża powodował wzrost poziomu ekspresji genu *Itga2* oraz gęstości podjednostki $\alpha 2$ na powierzchni komórek. Zjawisku temu towarzyszył wzrost poziomu kolagenu śródkomórkowego oraz rozpuszczalnego w pożywce hodowlanej w hodowlach rosnących na żelach miękkich. Elastyczne podłoże powodowało także wzrost poziomu mRNA dla łańcucha $\alpha 1$ prokolagenu typu I, natomiast ekspresja łańcucha $\beta 1$ prokolagenu typu III nie uległa zmianie w obydwu hodowlach. Poziom badanych metaloproteinaz nie uległ zmianom w badanych modelach doświadczalnych.

Wnioski: Zmiany twardości podłoża hodowanego wywierają wpływ na ludzkie fibroblasty (IHFC) pobrane z serca. W fibroblastach rosnących na żelu miękkim stwierdza się większe gromadzenie białka kolagenowego oraz wzrost ekspresji genu kodującego łańcuch $\beta 1$ prokolagenu typu I w porównaniu do hodowli na żelu twardym. W hodowlach na podłożu bardziej elastycznym odkryto większą ekspresję podjednostki $\alpha 2$ integryny. Zjawisko to może świadczyć o istotnej roli tej integryny w procesie przekazywania informacji do komórki w badanym modelu doświadczalnym. Hipoteza ta wymaga dalszych badań.

REACTIVITY OF ISOLATED YOUNG PORCINE CORONARY ARTERIES TO CHOLINERGIC AND ADRENERGIC DRUGS

M. S. Majewski¹, A. Rynkiewicz², W. Grzegorzewski¹, M. Gajęcka³, M. Gajęcki³

¹Katedra Farmakologii i Toksykologii, Wydział Lekarski, UWM, Olsztyn, Polska, ²Katedra Kardiologii i Kardiochirurgii, Wydział Lekarski, UWM, Olsztyn, Polska ³Katedra Prewencji Weterynaryjnej i Higieny Pasz, UWM, Olsztyn, Polska

email: michal.majewski@uwm.edu.pl

Cel: Z dostępnych danych literaturowych wynika, że lewa tętnica wieńcowa serca (*arteria coronaria sinistra*) jest podatna na działanie amin katecholowych oraz acetylocholin. Efekt ten jest zależny od stanu śródbłonna, napięcia spoczynkowego i warunków, w jakich przebiega doświadczenie. Również zaobserwowano zmienność gatunkową oraz wewnątrzgatunkową w zależności od wieku. Oprócz powyższych różnic istnieją dowody na znaczne rozbieżności w reaktywności naczyń jako analizy matematycznej funkcji ich wielkości. Z wyżej wymienionych powodów, celem niniejszej pracy była walidacja metody badania izolowanych odcinków lewej tętnicy wieńcowej serca.

Metody: Analizowano reaktywność lewej tętnicy wieńcowej serca świni (*MID LAD, odcinek D1-D2, n=12, wiek 6 tyg.*) na bezpośrednie działanie adrenaliny, noradrenaliny i acetylocholin. Dodatkowo zbadano wpływ indometacyny (Indo, 10 μ M, nieselektywny inhibitor COX1/2) i N(ω)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 0,1 mM, inhibitor syntazy NO) na odpowiedź naczyniową wywołaną przez acetylocholinę. Aktywność motoryczną pierścieni naczyń rejestrowano w warunkach izometrycznych przy napięciu spoczynkowym 0,5 cN. Wyniki zweryfikowano statystycznie jednoczynnikową analizą wariancji ANOVA.

Wyniki: *Acetylocholina* (10^{-8} – 10^{-6} M) wywoływała skurcz naczyń tętniczych będących w stanie spoczynku, a siła skurczu wynosiła $95 \pm 11\%$ (60 mM KCl) i $204 \pm 20\%$ (20 mM KCl) w przypadku 10^{-6} M Ach. Atropina znosiła to działanie. *Adrenalina* i *noradrenalina* w zakresie użytych stężeń (10^{-7} – 6×10^{-4} M) nie wywołały skurczu. Egzogenny donor NO, nitroprusydek sodu (10^{-5} M) wywołał relaksację na poziomie $68 \pm 11\%$ (60 mM KCl) i $100 \pm 12\%$ (Ach 10^{-6} M).

Indometacyna (30 min. stabilizacja) wywołała słabszą odpowiedź izolowanych odcinków naczyń na działanie acetylocholin ($180 \pm 16\%$ vs. $204 \pm 20\%$, Ach 10^{-6} M, $P=0.085$). Jednoczesne podanie Indo+L-NAME zwiększyło nieznacznie siłę skurczu ($226 \pm 22\%$ vs. $204 \pm 20\%$, Ach 10^{-6} M, $P=0.065$). Natomiast 30 min. inkubacja z L-NAME statystycznie istotnie zwiększyła siłę skurczu ($250 \pm 25\%$ vs. $204 \pm 20\%$, Ach 10^{-6} M, $P<0,001$) w porównaniu do grupy kontrolnej. Wykazano również różnicę działania między Indo a Indo+L-NAME ($P<0,001$), potwierdzając tym samym istotne znaczenie NO w relaksacji izolowanych mięśni gładkich tętnicy wieńcowej serca.

Ponowne podanie tej samej dawki Ach (10^{-6} M) przy jednoczesnym blokowaniu COX1/2 i syntazy NO, wywołało silniejszą odpowiedź naczyń na poziomie 45% ($P<0,05$), wskazując tym samym na istotną rolę NO i metabolitów prostaglandyny H2 w działaniu kolejnych dawek Ach.

Wnioski: Acetylocholina jest silnym czynnikiem aktywnym naczyniowo, pozwalającym analizować funkcje i dysfunkcje izolowanych naczyń – tętnicy wieńcowej serca w warunkach *in vitro*.

CARDIAC MITOCHONDRIA NUCLEOTIDE POOL AND ITS ROLE IN POST-ISCHEMIC ADENOSINE PRODUCTION

M. A. Zabielska^{1,2}, A. Bulinska¹, I. Pelikant- Malecka, E. M. Slominska, R. T. Smolenski¹.

Department of Biochemistry¹ and Physiology², Medical University of Gdansk, Poland

email:

Myocardial adenosine release decreases in the course of repeated ischemic events. However, whether mechanism of this relate purely to altered energy metabolism or other changes such as depletion of mitochondrial nucleotide pool has not been clarified. In this study we evaluated the mitochondrial nucleotide concentrations in control and nucleotide pool replenished hearts after repeated ischemic intervals.

An isovolumic preparation of the rat heart attached to a Langendorff perfusion system at constant pressure was used. Hearts were subjected to one of three protocols: in ischemic group (I) hearts were subjected to 1 min of global (37°C) ischemia after 20 min of perfusion, 10 min of global (37°C) ischemia after 30 min of perfusion and to 1 min ischemia after 65 min of perfusion. In ischemia + adenosine group (I-Ado) a similar protocol was used but with infusion of 30 μ M adenosine during the first 15 min of reperfusion after 10 min ischemia. In control group without 10 min ischemia (C), hearts were subjected three times to 1 min ischemia at 20, 30 and 65 min of perfusion. At the end of experiments, heart apexes were cut off, mitochondria isolated, extracted with HClO₄ and analyzed for ATP and related metabolites concentrations by HPLC.

In the mitochondria of I-Ado group, ADP, total adenine nucleotides (TAN=ATP+ADP+AMP) and total NAD (TNAD=NAD+ADPR) at 75 min were higher than in I and increased to 1.51 from 1.00, to 3.62 from 2.66 and to 4.23 from 3.51 μ mol/g dry weight respectively. Concentration of ADP and TAN were 1.00 and 2.66 μ mol/g dry weight respectively in C group.

These results shows that although changes in energy metabolism are key factor that regulate adenosine and other purine production in the heart changes in mitochondrial nucleotide pool may play an important role.

AN ALTERED NUCLEOTIDE METABOLISM AS A NOVEL MECHANISM LEADING TO HUNTINGTON DISEASE RELATED CARDIOMYOPATHY

M. Toczek¹, D. Zielonka², P. Zukowska¹, J.T. Marcinkowski², B. Kutryb-Zajac¹, E. Slominska¹, M. Isalan³, M. Mielcarek³, R. T. Smolenski¹

¹Department and Chair of Biochemistry, Medical University of Gdansk, Poland. ²Department of Social Medicine, Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland. ³Department of Life Sciences, Imperial College London, London, UK.

email: marta.toczek@gumed.edu.pl

Huntington's disease (HD) is a neurodegenerative disorder with a significant peripheral component to the disease pathology. This includes an HD-related cardiomyopathy, with an unknown pathological mechanism. In this study, we characterized changes in cardiac nucleotides metabolism in the HD mouse models. Moreover, we aimed to assess the concentrations of major adenine nucleotides and their catabolites in plasma of symptomatic HD patients.

We examined R6/2 transgenic and HdhQ150 knock-in mice and their WT littermates. To investigate changes in the nucleotides metabolism, the concentration of adenine and guanine nucleotides, creatine metabolites and nicotinamide adenine dinucleotides were measured. We evaluated cardiac substrate preferences in both of HD mouse models using ¹³C glucose isotopomer and LC-MS method. Analysis of genes transcripts were performed using RT- qPCR. Moreover, level of AMP regulated protein kinase phosphorylation in HD mouse models hearts was measured with ELISA KIT.

We observed a notable energy metabolism deterioration in hearts of HD mice (ATP/ADP ratio = 6.39 ± 0.46 in R6/2 and 3.57 ± 0.57 in WT; 8.56 ± 1.84 in HdhQ150 and 5.98 ± 0.55 in WT). We demonstrated AMPK over-activation in hearts of HD mice that was accompanied by shift in a cardiac substrate preference from glucose to fatty acids. Moreover, we found a significant down-regulation of genes involved in purine de novo biosynthesis (Adenylosuccinate lyase, Phosphoribosylglycinamide formyltransferase), conversion of adenine to guanine nucleotides (Guanine monophosphate synthetase), adenine nucleotides inter-conversion (Adenylate kinase 1) and up-regulation of transcripts of genes involved in adenosine degradation (Adenosine deaminase, Dipeptidyl peptidase-4). This was accompanied by an increases in concentration of nucleotide catabolites in HD mouse model serum, in comparison to their wild type littermates. Interestingly, we observed prominently increased levels of hypoxanthine and uridine also in HD patients plasma, in comparison to their healthy controls. Moreover, hypoxanthine and uridine levels strongly correlated with HD disease progression parameters.

This study highlights a profound deregulation in cardiac energy and nucleotides metabolism in HD mouse models. We suggest that mutant huntingtin disrupts coupling of cardiac energy metabolism with its regulatory pathways that despite its activation is unable to ensure recovery. Consequently, hearts and possibly other organs remains energy depleted that translate into elevated nucleotide catabolites concentration and suppression of nucleotide synthetic pathways. Furthermore, for the first time, our study identified biomarkers that might be linked to HD progression both in pre-clinical and clinical settings. Restoration of energy equilibrium in HD hearts may be important therapeutic target in HD.

PREZENTACJE POSTEROWE

ACUTE ALDOSTERONE ADMINISTRATION INCREASES VASCULAR PERMEABILITY IN RAT SKIN

M. Aleksiejczuk¹, A. Gromotowicz-Poplawska¹, J. Dzieciol², E. Chabielska¹

¹*Department of Biopharmacy, Medical University of Białystok, Białystok, Poland* ²*Department of Human Anatomy, Medical University of Białystok, Białystok, Poland*

email: michal.aleksiejczuk@umb.edu.pl

Objective: The aim of the presented study was to evaluate the effect of acute aldosterone (ALDO) administration on vascular permeability in rat skin.

Methods: A model of skin vascular permeability measurement in male Wistar rats was used. ALDO (10^{-8} - 10^{-6} M, 0.1 mL) was randomly injected intradermally. Evans blue dye was injected intravenously after ALDO injection. The skin sections were removed and analyzed colorimetrically. To investigate the mechanism of ALDO action, the mineralocorticoid receptor (MR) antagonist – eplerenone (EPL, 100 mg/kg) – was administered in two ways: in a single oral dose or chronically for 10 days. To evaluate the role of cyclooxygenase (COX), the rats were given its inhibitor – indomethacine (INDO, 8 mg/kg). To study the expression of endothelial biomarkers, skin biopsies were performed for immunohistochemical staining (von Willebrand factor – vWF and vascular endothelial growth factor – VEGF).

Results: ALDO injection resulted in an increased vascular permeability for 27% ($p < 0.05$). Single EPL administration did not change the ALDO effect, while 10-day administration of EPL reduced ALDO-induced permeability by over a half ($p < 0.001$). INDO also significantly decreased this parameter. Immunohistochemical analysis for VEGF showed a positive reaction in ALDO groups and for vWF a negative reaction.

Conclusion: Our results demonstrated that acute ALDO administration increased skin vascular permeability in the rapid and MR-independent mechanism. The ALDO effect is related to local endothelial damage mediated by the COX-dependent pathway. The present results of the ALDO effect on skin microcirculation may have important therapeutic implications in diseases ongoing with elevated ALDO levels and co-existing skin microangiopathy.

WPŁYW JEDNORAZOWEGO PODANIA INHIBITORA ROZKŁADU ENDOKANNABINOIDÓW URB597 NA UKŁAD KRAŻENIA U SZCZURÓW Z NADCIŚNIENIEM DOCA-SALT.

M. Toczek, E. Grzęda, K. Mińczuk, R. Kossakowski, B. Malinowska

Zakład Fizjologii i Patofizjologii Doświadczalnej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Białystok, Polska

email: marektoczek@interia.eu

Wstęp: Układ endokannabinoidowy jest zaktywowany w nadciśnieniu, co może mieć potencjalne znaczenie protekcyjne (*Bátkai et al., Circulation 2004;110:1996-2002; Li et al., J Hypertens 2009;27:1224-32; Godlewski et al., Chem Biol 2010;17:1256-66*). Zablockowanie rozkładu endokannabinoidu anadamidu przez jednorazowe podanie inhibitora enzymu hydrolazy amidowej kwasów tłuszczowych (FAAH) URB597 obniża ciśnienie krwi u szczurów z nadciśnieniem pierwotnym (SHR), ale nie ich u normotensyjnej kontroli – szczurów Wistar Kyoto (*Batkai et al., 2004*). Chroniczne podanie URB597 szczurom z nadciśnieniem wtórnym DOCA-salt powoduje zależny od wieku spadek ciśnienia (*Toczek et al., Pharmacol Rep. 2016;68:363-9*).

Cel: Określenie wpływu jednorazowego podania inhibitora rozkładu endokannabinoidów URB597 na parametry hemodynamiczne szczurów z nadciśnieniem wtórnym DOCA-salt.

Metody: W doświadczeniach wykorzystano model wtórnego nadciśnienia tętniczego DOCA-salt. Nadciśnienie indukowano podając przez 4 tygodnie (co 4 dni) szczurom poddanym jednostronnej nefrektomii podskórnie octan deoksykortykosteronu (DOCA; 25 mg/kg) oraz do picia 0,9% roztwór NaCl. Normotensyjna grupa kontrolna (UNX) otrzymywała rozpuszczalnik DOCA i wodę. Eksperymenty wykonywano na szczurach uśpionych uretanem (14 mmol/kg).

Wyniki: Skurczowe ciśnienie tętnicze (SBP) krwi u czuwających szczurów DOCA-salt wynosiło ok. 180 mmHg i było istotnie wyższe niż w normotensyjnej kontroli, gdzie osiągało wartości ok. 130 mmHg. Bazalne ciśnienia skurczowe, średnie (MBP) i rozkurczowe (DBP) u szczurów uśpionych DOCA-salt wynosiły odpowiednio ok. 95, 65 i 50 mmHg i były porównywalne do grupy UNX. Częstość akcji serca (HR) u szczurów nadciśnieniowych wynosiła ok. 380 uderzeń/minutę i nie różniła się istotnie w stosunku do grupy normotensyjnej. Podanie obwodowego antagonisty receptorów kannabinoidowych CB₁ AM6545 (15 μmol/kg, dootrzewnowo) nie wpływało istotnie na wartości ciśnienia tętniczego i częstości akcji serca w żadnej z grup. URB597 podany dożylnie (3 μmol/kg) powodował u szczurów DOCA-salt i UNX porównywalny spadek SBP (ok. 10%). Natomiast obniżenie MBP i DBP było wyższe u szczurów DOCA-salt, odpowiednio ok. 15 vs. 5% i ok. 25 vs. 10%. Po zablockowaniu obwodowych receptorów CB₁ URB597 spowodował dwufazową odpowiedź u szczurów normotensyjnych – porównywalny wzrost i spadek SBP, MBP i DBP odpowiednio o 15, 20, 30%. Natomiast u szczurów nadciśnieniowych zanikła faza hipotensyjna, a występował jedynie wzrost SBP, MBP i DBP odpowiednio o ok. 20, 25 i 35%. URB597 powodował nieznaczny spadek HR (ok. 4%) w obu grupach i nie był on istotnie zmieniony w obecności AM6545.

Wnioski: (1) Silniejsza odpowiedź hipotensyjna u szczurów nadciśnieniowych w stosunku do kontroli potwierdza potencjał inhibitorów FAAH jako leków hipotensyjnych. (2) Istnieją zależne od modelu różnice w odpowiedzi na zahamowanie FAAH u normotensyjnych szczurów kontrolnych. (3) Obwodowe receptory kannabinoidowe CB₁ hamują presyjne działanie endogennego anadamidu po zablockowaniu jego rozkładu.

WPŁYW DIETY O WYSOKIEJ ZAWARTOŚCI WIELONIENASYCONYCH KWASÓW TŁUSZCZOWYCH I O NISKIM ŁADUNKU GLIKEMICZNYM NA PROFIL LIPIDOWY PACJENTÓW Z HIPERCHOLESTEROLEMIĄ RODZINNĄ

K. Mironiuk¹, Z. Kochan²

¹Zakład Przechowalnictwa, Żywienia i Konsumpcji, Akademia Morska, Gdynia, Polska, ²Zakład Biochemii Żywienia, Gdański Uniwersytet Medyczny, Gdańsk, Polska

email: k.mironiuk@wpit.am.gdynia.pl

Cel: Ocena wpływu zwiększonej podaży wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w diecie oraz spożywania posiłków o niskim ładunku glikemicznym na profil lipidowy osób z hipercholesterolemią rodzinną.

Metody: Badanie zostało przeprowadzone w grupie 27 pacjentów Poradni Kardiologicznej I Katedry i Kliniki Kardiologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Interwencja dietetyczna trwała od 11 do 16 tygodni – w jej skład wchodziła edukacja żywieniowa pacjenta, przygotowywanie indywidualnie dostosowanych jadłospisów na podstawie analizy składu masy ciała metodą impedancji bioelektrycznej (BIA) oraz wywiad żywieniowy. Przed wprowadzeniem diety i po jej zakończeniu u wszystkich pacjentów oznaczono poziom triacylogliceroli (TG), cholesterolu całkowitego (TC), cholesterolu frakcji HDL (HDL-C) oraz cholesterolu frakcji LDL (LDL-C). W czasie trwania interwencji żywieniowej pacjent zobowiązany był do minimum 1 wizyty kontrolnej. Wyniki lipidogramów pacjentów przeanalizowano testem t-Studenta z użyciem programu GraphPad Prism.

Wyniki: W grupie badanej wykazano zmniejszenie stężenia TC z $237,7 \pm 68,78$ mg/dl do $214,7 \pm 64,15$ mg/dl ($P=0,0058$). Obniżenie stężenia TC było bardziej widoczne u pacjentów poddanych farmakoterapii (z $214,9 \pm 42,59$ mg/dl do $188,6 \pm 34,99$ mg/dl; $P=0,0006$). W grupie badanej doszło również do obniżenia stężenia LDL-C z $155 \pm 63,52$ mg/dl do $136,1 \pm 58,39$ mg/dl ($P=0,0076$). U pacjentów leczonych statynami także zaobserwowano istotne statystycznie obniżenie stężenia LDL-C z $133 \pm 38,65$ mg/dl do $112,1 \pm 32,08$ mg/dl ($P=0,001$). Nie zaobserwowano znaczących statystycznie różnic w stężeniach TG oraz HDL-C w całej grupie badanej – różnic tych nie było ani w grupie pacjentów stosujących statyny, ani u pacjentów bez farmakoterapii.

Wnioski: Powyższe wyniki sugerują, że wprowadzenie i monitorowanie odpowiedniego żywienia pacjentów z hipercholesterolemią rodzinną może być elementem wspomagającym farmakoterapię w procesie leczenia.

IS PLANT-BASED DIET BENEFICIAL FOR CARDIOVASCULAR SYSTEM?

P. Gogga¹, A. Śliwińska², E. Wrona², S. Małgorzewicz²

¹Department of Nutritional Biochemistry ²Department of Clinical Nutrition Medical University of Gdańsk, Dębinki 7, 80-211 Gdańsk, Poland

email: patig@gumed.edu.pl

Objective: The aim of the study was to evaluate, if vegan and vegetarian dietary patterns may influence the risk of developing cardiovascular disease, through the modulations of circulating lipid levels.

Methods: Levels of total cholesterol, LDL, HDL, and TAG were analyzed in the serum obtained from healthy men (N=15) and women (N=56) with normal BMI, who were on the plant diet for at least one year. A 24-hour Dietary Recall was performed in all participants to assess their daily intake of selected diet components. Nutritional analysis of consumed meals was made using Cronometer® software. To estimate serum concentrations of certain lipid fractions the automatic chemical analyzer was used (Hitachi 704); reagents were provided by Roche Diagnostics (Germany).

Results: Differences in serum levels of analyzed cholesterol fractions were observed. Concentrations of total cholesterol and LDL were significantly lower in vegans compared to vegetarians. In contrast, serum HDL levels were significantly higher in both vegetarians and vegans, compared to their mix-diet counterparts. There were no differences in serum TAG levels between all analyzed diet groups.

Nutritional analysis showed that subjects from both plant-diet groups exhibited higher consumption of PUFAs – including omega-3 and omega-6 fatty acids – than meat-eaters.

Conclusions: Our results suggest that adopting dietary pattern lacking in meat and meat-based products may be protective for the cardiovascular system through beneficial changes in lipid profile, notably higher HDL concentrations. Presumably, under these modulations lies higher consumption of PUFAs, which is observed especially in vegans.

ANTITHROMBOTIC EFFECT OF HNO DONORS

D. Jarmoc¹, A. Leszczyńska¹, N. Marcińczyk¹, P. Czajkowski¹, A. Sikora², K. Kramkowski¹

¹Department of Biopharmacy, Medical University of Białystok, Białystok, Poland ²Institute of Applied Radiation Chemistry, Lodz University of Technology, Lodz, Poland

email: dominika.jarmoc@gmail.com

Nitroxyl (HNO) is a redox congener of nitric oxide (NO) and may have a beneficial effect on hemostasis. HNO inhibits platelet aggregation *in vitro* (Bermejo E, 2005) and exerts vasodilatation (Favaloro JL, 2009). HNO is an unstable compound, thus there is a need of using its donors (Flores-Santana W, 2011). The most widely used are Angeli's Salt (AS) which additionally release biologically active NO²⁻ and Piloty's Acid (PA) with t_{1/2} reaching 90h.

Aim of the study: Evaluation of antithrombotic, antiplatelet and profibrinolytic effects of novel HNO donors *in vivo*.

Methods: The experiments were performed in Wistar rats, C57BL6/J (WT) mice (healthy, genetically unmodified strain) and eGFPC57BL6/J (GFP) mice (strain dedicated to use in intravital confocal experiment).

We used common HNO donor: sodium trioxodinitrate (AS; t_{1/2}=2,5 min.) and new compounds, derived from *N*-hydroxybenzenesulfonamide (PA): 2-bromo-*N*-hydroxybenzenesulfonamide in the form of suspension in Captisol in the form of sodium salt solution (2-Br-PA; t_{1/2}=3,8 min.) or in the form of a complex with Captisol in the form of ethyl ethers (2-Br-PA:Captisol; t_{1/2}=4,3 min.; Captisol is a modified cyclodextrin improving solubility) and 2-methyl-*N*-hydroxybenzenesulfonamide in a complex with Captisol in the form of ethyl ethers (2-CH3-PA:Captisol; t_{1/2}=1,5 h).

For *in vivo* experiments we used methods of the: laser- and FeCl₃-induced thrombosis analyzed intravitaly by using confocal microscope in GFP mice and the electrically-induced arterial thrombosis in rats and WT mice. We also measured the concentration of thromboxane B₂ (TxB₂) in the method of TxB₂ generation in mouse blood and bleeding time and t-PA concentration in thrombotic rats.

Results: AS (60 mg/kg, *i.v.*) significantly decreased thrombus weight in mice (0,035±0,02 mg vs VEH 0,09±0,02 mg; p<0,05) and only slightly decreased platelet accumulation in the laser-induced endothelial injury in mice, while 2-Br-PA in the form of suspension (30 mg/kg, *i.g.*) significantly decreased platelet accumulation (112,3±14,5 arbitrary units vs VEH 219,0±31 arbitrary units; p<0,05; calculated as an area under the curve) in the same method and increased plasma t-PA concentration in rats (1,204±0,383 ng/ml vs VEH 0,392±0,106 ng/ml; p<0,05). In turn, 2-Br-PA tend to decrease thrombus weight in rats.

2-Br-PA:Captisol (100 mg/kg, *i.v.*) slightly decreased platelet accumulation in mice and prolonged bleeding time.

2-CH3-PA:Captisol (3 µmol/kg, *i.v.*) significantly decreased the level of irreversibly activated platelets in the FeCl₃-induced endothelial injury in mice (14090±4912 µm² vs VEH 59570±16912 µm²; p<0,05; calculated as an area of irreversibly activated platelets which where conjugated with annexin V), while the same dose significantly decreased TxB₂ formation from mouse platelets (0,058±0,008 ng/ml vs control 0,096±0,012 ng/ml; p<0,05).

We did not observed significant changes in blood cell count in the rats nor in mice.

Conclusions: In our hands HNO donors seem to inhibit thrombosis in mechanism involving platelet inhibition or fibrinolysis activation. Further experiments to determine the mechanism of this effect, as well as evaluation of other HNO donors are needed.

ANTIPLATELET EFFECT OF CARVEDILOL IN INTRAVITAL REAL TIME LASER-INDUCED THROMBOSIS IN MICE.

P. Czajkowski^{1,2}, N. Marcińczyk¹, D. Jarmoc¹, A. Leszczyńska¹, K. Kramkowski¹

¹*Department of Biopharmacy, Medical University of Białystok, Białystok, Poland* ²*Clinical Research Centre, Medical University of Białystok, Białystok, Poland*

email: przemyslaw.czajkowski@umb.edu.pl

Introduction: Carvedilol is a third-generation β -adrenoceptor antagonist of β_1 and β_2 receptor and a competitive antagonist of α_1 -adrenoreceptor (Frishman WH, 2008). Newly published data show that carvedilol exerts antithrombotic activity in vivo, probably due to its metabolites, which act as a β_2 adrenoreceptor agonists (Kozlovski VI, 2015).

Aim of the study: To evaluate antithrombotic properties of carvedilol and its metabolites using the method of intravital real time laser-induced thrombosis.

Materials and methods: Green fluorescent protein (GFP)–expressing transgenic mice (18-22g) were anaesthetized 20 min before the surgical procedure with xylazine (12.5 mg/kg, i.p.) and ketamine (120 mg/kg, i.p.). The mesenteric vascular bed was exposed after making

a midline laparotomy incision. For intravital fluorescence confocal microscopy of the microcirculation of a living mouse, we used a Yokogawa Real Time 3D Workstation. Carvedilol was administered per os in the 5% of the mucilage at doses of 3 mg/kg and 10 mg/kg, 30 minutes before the mesenteric vein injury. Doses of carvedilol were chosen on the basis of previously published data. Sterilized tap water served as a control to carvedilol-treated animals. To assess possible involvement of β -receptors in antithrombotic effect of carvedilol, selective β_1 -blocker, atenolol (10 mg/kg, p.o.) was used. We inhibited metabolism of carvedilol with ketoconazole (50 mg/kg, p.o.) which is an inhibitor of CYP3A4 and P-glycoprotein. Additionally, 1-aminobenzotriazole (1-ABT, 200 mg/kg, p.o) was used as a cytochrome P450 2D6 inhibitor. Platelet accumulation in the blood vessel was taken as a marker of antithrombotic effect.

Results: Carvedilol (3 mg/kg) significantly decreased platelet accumulation at the site of endothelial injury (2349 ± 333 units vs VEH 50299 ± 12130 units, $p < 0.01$). Moreover, ketoconazole reversed antithrombotic effect of carvedilol (37929 ± 8628 units vs 2349 ± 333 units, $p < 0.01$), while atenolol or 1-ABT do not reversed this effect. Ketoconazole, atenolol nor 1-ABT do not exert antiplatelet effect when administrated alone.

Conclusion: For the first time we have shown that carvedilol exerts antiplatelet activity under intravital conditions. Due to the abolished antiplatelet effect after ketoconazole administration we conducted that antiplatelet effect of carvedilol is dependent on its metabolites. Wherefore the antiplatelet effect after carvedilol administration is independent on β_1 receptors or CYP3A4 (atenolol or 1-ABT do not reversed the effect, respectively). In conclusion, carvedilol may be a novel alternative treatment of thrombosis and further intravital studies will be performed.

THE EFFECT OF CORM-A₁, NaNO₂ AND INDOMETHACIN ON MICE BREAST CANCER CELLS (4T1-IRFP) METASTASES FORMATION IN THE LIVER AND LUNGS.

Leszczynska A¹, Marcinczyk N¹, Jarmoc D¹, Czajkowski P^{1,2}, Kramkowski K¹.

¹Laboratory of Biopharmacy, Medical University of Białystok, Poland. ²Clinical Research Centre, Medical University of Białystok, Poland.

email: wacam@poczta.onet.pl

Aim: The aim of the study was to determine the influence of carbon monoxide donor (CORM-A₁), nitric oxide donor (NaNO₂) and indomethacin on mice breast cancer (4T1-IRFP) metastases formation in the liver and lungs.

Methods: The study was conducted using the model of mice breast cancer cells (4T1-IRFP) transplanted intravenously into female BALB/c mouse. 4T1-IRFP cells were resuspended in HBSS (a suspension of 10⁴ of 4T1 IRFP cells in 0.1 ml HBSS) and were injected into the femoral vein of each female BALB/c in a following time schedule: 20min after oral administration of CORM-A₁ (30 µmol/kg), or 5min after oral administration of NaNO₂ (0,17 mmol/kg), or 2h after oral administration of indomethacin (2 mg/kg). To determine the anti-metastatic activity of the compounds, the right lobe of the liver and the inferior lobe of the right lung were cut off 20 minutes after 4T1 cells injection. The liver was scanned within 40 µmeter of tissue and the aggregates of cancer cells in the lung were scanned throughout the volume with 640 nm excitation laser using confocal microscopy system. The amount of 4T1 cells in the liver and the volume of the cancer cells aggregates in the lungs were calculated using SlideBook6.

Confocal system arranged in our laboratory is dedicated for intravital real-time visualisation of dynamic processes of cells interactions.

Results: CORM-A₁ decreased the volume of the cancer cells aggregates (7578±1300 µmeter³ vs VEH 9658±860 µmeter³, p<0,05), and indomethacin increased the volume of cancer cells aggregates (23548±9279 µmeter³, p<0,001) in the lungs, while NaNO₂ increased the number of the cells embedded in the liver (47±7 u vs VEH 24±3 u, p<0,05) as well as the volume of aggregates in the lungs (17226±3269 µmeter³ vs VEH 9658±860 µmeter³, p<0,05).

Conclusions: We observed different effects of CORM-A₁, NaNO₂ and indomethacin on mice breast cancer cells (4T1-IRFP) metastases formation in the liver and lungs: carbon monoxide donor (CORM-A₁) decreases, while nitric oxide donor (NaNO₂) and indomethacin enhance metastases formation of 4T1 IRFP breast cancer cells.

Additionally, we standardized the method of intravital visualization of antimetastatic drug activity in parenchymal organs.

GUT MICROBIOTA IN HYPERTENSIVE OVERWEIGHT AND OBESE SUBJECTS

J. Karbowska¹, A. Janczy², Z. Kochan², S. Malgorzewicz³

¹Department of Biochemistry, ²Department of Nutritional Biochemistry, ³Department of Clinical Nutrition and Dietetics, Medical University of Gdansk, Gdansk, Poland

email: jonka@gumed.edu.pl

The intestinal microbiome plays a vital role in human health. Numerous studies have demonstrated that an imbalance of gut bacteria (dysbiosis) is associated with immune dysfunction, obesity, insulin resistance and cardiovascular diseases, including atherosclerosis and hypertension. In humans, the majority of the gut microbiota belongs to four bacterial phyla: *Firmicutes* (64%), *Bacteroidetes* (23%), *Proteobacteria* (8%), and *Actinobacteria* (3%). In experimental models of hypertension, changes in the relative abundance of the two dominant bacterial phyla, *Firmicutes* and *Bacteroidetes*, have been shown to contribute to the increased blood pressure. In order to investigate the possible association of hypertension with the dysbiosis of the intestinal microbiota, we determined the relative proportions of *Firmicutes* and *Bacteroidetes* in hypertensive and normotensive individuals.

Faecal samples were obtained from 56 adult subjects, 43 women and 13 men, enrolled in a randomised trial evaluating the effects of probiotic supplementation on weight loss. All participants of the study were overweight or obese Caucasians (BMI > 25 kg/m²) and 20 of them were hypertensive. The hypertensive group consisted of 18 women (90%) and 2 men (10%) aged from 27 to 64 yr (the mean age in this group was 49.60 ± 2.36 yr). In the normotensive group, there were 25 women (69.4%) and 11 men (30.6%) and these subjects ranged in age from 18 to 66 yr, with an average age of 35.83 ± 2.21 yr. The BMI range was 27.6-56.4 kg/m² (the mean BMI: 37.09 ± 1.63 kg/m²) for hypertensive and 24.9-49.6 kg/m² (mean: 31.86 ± 1.04 kg/m²) for normotensive participants. In the hypertensive group, the body weight ranged from 69.0 to 170.4 kg (the mean body weight was 101.54 ± 6.00 kg), while in normotensive subjects it ranged from 55.4 to 137.9 kg (mean: 92.75 ± 3.40 kg). The faecal samples were analysed by quantitative PCR for the presence and abundance of *Firmicutes* (*Enterococcus*, *Clostridium*, and *Lactobacillus*) and *Bacteroidetes* (*Bacteroides*).

We observed an increase in the numbers of *Clostridium* spp. in hypertensive subjects as compared to normotensive individuals (4.63 x10⁵ vs. 1.45 x10⁵ CFU/g). In contrast, the levels of *Lactobacillus* spp. were lower in hypertensive than in normotensive subjects (8.88 x10⁵ vs. 29.94 x10⁵ CFU/g). There was no difference in the abundance of *Enterococcus* spp. and *Bacteroides* spp. between hypertensive and normotensive participants of the study (*Enterococcus*: 8.22 x10⁶ vs. 7.74 x10⁶ CFU/g, *Bacteroides*: 1.82 x10⁹ vs. 1.70 x10⁹ CFU/g).

These results indicate that hypertension in overweight and obese subjects is associated with a dysbiosis of the gut microbiota. The finding that the *Lactobacillus* spp. counts are lower in hypertensive than in normotensive individuals is of special interest in view of the published data showing that intestinal lactobacilli produce peptides that inhibit angiotensin-converting enzyme (ACE) activity. Therefore, the dietary intervention and/or supplementation of probiotics should be considered in order to change the gut microbiome composition and to reduce the risk of cardiovascular diseases.

SERUM LEVELS OF VITAMIN D IN RELATION TO DIETARY INTAKE AND SUPPLEMENTATION OF VITAMIN D IN PATIENTS WITH FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLAEMIA

N. Szupryczyńska¹, A. Wojda¹, M. Pajkowski², M. Lipiński³, K. Chlebus², R.T. Smoleński⁴, Z. Kochan¹

¹ Department of Nutritional Biochemistry, Medical University of Gdańsk ² 1st Department of Cardiology, Medical University of Gdańsk ³ Department of Pharmaceutical Biochemistry, Medical University of Gdańsk ⁴ Department of Biochemistry, Medical University of Gdańsk

email: n.szupryczynska@gumed.edu.pl

Aim: Familial hypercholesterolaemia (FH) is a genetic disorder characterized by high serum cholesterol levels, specifically very high levels of LDL. Vitamin D is an important factor in prevention and treatment of not only bone-related diseases, but also those of cardiovascular and metabolic origin, as well as neoplasms. The supplementation and food sources of vitamin D could be one of the components of the maintenance of adequate vitamin D levels.

Materials and methods: The study includes 21 adults, both men and women, with familial hypercholesterolaemia, patients of the 1st Department of Cardiology at the Medical University of Gdansk. The control group consists of sex- and age-matched healthy adult volunteers. Serum vitamin D levels were determined using LC-MS/MS. The analysis was performed on SHIMADZU LCMS 8050 with triple quadrupole and Nexera X2 HPLC system. Eating habits of FH patients and controls were estimated with FFQ-6 (Food Frequency Questionnaire with 6 answers), supplementation data were collected during nutritional interviews.

Results: Serum vitamin D levels were similar in both groups. However, a bigger percentage of FH patients achieved adequate vitamin D levels in comparison to the controls. Patients undergoing statin treatment had greater serum vitamin D levels in contrast to those not treated with statins. The intake of oily fish was lower in FH patients than in the control group. Patients without statin treatment more frequently ate both white and oily fish than patients with statin treatment. In all groups, there were no significant differences between frequency of fish intake, which are the major vitamin D source, but there were differences in butter and egg consumption. The majority of the control group (42% in comparison to 16% in the FH group) took vitamin D supplementation and ate more fish. Nevertheless, they had similar concentrations of vitamin D in the blood like their FH counterparts.

Conclusions: Determination of vitamin D and its metabolites, concurrent with the assessment of dietary intake, allows to satisfactorily monitor the actual vitamin status of the patients with familial hypercholesterolaemia. Further analysis is needed to understand the influence of this disease and its treatment on the vitamin D levels.

OCENA NAWYKÓW ŻYWIENIOWYCH PACJENTÓW Z HIPERCHOLESTEROLEMIĄ RODZINNĄ

A. Wojda¹, N. Szupryczyńska¹, M. Pajkowski², K. Chlebus², Z. Kochan¹

¹Zakład Biochemii Żywności, Gdański Uniwersytet Medyczny, Gdańsk, Polska ²I Klinika i Katedra Kardiologii, Gdański Uniwersytet Medyczny, Gdańsk, Polska

email: a.wojda@gumed.edu.pl

Cel: Prawidłowe nawyki żywieniowe wśród pacjentów chorujących na hipercholesterolemię rodzinną (FH) mogą wpływać na obniżenie stężenia cholesterolu oraz poprawę profilu lipidowego. Jadłospis takich pacjentów powinien się charakteryzować przede wszystkim ograniczeniem tłuszczów nasyconych (zawartych w takich produktach, jak: wędliny, sery, słodczyce, słone przekąski) oraz cholesterolu (jajka, przetwory jajeczne, produkty pochodzenia zwierzęcego). Jednocześnie należy zwrócić uwagę na zwiększenie podaży źródeł kwasów omega-3 w diecie (ryby morskie, olej rzepakowy, oliwa z oliwek, olej lniany, nasiona chia). Celem badań była analiza nawyków żywieniowych pacjentów z FH.

Metody: Konsultacje żywieniowe zostały przeprowadzone z pacjentami z FH, leczonymi w I Klinice i Katedrze Kardiologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Z każdym z pacjentów wypełniono kwestionariusz częstotliwości spożycia FFQ (Food Frequency Questionnaire) w celu oszacowania częstości spożycia produktów żywnościowych bogatych w tłuszcze nasycone lub cholesterol oraz produktów bogatych w wielonienasycone kwasy z grupy omega-3 w czasie ostatnich 12 miesięcy.

Wyniki: W badaniu uczestniczyło 21 pacjentów z FH (15 kobiet i 6 mężczyzn). Z analizy spożycia produktów mięsnych wynika, że mięso drobiowe było częściej wybierane przez badanych niż mięso wieprzowe czy wołowe – ponad połowa pacjentów wybierała drób (z odpowiedzią „kilka razy w tygodniu lub częściej”), zaś mięso wieprzowe lub wołowe tylko 14%. Około 60% respondentów spożywało jaja i potrawy z jaj kilka razy w miesiącu, 33% wybierało jaja kilka razy w tygodniu i tylko 5% respondentów określało spożycie jaj jako „nigdy lub prawie nigdy”. Spożycie słodczych i słonych przekąsek było zróżnicowane, jednak spożycie czekolady, cukierków czekoladowych i batonów było nadzwyczaj częste (ok. 14% badanych wskazało codzienne spożycie, około 19% osób wskazało odpowiedź „kilka razy w tygodniu”; 40% spożywało wymienione produkty kilka razy w miesiącu). Niepokojące również były odpowiedzi dotyczące spożycia ryb, w szczególności ryb tłustych – ponad połowa respondentów (57%) wskazała odpowiedź „kilka razy w miesiącu”, 29% wskazało „raz na miesiąc lub rzadziej”, zaś 5% przyznało, że tłuste ryby wybiera „nigdy lub prawie nigdy”. Dużą popularnością cieszyły się warzywa i owoce – najczęściej wskazywano odpowiedzi „kilka razy w tygodniu” (47% warzywa i 42% owoce), „codziennie” (24% i 28%) oraz „kilka razy dziennie” (19% i 10%).

Wnioski: Wstępna analiza udzielonych przez pacjentów z FH odpowiedzi dotyczących częstości spożycia różnych grup żywności wykazała, że wymagana jest dodatkowa edukacja żywieniowa w zakresie jakości wybieranej żywności – należy zwrócić większą uwagę pacjentów na konieczność ograniczenia spożycia produktów będących źródłami nasyconych kwasów tłuszczowych i cholesterolu, a także polecić częstsze sięganie po źródła wielonienasyconych kwasów tłuszczowych z grupy omega-3.

Indeks autorów:

Aleksandrowicz M.	S4.2	Labeledz W.	S3.6
Aleksiejczuk M.	S1.2, P1	Lango R.	S5.2
Bar A.	S3.4	Leszczynska A.	S1.4, P5, P6, P7
Baranowska-Kuczko M.	S4.1	Lewandowski J.	S3.2
Bartoszewski R.	S5.1	Lewicka E.	S2.2
Bednarek-Rajewska K.	S2.4	Lewicka-Potocka Z.	S2.2
Bierla J.	S2.3	Lipinski M.	P9
Borowiec M.	S1.1	Mackiewicz U.	S2.3, S2.4, S3.3
Buchner T.	S4.4	Maczewski M.	S2.3, S2.4, S3.3
Budzianowski J.	S2.5	Majewski M.S.	S5.4
Bulinska A.	S4.3, S5.5	Majewski P.	S2.4
Chabielska E.	S1.2, S1.4, P1	Malcher A.	S3.2, S3.5, S3.6
Chlebus K.	P9, P10	Malgorzewicz S.	P4, P8
Chlopicki S.	S3.4, S5.1	Malinowska B.	P2
Chojnacka K.	S2.4	Marcinzyk N.	S1.4, P5, P6, P7
Czajkowski P.	P5, P6, P7	Mateuszuk L.	S5.1
Czarnowska E.	S2.3	Minczuk K.	P2
Czepulis N.	S1.3	Mironiuk K.	P3
Dabrowska-Kugacka A.	S2.2	Nowaczyk M.	S3.6
Deja M.	S3.1	Nowicka-Bauer K.	S3.5
Drobnik J.	S5.3	Olkowicz M.	S3.4
Dzieciol J.	P1	Orzylowska A.	S3.4
Fiedorowicz K.	S3.5	Pajkowski M.	P9, P10
Gajecka M.	S5.4	Paterek A.	S3.3
Gajecki M.	S5.4	Pelikant-Malecka I.	S4.3, S5.5
Galdaszyńska M.	S5.3	Piekarska M.	S3.1
Gogga P.	P4	Raczak G.	S2.2
Gonet M.	S3.4	Rogowski J.	S5.2
Gromotowicz-Popławska A.	S1.2, S1.4, P1	Rozwadowska N.	S2.4, S3.2, S3.5, S3.6
Grzeda E.	P2	Rugowska A.	S2.4, S3.2
Grzegorzewski W.	S5.4	Rynkiewicz A.	S5.4
Grzelczak J.	S1.3	Serocki M.	S5.1
Jablonska M.	S3.4	Sikora A.	P5
Jablonska P.	S5.2	Skorka T.	S3.4
Janczy A.	P8	Sliwinska A.	P4
Jarmoc D.	S1.4, P5, P6, P7	Ślomska E.M.	S4.3, S5.1, S5.2, S5.5, S5.6
Jasinski K.	S3.4	Smolenski R.T.	S3.4, S4.3, S5.1, S5.2, S5.5, S5.6, P9
Jasztal A.	S5.1	Strawa J.	S1.4
Kaja M.	S4.4	Sucajtys-Szulc E.	S5.1
Kaleta A.M.	S2.2	Szemraj J.	S1.2
Karbowska J.	P8	Szupryczyńska N.	P9, P10
Karpinska O.	S4.1	Toczek M.	P2
Karpinski K.	S1.3	Toczek M.	S5.6
Kepska M.	S2.3, S3.3	Tomczyk M.	S1.4
Kloza M.	S4.1	Tyrankiewicz U.	S3.4
Kochan Z.	P3, P8, P9, P10	Witowski J.	S1.3
Kolanowski T.J.	S3.2, S3.5	Wojda A.	P9, P10
Kolodziejczyk J.	S2.3, S3.3	Wrona E.	P4
Korybalska K.	S1.3, S2.5	Zabielska M.A.	S4.3, S5.1, S5.5
Kossakowski R.	P2	Zakrzęska A.	S1.4
Kozłowska H.	S4.1	Zimna A.	S3.2, S3.5, S3.6
Koznińska E.	S4.2	Zoladz J.A.	S3.4
Kramkowski K.	S1.4, P5, P6, P7	Zukowska P.	S5.1, S5.2, S5.6
Krzyminska A.	S5.3		
Kubaszewski L.	S3.6		
Kurpisz M.	S2.4, S3.2, S3.5, S3.6		
Kutryb-Zajac B.	S4.3, S5.1, S5.2, S5.6		