XIX Sympozjum
Sekcji Kardiologii Eksperymentalnej

Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego

oraz

Komitetu Nauk Fizjologicznych i Farmakologicznych Polskiej Akademii Nauk

Gdańsk, 6-8 listopad 2014

KOMITET ORGANIZACYJNY:

Przewodniczący: dr hab. Ryszard T. Smoleński

dr hab. Ewa Maria Słomińska
dr hab. Tomasz Wierzba

Dane kontaktowe organizatorów:

rt.smolenski@gumed.edu.pl

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 sympozjum:

blirt®
Biolab Innovative Reaserch Technologies

Analytical Services in GLP standard
BLIRT Sp. z o.o.
Ul. Trzy lipy 3/1.38
80-172 Gdańsk
Poland

Gospodarstwo Ogrodnicze
Teresa Pietras
Piotr Pietras
Gdańsk

PROCAM
AGRONOMIA SUKCESU

PROGRAM SYMPOZJUM

CZWARTEK

16.00-18.30	**Rejestracja uczestników**
18.30- 19.10	**Wykład dr hab. Ewa Stępień** *MikroRNA - nowy marker diagnostyczny czy cel terapii w leczeniu powikłań niedokrwienia mięśnia sercowego.*
19.10-…	**Spotkanie przy lampce wina**

PIĄTEK

8.30 – 10.40

Sesja I – Śródbłonek, zastawki, naczynia cz.I
Przewodniczący sesji: Dr hab. Urszula Mackiewicz

8.30-9.00 **Extracellular Nucleotide Catabolism on the Surface of Human Aortic Valves and its Changes in Pathology** B Kutryb-Zając, P Jabłońska, P Żukowska, M Toczek, R Lango, J Rogowski, MH Yacoub, EM Słomińska, RT Smoleński

9.00-9.20 **Von Willebrand factor – endothelial biomarker detected by quantitative LC-MS/MS measurements** J Suraj, M Olkowicz, A Kowalska, A Zakrzewska, K Kuś, S Chlopicki, M Walczak

9.20-9.40 **Metoda przyżyciowej oceny działania związków wpływających na funkcję śródbłonka i płytek krwi w czasie rzeczywistym, za pomocą mikroskopii konfokalnej. Oferta dla przemysłu i laboratoriów naukowych.** K Kramkowski, A Leszczynska, K Przyborowski, U Rykaczewska, S Chlopicki, W Buczko.

9.40-10.00 **Anti-platelet effect of nitrite in vivo dependents on xanthine oxidoreductase (XOR).** K Kramkowski, A Leszczynska, K Przyborowski, T Kaminski, U Rykaczewska, B Sitek, B Proniewski, A Chmura-Skirlinska, RT Smolenski, W Buczko, S Chlopicki.

10.00-10.20 **Sezonowe zmiany ekspresji homologów Nox1, Nox2, Nox4 i Nox5 oksydazy NADPH w sercu świnki morskiej** A Gajos, A Beręsewicz

10.20–10.40 **What is the source of anticontractile factor released by the pedicle of human internal thoracic artery?** K Kociszewska, M Malinowski, P Czekaj, MA Deja

10.40-11.10 **Przerwa kawowa**

11.10-13.50

Sesja II – Śródbłonek, zastawki, naczynia cz.II
Przewodniczący sesji: Prof. Maciej Kurpisz

11.10-11.30 **Modyfikacja właściwości skrzepu fibrynowego przez antagonistów witaminy K u pacjentów z migotaniem przedsionków: związek z czynnikami krzepnięcia i generacją trombiny** M Ząbczyk, J Majewski, G Karkowski, A Undas

11.30-11.50 **Ocena wpływu IL-4 na ekspresję mRNA receptorów wysokiego (FcεRI) i niskiego (FcεRII) powinowactwa dla przeciwciał IgE na pierwotnych aortalnych komórkach śródbłonka naczyniowego** P Gorzelak-Pabiś, K Wojdan, E Łuczak, K Antosik, M Borowiec, M Chałubiński, M Broncel

11.50-12.10 **Wpływ lipopolisacharydu E. coli na integralność ludzkiego śródbłonka naczyniowego i profil cytokinowy komórek dendrytycznych w odpowiedzi na czynniki miażdzycogenne: apolipoproteinę B100 i 7-ketocholesterol** M Chałubiński, K Wojdan, E Łuczak, A Gajewski, K Rudnicka, M Borowiec, M Chmiela, M Broncel

12.10-12.30 **Effects of pulmonary hypertension on heart contractility: gender dependence** K Sztormowska Achranowicz, I Kocić, Z Jankowski

12.30-12.50 **Modyfikacja zależnej od kanałów potasowych odpowiedzi rozkurczowej naczyń krezkowych izolowanych od szczurów z nadciśnieniem wtórnym (DOCA-salt).** M Kloza, O Karpińska, M Baranowska-Kuczko, B Malinowska, E Harasim, E Grzęda, H Kozłowska

12.50-13.10 **Czy LY393558, jednoczesny antagonista receptorów 5-HT_{1B} i inhibitor transportera serotoniny SERT, może być stosowany w leczeniu tętniczego nadciśnieniu płucnego?** O Karpińska, M Baranowska-Kuczko, M Kloza, M Kozłowski, M Göthert, B Malinowska, H Kozłowska

13.10-13.30 **Effect of oxidized LDL CD39 and CD73 in human aortic valve endothelial cells** E Kaniewska, M Mielcarek, A Sielicka, I Pelikant-Małecka, A Chester, M H Yacoub, RT. Smoleński

13.30-13.50	**Ocena funkcji komórek śródbłonka naczyniowego u pacjentów otyłych przed i po umiarkowanej restrykcji kalorycznej** K Korybalska, J Łuczak, E Swora-Cwynar, A Kanikowska, N Czepulis, D Kanikowska, M Grzymisławski, J Witowski
14.00-15.00	**Obiad**
15.00-15.40	**Wykład dr Michał Mielcarek** *Cardiac dysfunction In Huntington's disease*
15.40–17.20	**Sesja III – Niewydolność i choroba niedokrwienna cz.I** **Przewodniczący sesji: Prof. Marek Deja**
15.40-16.00	**Eksperymenty *In vitro* modelu oryginalnej protezy zastawki aortalnej.** P Siondalski, K Dawidowska, M Ditrich, L Wilczyński
16.00-16.20	**Inhibition of AMP Deaminase is Cardioprotective in Acute Oxygen Deprivation in ApoE$^{-/-}$/LDLR$^{-/-}$AMPD$^{-/-}$ CRE^{+} triple knock- out mice** M Zabielska, B Kutyb- Zajac, EM Slominska, RT Smolenski
16.20-16.40	**Spontaneous physical activity inhibits progression of heart failure in Tgαq*44 mice at early as well as at advanced stage of disease** U Tyrankiewicz, T Skórka, M Jabłońska, A Osiak, K Jasiński, A Osip, M Wojewoda, JA Żołądź, S Chlopicki
16.40-17.00	**Cechy sercowych mezenchymalnych komórek zrębu CD105+CD34- i ich wpływ na strukturę pozawałowego serca myszy** S Matuszczak, J Czapla, E Wiśniewska, M Jarosz-Biej, R Smolarczyk, T Cichoń, J Śliwka, M Garbacz, T Jaźwiec, K Kozieł, M Zembala, M Zembala, S Szala
17.00-17.20	**Wpływ inhibitora rozkładu anandamidu URB597 na wybrane parametry izolowanego serca i lewego przedsionka szczurów z nadciśnieniem DOCA–salt.** J Weresa, A Pędzińska-Betiuk, M Toczek, B Malinowska
17.20-17.50	**Przerwa kawowa**
17.50–19.20	**Sesja IV – Niewydolność i choroba niedokrwienna cz.II** **Przewodniczący sesji: Dr hab. Ryszard T. Smoleński**
17.50-18.10	**Polihedrocyty w skrzeplinach z tętnic wieńcowych od pacjentów w ostrej fazie zawału serca** M Ząbczyk, M Sadowski, J Zalewski, A Undas
18.10-18.30	**Therapeutic potential of cardiac stromal stem cells (CStC) isolated from failing human heart in a mice model of chronic myocardial ischemia.** M Garbacz, A Sliwka, T Jazwiec, K Kozieł, M Jarosz-Biej, J Czapla, S Matuszczak, E Wiśniewska, T Cichoń, R Smolarczyk, P Wilczek, M Zembala, S Szala, M Zembala jr.
18.30-18.50	**Heme oxygenase-1 deficiency is associated with increased post-myocardial infarction monocyte mobilization and impaired heart function** A Jaźwa, M Tomczyk, K Bukowska-Strakova, K Szade, A Józkowicz, J Dulak
18.50-19.10	**Effect of graded ischemia on cardiac metabolism and function of AMP deaminase 3 knock-out mice.** M Toczek, P Żukowska, E Słomińska , RT Smoleński
19.10-19.30	**The comparison of tissue saturation during vascular occlusion test under sevoflurane and propofol anaesthesia in various phases of heart surgery with cardiopulmonary bypass.** A Biedrzycka, R Lango
19.30-19.50	**Masitinib has neuroprotective effect in rats with post- ischemic stroke** I Kocic, P Kowianski, I Rusiecka, G Lietzau, C Mansfield, A Moussy, O Hermine, P Dubreuil
20.00 - …	**Kolacja**

SOBOTA

9.00-9.30	**Wykład dr hab. Tomasz Śledziński** *The importance of fatty acid pattern and synthesis In cardiovascular disease*
9.30-11.10	**Sesja V – Lipidy i aspekty dietetyczne** **Przewodniczący sesji: Prof. Andrzej Beręsewicz**
9.30-9.50	**Rola ośrodkowej interakcji między układem apelinergicznym i wazopresynergicznym w regulacji czynności układu sercowo-naczyniowego** O Borowik, K Kolaszyńska, K Czarzasta, A Cudnoch-Jędrzejewska
9.50-10.10	**Hemodynamic effects of acute and chronic administration of hydrogen sulfide in rats with fructose-induced metabolic syndrome.** M Sikora, K Kolaszyńska, A Drapała, J Skrzypecki, M Ufnal
10.10-10.30	**A link between the loss of ecto-5'-nucleotidase activity and aortic valve dysfunction in mice** P Żukowska, I Rybakowska, B Kutryb-Zając, A Jasztal, M Toczek, P Romaszko, T Borkowski, S Chłopicki, RT Smoleński, EM Słomińska
10.30-10.50	**Effect of pravastatin on lipid profile and area of atherosclerotic lesions in ApoE/LDLR$^{-/-}$ double knockout mice fed control and low carbohydrate, high protein diet.** A Manterys, M Franczyk-Żarów, I Czyżyńska-Cichoń, A Drahun, E Maślak, S Chłopicki, RB Kostogrys
10.50-11.10	**The effect of oxidized cholesterol on barier functions and IL-10 mRNA expression In human intestinal epithelium co-cultured with dendritic cells In the transwell system** M Chalubinski, K Wojdan, P Gorzelak, M Borowiec , M Broncel
11.10-11.40	**Przerwa kawowa**
11.40-13.20	**Sesja VI – Symulacje i zaawansowane techniki obliczeniowe** **Przewodniczący sesji: Dr hab. Tomasz Wierzba**
11.40-12.00	**Visualization of short-term heart period variability with network tools** D Makowiec
12.00-12.20	**Komputerowa analiza obrazów SEM skrzepów fibrynowych z użyciem metody macierzy współwystąpień (GLCM).** J Siudut, J Tarasiuk, M Ząbczyk, A Undas
12.20-12.40	**Fraktalne skalowanie drzewa naczyniowego może stanowić substrat dla pierwotnego nadciśnienia tętniczego** T Buchner, T Sobiech
12.40-13.00	**Estimation of growth of human adipose derived stem cells (hADSC) on bio-scaffolds - measurement of the activity of ecto-5'-nucleotidase.** A Sielicka, E Kaniewska, I Pelikant-Malecka, EM. Slominska, RT. Smolenski
13.00-13.20	**Przewidywanie odpowiedzi sercowej na próbę symulowanego nurkowania w oparciu o spoczynkową częstość akcji serca wyznaczaną w sposób wielomodalny.** TH Wierzba, K Malinowski, S Zajączkowski, M Smolińska
13.30-14.30	**Obiad**
14.30-…	**Zakończenie sympozjum**

STRESZCZENIA

MikroRNA - nowy marker diagnostyczny czy cel terapii w leczeniu powikłań niedokrwienia mięśnia sercowego

Ewa Stępień

Zakład Fizyki Medycznej, Instytut Fizyki im. Mariana Smoluchowskiego, Uniwersytet Jagielloński, Kraków, Polska

Upłynęły prawie dwie dekady od czasu kiedy Andrew Fire i Craig Mello opublikowali doniesienie, że dwuniciowe krótkie fragmenty RNA (dsRNA) mogą powodować ”wyciszenie” genów, specyficzne dla danych sekwencji RNA (1998). Efekt ten nazwano interferencją RNA (RNAi) i uhonorowano odkrywców Nagroda Nobla w dziedzinie medycyny w 2004 roku. Dopiero kolejne doświadczenia dokumentające, że efekt ten jest konserwatywnym ewolucyjnie i uniwersalnym mechanizmem protekcyjnym i regulującym metabolizm komórkowy na poziomie transkrypcji genowej. Intensywne poszukiwania specyficznych, jak sadzono wówczas, sekwencji RNA odpowiedzianych za regulację genów pokazały, że jednym z ważniejszych elementów tego procesu są krótkie są fragmenty RNA o długości ok. od 19 do 23 nt powstające zazwyczaj wskutek cięcia dsRNA lub shRNA przez enzym endonukleazę Dicer. Cząsteczki te nazwano miRNA, wyodrębniono je systematycznie z całej grupy innych, niekodujących RNA i rozpoczęto poszukiwania nad ich rolą w fizjologiczną i potencjalnym zastosowaniem w medycynie, jako biomarkera lub potencjalnego leku. W kardiologii rozpoznano szereg miRNA istotnych dla rozwoju komórek serca (miR-1, -133a, -133b, -208, -199, -499), uszkodzenia i regeneracji śródbłonka (miR-15, -16, -126, -34) lub zmian związanych z niedotlenieniem serca (miRNA -1,-21,-133a,-423). Należy zwróć uwagę, że mikroRNA istotne z punktu widzenia diagnostyki kardiologicznej pojawiają się w krążeniu obwodowym stosunkowo szybko (minuty) i utrzymują się z pewną charakterystyczną dla siebie dynamiką.

Przykładem zastosowania interferencji RNA w chorobach układu krążenia jest leczenie hipercholesterolemii. Strategia terapeutyczna polega na zahamowaniu ekspresji białka PCSK9 które wiążąc się z receptorem komórkowym LDL powoduje jego degradację skierowując receptor do lizosomów i zmniejszając wychwyt LDL z krwi. Innym przykładem jest wykorzystanie antysensownego inhibitora dla miR-208 w leczeniu niewydolności serca i innych powikłań metabolicznych w cukrzycy. Mimo, że nie znane są przykłady zastosowań klinicznych w leczeniu powikłań związanych z niedotlenieniem serca, to miR-126 i rodzina miR-15 (-16a, 16b) mogą okazać nieskutecznym celem w ochronie przed skutkami niedokrwienia.

Extracellular Nucleotide Catabolism on the Surface of Human Aortic Valves and its Changes in Pathology

Barbara Kutryb-Zając[1], Patrycja Jabłońska[1], Paulina Żukowska[1], Marta Toczek[1], Romuald Lango[2], Jan Rogowski[3], Magdi H. Yacoub[4], Ewa M. Słomińska[1], Ryszard T. Smoleński[1]

[1]Department of Biochemistry, [2]Department of Cardiac Anesthesiology, [3]Chair and Clinic of Cardiac and Vascular Surgery, Medical University of Gdansk, Gdansk, Poland
[3]Heart Science Centre, Imperial College of London at Harefield Hospital, London, United Kingdom

*b.kutryb-zajac@gumed.edu.pl

Enzymes of extracellular nucleotide metabolism participate in regulatory functions, such as immunomodulation, thromboregulation, bone remodeling or cell proliferation by controlling extracellular nucleotide metabolite concentrations. In valves, disturbances of these processes may lead to calcification. This study aimed to investigate the changes in extracellular nucleotide metabolism in pathology of human aortic valves.

Stenotic aortic valves were obtained from patients after aortic valve replacement (n=101) and non-stenotic valves were obtained after heart transplantation or Bentall procedure (n=19). Valves were analyzed for ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (eNTPD), ecto-5'-nucleotidase (e5NT) and ecto-adenosine deaminase (eADA) activities by exposing specific area of fibrosa or ventricularis side to medium with nucleotide substrates and tracing conversions by high performance liquid chromatography. Valvular Ca^{2+}, Mg^{2+} and PO_4^{3-} deposits were estimated colorimetrically. Obtained results were correlated with echocardiography and laboratory clinical data.

On the fibrosa of stenotic aortic valve, activities of eNTPD, e5NT and eADA were 1.80±0.09, 1.23±0.07, 0.95±0.08 nmol/min/cm^2 (mean±SEM), respectively. Whereas, in the non-stenotic valves these activities were higher: 2.52±0.29 (eNTPD) and 1.95±0.21 (e5NT) or lower: 0.54±0.08 nmol/min/cm^2 (eADA). No differences between stenotic and non-stenotic valves were observed on the ventricular side. Negative correlations were found between activity of ecto-nucleotidases, valvular deposits, severe stenosis echocardiography parameters and plasma low density lipoproteins as well as between eADA activity and high density lipoproteins. Positive correlations were demonstrated between ecto-nucleotidases and prothrombin time, between eADA activity and blood pressure and valvular PO_4^{3-}.

These results demonstrated that extracellular nucleotide breakdown in the valve is adversely modified in aortic stenosis. Diminished activities of eNTPD and e5NT with increase in eADA activity may affect extracellular nucleotide concentrations in the way that favors valve inflammation and calcification.

This research was conducted within the project „Nucleotides in pathology, diagnosis and therapy of heart disease" that is co-financed by European Union within European Regional Development Fund of Innovative Economy Programme and Programme TEAM of Foundation for Polish Science

Von Willebrand Factor - endothelial biomarker detected by quantitative LC-MS/MS measurements

Joanna Suraj[1,2*], Mariola Olkowicz[4,5], Anna Kowalska[1], Agnieszka Zakrzewska[1], Kamil Kuś[1,2], Stefan Chlopicki[1,3], Maria Walczak[1,2]

[1] Jagiellonian Centre for Experimental Therapeutics (JCET), Jagiellonian University, Bobrzynskiego 14, 30-348 Krakow, [2] Department of Pharmacokinetics and Physical Pharmacy, Jagiellonian University Medical College, Medyczna 9, 30-688 Krakow, [3] Department of Experimental Pharmacology, Jagiellonian University Medical College, Grzegorzecka 16, 31-531, Krakow, [4]Department of Biochemistry, Medical University of Gdansk, Debinki 1, 80-211, Gdansk, [5]Department of Biotechnology and Food Microbiology, Poznan University of Life Sciences, Wojska Polskiego 48, 60-627, Poznan

*joanna.suraj@jcet.eu

Introduction: Von Willebrand Factor (vWF) is a large multimeric plasma protein that contains many domains which demonstrate their own significant function in human body. vWF plays crucial roles in platelet adhesion and aggregation which are classified as the initial steps in thrombus formation. Von Willebrand Factor is produced constitutively in endothelial cells, megakaryocytes and subendothelial tissues and is released upon endothelial damage, resulting in the significant elevation of its endogenous concentration in plasma. Accordingly, the vWF may be used successfully as a biomarker of endothelial dysfunction that is associated with pro-thrombotic phenotype.

The aim of this research was to develop a new nanoLC-MS/MS method for simultaneous detection and quantification of selected fragments of vWF factor in biological samples using its specific for mice and humans peptide fragments. The results of quantification of vWF concentration may be important in clinical diagnoses of endothelial dysfunction.

Materials and methods: In this research characteristic amino acid sequences of the investigated protein fragments were identified using high-resolution mass spectrometer Orbitrap XL Discovery (Thermo Scientific) and separated on nano liquid chromatography Ultimate 3000 (Dionex) coupled with tandem mass spectrometry QTRAP 5500 (AB SCIEX).

In order to pre-verify new quantitative method the experiment was performed using plasma obtained from C57BL/6J and db/db mice as a control and studied group, respectively. Protein mixtures of each samples were subjected to trypsin digestion, purification and densification using micro extraction according to previously elaborated protocol for sample preparation. Subsequently, obtained peptide fragments of vWF were analyzed using MRM mode in nanoLC-MS/MS configuration.

Results and Conclusions: After preliminary analyses demonstrated that based on the detection of specific and carefully selected fragments it is possible to monitor vWF activity in plasma. Further studies with quantitative mass spectrometry for measurements of changes in the vWF's concentrations in mice with endothelial dysfunction are ongoing.

Acknowledgments: This study was supported by the European Union from the resources of the European Regional Development Fund under the Innovative Economy Programme (grant coordinated by JCET-UJ, No POIG.01.01.02-00-069/09)

Metoda przyżyciowej oceny działania związków wpływających na funkcję śródbłonka i płytek krwi w czasie rzeczywistym, za pomocą mikroskopii konfokalnej. Oferta dla przemysłu i laboratoriów naukowych.

K. Kramkowski[1], A. Leszczynska[2], K. Przyborowski[3], U. Rykaczewska[1], S. Chlopicki[3,4], W. Buczko[1].

[1]Department of Biopharmacy, Medical University in Bialystok, Poland, 15-222 Bialystok, Mickiewicza 2C [2]Department of Pharmacodynamics, Medical University in Bialystok, Poland, 15-222 Bialystok, Mickiewicza 2C. [3]Jagiellonian Centre of Experimental Therapeutics (JCET), Jagiellonian University, Poland, 30-348 Krakow, Bobrzynskiego 14 [4]Department of Experimental Pharmacology, Chair of Pharmacology, Jagiellonian University Medical College, Poland, 31-531 Kraków, Grzegórzecka 16.

Metoda oparta jest na przyżyciowej mikroskopii konfokalnej w czasie rzeczywistym. Po raz pierwszy w takich warunkach możliwe są: Ocena aktywności poszczególnych elementów procesu zakrzepowego (śródbłonek, płytki krwi, niektóre białka osocza) oraz leukocytów w czasie rzeczywistym. - Fizjologia, - Patologia. Szybki skrining in vivo leków o potencjalnym działaniu przeciwzakrzepowym i śródbłonkowym: - „Drug developement", - Farmakologia. Wykrywanie mechanizmów działania leków na płytki krwi i/lub śródbłonek. Efekty działania natychmiastowego i odległego. - Farmakologia.

Dodatkowo istnieje możliwość modyfikacji metody w kierunkach:

1) Zwiększenia rozdzielczości i analiz biochemicznych,
2) Obserwacji narządowych (oko, mózg, wątroba),
3) Obserwacji/eksperymentów długotrwałych, zakładających wybudzenie zwierzęcia,
4) Analiz 4D,
5) Czynnika inicjującego zakrzepicę,
6) Mikrodysekcji przyżyciowej.

Ponadto oferuje się weryfikację pozyskanych wyników innymi metodami badania zakrzepicy u myszy lub szczurów:

1) Metoda zakrzepicy tętniczej stymulowanej prądem u myszy,
2) Metoda zakrzepicy tętniczej stymulowanej prądem u szczurów
3) Metoda zakrzepicy żylnej stymulowanej stazą u szczurów

Anti-platelet effect of nitrite in vivo dependents on xanthine oxidoreductase (XOR).

K. Kramkowski[1*], A. Leszczynska[2], K. Przyborowski[3], T. Kaminski[2], U. Rykaczewska[1], B. Sitek[3], B. Proniewski[3], A .Chmura-Skirlinska[3], RT Smolenski[4], W. Buczko[1], S. Chlopicki[3, 5].

[1]Department of Biopharmacy, Medical University in Bialystok, Poland, 15-222 Bialystok, Mickiewicza 2C, [2]Department of Pharmacodynamics, Medical University in Bialystok, Poland, 15-222 Bialystok, Mickiewicza 2C., [3]Jagiellonian Centre of Experimental Therapeutics (JCET), Jagiellonian University, Poland, 30-348 Krakow, Bobrzynskiego 14, [4]Department of Biochemistry, Medical University of Gdansk, Debinki 1, 80-211 Gdansk, Poland, [5] Department of Experimental Pharmacology, Chair of Pharmacology, Jagiellonian University Medical College, Poland, 31-531 Kraków, Grzegórzecka 16.

For decades nitrites (NO_2^-) and nitrates (NO_3^-) were thought to be the stable end products of nitric oxide (NO) produced by NO synthases (NOS). However, it is evident now that, nitrite is reduced back to bioactive NO along an oxygen and physiological pH gradient by a variety of mechanisms, including enzymatic reduction by deoxyhemoglobin or xanthine oxidoreductase (XOR). Recently, it was demonstrated that nitrite induced vasodilation in hypertensive rats is mediated by XOR-dependent reduction of nitrite to nitric oxide (NO) (Gosh, Hypertension 2013). The aim of this study was to analyze the role of XOX in anti-platelet and antithrombotic activities of nitrite in rats with renovascular hypertension, induced by partial ligation on left renal artery. Arterial thrombosis was induced electrically in carotid artery and nitrite effects on thrombus weight, ex vivo platelet activity, fibrynolysis and coagulation parameters, as well as nitrosylhemoglobin (NOHb) and nitrite/nitrate plasma concentration were assessed in presence and absence of XOX inhibitors. Sodium nitrite ($NaNO_2$) was administered twice a day for 3 days (p.o.) in a dose of 0.17 mmol/kg, and allopurinol (ALLO) and febuxostate (FEB) (p.o.) in doses of 100 mg/kg and 5 mg/kg, respectively, 30 minutes before nitrite administration (n=13-19). Nitrite decreased Thrombus Weight (TW) (0.48±0.03 mg vs. VEH 0.88±0.08 mg; $p<0.001$), but FEB only partially reversed this effect (TW=0.63±0.06 mg; $p<0.05$ vs nitrites), while ALLO was without the effect (TW=0.43±0.02 mg). On the other hand, in nitrite-treated animals, collagen (5 µg/ml)-induced whole blood platelet aggregation *ex vivo* (70.5±7.1% vs VEH 100±4.5%; $p<0.05$) as well as stirring -induced TXB_2 release were substantially reduced while FEB and ALLO fully reversed these effects. NOHb, nitrite/nitrate concentration in plasma increased profoundly in nitrite-treated rats to micromolar range of concentrations. In *in vitro* assay antiplatelet effects of nitrite (10-1000 uM) was fully reversed by FEB not only in normoxic but also in hypoxic conditions. In addition, nitrite treatment decreased PAI-1 concentration (0.47±0.13 ng/ml vs VEH 0.62±0.04 ng/ml; $p<0.05$) and FEB or ALLO reversed this effect (0.66±0.52 ng/ml and 0.69±0.05 ng/ml). In contrast, PT, APTT, TT, fibrinogen level, QUICK, t-PA level, α_2-antiplasmin activity remained unchanged after nitrite treatment. Interestingly, fibrinogen generation was blunted in nitrite-treated animals and neither FEB nor ALLO reversed this effects. In summary, nitrite reduction to NO by XOR , but not by deoxyhemoglobin, plays a major role in antiplatelet effect of nitrite *in vivo* in rats. However, antithrombotic effect of nitrite also involves XOR-independent mechanisms of NO generation affecting coagulation.

Sezonowe zmiany ekspresji homologów Nox1, Nox2, Nox4 i Nox5 oksydazy NADPH w sercu świnki morskiej

Anna Gajos*, Andrzej Beręsewicz

Zakład Fizjologii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego w Warszawie, Polska

*anna_gajos@wp.pl

Naczyniowy stres oksydacyjny (NSO) i dysfunkcja śródbłonkowa są centralnym elementem patomechanizmu choroby sercowo-naczyniowej i takich stanów jak po-reperfuzyjny odczyn zapalny i „*no-reflow phenomenon*". Za NSO odpowiedzialna jest nadprodukcja anionorodnika ponadtlenkowego (O_2^-) przez różne układy enzymatyczne, w tym przez oksydazę NADPH (Nox). W układzie krążenia u ludzi obecne są cztery homologi Nox (Nox1, Nox2, Nox4, Nox5). U gryzoni występują jedynie Nox1, Nox2 i Nox4. Rola poszczególnych Nox w mechanizmie NSO jest słabo poznana. Ostatnio pojawiły się dane, że, paradoksalnie, Nox4 ma ochronne działanie na śródbłonek naczyniowy (*Schröder et al. Circ Res 2012;110:1217-25*). Wykazaliśmy ostatnio (*Konior et al. JMCC 2011;50:686-94*), że w sercu świnki morskiej sezonowi letniemu towarzyszy zwiększona produkcja O_2^- i aktywność Nox oraz dysfunkcja śródbłonkowa. W obecnym badaniu analizujemy sezonowe zmiany ekspresji homologów Nox w izolowanym sercu świnki morskiej. Mierzyliśmy sercową produkcję O_2^- (metoda z cytochromem c) i funkcję śródbłonka (test z acetylocholiną) oraz w homogenatach serc aktywność enzymatyczną Nox (spektrofotometria) i ekspresję białek Nox (Western blot). Eksperymenty zostały wykonane w okresie czerwiec-lipiec vs październik-kwiecień.

Stwierdziliśmy ekspresję Nox5 w sercach świnki morskiej podobnie jak w sercu człowieka (pozytywna kontrola) i brak takiej ekspresji w sercu szczura (negatywna kontrola).

Serca badane w sezonie letnim w porównaniu do sezonu jesień-zima charakteryzowały się: (i) ~2,5-krotnym wzrostem produkcji O_2^-; (ii) ~2,5-krotnym wzrostem aktywności enzymatycznej Nox; (iii) ~80% upośledzeniem reaktywności naczyń wieńcowych na acetylocholinę; (iv) wzrostem ekspresji Nox2 i Nox5; (v) spadkiem ekspresji Nox4; (vi) niezmienioną ekspresją Nox1.

Wnioski; (i) Podobnie jak u człowieka i w przeciwieństwie do szczura i myszy, u świnki morskiej obecny jest Nox5. Dane literaturowe sugerują bliższe genetyczne pokrewieństwo świnki morskiej i człowieka niż myszy/szczura i człowieka. Ergo, NSO u świnki morskiej jest prawdopodobnie lepszym modelem NSO u człowieka.

(ii) Letniemu NSO towarzyszy wzrost ekspersji Nox2 i Nox5 i spadek ekspersji Nox4. W sezonie jesienno/ziomowym spadkowi ekspresjii Nox2/Nox5 towarzyszy wzrost ekspresji Nox4. Sugeruje to, że Nox2/Nox5 oraz Nox4 wzajemnie regulują swoją ekspresję. Mechanizm i znaczenie czynnościowe tej regulacji wymaga dalszych badań.

What is the source of anticontractile factor released by the pedicle of human internal thoracic artery?

Karolina Kociszewska[1,*], Marcin Malinowski[1], Piotr Czekaj[2], Marek A. Deja[1]

[1]*Department of Cardiac Surgery, Medical University of Silesia, Katowice, Poland* [2]*Department of Cytophysiology; Chair of Histology and Embryology, Medical University of Silesia, Katowice, Poland*

*karolina_kociszewska@interia.pl

INTRODUCTION: Perivascular tissue (PVT) surrounding human internal thoracic artery (ITA) releases an unidentified anticontractile factor supposedly released by adipose tissue - adipocyte-derived relaxing factor (ADRF). To look for ADRF source we examined the dilatory response of human ITA to PVT aliquots in relation to PVT histological composition.

METHODS: We studied isolated ITA segments from 20 patients subjected to coronary artery surgery. The vessels were skeletonized in-vitro. ITA rings and PVT were incubated in separate isolated organ baths. Skeletonized ITA segments were precontracted with $10^{-5.5}$M phenylephrine. The 5ml PVT aliquots were next transferred to the ITA tissue bath resulting in its relaxation.

Every PVT specimen was evaluated morphometrically using Image Pro Plus software.

The ITA relaxation to PVT aliquots was correlated to histological composition of PVT.

RESULTS: Phenylephrine elicited 40.6±23.1mN contraction of ITA. Addition of PVT aliquots to the skeletonized ITA induced 44.6±33.6% relaxation. Mean PVT weight was 778.3±346.6mg. The PVT composition was: 34.6±22.4% adipose tissue, 49.6±22.2% skeletal muscle, 16.0±8.4% connective tissue. This translated into 276.3±220.8mg of adipose tissue, 371.6±193.6mg of muscular tissue and 132.3±106.5mg of connective tissue. Neither PVT mass (r=0.2, p=0.9) nor adipose tissue (r= -0.2, p=0.3), muscular tissue (r= 0.3, p=0.2) or connective tissue (r= -0.2, p=0.8) content correlated with ITA relaxation response to PVT aliquots.

CONCLUSIONS: Adipose tissue of the pedicled ITA graft is an unlikely source of ADRF. The exact source of ADRF, as well as its chemical nature, should be further investigated so that we could have the possibility to modulate ADRF function, especially in the state of the disease.

Modyfikacja właściwości skrzepu fibrynowego przez antagonistów witaminy K u pacjentów z migotaniem przedsionków: związek z czynnikami krzepnięcia i generacją trombiny

Michał Ząbczyk[1,2*], Jacek Majewski[1,2], Grzegorz Karkowski[1,2], Anetta Undas[1,2]

[1]*Instytut Kardiologii, Uniwersytet Jagielloński - Collegium Medicum, Polska*
[2]*Krakowski Szpital Specjalistyczny im. Jana Pawła II, Polska*

*michalzabczyk@op.pl

Migotanie przedsionków (AF) ma związek z wysokim ryzykiem wystąpienia incydentów zakrzepowo-zatorowych. Stosowanie antagonistów witaminy K (VKA) skutecznie to ryzyko obniża i poprawia zarazem czynność i strukturę fibryny. Do tej pory nie zidentyfikowano jednak czynników wpływających na właściwości fibryny u chorych na AF rozpoczynających leczenia VKA.

Badano 40 kolejnych pacjentów z AF (28 mężczyzn, wiek od 45 do 83 lat, skala CHA_2DS_2-VASc 3,0±1,5; skala HASBLED 2±1) rozpoczynających terapię warfaryną lub acenokumarolem. Oceniono przepuszczalność skrzepu fibrynowego (Ks) i czas lizy skrzepu metodą turbidymetryczną (CLT) oraz w czasie rzeczywistym z użyciem mikroskopu konfokalnego. Badano także aktywność czynników krzepnięcia (F) i białka C (PC) oraz generację trombiny metodą kalibrowanego automatycznego trombogramu (CAT) w 3, 5, 7, 28 i 56±1 dniu od podania acenokumarolu (n=21) lub warfaryny (n=19) w dawce wyjściowej odpowiednio 4 i 5mg.

Pacjentów z AF charakteryzował o 16% wyższy Ks i o 15% krótszy CLT już w 3 dniu leczenia VKA w porównaniu do dnia przed włączeniem terapii ($p<0,001$ dla obydwu). Analizy przy użyciu mikroskopu konfokalnego potwierdziły wzrost porowatości skrzepu i skrócenie czasu lizy w trakcie antykoagulacji. Ks, ale nie CLT, korelował dodatnio z wartościami INR oraz parametrami CAT od 5 dnia leczenia. Nie zaobserwowano zależności pomiędzy wartością skali CHA_2DS_2-VASc i HAS-BLED oraz Ks ani CLT przy wartościach INR w zakresie terapeutycznym.

W dniu 28 i 56, ale nie w trakcie rozpoczynania antykoagulacji, stwierdzono korelacje Ks z FII, FVII, FIX i FX oraz PC, podczas gdy CLT korelował z FII, FVII i FX w 56 dniu leczenia.

Porowatość osoczowego skrzepu fibrynowego oraz sprawność jego lizy zwiększa się u pacjentów z AF już w pierwszych dniach leczenia VKA. Czynniki determinujące te właściwości wyodrębniono dopiero w stabilnej fazie antykoagulacji za pomocą VKA bez związku z czynnikami demograficznymi ani klinicznymi w tym z ryzykiem zatorowości obwodowej ani krwawienia.

Ocena wpływu IL-4 na ekspresję mRNA receptorów wysokiego (FcεRI) i niskiego (FcεRII) powinowactwa dla przeciwciał IgE na pierwotnych aortalnych komórkach śródbłonka naczyniowego

Paulina Gorzelak-Pabiś[1*], Katarzyna Wojdan[1], Emilia Łuczak[1], Karolina Antosik[2,3], Maciej Borowiec[2,3], Maciej Chałubiński[1], Marlena Broncel[1],

[1]Klinika Chorób Wewnętrznych i Farmakologii Klinicznej UM w Łodzi [2]Pracownia Immunopatologii i Genetyki Klinika Pediatrii, Onkologii, Hematologii i Diabetologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi [3]Zakład Genetyki Klinicznej Katedra Genetyki Klinicznej i Laboratoryjnej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

*pau.gorzelak@gmail.com

Wprowadzenie. Wysoki poziom przeciwciał IgE w surowicy pacjentów z niestabilną dławica piersiową w porównaniu z osobami zdrowymi oraz obecność IgE i jego receptora FcεR w ludzkich blaszkach miażdżycowych wskazują na potencjalny udział IgE w patogenezie miażdżycy.

Cel. Głównym celem badania była wykazanie obecności mRNA FcεR na pierwotnych ludzkich aortalnych komórkach śródbłonka naczyniowego (HAEC). Dodatkowym celem pracy była analiza wpływu IL-4, cytokiny produkowanej przez limfocyty Th2 i odpowiedzialnej za syntezę przeciwciał IgE, na ekspresję mRNA dla receptorów FcεRI i FcεRII w komórkach śródbłonka naczyniowego in vitro.

Materiał. Obecność mRNA dla FcεR w komórkach HAEC wykazano za pomocą sekwencjonowania transkryptu mRNA FcεR. W celu zwiększenia ekspresji mRNA dla FcεR komórki HAEC indukowano IL-4 w stężeniach 1, 10 i 100 ng/ml przez 48 godzin. Ocenę ekspresji mRNA dla FcεRI i FcεRII wykonano metodą real-time PCR z użyciem odpowiednich primerów. Oceny morfologii komórek HAEC oraz ich integralności dokonano w mikroskopii świetlnej i w systemie Real-time Cell Electric Impedance Sensing (RTCA-DP).

Wyniki: Komórki HAEC wykazywały ekspresję mRNA dla receptorów FcεRI i FcεRII. Ekspresja mRNA dla receptora FcεRI w komórkach HAEC indukowanych IL-4 w stężeniach 1 i 10 ng/ml była odpowiednio 1.8±0,16 (p=0.0006) i 1.8±0,38(p=0.03) większa w porównaniu z kontrolą niestymulowaną. Podobnie ekspresja mRNA dla receptora FcεRII w komórkach HAEC indukowanych IL-4 w stężeniach 1 i 10 ng/ml była odpowiednio 2,61±0,71 (p=0.03), 0,80±0,10 (p=0.12) większa w porównaniu z kontrolą niestymulowaną. Obrazy z mikroskopu świetlnego wykazały, że IL-4 w największym stężeniu powodowała zmniejszenie integralności monowarstwy HAEC, co odzwierciedlały wyniki obserwacji dokonanych w systemie RTCA-DP.

Wnioski: Ekspresja mRNA dla receptorów FcεRI i FcεRII na komórkach śródbłonka naczyniowego sugeruje istnienie potencjalnego mechanizmu jego odpowiedzi na antygeny drogą IgE-zależną. IL-4 zwiększając ekspresję receptorów FcεRI i FcεRII na śródbłonku może nasilać jego reaktywność na antygeny obecne we krwi. The effect of oxidized cholesterol on barrier functions and IL-10 mRNA expression in human intestinal epithelium co-cultured with dendritic cells in the transwell system.

Wpływ lipopolisacharydu *E. coli* na integralność ludzkiego śródbłonka naczyniowego i profil cytokinowy komórek dendrytycznych w odpowiedzi na czynniki miażdżycogenne: apolipoproteinę B100 i 7-ketocholesterol

Maciej Chałubiński[1], Katarzyna Wojdan[1], Emilia Łuczak[1], Adrian Gajewski[2], Karolina Rudnicka[2], Maciej Borowiec[3,4], Magdalena Chmiela[2], Marlena Broncel[1]

[1]Klinika Chorób Wewnętrznych i Farmakologii Klinicznej, Pracownia Immunofarmakologii Tkankowej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, [2]Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii, Uniwersytet Łódzki, [3]Pracownia Immunopatologii i Genetyki Klinika Pediatrii, Onkologii, Hematologii i Diabetologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, [4]Zakład Genetyki Klinicznej Katedra Genetyki Klinicznej i Laboratoryjnej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Wprowadzenie. Otyłości towarzyszy zwiększona przepuszczalność nabłonka jelitowego, która prowadzi do przenikania lipopolisacharydu (LPS) *E. coli*, składnika mikroflory jelita grubego, do krwioobiegu. Mimo związków bakterii kolonizujących przewód pokarmowy (*P. gingivalis* i *H. pylori*) z rozwojem miażdżycy, udział *E. coli* w jej patogenezie nie został dotychczas opisany.
Cel. Celem badania była ocena wpływu LPS *E. coli* na integralność śródbłonka naczyniowego i ekspresję interleukiny-10 (IL-10), odpowiedzialnej za tolerancję immunologiczną, w komórkach dendrytycznych (DCs) w obecności czynników miażdżycogennych: apolipoproteiny B100 (apoB100) i 7-ketocholesterolu (7-kCH).
Metody. Wpływ LPS *E. coli* (1 µg/ml), apoB100 (50 µg/ml) i 7-kCH (10 µg/ml) na integralność HUVEC oceniano w systemie Real-time Cell Electric Impedance Sensing (RTCA-DP) na podstawie wartości *cell index* (nCI). Przepuszczalność HUVEC hodowanych w systemie transwell oceniano metodą paracellular flux, a ekspresję mRNA białek połączeń ścisłych (okludyna i ZO-1) metodą real-time pcr. DCs wyprowadzane z monocytów krwi obwodowej prestymulowano LPS *E. coli* w czasie różnicowania przez 48 godz., a następnie indukowano apoB100 i 7-kCH w celu oceny ekspresji mRNA IL-10. HUVEC hodowane w systemie transwell indukowano apoB100 i 7-kCH w obecności DCs prestymulowanych LPS *E. coli*, pozostających w bezpośrednim kontakcie z HUVEC w celu oceny ekspresji mRNA okludyny i IL-10.
Wyniki. LPS *E. coli* spowodował spadek nCI HUVEC (0.54±0.01 *vs.* 0.84±0.01; $p<0.001$), wzrost przepuszczalności (13633±1134 *vs.* 8437±636; $p<0.01$) oraz 30% spadek ekspresji mRNA okludyny ($p<0.05$) w porównaniu z nieindukowaną kontrolą. 7-kCH spowodował silny spadek nCI w HUVEC (0.19±0.01 *vs.* 0.84±0.01; $p<0.001$), 2-krotny wzrost ekspresji mRNA okludyny i 20% spadek ekspresji mRNA ZO-1 ($p<0.05$) w porównaniu z kontrolą. Natomiast nCI HUVEC indukowanych apoB100 był nieco większy niż w hodowli spontanicznej (0.93±0.02 *vs.* 0.84±0.01, $p<0.05$), czemu towarzyszył spadek przepuszczalności (6370±786 *vs.* 9583±978, $p<0.05$) bez zmiany ekspresji białek połączeń ścisłych. ApoB100 spowodowała 50% spadek ekspresji mRNA IL-10 w DCs ($p<0.01$), a prestymulacja DCs LPS *E. coli* wywołała silny spadek ekspresji mRNA IL-10 do 0.005 wartości hodowli spontanicznej ($p<0.001$). Ekspresja mRNA IL-10 w DCs prestymulowanych LPS *E. coli* i następnie indukowanych apoB100 wyniosła 0.0025 wartości hodowli spontanicznej ($p<0.001$). Indukcja śródbłonka apoB100 w hodowli mieszanej z DCs w systemie transwell prestymulowanych LPS *E. coli* spowodowała spadek ekspresji mRNA okludyny w komórkach śródbłonka; nie wpłynęła na ekspresję mRNA IL-10 w DCs.
Wniosek. LPS *E. coli* zmniejsza integralność śródbłonka naczyniowego i ekspresję IL-10 w DCs indukowanych czynnikami miażdżycogennymi, co może stanowić mechanizm wpływu na procesy miażdżycowe zachodzące w ścianie naczynia krwionośnego.

Effects of pulmonary hypertension on heart contractility: gender dependence

Sztormowska Achranowicz K[1], Kocić I[1*], Jankowski Z[2]

[1]Department of Pharmacology; [2]Department of Forensic Medicine; Medical University of Gdansk, Poland.

*ikocic@gumed.edu.pl

Aim of study There are several different types of pulmonary arterial hypertension (PAH), but significant reduction in myocardial contractility was reported in all of them. However, a little is known about the mechanisms of changes in heart contractility in PAH. Therefore, the aim of this study was to compare the basic parameters of heart contractility of male and female rats with pulmonary hypertension using the rat model of monocrotaline-induced PAH and norepinephrine for stimulation of heart adrenergic receptors.

Methods Wistar rats of both genders weighing between 200-250g and monocrotaline-model of pulmonary hypertension (PAH) have been used. Monocrotaline was applied i.p. at dose 60mg/kg B.W. After three weeks from monocrotaline application, experimental animals were sacrificed and heart and lung isolated for further examination. We have measured: Fc=force of contraction; +dF/dt=velocity of contraction: -dF/dt= velocity of relaxation. Additionally, heart weight and lung morphology have been evaluated. All animals were divided in 4 groups: MC-male control, FC-female control, MPAH-male with PAH, IV-female with FPAH, Histological changes were used as confirmation of pulmonary hypertension.

Results Body weight was significantly reduced in PAH only in male rats (81,14±10g vs. 66±7, n=20, P<0,05), while heart weight/body weight ratio remained without changes in both gender ((male= 0,258% of B.W. and female control= 0257% of B.W.) and PAH groups (male=0.38%, female= 0.375%).. Fc, +dF/dt and –dF/dt have been significantly reduced in male rats with PAH, but especially +dF/dt (8.15 ± 1.26 mN/s vs. 3.2 ± 0.12 mN/s, n=7, P<0.01)., However, in female rats with PAH, only –dF/dt (velocity of relaxation) was affected (3.74 ± 0.35 mN/s vs. 1.97 ±0.35 mN/s, n=6, P<0.05).. Additionally, norepinephrine (NOR) induced similar effects on the contractility of right ventricle papillary muscles in male and female rats and PAH caused significant reduction of NOR action in both genders including all parameters of contractility.

Conclusions PAH significantly reduced heart contractility in rats, however, all measured parameters of heart contractility during development of PAH were affected only in male rats. In female, only velocity of relaxation was diminished.

Modyfikacja zależnej od kanałów potasowych odpowiedzi rozkurczowej naczyń krezkowych izolowanych od szczurów z nadciśnieniem wtórnym (DOCA-salt).

Monika Kloza[1,*], Olga Karpińska[1], Marta Baranowska-Kuczko[1,2], Barbara Malinowska[1], Ewa Harasim[3], Emilia Grzęda[1], Hanna Kozłowska[1]

[1]Zakład Fizjologii i Patofizjologii Doświadczalnej,[2]Zakład Farmacji Klinicznej,[3]Zakład Fizjologii, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Polska

* monika.kloza@umb.edu.pl

Śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzujący (EDHF) obok tlenku azotu (NO) i prostacykliny, rozszerza naczynia krwionośne o małej średnicy. Acetylocholina pobudza małe SKca i średnie IKca kanały potasowe zależne od wapnia, prowadząc do hiperpolaryzacji mięśni gładkich naczyń.

Celem pracy była ocena wpływu wtórnego nadciśnienia (DOCA-salt) na zależną od kanałów potasowych odpowiedź rozkurczową izolowanych małych tętnic krezkowych (trzecie odgałęzienie G3) szczurów.

Szczury poddano jednostronnej nefrektomii. Nadciśnienie indukowano podając podskórnie octan deoksykortykosteronu (grupa DOCA; 25mg/kg) oraz do picia 1% NaCl. Kontrolne szczury otrzymywały rozpuszczalnik DOCA (grupa UNX) oraz wodę do picia. Efekt relaksacyjny acetylocholiny (0,001-30 µM) oceniano w aorcie oraz G3 kurczonych fenylefryną odpowiednio (0,03 lub 0,3 µM) i (10 µM). Działanie selektywnych inhibitorów SKca (UCL1684 0.1 µM) oraz IKca (TRAM34 10 µM) badano w obecności inhibitorów syntazy NO (L-NAME 100 µM) i cyklooksygenazy – indometacyny (INDO 10 µM).

Nadciśnienie DOCA osłabiało działanie acetylocholiny w tętnicy krezkowej (DOCA: pEC50=6.5±0.1, n=6; UNX: 8,1±0.1, n=4; $p<0.001$; Rmax=92.7±1.9%; 95.0±4.5%) i aorcie (DOCA: pEC50=6.7±0.1, n=11; UNX: 7,0±0.1, n=7; Rmax=62.9±6.7%; 99.6±1.6%; $p<0.001$). Łączne podanie L-NAME i INDO osłabiło (G3) i całkowicie znosiło (aorta) relaksację w grupach UNX i DOCA. W G3 jednoczesne podanie UCL1684 i TRAM34 całkowicie zablokowało rozkurcz w UNX, a także zmniejszyło ich relaksację w DOCA. Otwierający w/w kanały potasowe NS309 (0,1 – 100 µM)) powodował ≈100% rozkurcz G3 w obydwu grupach, co było istotnie osłabione przez usunięcie śródbłonka oraz łączne podanie UCL1684 i TRAM34 w obecności L-NAME i INDO. Ekspresja kanałów IKca (ale nie SKca) była istotnie wyższa w grupie DOCA w porównaniu z grupą UNX.

Nadciśnienie tętnicze w modelu DOCA-salt u szczurów osłabia odpowiedź rozkurczową na acetylcholinę izolowanych aorty i G3. Zależne od kanałów potasowych (IKca > SKca) działanie relaksacyjne EDHF stwierdzono jedynie w tętnicy krezkowej.

Czy LY393558, jednoczesny antagonista receptorów 5-HT_{1B} i inhibitor transportera serotoniny SERT, może być stosowany w leczeniu tętniczego nadciśnieniu płucnego?

Olga Karpińska[1,*], Marta Baranowska-Kuczko[1,3], Monika Kloza[1], Mirosław Kozłowski[2], Manfred Göthert[1,4], Barbara Malinowska[1], Hanna Kozłowska[1].

[1]Zakład Fizjologii i Patofizjologii Doświadczalnej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Polska [2]Klinika Chirurgii Klatki Piersiowej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Polska [3]Zakład Farmacji Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Polska [4]Zakład Farmakologii i Toksykologii, Uniwersytet w Bonn, Niemcy

*olga.karpinska@umb.edu.pl

Z patogenezą tętniczego nadciśnienia płucnego (PAH) związane jest zwiększone wytwarzanie serotoniny (5-HT), jej oddziaływanie na receptory serotoninowe (5-HT_{2A}, 5-HT_{1B}), wzmożona ekspresja genu transportera dla serotoniny (SERT), dzięki któremu 5-HT wnika do wnętrza komórki. Współdziałanie receptora 5-HT_{1B} wraz z SERT moduluje skurcz i wpływa na proliferację naczyń płucnych. Wykazano, że jednoczesne zahamowanie SERT i receptora 5-HT_{1B} prowadzi do znacznego osłabienia odpowiedzi skurczowej indukowanej serotoniną w naczyniowym łożysku płucnym gryzoni. Celem pracy była ocena działania LY393558 antagonisty receptora 5-HT_{1B} i inhibitora SERT na czynność skurczową izolowanej ludzkiej tętnicy płucnej.

Tkanki zostały uzyskane od pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca podczas lobektomii lub pneumonektomii. Fragmenty naczyń krwionośnych poddano kąpieli tkankowej w płynie Tyrode'a. Zastosowano wzrastające stężenia (1 nM- 100 µM) agonistów receptorów serotoninowych: 5-$HT_{1B/2A/2B}$ (serotoninę, 5-HT), 5-$HT_{1B/1D}$ (5-karboksyamidotryptaminę, 5-CT) i 5-HT_{2A} (α-methyl-5-hydroksytryptaminę, α-methyl-5-HT). Wszystkie w/w związki indukowały zależne od stężenia reakcje skurczowe, wyrażone jako procent odpowiedzi KCl (60 mM); (odpowiednio: pEC_{50}=6.20±0.06, E_{max}=94.2±4.1; pEC_{50}=6.4±0.1, E_{max}=73.2±5.8; pEC_{50}=5.9±0.1, E_{max}= 76.5±6.2, n=7-28). LY393558 (0.1 µM) osłabił powyższe efekty skurczowe (odpowiednio, pA_2: 8.2; 7.9; 7.7). W każdej badanej grupie istotnie obniżył wartości E_{max} (>40%) w odniesieniu do kontroli (E_{max}=49.3±6.0; E_{max}= 33.5±8.7; E_{max}=33.5±4.8). LY393558 znacznie bardziej osłabił efekt skurczowy wywołany α-methyl-5-HT (pEC_{50}=5.13±0.2, E_{max}=33.5±4.8) w porównaniu do reakcji po podaniu antagonisty receptora 5-HT_{2A} ketanseryny (0.01 µM) (pEC_{50}=5.36±0.15, E_{max}=59.3±4.8).

Uzyskane wyniki wskazują na to, że LY393558 jako jednoczesny antagonista receptorów 5-HT_{1B} i inhibitor SERT, w znacznym stopniu osłabia skurcz tętnic płucnych wywołany 5-HT, ale także 5-CT oraz α-methyl-5-HT. Do tej pory uważano, że może być z powodzeniem stosowany w terapii PAH. Jednakże ze względu na wykazanie jego silnego działania na receptory 5-HT_{2A}, które nie są specyficzne dla krążenia płucnego, może prowadzić do hipotensji systemowej. Należy zatem rozważyć użycie LY393558 w leczeniu PAH.

Effect of oxidized LDL CD39 and CD73 in human aortic valve endothelial cells

Ewa Kaniewska[1,2], Michał Mielcarek[3], Alicja Sielicka[1], Iwona Pelikant-Małecka[1], A. Chester[2], M. H. Yacoub[2], Ryszard T. Smoleński[1]

[1]Department of Biochemistry, Medical University of Gdansk [2]Heart Science Centre, Imperial College London at Harefield Hospital [3]Department of Medical and Molecular Genetics, King's College London

e.kaniewska@gumed.edu.pl

Extracellular nucleotides have major impact on thrombosis, inflammation and immune responses. During inflammation nucleotides, such as adenosine triphosphate (ATP) or adenosine diphosphate (ADP), are released by endothelium, erythrocytes and core organ cells into extracellular space and are involved in induction of inflammation. Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (CD39) and ecto-5'-nucleotidase (CD73) convert extracellular nucleotides. CD39 converts sequentially ATP to ADP, and then to AMP, therefore CD73 converts AMP to adenosine. The balance between these two activities is crucial for regulation of inflammation. The influence of oxidized LDL (ox-LDL), as proinflammatory factor, on CD39 and CD73 in aortic valves was assessed.

Nucleotide metabolism was characterised by incubation with AMP and ATP in cultured (with and without ox-LDL) human aortic valve endothelial (hAVECs), and followed by HPLC analysis. Level of protein and mRNA amount were measured by Western Blots and RT-PCR.

No differences were observed for expression of protein and mRNA of CD39, while activity were decreased significantly ($p<0.005$. In contrast CD73 was more highly expressed in VECs incubate with ox-LDL. More over activity of the CD73 increased significantly ($p<0.005$). In conclusion, ox-LDL could play an important role in ectoenzyme expression and activity in hAVECs, which may contribute to the role of their degradation product adenosine against inflammation in valves.

This research was conducted within the project „Nucleotides in pathology, diagnosis and therapy of heart disease" that is co-financed by European Union within European Regional Development Fund of Innovative Economy Programme and Programme TEAM of Foundation for Polish Science

Ocena funkcji komórek śródbłonka naczyniowego u pacjentów otyłych przed i po umiarkowanej restrykcji kalorycznej

Katarzyna Korybalska[1*], Joanna Łuczak[1], Ewelina Swora-Cwynar[2], Alina Kanikowska[2], Natasza Czepulis[1], Dominika Kanikowska[1] Marian Grzymisławski[2], Janusz Witowski[1]

[1]Katedra i Zakład Patofizjologii, [2]Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Metabolicznych i Dietetyki, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu

*koryb@ump.edu.pl

Otyłość predestynuje do zmian naczyniowych, prowadzącą do dysfunkcji śródbłonka naczyniowego. Adipokiny produkowane przez tkankę tłuszczową trzewną, są przyczyną aktywacji zapalnej *endothelium*, i zmiany ich fenotypu.

Celem pracy jest ocena funkcji śródbłonka naczyniowego u pacjentów otyłych przed i po umiarkowanej diecie.

Metodyka Do badań przystąpiło 58 pacjentów (wiek: 37,4±11,5 lat; BMI 39,3±11,9 kg/m^2). Z grupy wykluczono osoby z cukrzycą, ciążą oraz z chirurgicznym leczeniem otyłości. Podczas pobytu w klinice wykonano: rutynowe badania kliniczne, analityczne, oceniono skład ciała, pobrano próbki surowicy oraz ustalono indywidualny jadłospis (strata 300-500 kcal/dzień przez okres 8 tygodni). W próbkach surowicy oceniono stężenia parametrów funkcji śródbłonka oraz adipokiny. W warunkach hodowli *in vitro*, po ekspozycji śródbłonka na medium z dodatkiem 20% surowicy pacjentów przed i po restrykcji kalorycznej, oceniono proliferację oraz u pięciu pacjentów, z największym spadkiem masy ciała (średnio 8,2 kg), zbadano profil zmiany ekspresji genów metodą mikromacierzy. **Wyniki** przedstawione są jako średnia ±SD

PARAMETR	RESTRYKCJA KALORYCZNA		p
	PRZED	PO	
BMI, kg/m^2	39,3±11,9	37,6±12,3	0,0001
Tkanka tłuszczowa, %	41,8±7,0	40,1±7,6	< 0,0001
VEGF, pg/ml	117,3±90,4	116,6±94,3	0,07
sICAM-1, ng/ml	114,1±22,0	108,2±20,5	0,0007
sVCAM-1, ng/ml	577,9±189,4	492,7±200,3	0,002
Selektyna E, ng/ml	19,6±10,0	13,8±7,6	< 0,0001
vWF, ng/ml	882,8±274,6	882,0±317,7	0,8816
TM, ng/ml	3,7±1,0	3,6±1,0	0,0764
PAI-1, ng/ml	11,4±4,6	12,2±5,3	0,1141
NO, µmol/l	6,0±3,6	7,8±6,4	0,1045
Proliferacja, % kontroli	65±14	75±14	< 0,0001
Profil ekspresji genów		brak zmian	
Leptyna, ng/ml	54,4±30,2	41,2±25,7	< 0,0001
Adiponektyna, µg/ml	1,94±1,07	1,95±0,90	0,2580
Il-6 HS, pg/ml	2,0±1,4	1,2±1,0	0.0001
TNF-alfa HS, pg/ml	16,9±8,1	8,2±8,5	< 0,0001

Wnioski Zastosowana restrykcja kaloryczna spowodowała poprawę parametrów antropometrycznych, zmniejszyła ogólnoustrojowy stan zapalny, prowadząc do zmniejszenia aktywacji zapalnej komórek śródbłonka oraz poprawiając ich proliferację. Żaden gen śródbłonka nie wykazał nominalnie istotnej różnicy w ekspresji po restrykcji dietetycznej. Ocena genów powiązanych w różne przemiany metaboliczne, uwidoczniła największe różnice ekspresji w grupie genów zaangażowanych w cykl komórkowy.

Cardiac dysfunction in Huntington's disease

Michal Mielcarek

Neurogenetics Research Laboratory, Department of Medical and Molecular Genetics. King's College London School of Medicine, Guy's Hospital, London, U.K.

michal.mielcarek@kcl.ac.uk

Cardiac remodelling and contractile dysfunction occur during both acute and chronic disease processes including the accumulation of insoluble aggregates of misfolded amyloid proteins that are typical features of Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's disease (HD). While HD has been described mainly as a neurological disease, multiple epidemiological studies have shown that HD patients exhibit a high incidence of cardiovascular events leading to heart failure, and that this is the second highest cause of death. Given that huntingtin is ubiquitously expressed, cardiomyocytes may be at risk of an HD-related dysfunction. In HD mouse models, it was shown that pre-symptomatic animals developed connexin-43 relocation and a significant deregulation of hypertrophic markers and Bdnf transcripts. A pronounced functional changes were visualised by cardiac MRI revealing a contractile dysfunction, which might be a part of dilatated cardiomyopathy (DCM). This was accompanied by the re-expression of foetal genes, apoptotic cardiomyocyte loss and a moderate degree of interstitial fibrosis. In addition, chronic treatment with isoproterenol, a potent beta-adrenoreceptor agonist, did not change the overall gross morphology of the HD murine hearts. However, there was a partial response to the beta-adrenergenic stimulation by the further re-expression of foetal genes. To our surprise, we could identify neither mutant HTT aggregates in cardiac tissue nor a HD-specific transcriptional dysregulation, even at the end stage of disease. We postulate that the HD-related cardiomyopathy is caused by altered central autonomic pathways although the pathogenic effects of mutant HTT acting intrinsically in the heart may also be a contributing factor. There is limited number of studies performed in HD subjects to draw a proper conclusion about the heart dysfunction in humans. Therefore, there is a need for more pre-clinical and clinical studies that will unravel the mechanism of HD-related cardiac pathology.

Eksperymenty *in vitro* modelu oryginalnej protezy zastawki aortalnej

Piotr Siondalski[1*], Kinga Dawidowska[2], Michał Ditrich[2], Leszek Wilczyński[2]

[1]Klinika chirurgii Serca i Naczyń, Gdański Uniwersytet Medyczny, [2]Zakład Badawczo–Rozwojowy, Centrum Techniki Okrętowej S.A., Gdańsk

*psiondalski@gumed.edu.pl

Protezy zastawek serca są przedmiotem licznych badań i prób opracowania nowych modeli, które nie będą posiadały wad występujących we wcześniejszych rozwiązaniach.
Celem przeprowadzonych eksperymentów było wykazanie dobrej funkcji modelu oryginalnej protezy zastawki aortalne, której kształt pierwotny został opracowany wcześniej przez autorów tej pracy. Porównano także jej działanie z pracą innych protez dostępnych na rynku medycznym.
Badania trzech różnych protez przeprowadzono na testerze do badań zastawek serca, który umożliwia dokładną symulację przepływu krwi w układzie krążenia człowieka.
Wykonywano pomiary wielkości przepływu i kontroli ciśnienia oraz wizualizację pracy za pomocą szybkiej kamery.
Na podstawie przeprowadzonych badań można wnioskować, że badany model protezy zastawki aortalnej wykazuje możliwość dostosowania się do pełnego, fizjologicznego zakresu parametrów przepływu w badaniach *in vitro*.

Inhibition of AMP Deaminase is Cardioprotective in Acute Oxygen Deprivation in ApoE$^{-/-}$/LDLR$^{-/-}$AMPD$^{-/-}$ CRE^{+} triple knock- out mice

Magdalena Zabielska*, Barbara Kutyb- Zajac, Ewa M Slominska, Ryszard T Smolenski

Department of Biochemistry, Medical University of Gdansk, Poland

*magdalena.zabielska@gumed.edu.pl

Background: AMP deaminase (AMPD) activity may have impact on heart disease and highlights important therapeutic potential. The effect of AMPD inhibition was tested using hypoxia in ApoE$^{-/-}$/LDLR$^{-/-}$ double knock-out mouse and in ApoE$^{-/-}$/LDLR$^{-/-}$AMPD$^{-/-}$ CRE^{+} triple knock-out mice.

Methods: After series of cross breeding, genotyping of ApoE$^{-/-}$/LDLR$^{-/-}$ and ApoE$^{-/-}$LDLR$^{-/-}$ AMPD$^{-/-}$ CRE^{+} indentified homozygous mice strains. Following anaesthesia six months male double knock-out and triple knock- out mice were exposed to hypoxic stress (7.5 minutes of 7% oxygen in breathing air) followed by reoxygenation. ECG was monitored during hypoxia using the electrodes attached to the chest. After 24 hours blood was collected from the jugular vein and the heart was removed and prepared for enzymatic analysis. Troponin T in plasma was analysed with ELISA Kit. Activities of AMP-deaminase (AMPD), adenosine deaminase (ADA), and purine nucleoside phosphorylase (PNP) were measured by HPLC

Results: Inhibition of AMPD in triple knock- out mice reduces ECG STU area changes for 95% and decreases troponin T content in mice serum (188,46±17.17 pg/ml in ApoE$^{-/-}$/LDLR$^{-/-}$ and 147.69±8.4 pg/ml in ApoE$^{-/-}$/LDLR$^{-/-}$AMPD$^{-/-}$ CRE^{+}, n=5, $p<0.001$). Currently developed cardiac specific conditional knock-outs for *AMPD3* indicated effective reduction of cardiac AMPD activity (to about 64%).

Conclusion: This study shows that reduced AMPD activity has a beneficial effect on cardiac function in acute oxygen deprivation. It provides further clinical evidence for protective effect of reduced cardiac activity of AMPD in acute cardiac stress/ischemia The use of specific AMPD inhibitors may offer significant therapeutic potential.

Acknowledgments: This study was supported by the European Union from the resources of the European Regional Development Fund under the Innovative Economy Programme (grant coordinated by JCET-UJ, No POIG.01.01.02-00-069/09)

Spontaneous physical activity inhibits progression of heart failure in Tgαq*44 mice at early as well as at advanced stage of disease

Tyrankiewicz Urszula[1,*], Skórka Tomasz[1], Jabłońska Magdalena[1,2], Osiak Anna[1], Jasiński Krzysztof[1], Osip Anna[1], Wojewoda Marta[3], Żołądź Jerzy Andrzej[4] and S. Chlopicki[3,5]

[1]Department of Magnetic Resonance Imaging, Institute of Nuclear Physics, Polish Academy of Sciences, Krakow, Poland; [2]Department of Medical Physics and Biophysics, AGH University of Science and Technology, , Krakow, Poland; [3]Jagiellonian Centre for Experimental Therapeutics (JCET), Krakow, Poland; [4]Department of Muscle Physiology, Faculty of Rehabilitation, Krakow, Poland; [5]Department of Experimental Pharmacology, Jagiellonian University Medical College, Krakow, Poland

*Urszula.Tyrankiewicz@ifj.edu.pl

Purpose: The goal of the study was to assess the effect of spontaneous physical activity performed at the early and at the advanced stages of heart failure (HF) in a murine model of dilated cardiomyopathy (Tgαq*44 mice).

Methods: Two groups of Tgαq*44 mice: at the early and advanced stage of HF (at the age of 6 months or 10 months, respectively), were subjected to spontaneous physical activity in running wheels for 8 weeks. Cardiac function was measured immediately after this period by in vivo MRI (BioSpec® 9.4 T, Bruker, Germany) and assessed at rest and under dobutamine stimulation and compared to sedentary age-matched Tgαq*44 groups.

Results: Both exercised groups reveal increased SV as compared to their sedentary counterparts without an effects on cardiac rhythm. Additionally, at the early stage of HF spontaneous running improved diastolic blood flow, inhibited atrial impairment (preserved LA EF), and ventricular volume enlargement (increased ESV and EDV), but also inhibited hiperdynamic state of cardiac rotation and unrotation all of the above observed in the course of HF deterioration in the sedentary group. At the advanced stage spontaneous physical training did not changed atrial nor ventricular enlargement, but improved global performance and contractility (preserved EF and preserved inotropic reserve) and inhibited cardiac hypertrophy.

Conclusion: We demonstrated a positive effect of spontaneous physical activity on HF progression in Tgαq*44 mice confirming known beneficial effects of maintaining physical activity in HF. Interestingly, we noticed greater influence on inotropic reserve at the early stage and inhibition of hypertrophy at the advanced stage of pathology. Lack of chronotropic reserve after training suggest profoundly reduced responsiveness to inotropic agents probably due to atrial impairment. Further studies are on the way to determine the additive effects of spontaneous physical activity and RAAS blockade.

Cechy sercowych mezenchymalnych komórek zrębu CD105+CD34- i ich wpływ na strukturę pozawałowego serca myszy

Sybilla Matuszczak[1], Justyna Czapla[1], Ewa Wiśniewska[2], Magdalena Jarosz-Biej[1], Ryszard Smolarczyk[1], Tomasz Cichoń[1], Joanna Śliwka[2], Marcin Garbacz[2], Tomasz Jaźwiec[2], Karolina Kozieł[2], Marian Zembala[2], Michał Zembala[2], Stanisław Szala[1]*

[1]Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie Oddział w Gliwicach, Wybrzeże Armii Krajowej 15 Gliwice [2]Katedra i Oddział Kliniczny Kardiochirurgii i Transplantologii SUM Śląskie Centrum Chorób Serca, Skłodowskiej-Curie 9 Zabrze

*smatuszczak@io.gliwice.pl

Wstęp i cel badań: W ostatnich latach jednymi z najintensywniej badanych komórek są mezenchymalne komórki zrębu (MSC). Najczęstszym źródłem tych komórek jest szpik kostny oraz tkanka tłuszczowa. Szereg danych literaturowych wskazuje, że MSC można wykorzystać w wielu strategiach terapeutycznych. Celem pracy była izolacja i charakterystyka komórek MSC izolowanych z ludzkiego serca oraz określenie ich zdolności terapeutycznych na modelu mysiego zawału serca.

Materiały i metody: Materiał do badań stanowiły serca biorców usunięte podczas transplantacji. Z fragmentu prawej komory serca izolowano komórki i wstępnie selekcjonowano w hodowli na podłożu plastikowym. Następnie wyselekcjonowano populację komórek o fenotypie $CD105^{+}CD34^{-}$ na sorterze FACS Aria III. Komórki $CD105^{+}CD34^{-}$ charakteryzowano pod względem obecności antygenów, zdolności do różnicowania oraz wydzielanych cytokin i czynników wzrostu. Komórki $CD105^{+}CD34^{-}$ wszczepiano do mięśnia sercowego 7 dni po podwiązaniu LAD w ilości 500tys./mysz. 42 dni po transplantacji komórek $CD105^{+}CD34^{-}$ lub PBS^{-} serca myszy pobrano do analiz immunohistochemicznych w celu oceny wielkości blizny pozawałowej, zwłóknienia oraz gęstości naczyń krwionośnych.

Wyniki: Ponad 96% komórek $CD105^{+}CD34^{-}$ posiada markery charakterystyczne dla komórek mezenchymalnych (CD105, CD29, CD73 i CD44) oraz nie posiada markerów (<1%): CD45, Lin, HLA-DR, CD31, KDR oraz CD146. Komórki $CD105^{+}CD34^{-}$ różnicują się do adipocytów, osteoblastów i chondroblastów. Komórki $CD105^{+}CD34^{-}$ wydzielają głównie IL-6, IL-8 oraz GRO. Po wszczepieniu komórek $CD105^{+}CD34^{-}$ do pozawałowego serca myszy zaobserwowano zmniejszenie o 8,3% wielkości blizny pozawałowej, zmniejszenie o 10,2% ilości odkładanego kolagenu między włóknami tkanki mięśniowej oraz zwiększenie liczby naczyń zarówno w obszarze graniczącym jak i w samej bliźnie pozawałowej w porównaniu do myszy kontrolnych otrzymujących PBS^{-}.

Wnioski: Serce stanowi nowe źródło mezenchymalnych komórek zrębu. Komórki $CD105^{+}CD34^{-}$ wydzielają szereg cytokin przeciwzapalnych i proangiogennych. Nasze wyniki wskazują, że wyizolowane z ludzkiego serca komórki $CD105^{+}CD34^{-}$ mogą być stosowane w terapii pozawałowego serca.

Wpływ inhibitora rozkładu anandamidu URB597 na wybrane parametry izolowanego serca i lewego przedsionka szczurów z nadciśnieniem DOCA–salt.

Jolanta Weresa*, Anna Pędzińska-Betiuk, Marek Toczek, Barbara Malinowska

Zakład Fizjologii i Patofizjologii Doświadczalnej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Mickiewicza 2A Białystok

*jolanta.weresa@umb.edu.pl

Nadciśnienie tętnicze może prowadzić do wzrostu poziom endogennego anandamidu, rozkładanego przez hydrolazę amidową kwasów tłuszczowych (FAAH). URB597 jest inhibitorem FAAH. Celem pracy była ocena wpływu przewlekłego podawania URB597 na czynność izolowanego serca i lewego przedsionka serca u szczurów z indukowanym nadciśnieniem tętniczym w modelu DOCA–salt.

Wszystkie szczury poddano jednostronnej nefrektomii. Nadciśnienie indukowano podając przez 6 tygodni podskórnie octan deoksykortykosteronu (DOCA; 25mg/kg) oraz do picia 1% NaCl. URB597 (1mg/kg/12godz) podawano dootrzewnowo od 5 tygodnia przez 14 dni. Grupy kontrolne (normotensyjne) otrzymywały rozpuszczalnik DOCA i URB597 (lub jego rozpuszczalnik) oraz wodę do picia. W izolowanym sercu (metoda Langendorffa) oceniono sztywność rozkurczową oraz indukowane izoprenaliną (10^{-11}-10^{-6}M): wzrost częstości pracy serca (HR), przepływ wieńcowy (CPP) i kurczliwość (RPP=HRxciśnienie lewokomorowe). Równolegle, w izolowanym lewym przedsionku badano efekt inotropowy agonisty receptorów kannabinoidowych CP 55940 (10^{-9}-$3x10^{-5}$M) oraz izoprenaliny (10^{-11}-10^{-6}M).

Bazalne parametry były porównywalne we wszystkich grupach. Izoprenalina powodowała zależny od stężenia wzrost wszystkich badanych parametrów. CP55940 zależnie od stężenia obniżał kurczliwość przedsionków. W grupie DOCA stwierdzono hipertrofię serca (w tym wzrost sztywności), osłabienie działania izoprenaliny w izolowanym sercu [HR, RPP i CPP dla efektu maksymalnego (E_{max}) odpowiednio o 25, 42 i 89%) ale nie w przedsionkach, oraz obniżenie ujemnego efektu inotropowego CP55940 (dla E_{max} o 60%). URB597 osłabił nieznacznie hipertrofię serca, zmniejszył efekt inotropowy i chronotropowy dodatni izoprenaliny w sercu zwierząt normotensyjnych oraz przywrócił ujemny efekt inotropowy CP55940 w grupie DOCA do wartości zwierząt normotensyjnych. Nie wpływał na pozostałe parametry szczurów normo- lub hipertensyjnych.

Podsumowując: przewlekłe podawanie inhibitora FAAH wpłynęło niekorzystnie na pracę serca szczurów normotensyjnych, natomiast nieznacznie poprawiło parametry pracy serca szczurów z nadciśnieniem.

Finansowanie - NCN 2012/05/B/N27/03102

Polihedrocyty w skrzeplinach z tętnic wieńcowych od pacjentów w ostrej fazie zawału serca

Michał Ząbczyk[1,2*], Marcin Sadowski[3], Jarosław Zalewski[1,2], Anetta Undas[1,2]

[1]*Instytut Kardiologii, Uniwersytet Jagielloński - Collegium Medicum, Polska* [2]*Krakowski Szpital Specjalistyczny im. Jana Pawła II, Polska* [3]*Świętokrzyskie Centrum Kardiologii, Polska*

*michalzabczyk@op.pl

Kształt wielościanu umożliwia układom fizycznym w przyrodzie osiągnięcie stanu o minimalnej energii potencjalnej. Niedawno opisano po raz pierwszy wielościenne erytrocyty, nazywane polihedrocytami, które powstają podczas retrakcji skrzepu wytworzonego z pełnej krwi. Polihedrocyty występują również w skrzeplinach z tętnic wieńcowych od pacjentów w ostrej fazie zawału serca. Powstawanie polihedrocytów może mieć związek z naturalnym mechanizmem, którego celem jest reperfuzja zamkniętego naczynia. Czynniki, które mogą sprzyjać tworzeniu polihedrocytów *in vivo* nie zostały dotąd zidentyfikowane.

Badaniu poddano 104 skrzepliny wieńcowe aspirowane podczas trombektomii od pacjentów z zawałem serca z uniesieniem odcinka ST w czasie od 1 do 72 godzin od wystąpienia bólu w klatce piersiowej. Skrzepliny były utrwalanie w 2,5% glutaraldehydzie, odwadniane w etanolu, suszone w punkcie krytycznym i oceniane w co najmniej 10 różnych polach przy użyciu mikroskopu skaningowego.

Polihedrocyty stanowiące przynajmniej 5% wszystkich erytrocytów w obrębie skrzepliny występowały tylko u 21 pacjentów (20%) ze STEMI, przy czym komórki te stanowiły średnio 30% pola powierzchni analizowanych fragmentów skrzepliny. Nie stwierdzono związku pomiędzy obecnością polihedrocytów i danymi demograficznymi badanej grupy, czynnikami ryzyka sercowo-naczyniowego, leczeniem statynami lub aspiryną, morfologią krwi obwodowej, markerami nekrozy mięśnia serca oraz czasem jego niedokrwienia ($p>0,05$ dla wszystkich). Pacjentów, u których zaobserwowano polihedrocyty charakteryzowała wyższa zawartość erytrocytów (mediana 40 vs. 24%) i niższa zawartość płytek krwi (mediana 1 vs. 5%) w skrzeplinie oraz niższy poziom fibrynogenu w osoczu (mediana 3,0 vs. 3,9 g/l) w porównaniu do pacjentów, u których nie stwierdzono obecności polihedrocytów ($p<0,05$ dla wszystkich). Erytrocyty wielościenne występowały częściej w skrzeplinach pacjentów, u których stwierdzono ≥2 istotne zwężenia tętnic wieńcowych ($p<0.05$).

Polihedrocyty występują w skrzeplinach wewnątrzwieńcowych u niewielu pacjentów ze STEMI a na ich obecność ma wpływ skład komórkowy skrzepliny i stężenie fibrynogenu w osoczu.

Therapeutic potential of cardiac stromal stem cells (CStC) isolated from failing human heart in a mice model of chronic myocardial ischemia.

M. Garbacz [1]*, A. Sliwka[1], T. Jazwiec[1], K. Kozieł[1], M. Jarosz-Biej[2], J. Czapla[2], S. Matuszczak[2], E. Wiśniewska[2], T. Cichoń[2], R. Smolarczyk[2], P. Wilczek[3], M. Zembala[1], S. Szala[2], M. Zembala jr[1].

[1]Dept. of Cardiac Surgery and Transplantology, Silesian Center For Heart Diseases, Zabrze [2]Center for Translational Research and Molecular Biology of Cancer, Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, Gliwice Branch [3]Foundation for Cardiac Suregry Development in Zabrze

*margarbacz@wp.pl

BACKGROUND Stromal cells have been experimentally isolated from a variety of adult tissues and organs, most extensively characterized being those of bone marrow origin. While extensive research proved their beneficial effect on skeletal and connective tissue regeneration, little is known about cardiac-specific stromal cells and their regenerative potential.

AIM OF THE STUDY The aim of this study was to assess regenerative potential of the human cardiac stromal cells (hCStC) isolated from failing myocardium explanted during heart transplantation, in an experimental model of chronic myocardial ischemia.

MATERIAL and METHODS Myocardial tissue samples were obtained from 10 heart transplant recipients. hCStC were analysed using flow cytometry with CD105, CD90, CD29, CD73, CD44,CD34, CD31, CD45, LIN antibodies and tested on their differentiation potential. Once sufficient amount of cells was cultured, hCStC were prepared under sterile conditions for intramyocardial implantation. Meanwhile adult male C57BL/6 mice underwent surgical induction of acute myocardial ischemia (LAD ligation). Animals surviving the acute phase of myocardial ischemia, 7 days post LAD ligation, with a proven scar (>3mm on echocardiography) were then assigned to control or treated groups, receiving 10 ⍰l of PBS alone and $5x10^5$ cells in 10 ⍰l PBS respectively. Injections were performed under direct vision, intramyocardially through re-thoracotomy 7 days post MI. Cardiac function was evaluated on 7 and 42 days post intervention by means of echocardiography (Vevo 2100) where LV diameter, ejection fraction and strain were assessed. On 42 day animals were sacrificed and myocardial tissue samples obtained for immunostaining.

RESULTS HCStC were characterized as CD105+ CD34(-)and obtained from all 10 explanted hearts in large quantities (2 ml tissue 1 mln hCStC). All animals experienced significant decrease in LV contractility and function 7 days post MI (Baseline vs 7d po AMI). In a control (PBS) group visible further decrease of LVEF was noted 42 days post MI (41% vs. 36% respectively) while in the treated group a trend towards reversed remodeling and LVEF improvement was apparent (39% vs. 43% respectively.) Regional wall motion abnormalities in post myocardial infarction segments measured by two dimensional speckle tracking echocardiography revealed increase radial strain from 10,6% to 17,2% in the treated group and decrease radial strain from 12.9% to 8,6% in a control group. Immunostatining revealed substantial retention hCStC on 21 days and 42 days post implantation with visible reduction in a scar size, especially angmented within the MI border zone.

CONCLUSIONS Our findings suggest that human cardiac stromal cells may have a crucial therapeutic importance in human chronic myocardial ischemia. Further extensive research should be done to prove their beneficial effect on failing heart function.

Heme oxygenase-1 deficiency is associated with increased post-myocardial infarction monocyte mobilization and impaired heart function

Agnieszka Jaźwa[1,*], Mateusz Tomczyk[1], Karolina Bukowska-Strakova[1,2], Krzysztof Szade[1], Alicja Józkowicz[1], Józef Dulak[1]

[1]*Department of Medical Biotechnology, Faculty of Biochemistry, Biophysics and Biotechnology, Jagiellonian University, Krakow, Poland* [2]*Department of Clinical Immunology and Transplantology, Polish-American Institute of Pediatrics, Medical College, Jagiellonian University Krakow, Poland*

*agnieszka.jazwa@uj.edu.pl

Immune system becomes activated upon myocardial infarction (MI) and timely resolution of inflammation in the infracted zone is crucial for regenerative processes. Heme oxygenase 1 (HO-1) is emerging as a potential therapeutic target in cardiovascular disease due to its anti-oxidative and anti-inflammatory properties.

HO-1 knockout (KO) and wild type (WT) mice were exposed to a permanent ligation of the left anterior descending coronary artery. At 3 weeks post-MI a more potent reduction of ejection fraction was observed in HO-1 KO mice. Coronary artery occlusion in WT mice led to strong up-regulation of HO-1 expression, with no changes in other genes involved in iron metabolism (HO-2, ferritin). Some genotype-dependent differences were observed in the expression of cardiac myocytes-associated miRNAs (miR-29a, miR-199). Moreover, much higher numbers of MI-induced granulocytes ($CD11b^{+}Ly6G^{+}$), as well as classical ($Ly6C^{++}CD43^{+}$) and intermediate ($Ly6C^{++}CD43^{++}$) monocytes were found in the peripheral blood of HO-1 deficient mice when compared to their WT littermates. In contrary, significantly less hematopoietic stem and progenitor cells ($Lin^{-}c\text{-}kit^{+}Sca\text{-}1^{+}$) were detected in spleens, but not in the bone marrow, of HO-1 KO when compared to WT mice. Additionally, higher numbers of macrophages ($MHCII^{++}CD11c^{+}F4/80^{+}$) were detected in the hearts of HO-1 deprived mice.

Lack of HO-1 impairs post-MI heart function and influences inflammatory responses to MI related to monocyte/macrophage-dependent wound healing and cardiac remodeling.

Supported by Iuventus Plus grant No. 0249/IP1/2013/72 from the Ministry of Science and Higher Education and Maestro grant No. 2012/06/A/NZ1/00004 from the National Science Center.

Effect of graded ischemia on cardiac metabolism and function of AMP deaminase 3 knock-out mice

Marta Toczek*, Paulina Żukowska, Ewa Słomińska, Ryszard Tomasz Smoleński

Department and Chair of Biochemistry, Medical University of Gdańsk, Poland

*marta.toczek@gumed.edu.pl

The ischemic heart disease is the world's leading cause of death. Episodes of the acute myocardial ischemia may cause an irreversible injuries resulted in metabolic derangements. Inseparable metabolic pathway liked to cardiac metabolism during ischemia conditions is a nucleotides catabolism. Purines and pyrimidines nucleotides, released from the damage cardiomyocytes could intensified injury but also cause a protective effects. The entry to the purine nucleotide cycle is controlled by the AMP deaminase which converts AMP to IMP and plays an important role in nucleotides breakdown. This study aimed to investigate the effect of graded ischemia to the AMPD3 KO mice heart function and nucleotides metabolism.

25 male AMPD3 KO mice and 25 Mer-Cre-Mer mice as a control were used. Hearts were rapidly excised after animal intubation and artificial ventilation. Afterwards attached to the Langendorff perfusion system. The buffer flow was maintained in first 15 min of perfusion in 1.8 mL/min. After initial perfusion, the flow was reduce to 0.3 mL/min. The hearts were perfused in ischemia conditions from 3 to 15 min, thereafter freeze-clamped and stored in -80° C. Collected effluents and heart tissues were analyzed by RP-HPLC method to determine a nucleotides concentration. Moreover the analysis of enzymes activities involved in nucleotide catabolism in heart tissues was performed.

Analysis of nucleotides in the effluents showed the higher concentration of adenosine in AMPD KO mice hearts in comparison to the control mice in normoxia but also in short and long time hypoxia conditions. Diminished concentration of hypoxanthine, xanthine, uric acid, purines pool and uridine relative to the control mice were also observed. In case of inosine concentration, the elevated level in AMPD KO mice hearts relative to the control mice was observed only in long time ischemia conditions. After long time ischemia, the ATP/ADP and PCr/Cr ratio in AMPD KO mice hearts were higher in comparison to the control. Analysis of the enzymes activities show significantly lower activity of AMPD in AMPD KO in comparison to the control mice and also a tendency suggested the diminished activity of ADA in AMPD KO mice heart relative to the control mice.

This study highlights the significance of nucleotide metabolism in the ischemic heart and suggests that its regulation could resulted in metabolic and function improvement. Moreover data supports our earlier concept that pharmacological inhibition of AMP deaminase before transient ischemic event such as ischemic heart disease or cardiac surgery could provide the therapeutic benefits.

This research was conducted within the project „Nucleotides in pathology, diagnosis and therapy of heart disease" that is co-financed by European Union within European Regional Development Fund of Innovative Economy Programme and Programme TEAM of Foundation for Polish Science

The comparison of tissue saturation during vascular occlusion test under sevoflurane and propofol anaesthesia in various phases of heart surgery with cardiopulmonary bypass.

Aleksandra Biedrzycka*, Romuald Lango

Department of Cardioanaesthesiology, Medical University of Gdańsk,

*biedrzycka.ola@gmail.com

Numerous studies have confirmed that significant changes of microcirculation occur in cardiac surgical procedures, especially if cardiopulmonary bypass (CPB) is used. Conventional monitoring is not sufficiently sensitive to detect acute changes in tissue perfusion, while its normal parameters are critical for maintaining optimum oxygen balance. The purpose of this study was to compare the effects of propofol and sevoflurane anaesthesia on tissue saturation during a vascular occlusion test (VOT) in various phases of heart surgery with CPB.

Data from 60 patients, randomized to group P (Propofol), and S (Sevoflurane), were analysed. VOT was performed using the INVOS oxymeter placed over the thenar muscle by inflating the sphygmomanometer cuff to exceed the systolic pressure value by 30mmHg, and maintain this induced ischemia for 3 minutes at six times during each procedure. Group and time effects on oxymetric parameters were analyzed with RM-ANOVA and post hoc Tukey test.

During the hypoxic phase there was observed a trend towards lower speed of desaturation under sevoflurane anaesthesia (p=0.08), also patients given sevoflurane showed higher measurements of the lowest tissue saturation (p=0.018). Post hoc analysis demonstrated significant decrease of the baseline, the minimal and maximal values of muscle saturation in both groups during CPB. Significantly higher speed of tissue desaturation was reported 20 minutes after X-clamp release and 45 minutes after weaning from CPB. Also in both groups a decrease of resaturation speed was observed during aortic X-clamp, and prolongation of resaturation time at all time-points during CPB.

The speed of desaturation during VOT was proposed to reflect the local metabolic rate and the speed of tissue saturation recovery on reperfusion is thought to express microcirculatory flow. Differences observed in the hypoxic phase might be caused by attenuation of mitochondrial respiration by sevoflurane. We conclude that sevoflurane anaesthesia may ameliorate hypoxia resulting from tissue ischemia in comparison to propofol.

Masitinib has neuroprotective effect in rats with post- ischemic stroke

[1]Kocic Ivan*, [2,3]Kowianski Przemyslaw, [1]Rusiecka Izabela, [2] Lietzau Grazyna, [4]Colin Mansfield, [4]Alain Moussy, [4,5]Olivier Hermine, [4,6]Patrice Dubreuil

[1]Department of Pharmacology, Medical University of Gdansk, Poland [2]Department of Anatomy and Neurobiology, Medical University of Gdansk, Poland [3]Department of Clinical Sciences, Institute of Health Sciences, Pomeranian University of Slupsk, Slupsk, Poland; [4]AB Science, SA, Paris, France. [5]Université Paris Descartes, Service d'hématologie adulte, Centre de référence des mastocytoses, CNRS UMR 8147, Hôpital Necker, Paris, France [6]Inserm U1068, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Signalisation, Hematopoiesis and Mechanisms of Oncogenesis, Centre de référence des mastocytoses; Institut Paoli Calmettes, CNRS; Aix Marseille Université, Marseille, France

*ikocic@gumed.edu.pl

Aim of study Despite stroke being the second leading cause of mortality worldwide and the third one of premature mortality in developed countries it remains largely without any significant therapeutic strategies. Both ischemic and hemorrhagic strokes continue to have very poor outcomes. This study evaluated the therapeutic potential of masitinib, an oral tyrosine kinase inhibitor with activity against c-Kit and PDGFR, to reduce ischemic brain area and neurological deficit.

Methods Using a well-established filament model of ischemic stroke in rats, the responses to oral treatment with masitinib alone, or in combination with rt-PA were compared to those after tissue plasminogen activator (rt-PA, 10 mg/kg i.v.) monotherapy. In both cases two doses of masitinib were used - 25 or 100 mg/kg, twice per day. Ischemic brain area and the neurological deficit were assessed using the triphenyltetrazolium chloride (TTC) method and behavioral neurological tests, respectively.

Results Masitinib, as a single agent reduced significantly the infarct size, as compared with the stroke control group. Brain ischemic area decreased from 9.14% to 4.36% (25 mg/kg) or 2.60% (100 mg/kg). Moreover, a combined treatment of masitinib with rt-PA produced a stronger effect than the one observed after each of the compound alone. The size of the brain ischemic area (rt-PA 1.67%) was further reduced to 0.83% or 0.7% at masitinib doses of 25 and 100 mg/kg, respectively.

Conclusions and implications Masitinib reduced significantly brain ischemia induced by experimental stroke and potentiated the therapeutic effect of rt-PA. Particularly promising seems to be the dose of 25 mg/kg, as it decreased ischemic area by approximately 50% or 90%, if the drug was used alone or in combination with rt-PA, respectively.

The importance of fatty acids synthesis and pattern in cardiovascular disease

Tomasz Śledziński

Department of Pharmaceutical Biochemistry, Medical University of Gdansk

tsledz@gumed.edu.pl

The importance of blood levels of omega-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) for the risk of cardiovascular disease (CVD) is widely appreciated. However omega-3 PUFA constitute only minor portion of fatty acids (FA) contained in blood lipids, and other FA may also have a significant influence on CVD risk. Currently, gas chromatography-mass spectrometry technique enables for the detection and quantification in human blood sample of more than 30 different FA, classified into saturated FA (SFA), monounsaturated FA (MUFA) and PUFA. In contrast to omega-3 PUFA, which mainly originate from food, some of FA can be efficiently synthesized in human organism. Fatty acid synthase (FASN) is key enzyme of de novo FA synthesis, and its main product is palmitic acid, belonging to SFA. The highest activities of FASN were found in liver and adipose tissue, where it provides FA for formation of triacylglycerols, but the enzyme is also present in other tissues. Recent research on FASN knockout mice revealed that palmitate synthesis could play the role in insulin dependent regulation of nitric oxide synthase in epithelium and cardioprotective role in heart while proatherogenic role in macrophages. In liver and adipose tissue palmitic acid, stearic acid and other SFA can be further desaturated into MUFA. In human the main enzyme involved in FA desaturation is stearoyl-CoA desaturase (SCD1). The results of rodent studies point to a negative role of elevated SCD1 activity, desaturation level and MUFA levels in blood in the development of metabolic disorders, thus increasing the CVD risk. In humans, this relationship is less convincing, however some studies, including ours, confirmed the association between FA desaturation level and CVD risk. Recently we have identified FA containing cyclopropane rings in human adipose tissue and serum. These unusual FA turned out to be elevated in blood of patients with morbid obesity and chronic renal failure – diseases associated with increased CVD risk.

Rola ośrodkowej interakcji między układem apelinergicznym i wazopresynergicznym w regulacji czynności układu sercowo-naczyniowego

Olena Borowik, Katarzyna Kolaszyńska, Katarzyna Czarzasta, Agnieszka Cudnoch-Jędrzejewska

Zakład Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej, Laboratorium Centrum Badań Przedklinicznych, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Liczne prace wykazały, że apelina (AP), będąca adipokiną, odgrywa istotną rolę w regulacji czynności układu sercowo-naczyniowego, gospodarki wodnej oraz przyjmowaniu pokarmu. Obecność preproapleiny oraz receptorów APJ apeliny opisano w licznych strukturach ośrodkowego układu nerwowego, m. in. w jądrach podwzgórza: przykomorowym (PVN) i nadwzrokowym (SON), będących również kluczowym miejscem syntezy wazopresyny (AVP). Celem niniejszej pracy było zbadanie roli interakcji pomiędzy układem apelinergicznym i wazopresynergicznym w ośrodkowej regulacji czynności układu sercowo-naczyniowego u szczurów Sprague Dawley (SPRD). Zwierzętom wszczepiono kaniulę do komory bocznej mózgu (LCV), umożliwiającą podanie badanych substancji oraz cewnik do aorty brzusznej w celu pomiaru średniego ciśnienia tętniczego (MABP) i częstości serca (HR). Ośrodkowa infuzja soli fizjologicznej (NaCl) oraz antagonisty receptora V1a (V1aRANT) nie powodowała istotnych zmian hemodynamicznych w żadnej grupie doświadczalnej. Dokomorowe podanie AP natomiast spowodowało istotny wzrost MABP, nieobecny podczas łącznej, ośrodkowej infuzji AP z V1aRANT. Na podstawie powyższych wyników można przypuszczać, że AP może wywierać ośrodkowy wpływ na parametry hemodynamiczne poprzez aktywację receptorów V1a wazopresyny. Dlatego też wydaje się, iż istnieje interakcja między układami apelinergicznym i wazopresynergicznym, odgrywająca istotną rolę w ośrodkowej regulacji czynności układu sercowo-naczyniowego.

Hemodynamic effects of acute and chronic administration of hydrogen sulfide in rats with fructose-induced metabolic syndrome.

Mariusz Sikora[1*], Katarzyna Kolaszyńska[2], Adrian Drapała[1], Janusz Skrzypecki[2], Marcin Ufnal[1]

[1]Department of Experimental and Clinical Physiology, Medical University of Warsaw, Poland [2]Students Scientific Group, Department of Experimental and Clinical Physiology, Medical University of Warsaw, Poland

*mariusz.sikora@wum.edu.pl

Hydrogen sulfide (H2S) is an endogenous gasotransmitter that regulates cardiovascular functions. Alteration in H2S synthesis is involved in developing abnormalities, characteristic for metabolic syndrome, such as hypertension, diabetes and atherosclerosis. The aim of this study was to evaluate the hemodynamic effects of acute and chronic administration of H2S donor, sodium hydrosulfide (NaHS), in rats with metabolic syndrome.

Metabolic syndrome in male Sprague-Dawley rats was induced by adding fructose (100mg/l) to drinking water for 6 weeks. The acute vasorelaxant effect of H2S was assessed by i.v. administration of NaHS (1, 2, 5, 10, 20 µmol/kg of body weight). The chronic effects of H2S on hemodynamic parameters in rats with metabolic syndrome were determined by 6 week intraperitoneal treatment with NaHS (56 µmol/kg/day). Autonomic control was evaluated by i.v. pharmacological blockade with hexamethonium (25mg/kg), atropine (1mg/kg) or propranolol (3mg/kg).

Baseline comparison showed that rats with metabolic syndrome (MS) were hypertensive compared with control (C: 110±2mmHg; MS: 129±5mmHg, $P<0.05$).

Acute systemic administration of H2S donor, dose-dependently reduced mean arterial blood pressure (MABP). MS rats responded with significantly higher decreases of MABP.

Chronic NaHS treatment in MS rats reduced blood pressure (MS+H2S: 112±4mmHg), reduced sympathetic effect (MS: 63±7bpm, MS+H2S: 38±7bpm; C: 31±6bpm; $P<0.05$) and increased vagal effect (MS: 36±5bpm, MS+H2S: 52±7bpm; C: 59±4bpm; $P<0.05$).

The findings of this study suggest that the exogenous H2S administration lowers blood pressure and improve cardiac autonomic control in fructose-induced metabolic syndrome.

This work was supported by the National Science Center, grant no. 2011/01/N/NZ4/03682 and Medical University of Warsaw, grant no. 1MA/PM11/13.

A link between the loss of ecto-5'-nucleotidase activity and aortic valve dysfunction in mice

Paulina Żukowska[1,*], Iwona Rybakowska[2], Barbara Kutryb-Zając[1] , Jasztal Agnieszka[4], Toczek Marta[1], Romaszko Paweł[1], Borkowski Tomasz[3], Chłopicki Stefan[4], Smoleński Ryszard T. [1], Słomińska Ewa M. [1]

[1]Department of Biochemistry, Medical University of Gdansk, Poland [2]Department of Biochemistry and Clinical Physiology, Medical University of Gdansk, Poland [3]Department of Cardiology, Provincial Specialist Hospital in Wloclawek, Poland [4]Jagiellonian Center for Experimental Therapeutics, Jagiellonian University, Krakow, Poland

*paulina.zukowska@gumed.edu.pl

Aortic valve stenosis is common problem in humans. The inflammation plays key part in its pathophysiology. Adenine nucleotides and products of their catabolism have an important role in the control of this process. The decrease in the extracellular adenosine amount may contribute to intensification of inflammation.

The aim of the study was to investigate the effect of high-fat diet and CD73 knock out (CD73-/-) on the development of aortic valve dysfunction in mice.

Groups of animals: low-fat CD73-/-, low-fat Wild Type (WT), high-fat CD73-/- and high-fat WT. Mice were fed a special diets for 15 weeks with weight and blood glucose concentration monitoring. Animals were underwent Doppler ultrasound analysis. Afterwards, the aortic roots were collected for analysis of the extracellular nucleotides catabolism enzymes activities: ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (eNTPD), ecto-5'-nucleotidase (e5'NT) and ecto-adenosine deaminase (eADA). Fragments of heart were also collected for aortic valve histological analysis.

CD73-/- mice were characterized by a lower weight and higher glucose level than WT(27,8±0,9 vs 31,0±1,4g; 144,6±7,1 vs 107,3±5,2 mg/dl). High-fat diet induced an increase in the blood glucose level. Activity of e5'NT in CD73-/- mice was below 10% of WT. Activity of eADA in the CD73-/- group was lower compared to WT (0,71±0,11 vs 1,12±0,09 nmol/cm2/min). Activity of eNTPD in CD73-/- mice was higher in comparison to WT (2,97±0,35 vs 2,09±0,17 nmol/cm2/min). High-fat diet caused substantial increase in peak aortic flow indicating obstruction in comparison to low-fat diet. CD73-/- knock out on low-fat diet led to increase in this parameter compared to WT (4,36±0,27 vs 2,85±0,22 m/s). There were no calcium deposits, fibrin clots and accumulation of amorphous matrix in the aortic valves, but changes in their morphology may indicate a development of dysfunction.

Our results show that knock out of CD73 leads to aortic stenosis in mice similar to that induced by high-fat diet. Combination of high-fat diet with CD73 knock out leads to most severe valve dysfunction. Increasing the concentration of extracellular adenosine could have therapeutic potential in the aortic valve pathology.

This research was conducted within the project „Nucleotides in pathology, diagnosis and therapy of heart disease" that is co-financed by European Union within European Regional Development Fund of Innovative Economy Programme and Programme TEAM of Foundation for Polish Science

Effect of pravastatin on lipid profile and area of atherosclerotic lesions in ApoE/LDLR$^{-/-}$ double knockout mice fed control and low carbohydrate, high protein diet.

Angelika Manterys[1*], Magdalena Franczyk-Żarów[1], Izabela Czyżyńska-Cichoń[1], Anna Drahun[1], Edyta Maślak[2], Stefan Chłopicki[2], Renata B. Kostogrys[1]

[1]*Department of Human Nutrition, Faculty of Food Technology, University of Agriculture, Cracow, Poland*
[2]*Jagiellonian Center of Experimental Therapeutics (JCET), Cracow, Poland*

*angelika.manterys@gmail.com

Overconsumption of animal protein and restriction in carbohydrates intake impairs lipid metabolism and promotes atherosclerosis development. One of the commonly used therapy in these disorders are statins. The aim of study was to evaluate effect of pravastatin administration on lipid profile and area of atherosclerotic lesions in ApoE/LDLR$^{-/-}$ mice fed control (AIN) and low carbohydrates, high protein (LCHP) diet.

ApoE/LDLR$^{-/-}$ mice (16-18 weeks of age), with pre-established atherosclerosis, were divided into six experimental groups. Animals in three groups were fed for the next 8 weeks AIN diet (AIN), AIN with 40 mg of pravastatin /kg b.w./d (AIN+40) and AIN with 100 mg pravastatin /kg b.w./d (AIN+100). Another three groups were fed LCHP diet (LCHP), LCHP with 40 mg of pravastatin /kg b.w./d (LCHP+40) and LCHP with 100 mg pravastatin /kg b.w./d (LCHP+100). Plasma lipid profile (TC, LDL, HDL, TAG) was determined using commercially available kits. *En face* analysis of aortas was used to asses quantification of atherosclerotic lesions.

Pravastatin had no impact on lipid profile in mice fed AIN diet. In LCHP+100 group TC levels was nearly 2-fold lower than in LCHP and LCHP+40 groups. Also LDL-cholesterol significantly decreased in LCHP+100 group (17,96±2,15 mmol/l) compared to LCHP and LCHP+40 (26,18±2,53 and 25,70±1,68 mmol/l, respectively). Abdominal lesions area in AIN+100 group was significantly reduced compared to AIN+40 (4,26±2,13 vs. 8,79±1,27%). Also in whole aorta AIN+100 group had lower atherosclerotic surface in comparison to AIN and AIN+40 groups (10,07±2,09 vs. 16,48±1,68 and 16,45±2,07%, respectively). In LCHP groups administration of 100 mg/kg b.w./d resulted in significantly lower lesions area in both abdominal and whole aorta. Lesions area in whole aorta in mice fed LCHP, LCHP+40 and LCHP+100 were 23,77±2,74%, 19,23±3,05% and 13,36±1,07%, respectively.

Administration 100 mg/kg b.w./d of pravastatin had significant beneficial effect on atherosclerosis lesions area in both experimental diets. However, only in LCHP groups pravastatin affected lipid profile of ApoE/LDLR$^{-/-}$ mice. This can lead to conclusion that in animals fed control diet pravastatin reduced atherosclerosis development through mechanisms other than lipid-lowering.

The effect of oxidized cholesterol on barier functions and IL-10 mRNA expression In human intestinal epithelium co-cultured with dendritic cells In the transwell system

Maciej Chalubinski[1*], Katarzyna Wojdan[1], Paulina Gorzelak[1], Maciej Borowiec[2,3], Marlena Broncel[1]

[1]Dept. of Internal Diseases and Clinical Pharmacology, Laboratory of Tissue Immunopharmacology, Medical University of Lodz, Poland [2] Immunopathology and Genetics Laboratory, Department of Pediatrics, Oncology, Hematology and Diabetology, Medical University of Lodz, Poland [3] Department of Clinical Genetics, Medical University of Lodz, Poland

*maciej.chalubinski@umed.lodz.pl

The intestinal epithelium is exposed to oxygenated cholesterol products present in foodstuffs. In vitro studies demonstrate the effect of oxysterols on cytokine release by intestinal cells cultured alone. However, physiologically, the response of the intestinal epithelium to external agents occurs in the presence of dendritic cells (DCs).

The aim of the study was to analyze the effect of 7-ketocholesterol on the barrier functions and IL-10 mRNA expression of Caco-2 cells in the presence of DCs, and secondly, on IL-10 mRNA expression in DCs.

Methods:

1. In vitro preparation of Caco-2 cells.
2. In vitro generation of dendritic cells from human monocytes.
3. Co-culture of Caco-2 cells and monocyte-derived DCs in transwell system and treatment with 7-ketocholesterol.
4. Transepithelial electrical resistance (TER) of Caco-2 cells measurements in the transwell system.
5. Total RNA extraction, complementary DNA (cDNA) preparation, real-time polymerase chain reaction (RT-PCR).
6. Statistical analysis.

Results:

1. Induction of Caco-2 cells with 7-ketocholesterol in the co-culture with DCs was associated with a significant decrease of TER compared to Caco-2 cells cultured alone (85.5 ± 4.2% versus 110 ± 5.6%; $p = 0.01$ and 72.6 ± 6.2% versus 105 ± 9.9%; $p < 0.05$, respectively).
2. Caco-2 cells co-cultured with DCs treated with 7-ketocholesterol demonstrated ZO-1 mRNA expression 30% lower in 7-ketocholesterol-treated cultures than untreated ones cultured alone and co-cultured with DCs ($p < 0.05$).
3. In DCs co-cultured with Caco-2 cells treated with 7-ketocholesterol, IL-10 mRNA expression was 3 times lower than in DCs co-cultured with Caco-2 cells not stimulated with 7-ketocholesterol ($p < 0.05$)

The results of the present study demonstrate that DCs may modify IL-10 expression in the intestinal epithelium. Secondly, 7-ketocholesterol may affect the intestinal epithelial barrier and diminish the effect of DCs on IL-10 expression in epithelial cells. Finally, 7-ketocholesterol can influence the intestinal epithelium, resulting in altered IL-10 expression in dendritic cells. Therefore, food-derived oxidized cholesterols present in gut mucosa may contribute to the decrease of both epithelial barrier functions and inappropriate development of an inflammatory response to other food compounds.

Visualization of short-term heart period variability with network tools

Danuta Makowiec*

Institute of Theoretical Physics and Astrophysics, Gdansk University, Poland

*fizdm@ug.edu.pl

The heart homeostatic blood supply to organs is preserved by the cascade of complex feedback loops which are maintained by the autonomous nervous system. It has been shown that changes in time lengths between subsequent heart contractions, so-called RR-intervals, can provide information about the activity of the autonomic regulation. However, long-term ECG recordings are difficult for standard heart rate variability study because the signals are nonstationary. The nonstandard approach, called Poincare Plot (PP), provides a compact graphical representation of recordings. We propose the method of visualization of changes in the heart periods, tightly related to PP, which appears efficient in the study of short-term complexity in cardiac rhythms.

A network is constructed of vertices representing increments between subsequent RR-intervals, and edges which connect subsequent in time RR-increments. The method is applied to nocturnal Holter signals recorded from healthy young people.

If A/D denotes acceleration/deceleration of a size greater than 35 ms, respectively, then the probability for a sequence (A,A) is 6.6±0.6 % while for (D,D)= 8.3 ± 0.8 %. Thus decelerations of these sizes are more likely persistent than accelerations. On the other hand Prob(A,D) = 6.6±0.6 % and P(D,A)=4.4±0.5 % what indicates that accelerations of a size greater than about 35 ms are more likely anitipersitant than decelerations.

Since large accelerations can be attributed to the vagal withdrawal and large decelerations to the increased vagal activity, the method provides an attractive tool for evaluation of the vagal modulation. The property of autonomic nocturnal regulation found in the short-term variability in healthy young people reveals vagal dynamics as permanent switches between high activity and withdrawals.

Komputerowa analiza obrazów SEM skrzepów fibrynowych z użyciem metody macierzy współwystąpień (GLCM).

Jakub Siudut[1,*], Jacek Tarasiuk[2], Michał Ząbczyk[1,3], Anetta Undas[1,3]

[1]*Krakowski Szpital Specjalistyczny im. Jana Pawła II, Polska* [2]*Wydział Fizyki i Techniki Jądrowej, Akademia Górniczo-Hutnicza, Polska* [3]*Instytut Kardiologii Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Polska*

*jakub.siudut@gmail.com

Wiele czynników genetycznych i środowiskowych wpływa na tworzenie fibryny i jej strukturę. Za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) obrazowano strukturę skrzepu fibrynowego w różnych jednostkach chorobowych i manualnie obliczano grubość włókien fibryny oraz wielkość kątów pomiędzy nimi. W niniejszym badaniu po raz pierwszy zastosowano komputerową analizę zdjęć z użyciem metody macierzy współwystąpień (Gray Level Co-Occurrence Matrix, GLCM) opartą na informacji o rozkładzie przestrzennym pojedynczych pikseli. Wynikiem tych analiz jest macierz przejść, na podstawie której wyznaczane są charakterystyki obrazu: energia (Uniformity of Energy), entropia (Entropy), maksymalna wartość prawdopodobieństwa (Maximum Probability), korelacja danych obrazowych (Correlation), homogeniczność (Homogenity) oraz tendencja skupienia (Cluster Tendency).

Wstępnym badaniom poddano obrazy SEM skrzepu fibrynowego wytworzonego z osocza 4 pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową (ŻChZZ) oraz 5 zdrowych osób w 2 punktach czasowych tj. przed i po podaniu atorwastatyny (40 mg/d) przez 3 kolejne dni.

U obu grup wykonano lipidogram, oznaczono stężenie białka C reaktywnego, fibrynogenu, glukozy, czynnika von Willebranda, poziom interleukiny 1, 6, 8, 10 (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10) oraz P-selektyny. Zbadano także właściwości skrzepu fibrynowego. Parametry charakterystyki obrazu wyznaczono komputerowo.

Pacjentów z VTE charakteryzowała wyjściowo wyższa wartość entropii ($p=0,02$) oraz niższa wartość energii ($p=0,02$) i homogeniczności ($p=0,03$) w porównaniu do osób zdrowych, nie przyjmujących statyny. Po 3 dniach stosowania atorwastatyny nie wykazano tych różnic ($p>0,05$). Energia obrazów przed podaniem statyny korelowała ujemnie ze wskaźnikiem masy ciała, stężeniem glukozy, poziomem IL-6 i IL-8 oraz czasem lizy skrzepu, natomiast dodatnio z przepuszczalnością skrzepu. Te same parametry odwrotnie korelowały z entropią obrazów. U obu grup przed podaniem leku wykazano również korelację pomiędzy IL-6 a maksymalną wartością prawdopodobieństwa oraz pomiędzy IL-8 a korelacją danych i homogenicznością obrazu. Nie zaobserwowano statystycznych różnic w charakterystyce obrazów SEM pomiędzy wyjściową grupą osób zdrowych a tą samą grupą po 3 dniach podawania statyny. W grupie osób z ŻChZZ przed i po leczeniu wykazano tendencję do zmian energii, korelacji danych obrazowych oraz ich homogeniczności ($p=0,07$).

Ocena obrazów SEM z użyciem macierzy przejść może być przydatna do analizy osoczowych skrzepów fibrynowych jako uzupełnienie badań czynnościowych. GLCM może uwidocznić dodatkowe różnice w strukturze osoczowego skrzepu fibrynowego pomiędzy osobami zdrowymi a osobami po przebytej ŻChZZ.

Fraktalne skalowanie drzewa naczyniowego może stanowić substrat dla pierwotnego nadciśnienia tętniczego

Teodor Buchner[1,*], Tomasz Sobiech[1]

[1]*Wydział Fizyki, Politechnika Warszawska, Polska*

*buchner@if.pw.edu.pl

Celem naszego badania jest analiza wpływu skalowania fraktalnego na propagację fali tętna w modelu numerycznym symetrycznego drzewa naczyniowego (model Duan-Zamir). Na skutek odbić od bifurkacji propagacja fali ciśnienia w modelu znacznie odbiega od propagacji w nieskończonej elastycznej rurze o tych samych parametrach. Efektywna admitancja dla drzewa ma wartości inne niż admitancja właściwa naczynia a jej wartość zależy od takich parametrów modelu jak długości i średnice w kolejnych pokoleniach drzewa naczyniowego. Poddajemy analizie drzewa naczyniowe o różnych parametrach morfologicznych (współczynniki skalowania dla średnic i długości, liczba pokoleń drzewa naczyniowego) i elastycznych (moduł Younga), dla różnych parametrów krwi (gęstość i lepkość). W badaniu analizujemy profil fali ciśnienia wzdłuż drzewa naczyniowego i pokazujemy, że w zależności od współczynników skalowania różne składowe harmoniczne ciśnienia mogą być wzmacniane lub wygaszane. W efekcie, pokazujemy, że drzewa naczyniowe o różnych fraktalnych współczynnikach skalowania mogą cechować różne wartości oporu naczyniowego dla harmonicznych ciśnienia. W efekcie niektóre morfometrie drzewa naczyniowego mogą stanowić substrat dla rozwoju nadciśnienia tętniczego. Stawiamy również pytanie o możliwość wpływania na morfometrię drzewa naczyniowego przez sterowanie procesem angiogenezy, co może wpływać korzystnie lub niekorzystnie na rozwój pierwotnego nadciśnienia tętniczego, zwłaszcza wśród dzieci i młodzieży. Fraktalne skalowanie drzewa naczyniowego może stanowić jeden z czynników ułatwiających rozwój tego schorzenia. Możliwy jest również wpływ fraktalnego skalowania na inne choroby naczyń takie jak preeklampsja.

Estimation of growth of human adipose derived stem cells (hADSC) on bio-scaffolds - measurement of the activity of ecto-5'-nucleotidase.

Alicja Sielicka*, Ewa Kaniewska, Iwona Pelikant-Malecka, Ewa M. Slominska, Ryszard T. Smolenski

Department of Biochemistry, Medical University of Gdansk, Poland

*alicjasielicka@gumed.edu.pl

Introduction Multipotent stem cells derived from adipose tissue are promising stem cells population identified so far. They are characterized by easy accessibility and biocompatibility. Adipose stem cells are potentially good source to regeneration of damaged organs. However, non-invasive evaluation of the growth of these cells on bio-scaffolds remains substantial problem. Extracellular enzyme ecto-5'-nucleotidase (e5NT, CD73) that hydrolyze AMP to adenosine has been also identified as the marker of mesenchymal stem cells. This activity could be measured without cell destruction by brief exposure to its substrate. The aim of this study was therefore evaluation whether non-destructive assessment of e5NT could be used for evaluation to cells growth on bio-scaffolds such as Cormatrix. Cormatrix is formed from pigs small intestinal submucosa. Subjected to dehydration, sterilization and pressed together, so that the obtained thin layer, is used to cardiac surgery to reconstruction of interventricular septum or consolidation heart wall after myocardial infarction.

Materials and methods Human adipose derived stem cells (hADSCs) were incubated for 24h in Mesenchymal Stem Cell Growth Medium DXF on Cormatrix or in standard conditions. For non-destructive analysis of e5NT activity, cells were incubated with AMP at final concentration of 50µM. Medium samples were collected at time intervals up to 30 min and the conversion of substrates into products was measured using reversed-phase HPLC.

Results Activity of e5NT was 0.3±0.05 nmol/min./ml (±SD, n=5) in control sample and increased to 0.68±0.28 nmol/min./ml (±SD, n=5) activity on scaffold. After activity assessment cells retained viability and ability to growth.

Conclusion We have demonstrated that measurement of e5NT activity, which is a specific marker of human adipose derived stem cells, could be potential NON-DESTRUCTIVE method to the evaluation of cells growth on bio-scaffolds could be used to after myocardial infraction.

This research was conducted within the project „Nucleotides in pathology, diagnosis and therapy of heart disease" that is co-financed by European Union within European Regional Development Fund of Innovative Economy Programme and Programme TEAM of Foundation for Polish Science

Przewidywanie odpowiedzi sercowej na próbę symulowanego nurkowania w oparciu o spoczynkową częstość akcji serca wyznaczaną w sposób wielomodalny.

Tomasz H. Wierzba, Krzysztof Malinowski, Stanisław Zajączkowski, Maria Smolińska

Katedra i Zakład Fizjologii, Gdański Uniwersytet Medyczny

*twierzba@gumed.edu.pl

Wcześniejsze badania własne wskazują, że wybrane wskaźniki zmienności rytmu serca (HRV) wyznaczone z okresu bezpośrednio poprzedzającego standaryzowany test symulowanego nurkowania mają potencjał predykcyjny w przewidywaniu wielkości wywołanej odpowiedzi kardiodepresyjnej. Celem bieżących badań jest przydatność wielomodalnego sposobu wyznaczania wyjściowej częstości rytmu serca (HR) w przewidywaniu odpowiedzi sercowej wywołanej próbą symulowanego nurkowania

Dwudziestu siedmiu zdrowych studentów (mężczyźni, 20-25 lat) wykonało test polegający na zanurzeniu twarzy w zimnej wodzie (+8 do +9°C), przy zatrzymaniu oddychania po submaksymalnym wdechu. Wyznaczono HR z odstępów RR wyznaczonych z Ekg rejestrowanego w sposób ciągły z rozdzielczością 4 kHz: podczas testu oraz przez jego rozpoczęciem, kolejno w: 15-min spoczynku w pozycji leżącej (HR_L) i 15-min spoczynku w pozycji siedzącej (HR_S). Odpowiedź sercowa na próbę nurkowania miała zawsze charakter dwufazowy. Po początkowym zwiększeniu HR, które rozpoczynało się jeszcze przed zanurzeniem i trwało do kilkunastu sekund od jego rozpoczęcia obserwowano istotne zwolnienie HR. Zarówno początkowy wzrost HR jak i późniejsza odpowiedź kardiodepresyjna znamiennie korelowały ze średnią HR_L i HR_S. Przyjmując, że średnia HR w 15-min okresu niekoniecznie jest optymalnym wyznacznikiem odpowiedzi sercowej w późniejszym teście symulowanego nurkowania, dokonano porównawczej oceny trzech różnych sposobów estymacji referencyjnego HR. przy założeniu, że optymalnie wyznaczone referencyjne HR będzie w największym stopniu korelowało z wywołanymi odpowiedziami sercowymi i z wybranymi wskaźnikami HRV. Porównano współczynniki korelacji (r) Pearsona dla HR: wyznaczonej jako: 1) minimalna średnia z kolejnych 512 cykli serca, 2) minimum średniej ruchomej HR przy danej liczbie RR; 3) z najdłuższego odstępu RR w każdym z okresów spoczynkowych.

Wynik porównań wskazuje na brak uniwersalnego sposobu wyznaczania spoczynkowego, referencyjnego HR. Najdłuższy odstęp RR zarejestrowany w okresie poprzedzającym próbę symulowanego nurkowania wykazuje największą moc predykcyjną późniejszej odpowiedzi kardiodepresyjnej. Z kolei, średnia HR z okresu odpowiadającego 200 – 512 RR w największym stopniu koreluje z wzrostem HR w pierwszej fazie testu i z czasem dowolnego zanurzenia.