

Raport z wykonania zadania 4

Cel zadania

Zadanie miało na celu sprawdzenie czy badane preparaty poprawiają funkcjonowanie śródbłónka naczyniowego u zwierząt z cukrzycą doświadczalną. Ocenę funkcjonowania śródbłónka wykonywano metodą perfuzji serc *ex vivo* z użyciem systemu Langendorffa. Modelem badawczym były szczury z cukrzycą doświadczalną wyindukowaną za pomocą streptozotocyny (STZ).

Wykonanie

W eksperymencie wykorzystano samce szczurów szczepu Sprague-Dawley o masie 250-300g. Zwierzęta, zarówno w trakcie hodowli jak i w trakcie eksperymentu, karmione były paszą bezsojową o obniżonej zawartości fitoestrogenów. Cukrzycę doświadczalną wywoływano przez dootrzewnową iniekcję roztworu streptozotocyny w dawce 70 mg/kg masy ciała. Zwierzęta po iniekcji znakowano numerowanymi klipsami. 7 dni po iniekcji zwierzęta ważono i wykonywano pomiar glikemii we krwi żyłnej. Warunkiem uznania zwierzęcia za obarczone cukrzycą i włączenia do eksperymentu było jednoczesne spełnienie następujących warunków:

- spadek masy ciała o co najmniej 10%
- wartość glikemii przekraczająca 200 mg%.

Zwierzęta spełniające jednocześnie powyższe kryteria alokowano w sposób losowy do 2 grup eksperymentalnych liczących po 80 osobników każda. Utworzono grupy eksperymentalne otrzymujące następujące dawki preparatu w wodzie pitnej:

- 0 mg kwasu galusowego/kg masy ciała/ dobę
- 5 mg kwasu galusowego /kg masy ciała/ dobę

Dawki te wybrano na podstawie eksperymentów oceniających przeżywalność zwierząt cukrzycowych po suplementacji badanymi preparatami w **zadaniu 7**.

W badaniach założono standaryzację badanego preparatu na zawartość kwasu galusowego, dlatego dawki wyrażone są jako masa polifenoli ogółem w preparacie w przeliczeniu na kwas galusowy.

Na podstawie wcześniejszych doświadczeń wykazano, że obecność badanego preparatu w najwyższej testowanej dawce w wodzie pitnej nie wpływa na ilość płynu spożywanego przez zwierzęta. Na tej podstawie przyjęto tą drogę podawania badanego preparatu. Zwierzęta w grupie kontrolnej otrzymywały czystą wodę pitną.

Zwierzęta umieszczone były w klatkach po nie więcej niż 5 osobników w jednej (położenie klatek na półkach w pokoju bytowania zwierząt zmieniano w sposób sterowany). Co 7 dni dokonywano pomiarów masy ciała. Na tej podstawie obliczano masę preparatu jaką powinny w ciągu doby spożyć zwierzęta w danej klatce, by przyjąć określoną dawkę. Codziennie odpowiednia masa preparatu była rozpuszczana w 0,5 litra wody pitnej i podawana zwierzętom.

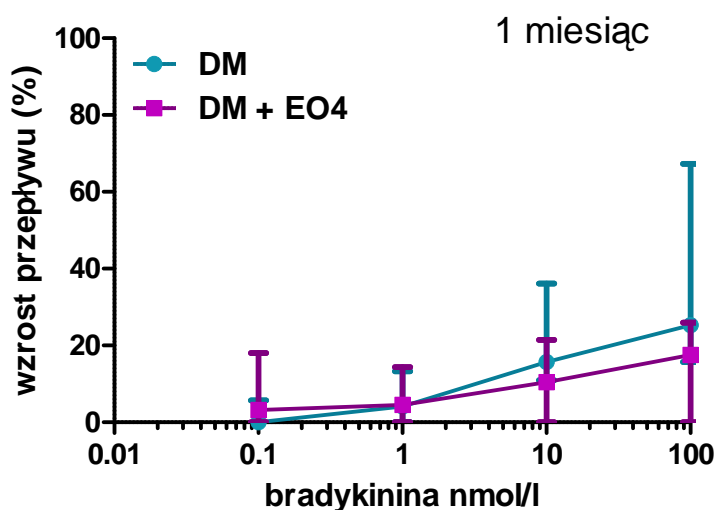
Codziennie rejestrowano padnięcia zwierząt, a co 7 dni ich masę i glikemię.

Po 4, 10 i 20 tygodniach podawania preparatu pobierano 10 osobników z każdej grupy i prowadzono pomiary przepływów wieńcowych.

Sposób prowadzenia pomiarów opisują procedury zamieszczone na końcu sprawozdania.

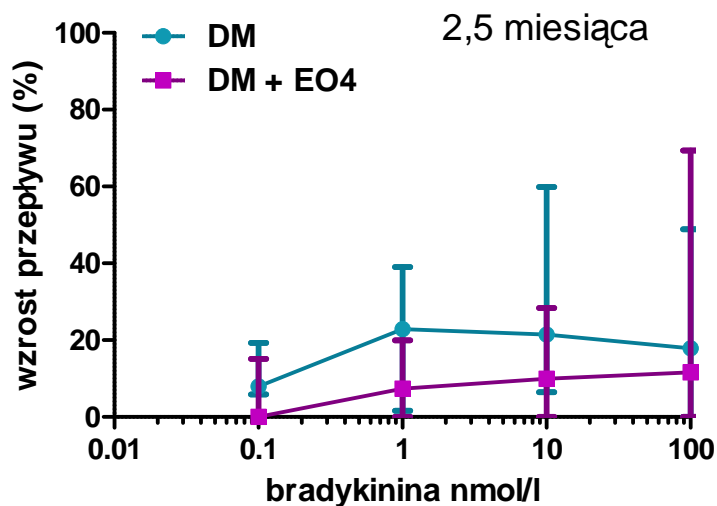
Wyniki

Preparat EO4

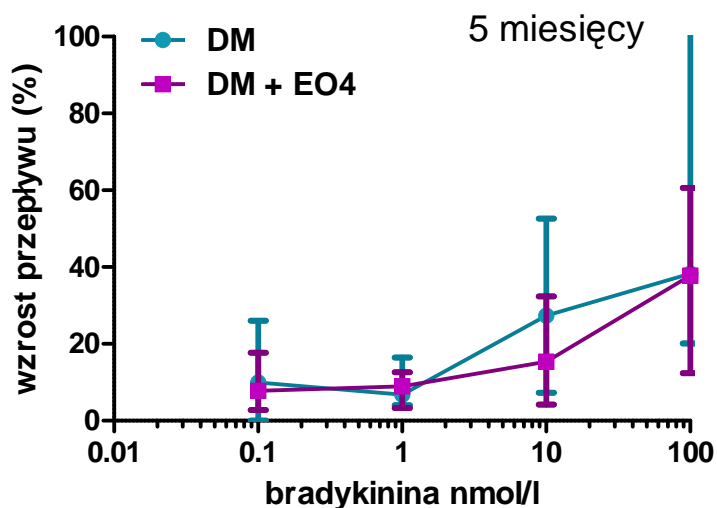


Ryc. 1 Zmiana przepływu wieńcowego w odpowiedzi na bradykininę u zwierząt po 1 miesiącu podawania EO4 w dawce 5 mg/kg m.c. (DM + EO4) w porównaniu do zwierząt

otrzymujących czystą wodę pitną (DM). Wyniki zaprezentowane jako mediana z rozstępem międzykwartylowym (n = 8-10).

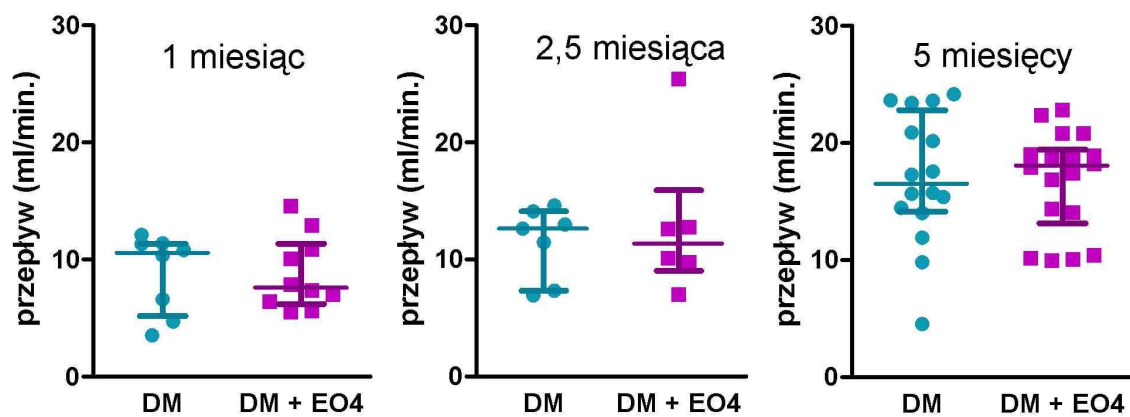


Ryc. 2 Zmiana przepływu wieńcowego w odpowiedzi na bradykininę u zwierząt po 2,5 miesiąca podawania EO4 w dawce 5 mg/kg m.c. (DM + EO4) w porównaniu do zwierząt otrzymujących czystą wodę pitną (DM). Wyniki zaprezentowane jako mediana z rozstępem międzykwartylowym (n = 8-10).

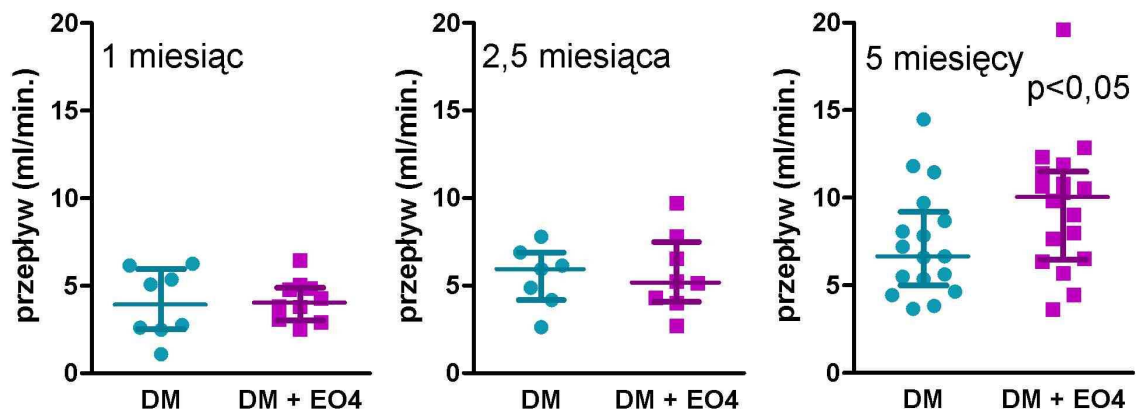


Ryc. 3 Zmiana przepływu wieńcowego w odpowiedzi na bradykininę u zwierząt po 5 miesiącach podawania EO4 w dawce 5 mg/kg m.c. (DM + EO4) w porównaniu do zwierząt

otrzymujących czystą wodę pitną (DM). Wyniki zaprezentowane jako mediana z rozstępem międzykwartylowym (n = 8-10).



Ryc. 4 Przepływ wieńcowy w odpowiedzi na donor tlenu azotu (DEA-NO) u zwierząt doświadczalnych po 1; 2,5 i 5 miesiącach podawania EO4 w dawce 5 mg/kg m.c. (DM+EO4) w porównaniu do zwierząt otrzymujących czystą wodę pitną (DM). Wyniki zaprezentowane jako mediana z rozstępem międzykwartylowym.

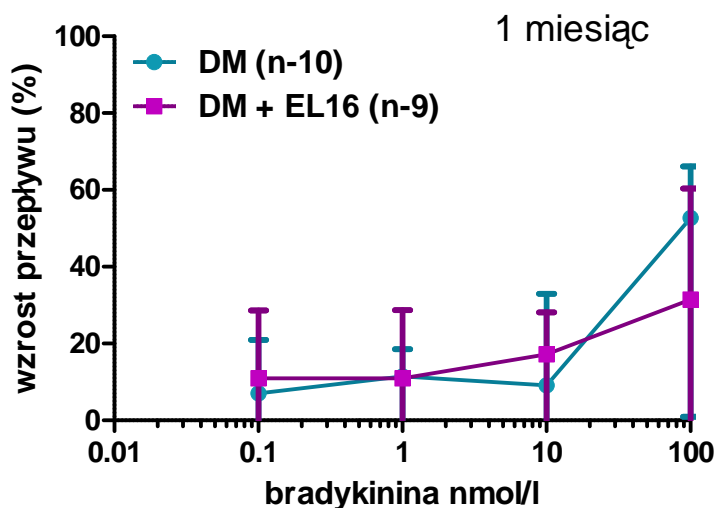


Ryc. 5 Przepływ wieńcowy w odpowiedzi na inhibitor syntazy tlenu azotu (L-NAME) u zwierząt doświadczalnych po 1; 2,5 i 5 miesiącach podawania EO4 w dawce 5 mg/kg m.c. (DM+EO4) w porównaniu do zwierząt otrzymujących czystą wodę pitną (DM). Wyniki zaprezentowane jako mediana z rozstępem międzykwartylowym.

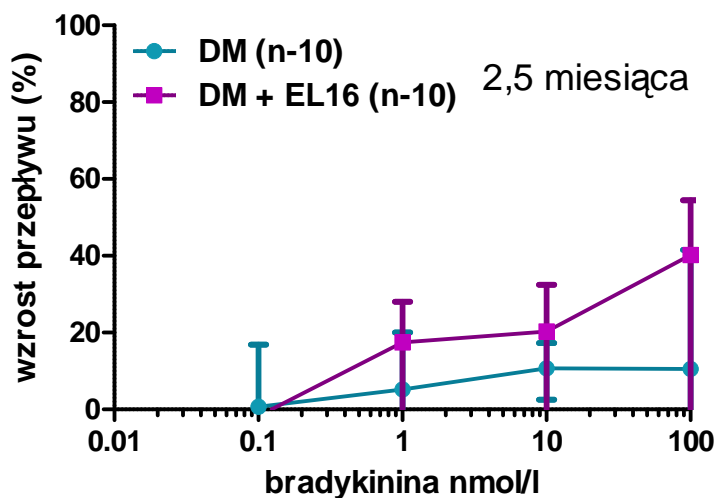
Wnioski

Suplementowanie zwierząt cukrzycowych preparatem EO4 nie poprawiło wazodylatacji zależnej od śródbłonka naczyniowego (Ryc. 1, Ryc. 2 i Ryc. 3). Suplementacja preparatem nie miała również wpływu na rozkurcz naczyń indukowany donorem tlenu azotu tj. niezależny od śródbłonka naczyniowego (Ryc. 4). Natomiast przepływ po zahamowaniu syntazy tlenu azotu niewybiórczym inhibitorem L-NAME był istotnie większy w grupie zwierząt suplementowanych 5 miesięcy wychmielinami (Ryc. 5). Ten efekt można tłumaczyć zwiększoną aktywnością czynników wazodylatacyjnych innych niż tlenek azotu np. produktów cyklooksygenaz lub tych określanych wspólnym mianem śródbłonkowego czynnika hiperpolaryzującego (endothelium-derived hyperpolarizing factor, EDHF).

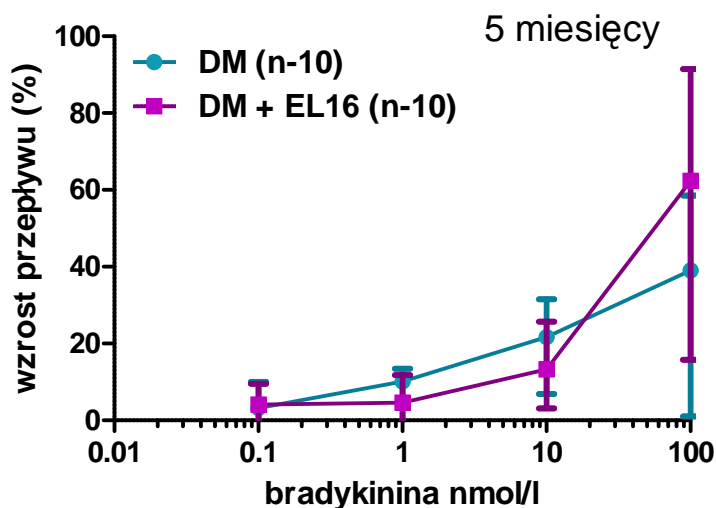
Preparat EL16



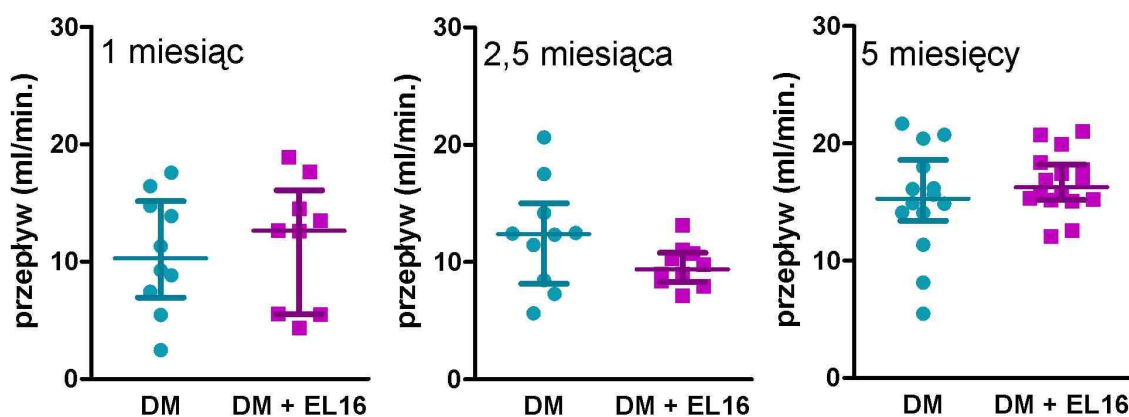
Ryc. 6 Zmiana przepływu wieńcowego w odpowiedzi na bradykininę u zwierząt po 1 miesiącu podawania EL16 w dawce 5 mg/kg m.c. (DM + EL16) w porównaniu do zwierząt otrzymujących czystą wodę pitną (DM). Wyniki zaprezentowane jako mediana z rozstępem międzykwartylowym (n = 9-10).



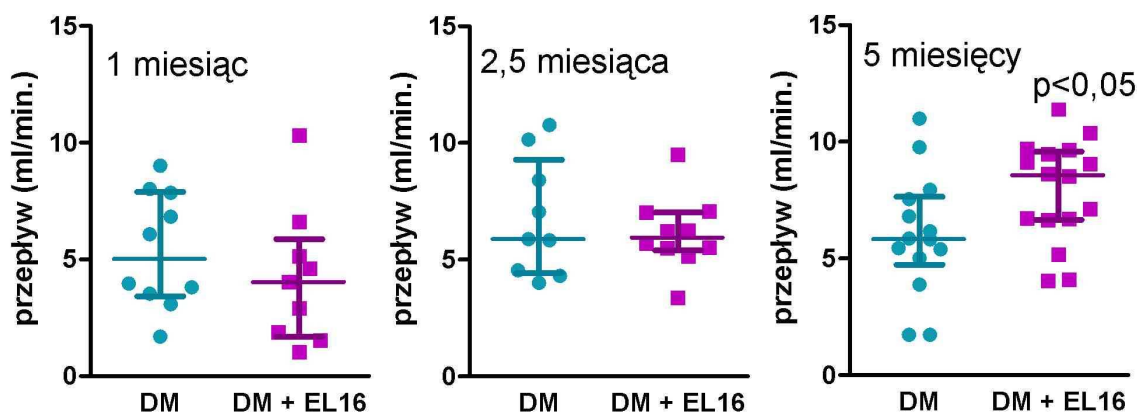
Ryc. 7 Zmiana przepływu wieńcowego w odpowiedzi na bradykininę u zwierząt po 2,5 miesiąca podawania EL16 w dawce 5 mg/kg m.c. (DM + EL16) w porównaniu do zwierząt otrzymujących czystą wodę pitną (DM). Wyniki zaprezentowane jako mediana z rozstępem międzykwartylowym (n = 10).



Ryc. 8 Zmiana przepływu wieńcowego w odpowiedzi na bradykininę u zwierząt po 5 miesiącach podawania EL16 w dawce 5 mg/kg m.c. (DM + EL16) w porównaniu do zwierząt otrzymujących czystą wodę pitną (DM). Wyniki zaprezentowane jako mediana z rozstępem międzykwartylowym (n = 10).



Ryc. 9 Przepływ wieńcowy w odpowiedzi na donor tlenku azotu (DEA-NO) u zwierząt doświadczalnych po 1; 2,5 i 5 miesiącach podawania EL16 w dawce 5 mg/kg m.c. (DM+EL16) w porównaniu do zwierząt otrzymujących czystą wodę pitną (DM). Wyniki zaprezentowane jako mediana z rozstępem międzykwartylowym.

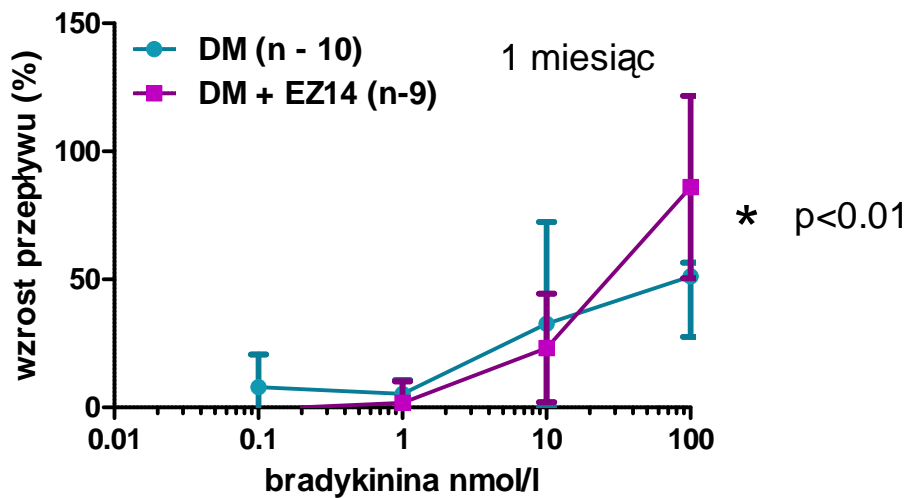


Ryc. 10 Przepływ wieńcowy w odpowiedzi na inhibitor syntazy tlenu azotu (L-NAME) u zwierząt doświadczalnych po 1; 2,5 i 5 miesiącach podawania EL16 w dawce 5 mg/kg m.c. (DM+EL16) w porównaniu do zwierząt otrzymujących czystą wodę pitną (DM). Wyniki zaprezentowane jako mediana z rozstępem międzykwartylowym.

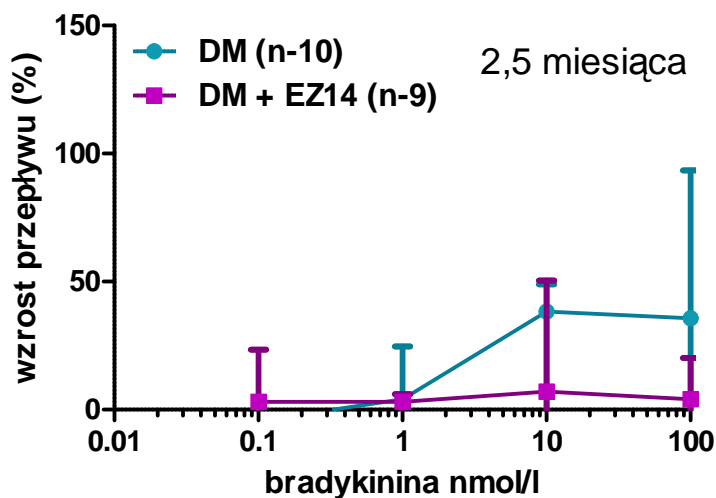
Wnioski

Suplementowanie zwierząt cukrzycowych preparatem EL16 nie poprawiło wazodylatacji zależnej od śródbłonna naczyniowego (Ryc. 6, Ryc. 7 i Ryc. 8). Suplementacja preparatami nie miała również wpływu na rozkurcz naczyń indukowany donorem tlenu azotu tj. niezależny od śródbłonna naczyniowego (Ryc. 9). Natomiast przepływ po zahamowaniu syntazy tlenu azotu niewybiórczym inhibitorem L-NAME był istotnie większy w grupie zwierząt suplementowanych 5 miesięcy ekstraktem z liści porzeczki (Ryc. 10). Ten efekt można tłumaczyć zwiększoną aktywnością czynników wazodylatacyjnych innych niż tlenek azotu np. produktów cyklooksygenaz lub tych określanych wspólnym mianem śródbłonkowego czynnika hiperpolaryzującego (endothelium-derived hyperpolarizing factor, EDHF).

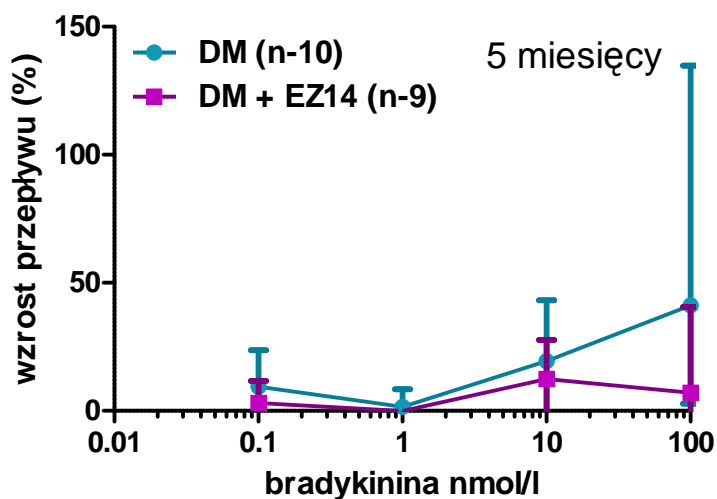
Preparat EZ14



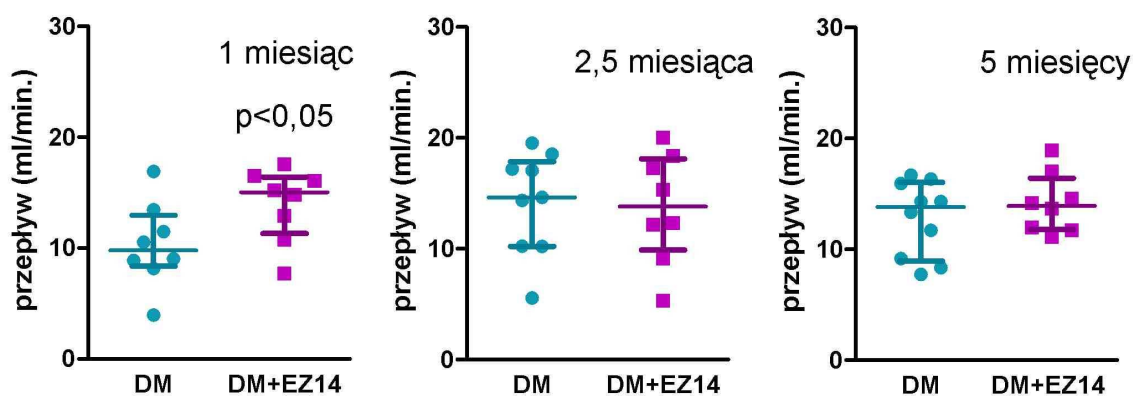
Ryc. 11 Zmiana przepływu wieńcowego w odpowiedzi na bradykininę u zwierząt po 1 miesiącu podawania EZ14 w dawce 5 mg/kg m.c. (DM + EZ14) w porównaniu do zwierząt otrzymujących czystą wodę pitną (DM). Wyniki zaprezentowane jako mediana z rozstępem międzykwartylowym (n = 9-10).



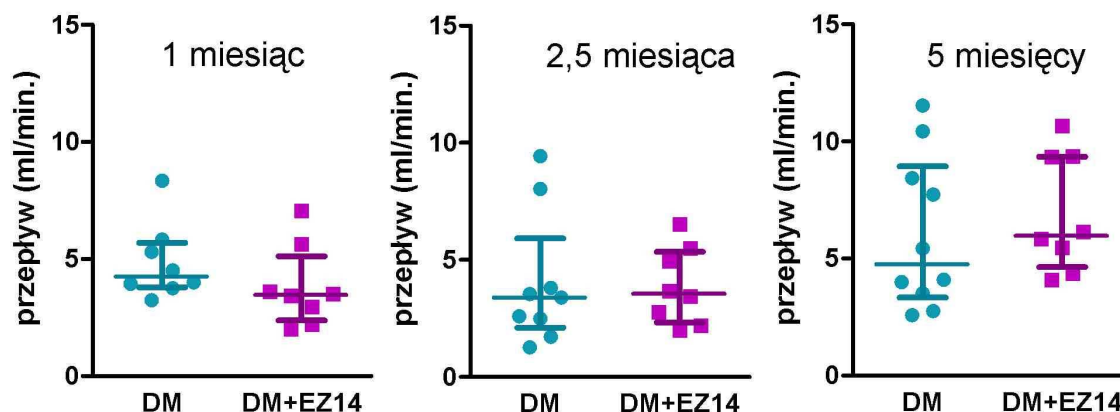
Ryc. 12 Zmiana przepływu wieńcowego w odpowiedzi na bradykininę u zwierząt po 2,5 miesiąca podawania EZ14 w dawce 5 mg/kg m.c. (DM + EZ14) w porównaniu do zwierząt otrzymujących czystą wodę pitną (DM). Wyniki zaprezentowane jako mediana z rozstępem międzykwartylowym (n = 9-10).



Ryc. 13 Zmiana przepływu wieńcowego w odpowiedzi na bradykininę u zwierząt po 5 miesiącach podawania EZ14 w dawce 5 mg/kg m.c. (DM + EZ14) w porównaniu do zwierząt otrzymujących czystą wodę pitną (DM). Wyniki zaprezentowane jako mediana z rozstępem międzykwartylowym (n = 9-10).



Ryc. 14 Przepływ wieńcowy w odpowiedzi na donor tlenku azotu (DEA-NO) u zwierząt doświadczalnych po 1; 2,5 i 5 miesiącach podawania EZ14 w dawce 5 mg/kg m.c. (DM+EZ14) w porównaniu do zwierząt otrzymujących czystą wodę pitną (DM). Wyniki zaprezentowane jako mediana z rozstępem międzykwartylowym.



Ryc. 15 Przepływ wieńcowy w odpowiedzi na inhibitor syntazy tlenu azotu (L-NAME) u zwierząt doświadczalnych po 1; 2,5 i 5 miesiącach podawania EZ14 w dawce 5 mg/kg m.c. (DM+EZ14) w porównaniu do zwierząt otrzymujących czystą wodę pitną (DM). Wyniki zaprezentowane jako mediana z rozstępem międzykwartylowym.

Wnioski

Po 1 miesiącu podawania ekstraktu EZ14 zaobserwowano istotnie większą wazorelaksację w odpowiedzi na 100 nM bradykinę i donor tlenu azotu niż u zwierząt niesuplementowanych. Wazodylatacja zależna i niezależna od śródbłonna naczyniowego była zatem istotnie poprawiona u zwierząt cukrzycowych pod wpływem podawania ekstraktu EZ14. Efekt ten nie wystąpił w kolejnych interwałach czasowych. Można przypuszczać, że zmiany powstające na skutek długo utrzymującej się i niekontrolowanej hiperglikemii są tak znaczne, że podawanie preparatu w badanej dawce jest je w stanie zniwelować jedynie na wczesnym etapie.

Archiwizacja wyników

Wprowadzenie zwierząt do eksperymentu oraz ich pobieranie wraz z datami było odnotowywane w dzienniku laboratoryjnym.

Cotygodniowe pomiary masy ciała zwierząt w formie wydruków zgromadzone zostały w segregatorze.

Zapisy poszczególnych rejestracji opisane numerami zwierząt w formacie elektronicznym właściwym dla programu LabChart obsługującym system Langendorffa zostały zarchiwizowane na nośniku elektronicznym (płyta CD)

Wszystkie powyższe archiwa dostępne są w siedzibie Wykonawcy.

Procedury

1 Procedura resekcji serca.

1.1 Anestezja:

Podanie domięśniowe ksylazyny w dawce 10 mg/kg.m.c (Sedazin, Biowet ®) oraz ketaminy (Ketanest, Biowet®) w dawce 100 mg/kg m.c. Zastrzyk dwiema igłami insulinowymi w mięśnie pośladkowe zwierzęcia ułożonego brzusznie i przykrytego od pasa w górę materiałem. Po podaniu środków anestetycznych umieszczenie zwierzęcia w małej klatce izolacyjnej wyłożonej papierem.

1.2 Zabieg resekcji serca:

- 1.2.1 Umieszczenie zwierzęcia na stole operacyjnym w pozycji grzbietowej z fiksacją kończyn oraz głowy (uchwyt za zęby).
- 1.2.2 Otwarcie powłok brzusznych poniżej grzebienia mostka za pomocą nożyczek chirurgicznych przez wszystkie warstwy cięciem pojedynczym. Odstąpienie przepony i podstawy żeber kolejnymi cięciami.
- 1.2.3 Przecięcie przepony i żeber przez wszystkie powłoki ciała dwoma cięciami w górę ciała wzdłuż prawej i lewej linii pachowej środkowej aż do odkrycia całego serca. Uniesienie mostka i fiksacja peanem powyżej pola operacyjnego.
- 1.2.4 Usunięcie osierdzia i podniesienie serca. Odnalezienie aorty i uchwycenie jej pęsetą atraumatyczną. Izolacja serca od otaczających organów (grasicy, płuc). Trzymając aortę cięcie nożyczkami tępymi od strony wewnętrznej ciała w górę odcinając płuca i na końcu naczynia powyżej miejsca uchwytu.
- 1.2.5 Umieszczenie bijącego serca w schłodzonym do 4°C buforze Krebsa-Henseleita oraz wykonanie masażu mięśnia sercowego w celu wymiany krwi na roztwór w naczyniach wieńcowych (skład roztworu K.H w tabeli poniżej).

1.3 Umieszczenie serca w aparacie Langendorffa:

- 1.3.1 Ponowne odnalezienie aorty i uchwycenie atraumatyczną pęsetą. Podniesienie serca za aortę i zbliżenie do kaniuli aparatu.
- 1.3.2 Dwoma pęsetami (jedna najlepiej o ostrych szpatułach – mikrochirurgiczna) otwarcie aorty i uchwycenie jej za brzeg w przeciwnych miejscach. Wprowadzenie kaniuli do aorty poprzez podniesienie serca. Kaniula nie może znajdować się poniżej zastawki aortalnej.
- 1.3.3 Przytrzymując pęsetą serce za aortę na zadanej wysokości na kaniuli zapiąć narzędziem atraumatycznym przez zaciśnięcie. Następnie przywiązanie aorty poniżej narzędzia nicią. Uwolnienie narzędzia.
- 1.3.4 Usunięcie lewego przedsionka i uruchomienie przepływu roztworu K.H z pompy aparatu. Usunięcie prawego przedsionka.

- 1.3.5 Usunięcie pozostałości poresekcyjnych: fragmentów pnia płucnego oraz płuc.
- 1.3.6 W koniuszku serca umieścić elektrodę dostarczającą impulsy elektryczne. Igłę należy wprowadzić w mięsień na tyle głęboko by nie ulegała wysunięciu.
- 1.3.7 Podnieść płaszcz grzeiny. Ustalić częstotliwość stymulacji serca na ok. 300 uderzeń/minutę.

2 Procedura pomiarów na systemie Langendorffa

- 2.1 *Upewnić się, że wartość ciśnienia jest ustalona na 73 mmHg (patrz: „Uruchomienie i kalibracja aparatu”)*
- 2.2 *Umieścić serce w aparacie (Patrz: „Procedura resekcji serca.”)*
- 2.3 *Ustabilizować przepływ dla ciśnienia 73 mmHg (używając pokrętki szybkości przepływu). Czas oczekiwania około 20 minut.*
- 2.4 *Pobrać do strzykawki 20 ml 2nM roztworu bradykininy. (stężenie robocze 0,1nM)*
- 2.5 *Umieścić strzykawkę w pompie infuzyjnej i rozpocząć podawanie roztworu. Prędkość podawania roztworu powinna być 20 razy mniejsza niż aktualny przepływ w systemie. Na stosowanej pompie infuzyjnej prędkość jest podana w ml/h, a przepływ w systemie w ml/min. Aby uzyskać odpowiednią prędkość podawania należy zatem wartość przepływu w systemie pomnożyć przez 3 i uzyskaną wartość wpisać jako ml/h na pompie infuzyjnej. Podawanie należy rozpocząć jednak z prędkością jednej trzeciej żądanej by natychmiast po jej uruchomieniu ustawić na pompie właściwą.*
- 2.6 *Ustawić znacznik w polu zapisu wyników i po zakończeniu podawania substancji. Podawać przez 2 minuty aktualizując na bieżąco prędkość podawania wraz ze zmieniającym się przepływem na pompie infuzyjnej.*
- 2.7 *Zaprzestać podawania bradykininy. Przełączyć zawór na perfuzję buforem K.H. Perfudować 8 minut.*
- 2.8 *Tak jak opisano w punktach 5-7 podać kolejno roztwory bradykininy o stężeniach 20nM, 200 nM i 2μM. (stężenia robocze odp. 1nM, 10nM, 100nM)*
- 2.9 *Tak jak opisano w punktach 5-7 podać roztwór DEA-NO o stężeniu 15μM. (przyrządzanie roztworu DEA-NO patrz „Sporządzanie roztworów”). (stężenie robocze 1μM) Prędkość podawania roztworu powinna być 15 razy mniejsza niż aktualny przepływ w systemie. Zatem wartość przepływu w systemie należy pomnożyć przez 4 i uzyskaną wartość wpisać jako ml/h na pompie infuzyjnej. Również należy rozpoczynać podawanie od jednej trzeciej żądanej szybkości przepływu.*
- 2.10 *Przygotować 200ml 300μM roztworu L-NAME (patrz „Sporządzanie roztworów”) i włączyć do rezerwowego zbiornika.*
- 2.11 *Po zakończeniu podawania DEA-NO i upływie 8 min. perfuzji buforem K.H. przełączyć zawór na podawanie roztworu L-NAME ze zbiornika rezerwowego.*

- 2.12 *Czekać min. 15 min. na ustabilizowanie się przepływu.*
- 2.13 *Zapisać plik z danymi odpowiednio go etykietując.*
- 2.14 *Usunąć serce z kaniuli i umieścić wraz ze szczątkami zwierzęcia w pojemniku z odpadami biologicznymi z przeznaczeniem do spalenia.*

3 Uruchomienie i kalibracja aparatu

- 3.1 *Założyć wężyki na pompę perystaltyczną.*
- 3.2 *Wypełnić cylinder buforem Krebsa-Hansenleita.*
- 3.3 *Uruchomić pompę perystaltyczną, przetworniki, sterownik temperatury.*
- 3.4 *Uruchomić napływ karbogenu do cylindrów.*
- 3.5 *Odczekać do całkowitego napełnienia systemu buforem.*
- 3.6 *Upewnić się, że rurka do kalibracji ciśnienia jest wypełniona wodą do oznaczonego poziomu.*
- 3.7 *Upewnić się, że mierniki ciśnienia znajdują się na tym samym poziomie co kaniula.*
- 3.8 *Włączyć rejestrację.*
- 3.9 *Przestawić zawory na mierniku ciśnienia tak, by odciąć rurkę kalibracyjną, a miernik połączyć z systemem. Rejestrować ok. 30s. (ciśnienie 0).*
- 3.10 *Przestawić zawory na mierniku tak by odciąć system a połączyć z rurką kalibracyjną. Rejestrować ok. 30s. (ciśnienie 73mmHg)*
- 3.11 *Zatrzymać rejestrację. W menu UNITS CONVERSION zaznaczyć odpowiednie fragmenty wykresu i przypisać im wartości ciśnienia: 0 i 73mmHg.*
- 3.12 *Upewnić się, że przycisk HOLD PRESSURE jest wyłączony a pokrętko ADJUST jest ustawione na maksimum.*
- 3.13 *Podstawić cylinder miarowy pod kaniulę.*
- 3.14 *Jednocześnie uruchomić przełącznik pompy i włączyć rejestrację (przepływ max.).*
- 3.15 *Po 1 min. zatrzymać pompę i kontynuować rejestrację przez ok. 30s (przepływ 0).*
- 3.16 *W menu UNITS CONVERSION zaznaczyć odpowiednie fragmenty wykresu i przypisać im wartości przepływu: 0 i uzyskaną w cylindrze miarowym (przepływ max.).*

Składy i przygotowanie roztworów

Bufor Krebsa-Henseleita (roztwór K.H)

SUBSTANCJA	STĘŻENIE	NAWAŻKA / 5 litrów wody
CaCl ₂	1,2 mM	0,67 g
glukoza	11 mM	9,90 g
NaCl	118 mM	34,48 g
KH ₂ PO ₄	1,2 mM	0,82 g
NaHCO ₃	25 mM	10,50 g
KCl	4,7 mM	1,75 g
MgSO ₄	1,2 mM	0,72 g

pH buforu doprowadzone do 7,4 za pomocą kwasu solnego.

Bradykinina

Stock (1 mM):

5mg soli octowej bradykininy rozpuścić w 4,7 ml H₂O

ROZTWORY ROBOCZE:

2µM 40µl 1mM bradykininy + 20ml Krebsa-Hensenleita

2nM 20µl 2µM bradykininy + 20ml Krebsa-Hensenleita

20nM 200µl bradykininy + 19,8 ml Krebsa-Hensenleita

200nM 2ml bradykininy + 18ml Krebsa-Hensenleita

DEA-NO

STOCK (15mM)

5mg DEA NO rozpuścić w 1,6ml 0,1mM NaOH

ROZTWORY ROBOCZE

15µM 20µl 15mM DEA NO + 20ml Krebsa-Hensenleita

L-NAME

STOCK (300mM)

1g L-NAME rozpuścić w 12,3 ml H₂O

ROZTWORY ROBOCZE

200 µl 300mM L-NAME + 200ml Krebsa-Hensenleita