

RAPORT SKRÓCONY Z WYKONANIA ZADANIA NR 3

Tytuł zadania: Określenie wydajności oddechowej mitochondriów kardiomiocytarnych pod wpływem trzech wyselekcjonowanych preparatów polifenolowych w modelach zwierzęcych

Koordinator zadania: dr Magdalena Łabieniec-Watała (Uniwersytet Łódzki)

Wykonawcy: dr Agata Rucińska oraz mgr Karolina Siewiera

Cel zadania

Celem zadania było sprawdzenie czy badane preparaty poprawiają oddychanie mitochondrialne kardiomiocytów izolowanych z serc od zwierząt z cukrzycą doświadczalną. Ocenę funkcjonowania łańcucha oddechowego (w tym ilość wytwarzanego ATP) wykonano metodą polarograficzną z użyciem oksygrafu. Modelem badawczym były mitochondria izolowane z mięśnia sercowego od szczurów z cukrzycą doświadczalną wyindukowaną za pomocą streptozotocyny (STZ).

Hipoteza badawcza: preparat(y) pochodzenia roślinnego podawane zwierzętom z cukrzycą poprawiają funkcjonowanie bioenergetyki mięśnia sercowego u szczurów

Plan badania:

Szczury Sprague-Dawley, samce, wiek ok. 2 miesiące, masa ok. 250-300 g. Cukrzyca wywoływana przez dootrzewnową iniekcję STZ. Dyskryminacja *a priori* obecności cukrzycy na podstawie przekroczenia granicznej wartości glikemii na czczo > 200 mg% (dodatkowo oceniano spadek masy). Z doświadczenia wyłączałyśmy zwierzęta, u których glikemia nie przekroczyła granicznej wartości. Preparaty polifenolowe podawano szczurom Sprague- Dawley w zawiesinie wodnej w wybranej dawce (oszacowanej na podstawie dostępnych danych) przez cały okres trwania obserwacji; Czas trwania obserwacji.

Grupy obserwacyjne:

1 – placebo

2 - jedna z frakcji polifenolowej (1, 2 lub 3)

Wszystkie badania *in vivo* zostały przeprowadzone na szczurach Sprague-Dawley. Wszystkie doświadczenia i badania *ex vivo* oraz *in vitro* zostały wykonane na mitochondriach izolowanych z serc szczurów.

Hodowla i anestezja zwierząt wykorzystanych w badaniach

Do eksperymentów wykorzystano dorosłe, dwumiesięczne osobniki (o masie 250-300 g) z prowadzonej standardowo hodowli zwierząt laboratoryjnych. Przez cały czas trwania eksperymentu zwierzęta były umieszczone w plastikowych klatkach, w grupach po 5 osobników, z nieograniczonym dostępem do wody pitnej oraz suchej karmy, pod sztucznym oświetleniem włączanym w cyklu dobowym dzień/noc (12h/12h). Karma była odstawiona na 12 godzin przed planowanym eksperymentem. Wprowadzenie zwierząt do stanu znieczulenia obejmowało podanie siarczanu atropiny (Atropinum sulfuricum, Polfa Warszawa) oraz ksylazyny (Sedazin, Biowet). Domięśniowa iniekcja ketaminy (Ketanet, Biowet) zapewniała pełną anestezję i analgezę na czas pobrania organów. Po uzyskaniu znieczulenia ogólnego zwierzęta były unieruchamiane oraz intubowane. Po instrumentacji zwierzęta były poddane eutanazji a wypreparowały organ wykorzystany w dalszych badaniach.

Wykonanie

Cukrzycę doświadczalną wywoływano przez dootrzewnową iniekcję streptozotocyny w dawce 70 mg/kg masy ciała. 7 dni po iniekcji zwierzęta ważono i wykonywano pomiar glikemii we krwi żyłnej. Warunkiem uznania zwierzęcia za obciążone 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 gallusowego/kg masy ciała/ dobę
- 5 mg kwasu gallusowego /kg masy ciała/ dobę

Po 4, 10 i 20 tygodniach podawania preparatu pobierano 10 osobników z każdej grupy i badano wydajność oddechową mitochondriów kardiomiocytarnych. Mitochondria izolowano z mięśnia sercowego zgodnie z procedurą ich pozyskiwania. Pomiar respirometryczny trwał max. do 4h po wyizolowaniu preparatu. W celu oceny wydajności mitochondrialnej, do mieszaniny mitochondriów dodawano kolejno substratów oraz inhibitorów oddechowych a następnie rejestrowano różne stany, w jakich mitochondria się znajdowały po dodaniu tych związków. Ocenie m.in. podlegały następujące parametry: szybkość przepływu elektronów; integralność błony mitochondrialnej; ilość wytwarzanego ATP; Wyniki przedstawiano w przeliczeniu na mg białka.

Wyniki

Ocenę wydajności mitochondrialnej wykonano dla kardiomiocytów izolowanych od zwierząt suplementowanych preparatami z wychmielin, liści czarnej porzeczki oraz ekstraktem z ziela tyśiącznika.

Na podstawie pozyskanych danych stwierdzono, że mitochondria pozyskane od zwierząt z cukrzycą nieleczoną żadnym z preparatów – mają pogorszone parametry oddychania komórkowego w porównaniu ze zwierzętami zdrowymi. We wszystkich grupach badanych zwierząt stwierdzono, że im dłużej trwała cukrzyca tym bioenergetyka mitochondrialna była mniej wydajna. Niemniej jednak nie odnotowano poprawy efektywności oddechowej w mitochondriach izolowanych od zwierząt, którym podawano preparat roślinny. Bez względu na czas trwania suplementacji (miesiąc, 2.5 miesiąca czy 5 miesięcy), parametry oddychania mitochondriów były porównywalne w obu grupach tj. od zwierząt z cukrzycą jak i od zwierząt z cukrzycą leczoną ekstraktami roślinnymi. Świadczy to o tym, że testowane preparaty nie przyczyniły się do poprawy parametrów bioenergetyki mięśnia sercowego funkcjonującego w warunkach patologii (w cukrzycy) ale także nie wpłynęły na pogorszenie tego funkcjonowania. Tym samym nie udało się pozytywnie zweryfikować hipotezy badawczej, którą postawiono w tym zadaniu.