

## **BIAŁKO CHEMOTAKTYCZNE MONOCYTÓW MCP-1/CCL2 I JEGO ROLA W PROCESIE ZAPALNYM W MODELU SERCA NIEDOKRWIONEGO**

*Bartosz Malinowski<sup>1</sup>, Michał Wiciński<sup>2</sup>, Elżbieta Grzešek<sup>1</sup>, Joanna Klonowska<sup>2</sup>,*

*Grzegorz Grzešek<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>Katedra i Farmakologii i Terapii, Wydział Lekarski, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu.*

*<sup>2</sup>Wyższa Szkoła Inżynierii i Zdrowia w Warszawie, Wydział Nauk o Zdrowiu*

**Słowa kluczowe:** stan zapalny, zawał mięśnia sercowego, MCP-1, CCL2, serce izolowane

**Streszczenie:** Schorzenia układu krążenia są znaczącą przyczyną zgonów i zachorowań we współczesnym świecie. Obejmują one szeroki zakres przypadków od zawału serca z uniesieniem odcinka ST do niestabilnej dusznicy bolesnej bez widocznych zmian niedokrwienia w obrazie EKG, czy zmian poziomu markerów uszkodzenia mięśnia. Incydenty sercowo-naczyniowe obejmują również remodeling lewej komory, który może być wynikiem wielu procesów toczących się w miokardiocytach. Bez wątpienia stan zapalny jest istotnym ogniwem przemian zachodzących w mięśniu sercowym podczas niedokrwienia/reperfuzji.

### **Wstęp**

Choroby serca są główną przyczyną zgonów we współczesnym świecie. Pomimo, że śmiertelność z powodu epizodów sercowo-naczyniowych spadła w ciągu ostatnich 30 lat, to identyfikacja i leczenie niestabilnych zmian wieńcowych jest wciąż wyzwaniem. Za obraz dzisiejszych statystyk odpowiedzialny jest wzrost liczebności ogólnoswiatowej populacji, jej starzenie się oraz odrębności organizacyjno-społeczne.

Niewątpliwie stan zapalny odgrywa istotną rolę w patogenezie chorób niedokrwienych serca. Zapalenie stanowi złożoną reakcję obronną, aktywowaną na skutek wniknięcia szkodliwego czynnika do organizmu lub komórki, w celu jego eliminacji, i/lub naprawy uszkodzonych struktur.

Czynniki ryzyka chorób sercowo-naczyniowych obejmują styl życia i czynniki biologiczne takie jak: nadciśnienie tętnicze, hiperlipidemię, otyłość i cukrzycę. Wszystkie wymienione aspekty biologiczne są bezpośrednio związane z aktywacją reakcji prozapalnej.

## Rola stanu zapalnego w chorobach sercowo–naczyniowych

Uszkodzenie mięśnia sercowego, indukowane niedokrwieniem, inicjalizuje odpowiedź immunologiczną za pośrednictwem receptora toll–like (TLR), który pośredniczy w syntezie cytokin prozapalnych obecnych w zawale mięśnia sercowego. Ekspozowane na powierzchni komórek śródbłonna naczyniowego, kardiomiocytów – receptory TLR posiadają zdolność do rozpoznawania endogennych sygnałów „ostrzegawczych” uwalnianych podczas śmierci komórki w następstwie niedokrwienia i/lub perfuzji.

Coraz większa liczba badań sugeruje, że aktywacja TLR może osłabiać negatywne skutki reakcji zapalnej, stwarzając nowe możliwości terapeutyczne zapobiegające niedokrwieniu i perfuzji.

Niedokrwienie/perfuzja indukuje złożoną reakcję zapalną z towarzyszącą infiltracją leukocytów do zmienionego martwiczo obszaru. Powszechnie wiadomo, że reakcja zapalna i obecność cytokin stanowią integralną część procesu gojenia i biorą udział w remodelingu lewej komory. Należy także pamiętać o drugiej stronie tego zjawiska tj. aktywacji szlaków proapoptotycznych, ze złym rokowaniem klinicznym.

Udowodniono, że monocyty i makrofagi są obecne w obszarze niedokrwienia przez wiele dni, determinując tym samym fagocytozę, angiogenezę i depozycję kolagenu.

Zredukowane naciekanie makrofagów znacząco zmniejsza reakcję zapalną oraz przebudowę lewej komory serca.

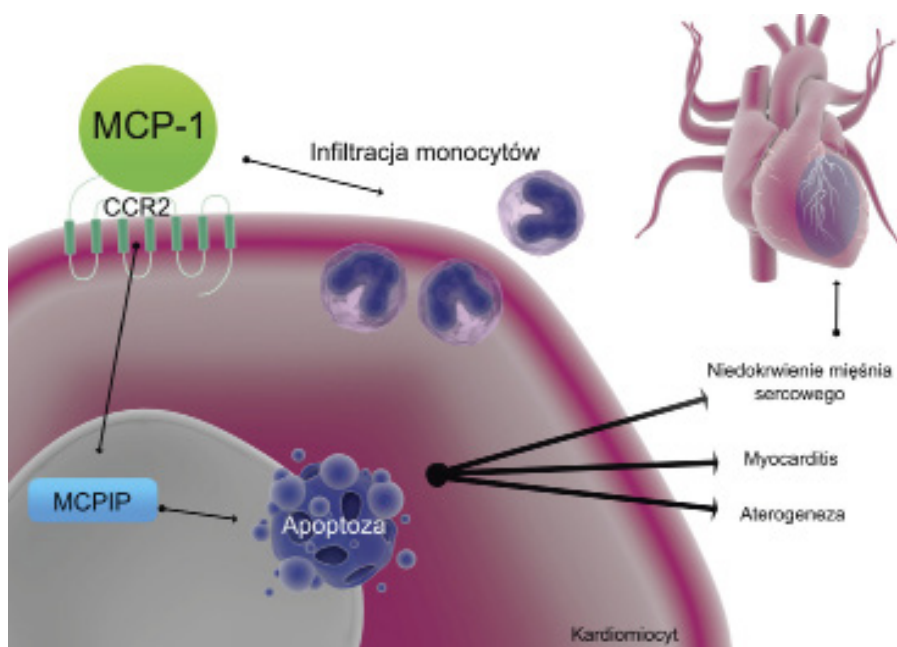
## Białko chemotaktyczne monocytów – MCP-1/CCL2 w sercu niedokrwionym

Ekspresja chemokin stanowi kluczowy element pozawałowej reakcji zapalnej, procesów angiogenezy oraz tworzenia blizny pozawałowej.

Jedną z najszerzej badanych chemokin C-C jest CCL2 (MCP–1). Drogi syntezy MCP–1 obejmują szlaki biosyntezy konstytutywnej, jak i przy udziale cytokin. MCP-1 ma zdolność wiązania siedmiu białek błonowych typu G, przez które indukuje transdukcję sygnału i rekrutację monocytów w ognisku zapalnym. Uważa się, że białko MCP-1 odgrywa kluczową rolę w rozwoju chorób sercowo-naczyniowych, jednak dokładny mechanizm tego zjawiska nie został poznany [1]. W prowadzonych dotychczas badaniach wykazano, że MCP-1 produkowane jest miejscowo w obrębie uszkodzonego śródbłonna pod wpływem IL–1, IL–4, TNF $\alpha$ , VEGF, czy też IFN $\gamma$ . Chemokina ta wiąże się z proteoglikanem ściany naczyń. Monocyty, wędrujące do objętego stanem zapalnym śródbłonna, wychwytywane są przez receptory dla MCP–1 typu CCR2. Kompleks MCP-1/CCR2 aktywuje białko G, co skutkuje diapedezą monocytów do mięśniówki gładkiej naczyń. Po wnikięciu do ściany naczynia monocyty, ulegają transformacji do makrofagów, a następnie w obecności oxLDL tworzą komórki piankowate. Oprócz aktywności chemotaktycznej wykazano udział CCL2 w procesach neowaskularyzacji indukowanej

przez czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego –VEGF [2]. Badania genetyczne polimorfizmu genów związanych z ekspresją MCP-1 potwierdziły, że pacjenci z genotypem CCR2, z walina w pozycji 64, wykazują niższe ryzyko wystąpienia incydentów kardiologicznych. Gen kodujący białko CCL2 jest położony na krótkim ramieniu chromosomu 17 (17q11.2-q12), zbudowanego z trzech egzonów [3].

**Rycina 1.** Układ zdarzeń receptorowych i pozareceptorowych z udziałem białka chemotaktycznego monocytów – MCP-1 w mięśniu sercowym podczas niedokrwienia.



Źródło: opracowanie własne

## Materiał i metody

### Grupa badana

Badania przeprowadzono, wykorzystując albinotyczne samce myszy szczepu BALB/c (n=19). Zwierzęta ważyły około 25–30 g. Myszy miały wolny dostęp do pokarmu (standardowa dieta laboratoryjna) i wody. Hotelowanie odbywało się w cyklu 12 godzin dzień/12 godzin noc [4, 5]. Wszystkie zwierzęta wykorzystane w doświadczeniach pochodziły z Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego Państwowej Akademii Nauk w Warszawie.

Numer zgody Lokalnej Komisji Bioetycznej w Bydgoszczy 8/2015.

## **Anestezja**

Anestezję indukowano przy użyciu 4 vol% izofluranu i podtrzymywano przy wykorzystaniu 1,5 vol% izofluranu. Procedurę znieczulenia przeprowadzono w ciągu 5 minut, aby maksymalnie ograniczyć stres zwierząt [6, 7].

## **Pobranie materiału biologicznego**

Przed procedurami chirurgicznymi pobrano krew z żyły odpiszczelowej w ilości 0,15 ml [8] do badań biochemicznych. Tak pobrane próbki krwi stanowiły próbki kontrolne do pomiaru stężeń białka chemotaktycznego dla monocytów – MCP-1. Pozwoliło to na zredukowanie liczby zwierząt objętych protokołem badawczym.

Do badań biochemicznych przeprowadzonych po indukcji niedokrwienia wykorzystano płyn perfundujący przez mięsień sercowy.

## **Terapia przeciwzakrzepowa**

W celu uniknięcia wykrzepiania krwi podczas procedur chirurgicznych dootrzewnowo podano heparynę w dawce 50 IU/kg m. c. na 10 minut przed zabiegiem [9].

## **Przygotowanie zwierząt do zabiegu**

Pierwszą procedurą przygotowującą zwierzę doświadczalne do zabiegu kardiochirurgicznego jest ogolenie klatki piersiowej. Następnie mysz układano na stole operacyjnym i intubowano. W celu właściwego pozycjonowania myszy na stole unieruchamiano ogon przy użyciu taśmy. Następnie nylonową nicią (rozmiar 5–0) podwiązywano górne siekacze, odchylając głowę myszy w tył. Nos zwierzęcia umieszczano blisko krawędzi stołu operacyjnego (około 5 mm), co ułatwiało intubację. Kończyny przednie unieruchamiano po obydwu stronach ciała przy użyciu cienkiej taśmy tak, aby lewa przednia kończyna uniesiona była w górę, a prawa przednia kończyna w dół [10].

## **Intubacja tchawicy**

Istnieje wiele metod intubacji zwierząt zarówno inwazyjnych, jak i nieinwazyjnych. W badaniach własnych postanowiono zastosować metodę nieinwazyjną, aby uniknąć dodatkowej procedury chirurgicznej w postaci tracheotomii. Metoda nieinwazyjna jest dużo prostsza, mniej czasochłonna i pozwala uniknąć komplikacji w dalszych etapach zabiegu.

Do intubacji użyto wygiętej pęsety, która posłużyła jako laryngoskop. Do wykonania małego zestawu intubacyjnego wykorzystano cewnik dożylny 20 g, przycięty do długości 25 mm, łącznik PE 190 i PE 240. Przed zabiegiem chirurgicznym zestaw intubacyjny dezynfekowano za pomocą alkoholu. Intubację przeprowadzono w anestezji z zastosowaniem 1% lidokainy [11].

## Kontrola oddechu

Objętość oddechową i szybkość oddychania wyznaczono na podstawie wzorów:

$$V_t = 0,0062 \times Mb^{1,01},$$

gdzie  $V_t$  to objętość oddechowa, a  $Mb$  to masa ciała w kg.

$$V_r \text{ (oddechy/minutę)} = 53,5 \times Mb^{1,01}$$

Dla myszy o masie ciała  $\sim 30$ g  $V_t$  wynosiła 0,18 ml, natomiast szybkość oddychania  $V_r$  – 133 oddechy/minutę.

## Chirurgiczna indukcja niedokrwienia mięśnia sercowego

Procedurę tę rozpoczęto od wykonania niewielkiego nacięcia w obrębie lewej pachy. Lidokainę podano podskórną w dawce 0,1 ml (1 % roztwór). Następnie wykonano nacięcie o długości około 8 mm od lewej granicy mostka do lewego dołu pachowego. Ostrożnie oddzielone mięśnie, tak aby nie uszkodzić naczyń krwionośnych. Odsłonięto w ten sposób klatkę piersiową i fragment lewego płuca. Czwarta przestrzeń międzyżebrowa jest miejscem, gdzie najlepiej uwidoczniła jest dolna część płuc. W kolejnym kroku otwierano klatkę piersiową, a w miejscu nacięcia umieszczano retraktor automatyczny, rozpięty do szerokości 10 mm. Następnie z tak wyeksponowanego serca zdjęto perikardium i umieszczono je za ramionami retraktora. Lewa tętnica wieńcowa (LAD) była uwidoczniła jako czerwone pulsujące naczynie biegnące wewnątrz ściany serca spod lewego przedsionka w kierunku wierzchołka.

Miejsce podwiązania LAD bezpośrednio koreluje z rozmiarem planowanego niedokrwienia. W badaniu własnym LAD podwiązywano około 2 mm poniżej końca lewego przedsionka, w jego fizjologicznej pozycji. Następnie, przy użyciu kleszczy, delikatnie naciskano na naczynie wieńcowe w celu lepszego jego uwidocznienia i stabilizacji pozycji serca. W kolejnym etapie za pomocą igły stożkowej i nici jedwabnej 7-0 podwiązywano tętnicę wieńcową. Podczas tej procedury konieczne jest zachowanie szczególnej ostrożności, tak aby nie przebić igłą ściany komory serca. Prawidłowe wywołanie okluzji obserwowano na podstawie zmiany koloru (blednięcia) przedniej ściany lewej komory [10, 12].

Po indukcji niedokrwienia serce pobrano i podwieszono w układzie Working Heart.

## Model niedokrwienia izolowanego serca – metoda serca pracującego

Od pierwszego opisu układu izolowanego serca Langendorff'a–Neely'ego minęło wiele lat. Ten fascynujący model znalazł zastosowanie w licznych laboratoriach na całym świecie. Wiele instytucji naukowych stosuje układy własnego pomysłu, co pozwala im na dostosowanie modelu do własnych potrzeb. W niniejszej pracy użyto układu wykorzystującego komponenty firmy Experimetria. Atutem zbudowanego zestawu jest możliwość szybkiej zmiany systemu pracy, pomiędzy *working heart mode* – *constant flow mode* – *constant*

*pressure mode*. Cała aparatura zbudowana jest ze szkła i stalowej platformy. Serce podłączano do aparatury za pomocą dwóch kaniuli – aortalnej i przedsionkowej. Kaniule wykonane były ze stali nierdzewnej. Rozmiary kaniuli stanowią istotny czynnik w celu zapewnienia swobodnej perfuzji. Sztywność kaniuli zapewnia stały opór naczyniowy podczas zmian frakcji wyrzutowej lewej komory. Przekrój wewnętrzny kaniuli wymiarami powinien być zbliżony do przekroju wewnętrznego aorty. O ile niewielkie różnice w średnicy są dopuszczalne ze względu na elastyczność aorty, to długość kaniuli powinna odpowiadać długości aorty. W przeprowadzonym eksperymencie zastosowano kaniulę o przekroju wewnętrznym około 1 mm, skalując ten wymiar w razie konieczności co 0,1 mm średnicy. Te same warunki należy rozważyć, projektując kaniulę przedsionkową, zwracając uwagę na wymiary żyły płucnej. Kalibrując prawidłowo dobrane kaniule, należy zwrócić uwagę na opory przepływu. W badaniu własnym opór aortalny był identyczny z oporem w kaniuli bez podwieszonego serca. Kaniula przedsionkowa wykazywała niewielki opór przepływu. W przeprowadzonym doświadczeniu maksymalny rzut serca generowany przez pracujące serce wynosił 22–25 ml/min preload 25 mmHg/ afterload 60mmHg.

Do perfuzji izolowanego serca użyto płyn Krebs'a–Henseleit'a o następującym składzie (mM): NaCl (118), KCl (4,7),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,2),  $\text{MgSO}_4$  (1,2),  $\text{CaCl}_2$  (3,0),  $\text{NaHCO}_3$ , (25), glukoza (11), EDTA (0,5). Perfuzat natleniono przy zastosowaniu filtrów szklanych, mieszaniną 95%  $\text{O}_2$  i 5%  $\text{CO}_2$ . W celu zachowania warunków doświadczenia, zbliżonych do stanu fizjologicznego, płyn perfundujący utrzymywano w temperaturze 37 °C i pH 7,4.

Do podtrzymania krążenia płynu zastosowano pompę perystaltyczną. W celu kontroli prawidłowego ciśnienia przepływu zamontowano rezystory przepływu. Aby zmierzyć objętość płynu perfundującego izolowane serce, użyto skalowanego przepływomierza.

W modelu pracującego serca lewy przedsionek zaopatrywany jest w płyn perfundujący pochodzący z naczyń obciążenia wstępnego (*preload*). Przy zastosowaniu pompy rolkowej więcej perfuzatu dostaje się do naczyń obciążenia wstępnego niż do samego przedsionka. Nadmiar płynu jest usuwany jednym z kanałów pompy do zbiornika.

Perfuzat wyrzucony przez lewą komorę przechodzi do naczyń wieńcowych przez pień aorty. Nadmiar perfuzatu, który mógłby zostać błędnie odczytany jako frakcja wyrzutowa, trafia poprzez kaniulę aortalną do bloku aortalnego. Następnie przechodzi do komory wyrównawczej (*compliance chamber*) zawierającej około 1 ml powietrza, co odwzorowuje warunki panujące w aorcie. Komora wyrównawcza pełni funkcje bufora. Obniża ona opór mechaniczny frakcji wyrzutowej serca i zabezpiecza perfuzję wieńcową podczas rozkurczu.

Ciśnienie lewej komory (*left ventricular pressure – LVP*) zostało zmierzone przy użyciu cewnika wypełnionego płynem, wprowadzonego do wnętrza lewej komory i podłączonego do przetwornika.

Parametry elektrokardiograficzne serca zmierzono, stosując elektrody nasercowe umieszczone na prawym przedsionku i komorze [13].

### **Grupa kontrolna**

Grupę kontrolną stanowiły próbki krwi pobranej przed interwencją chirurgiczną. Przed oceną parametrów biochemicznych krew została odwirowana z prędkością 2000 rpm w czasie 10 minut.

### **Grupa badana**

Płyn perfundujący przez mięsień sercowy stanowił materiał badany w pierwszej części analizy biochemicznej w stanie niedokrwienia. Próbkę płynu pobierano w ustalonym czasie tj. po 2, 4, 6 i 8 godzinach perfuzji (objętość 1 ml w każdym odstępie czasu).

### **Analiza parametrów biochemicznych**

Stężenie cytokin oznaczono z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. W metodzie tej mierzone jest natężenie światła rozproszonego lub emitowanego przez molekuly przepływające przez optyczny układ pomiarowy. Ponadto uprzednie wyznaczenie cząstek fluorochromami lub fluoroforami umożliwia ocenę intensywności świecenia (fluorescencji) wzbudzonego wiązką lasera. Następnie sygnały fotoelektryczne, zebrane w obrębie układu detektorów, są transformowane do wartości liczbowych, co pozwala dokładnie ocenić populację cząsteczek. Zestawy Cytometric bead array (CBA) są stosowane do pomiaru cząstek o określonej średnicy, które rozpraszają światło w określony sposób. Dzięki temu można poddać analizie ilościowej dowolną substancję. Cząstki nośnikowe wchodzące w skład testu są opłaszczane przeciwciałami skierowanymi przeciwko badanym molekułom. Oznaczenie stężenia badanych substancji oparte jest na pomiarze emisji fluorescencji powstałych kompleksów immunologicznych. Zastosowanie techniki CBA umożliwia jednoczesną ocenę wielu substancji w jednej próbce.

Pomiaru stężenia MCP-1 dokonano przy użyciu zestawu CBA firmy Becton Dickinson. Próbkę krwi pobrane przed zabiegiem chirurgicznym stanowiły grupę kontrolną. Jako grupę badaną wykorzystano płyn perfundowany przez serce w systemie Working Heart.

Badania z zastosowaniem testów CBA wykonano zgodnie z rekomendacją producenta.

W próbkach umieszczano po 50 µl surowicy myszy, perfuzatu zależności od etapu eksperymentu. W kolejnej fazie do wszystkich próbek dodawano po 50 µl mieszaniny capture beads (kulek nośnika) oraz 50 µl zawiesiny przeciwciał sprzężonych z fikoerytryną – Mouse Inflammation PE Detection Reagent. Następnie próbki inkubowano przez 2 h (temp. 25 °C, w ciemności). Po inkubacji do wszystkich próbek dodawano po 1 ml buforu płuczącego i odwirowywano (5 min/200 g). W kolejnym etapie oddzielano

supernatant, a pozostały osad zawieszano w 300  $\mu$ l buforu płuczącego. Przygotowane w tej procedurze próbki poddawano analizie cytometrycznej z zastosowaniem cytometru przepływowego FACSCalibur i oprogramowania FCAP array [14].

### Metody statystyczne

W pierwszej kolejności zweryfikowano rozkład wyników wg założeń Gaussa, korzystając z testu normalności Shapiro-Wilka.

Do analizy danych wykorzystano metodę wieloczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) w układzie powtarzanych pomiarów. Do szczegółowej analizy wariancji zastosowano test POST HOC dla porównań wielokrotnych – Bonferroniego. Wielkość efektu w obrębie mierzonych parametrów przedstawiono za pomocą testu d-Cohena. Do analizy korelacji między badanymi parametrami wykorzystano współczynnik korelacji liniowej r Pearsona. Za istotne statystycznie przyjęto wartości  $p < 0,05$ . Wszystkie obliczenia wykonano w programach GraphPad Prism v 6,01 oraz IBM SPSS.

### Wyniki

**Tabela 1.** Statystyka ogólna dla MCP-1 (pg/mL).

	Średnia (pg/ml)	Odchylenie standardowe
<b>Kontrola</b>	134,9	27,0
<b>2 godz.</b>	133,2	28,0
<b>4 godz.</b>	135,7	23,8
<b>6 godz.</b>	141,6	20,4
<b>8 godz.</b>	129,8	27,7

Źródło: opracowanie własne

Opierając się na wynikach analizy wariancji w schemacie dla powtarzanych pomiarów, nie stwierdzono, żeby istniały istotne różnice stężenia MCP-1 pomiędzy rozpatrywanymi pomiarami  $F(4,72)=0,60$ ;  $p=0,666$ ;  $\eta^2=0,03$ . Zmienność w czasie wyjaśniała 3% zmienności w zakresie stężenia MCP-1 pomiędzy pomiarami. Stężenia MCP-1 w poszczególnych pomiarach były zbliżone.



**Tabela 2.** Analiza post-hoc i siły efektu d-Cohena dla MCP-1.

MCP-1		Różnica średnich	Istotność	d-Cohen
Kontrola	2 godz.	1,8	nz	0,1
	4 godz.	-0,8	nz	0,0
	6 godz.	-6,7	nz	0,4
	8 godz.	5,1	nz	0,2
2 godz.	Kontrola	-1,8	nz	0,1
	4 godz.	-2,6	nz	0,1
	6 godz.	-8,5	nz	0,3
	8 godz.	3,4	nz	0,1
4 godz.	Kontrola	0,8	nz	0,0
	2 godz.	2,6	nz	0,1
	6 godz.	-5,9	nz	0,3
	8 godz.	5,9	nz	0,2
6 godz.	Kontrola	6,7	nz	0,4
	2 godz.	8,5	nz	0,3
	4 godz.	5,9	nz	0,3
	8 godz.	11,8	nz	0,5
8 godz.	Kontrola	-5,1	nz	0,2
	2 godz.	-3,4	nz	0,1
	4 godz.	-5,9	nz	0,2
	6 godz.	-11,8	nz	0,5

Źródło: opracowanie własne

### Ocena rozmiaru zawału

Po fazie perfuzji w układzie Langendorff'a niedokrwione serca zamrożono (temp. -20 °C/20 min.). Następnie, zaczynając od wierzchołka lewej komory, poprzecznie skrawano od 3 do 5 sekcji tkankowych o grubości 1 mm. W świeżo przygotowanym roztworze 2,3,5-trójfenylotetrazoliowym (1% vol/wt w 0,9% NaCl) umieszczano skrawki tkankowe (37 °C/10 min.).

Stosowano barwienie TTC, które pozwala odróżnić tkankę żywą od martwej, w oparciu o jej aktywność enzymatyczną. W tkance żywej TTC jest enzymatycznie redukowany do czerwonego formazanu, natomiast w tkance martwej pozostaje biały.

Wybarwione preparaty oceniano i sfotografowano, używając mikroskopu fluorescencyjnego Opta-Tech z kamerą cyfrową 3MP.

Zdjęcia preparatów implementowano do programu ImageJ, w którym manualnie konturowano obszar martwicy (AON; *Area of Necrosis*) i obszar ryzyka wystąpienia martwicy (AAR; *Area at Risk*).

**Rycina 2.** Przekrój poprzeczny serca, obszar martwicy – filtr o intensywnie czerwonej barwie.



Źródło: materiały własne

Rozmiar niedokrwienia mięśnia sercowego wyrażono jako stosunek maksymalnej ilości pikseli MIP w obszarze martwicy (MIP–AON) do maksymalnej ilości pikseli MIP w obszarze ryzyka (MIPAAR) x 100%.

Tabela poniżej przedstawia statystykę ogólną tej części eksperymentu.

**Tabela 3.** Statystyka ogólna – Rozmiar MI %

Rozmiar niedokrwienia serca [%]	Minimum	Maksimum	Średnia	Odchylenie standardowe
	22	30	26,3	2,56

Źródło: opracowanie własne

Analizę zależności pomiędzy rozmiarem obszaru niedokrwienia serca a stężeniem MCP–1 przeprowadzono przy użyciu metody estymowania wartości oczekiwanej zmiennej – regresji liniowej. Do obliczeń włączono wartości stężeń zmierzone po 8 godz. od indukcji niedokrwienia mięśnia sercowego, bezpośrednio poprzedzające ocenę morfometryczną preparatów.

Wszystkie serie pomiarowe charakteryzował rozkład normalny, dlatego do wyznaczenia siły współzależności zmiennych zastosowano współczynnik korelacji liniowej Pearsona  $r_{xy}$ .

Podczas obliczeń zastosowano następującą skalę oceny siły:

$r_{xy}=0$  zmienne nie są skorelowane

$0 < r_{xy} < 0,1$  korelacja nikła

$0,1 \leq r_{xy} < 0,3$  korelacja słaba

$0,3 \leq r_{xy} < 0,5$  korelacja przeciętna

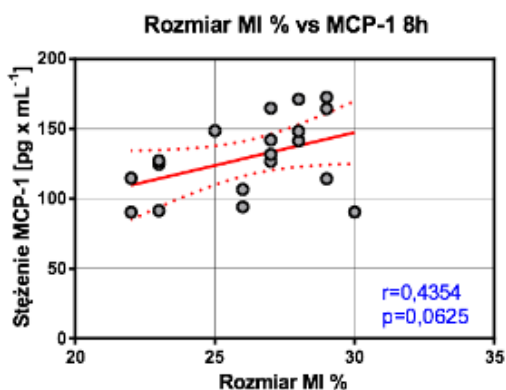
$0,5 \leq r_{xy} < 0,7$  korelacja wysoka

$0,7 \leq r_{xy} < 0,9$  korelacja bardzo wysoka

$0,9 \leq r_{xy} < 1$  korelacja prawie pełna.

Wyniki analizy przedstawiono za pomocą wykresu rozrzutu.

**Rycina 3.** Wykres rozrzutu danych rozmiar MI% vs MCP-1, po 8 godzinach perfuzji.



Źródło: opracowanie własne

## Dyskusja

Białko chemotaktyczne monocytów odgrywa kluczową rolę w patogenezie chorób sercowo-naczyniowych. MCP-1, poprzez swoją aktywność chemotaktyczną, indukuje diapedezę monocytów i makrofagów ze światła naczynia krwionośnego do subendotelium, gdzie powstają komórki piankowe, co w konsekwencji prowadzi do powstania blaszki miażdżycowej. Makrofagi natomiast odpowiedzialne są za niestabilność blaszki, czego rezultatem jest epizod niedokrwienności lub nawrót restenozy po angioplastyce. Istnieje wiele doniesień na temat funkcji MCP-1 w procesie niedokrwienia/reperfuzji czy odrzucaniu przeszczepionego serca.

Doświadczenia przeprowadzone na modelach zwierzęcych pokazują, że MCP-1 jest jednym z czynników aktywujących infiltrację leukocytów w niedokrwionym mięśniu serca już 5 godz. po incydencie sercowym [15, 16].

W modelu szczurzym podanie przeciwciał anti-MCP1 istotnie zmniejszało obszar niedokrwienia. Dodatkowo terapia anti-MCP1 znamienne zmniejszała rozstrzeń komorową i przywracała prawidłową czynność serca w modelu mysim [17].

W omawianych badaniach własnych nie zaobserwowano istotnych różnic stężenia MCP-1 w czasie, przed i po niedokrwieniu serca. Istnieje znacząca różnica pomiędzy proponowanymi aktualnie modelami serca niedokrwionego, tj. permanentnej ligacji LAD i modelu MI/reperfuzja.

Reperfuzja uwalnia liczne reaktywne formy tlenu i jest przyczyną tzw. „uszkodzenia reperfuzyjnego”. Odpowiedź zapalna z towarzyszącą infiltracją limfocytów i neutrofilii jest intensywniejsza w modelach MI/reperfuzja niż w sercu niedokrwionym. Różnice te potwierdzają uzyskane przez nas wyniki, zmienność stężenia w czasie wyjaśniała zaledwie 3% zmienności w zakresie stężenia MCP-1 pomiędzy pomiarami w modelu permanentnej okluzji LAD.

Zaobserwowano tendencję ku istotności w obrębie analizy korelacji stężenia MCP-1 a rozmiarem zawału mięśnia sercowego.

## Podsumowanie

Model izolowanego serca jest powszechnie stosowanym i uznanym materiałem do badań. Doświadczenie miało na celu określenie ewentualnych zmian zachodzących w mięśniówce poprzecznie prążkowanej serca podczas niedokrwienia i stanu zapalnego.

W wyniku przeprowadzonych badań nie wykazano istotnie statycznych zmian stężenia białka chemotaktycznego dla monocytów – MCP-1.

## Informacje dodatkowe

Wszystkie badania zostały sfinansowane z grantu MN-4/WL/2014.

## Bibliografia

1. Niu J., Kolattukudy P.E., *Role of MCP-1 in cardiovascular disease: molecular mechanisms and clinical implications*. Clin Sci. 2009; 117: 95–109.
2. Jay S.M., Shepherd B.R., Andrejcsk J.W., Kyriakides T.R., Pober J.S., Saltzman W.M., *Dual delivery of VEGF and MCP-1 to support endothelial cell transplantation for therapeutic vascularization*. Biomaterials. 2010; 31: 3054–3062.
3. Tabara Y., Kohara K., Yamamoto Y., Igase M., Nakura J., Kondo I., Miki T., *Polymorphism of the monocyte chemoattractant protein (MCP-1) gene is associated with the plasma level of MCP-1*

- but not with carotid intima-media thickness.* Hypertens Res. 2003; 26: 677–683. *Proceedings of New Paradigms In Laboratory Animal Science FELASA 2010 Helsinki, Finland.*
4. Johns Hopkins University IACUC, *Rodent Anesthesia: Open-Drop Exposure.* [Web Page], Available from: <http://web.jhu.edu/animalcare/rdf/open-drop.html>
  5. Hoff J., *Methods of blood collection in the Mouse.* Lab Animal. 2000; 29: 47–53.
  6. Reilly M.P., Taylor S.M., Hartman N.K., Arepally G.M., Sachais B.S., Cines D.B., Poncz M., McKenzie S.E., *Heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis in a transgenic mouse model requires human platelet factor 4 and platelet activation through FcγRIIA.* Blood. 2001; 98: 2442–2447.
  7. Kolk M.V.V., Meyberg D., Deuse T., Tang-Quan K.R., Robbins R.C., Reichenspurner H., Schrepfer S., *LAD-Ligation: A Murine Model of Myocardial Infarction.* J Vis Exp. 2009; 32: 1438.
  8. Brown R.H., Walters D.M., Greenberg R.S., and Mitzner W., *A method of endotracheal intubation and pulmonary functional assessment for repeated studies in mice.* J Appl Physiol. 1999; 87: 2362–2365.
  9. Tarnavski O., McMullen J.R., Schinke M., Nie Q., Kong S., Izumo S., *Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies.* Physiol Genomics. 2004 ;16 (3): 349–360.
  10. Liao R., Podesser B.K., Lim C.C., *The continuing evolution of the Langendorff and ejecting murine heart: new advances in cardiac phenotyping.* Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2012; 303: 156–167.
  11. Manual instruction – BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation Kit Carson R., Vignali D., *Simultaneous quantitation of fifteen cytokines using a multiplexed flow cytometric assay.* J. Immunol. Methods. 1999; 227: 41–52.
  12. Villanova P.A., *Clinical Applications of Flow Cytometry: Quality Assurance and Immunophenotyping of Peripheral Blood Lymphocytes;* Tentative Guideline: National Committee for Clinical Laboratory Standards 1992; NCCLS document H42-T.
  13. Morimoto H., Takahashi M., Izawa A., Ise H., Hongo M., Kolattukudy P.E., Ikeda U., *Cardiac overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in transgenic mice prevents cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction.* Circ Res. 2006; 99 (8): 891–899.
  14. Kumar A.G., Ballantyne C.M., Michael L.H., Kukielka G.L., et al., *Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in the small veins of the ischemic and reperfused canine myocardium.* Circulation. 1997; 95: 693–700.
  15. Wayman N.S., Hattori Y., McDonald M.C., Mota-Filipe H., et al., *Ligands of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR-γ and PPAR-α) reduce myocardial infarct size.* FASEB J. 2002; 16: 1027–1040.
  16. Tarzami S.T., Calderon T.M., Deguzman A., Lopez L., et al., *MCP-1/CCL2 protects cardiac myocytes from hypoxia-induced apoptosis by a G(αi)-independent pathway.* Biochem. Biophys. Res. 2005; 335 (4): 1008–16. Commun.2005 20052005; 335 (4): 1008–162005; 335: 1008–1016.