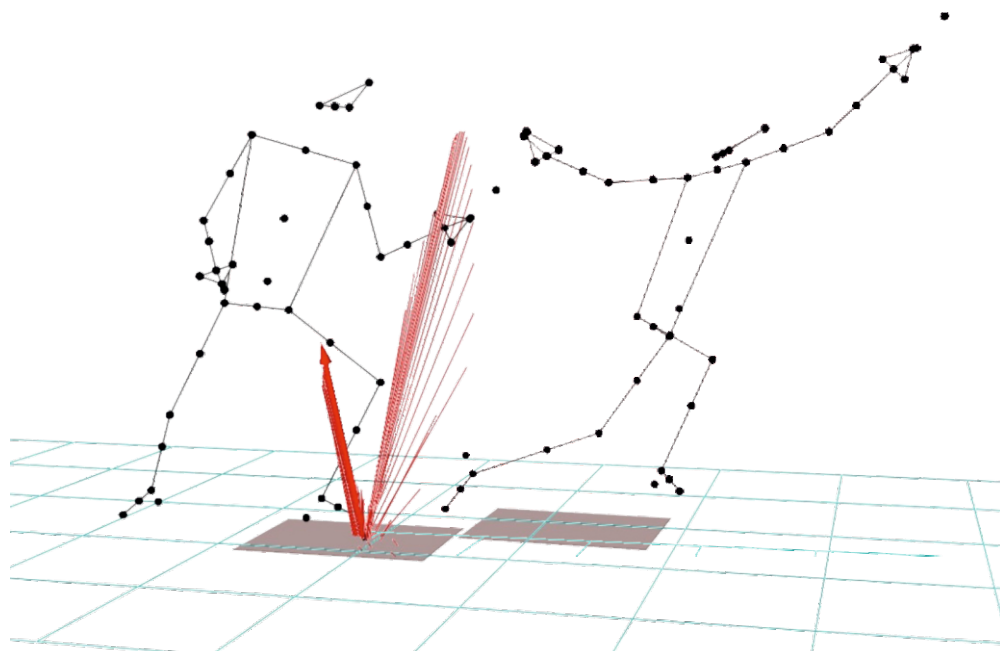


**VI SYMPOZJUM  
WSPÓŁCZESNA MYŚL TECHNICZNA  
W NAUKACH MEDYCZNYCH I BIOLOGICZNYCH**

**MATERIAŁY KONFERENCYJNE**



**WROCŁAW 19-20 CZERWCA 2015**



KOMISJA INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ  
WROCŁAWSKIEGO ODDZIAŁU POLSKIEJ AKADEMII NAUK



**VI SYMPOZJUM  
WSPÓŁCZESNA MYŚL TECHNICZNA  
W NAUKACH MEDYCZNYCH I BIOLOGICZNYCH**

**MATERIAŁY KONFERENCYJNE**



**Wrocław, 19-20 czerwca 2015**

Ilustracja zamieszczona na stronie tytułowej pochodzi z badań techniki ruchu wielokrotnego Mistrza Polski, finalisty Mistrzostw Świata, Pucharów Świata, Mistrzostw Europy, Mistrzostw Polski oraz Wicemistrza Olimpijskiego (Pekin 2008). Do badań wykorzystano System BTS oraz platformę Kistlera. Autor: mgr Sebastian Jaroszczuk.

Projekt okładki  
Teresa Horyd

Przygotowanie materiałów do druku  
Teresa Horyd

© Copyright by Oddział Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, Wrocław 2015  
All Rights reserved

ISBN 978-83-934204-8-3

Wszelkie prawa zastrzeżone. Żadna część publikacji nie może być kopiowana ani odtwarzana w jakiegokolwiek formie i przy użyciu jakichkolwiek środków bez pisemnej zgody Wydawcy.

Druk: Wrocławska Drukarnia Naukowa PAN im. St. Kulczyńskiego

## Organizator

KOMISJA INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ  
WROCŁAWSKIEGO ODDZIAŁU POLSKIEJ AKADEMII NAUK

## Patronat

Prof. dr hab. Andrzej Górski, członek rzecz. PAN,  
Wiceprezes Polskiej Akademii Nauk w latach 2007-2014

Prof. dr hab. Andrzej Żelaźniewicz, członek koresp. PAN,  
Prezes Wrocławskiego Oddziału Polskiej Akademii Nauk

## Komitet Organizacyjny

Prof. dr hab. Romuald Będziński, członek koresp. PAN – Uniwersytet Zielonogórski

Prof. dr hab. Piotr Dzięgiel – Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

Prof. dr hab. Urszula Paślawska – Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Dr hab. inż. Celina Pezowicz, prof. PWr. – Politechnika Wrocławska

Dr hab. Marzenna Podhorska-Okolów, prof. nadzw. UM – Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

Prof. dr hab. Dariusz Rakus – Uniwersytet Wrocławski

Dr hab. Alicja Rutkowska-Kucharska, prof. AWF – Akademia Wychowania Fizycznego we Wrocławiu

### sekretarz

dr inż. Sławomir Winiarski – Akademia Wychowania Fizycznego we Wrocławiu

## Współorganizatorzy:

Akademia Wychowania Fizycznego we Wrocławiu

Fundacja Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu

Politechnika Wrocławska

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Uniwersytet Wrocławski



## **KOMITET NAUKOWY**

Romuald Będziński  
Janusz Boratyński  
Monika Danielewska  
Szymon Dragan  
Piotr Dzięgiel  
Agnieszka Gomułkiewicz  
Marek Langner  
Jerzy Mozrzyimas  
Urszula Paśawska  
Celina Pezowicz  
Halina Podbielska  
Marzenna Podhorska-Okotów  
Janina Pospieszna  
Norbert Pospieszny  
Dariusz Rakus  
Alicja Rutkowska-Kucharska  
Marek Woźniwski

## SPIS TREŚCI

<i>Waldemar Andrzejewski, Krzysztof Kassolik, Jędrzej Grzegorzka, Christopher Kobierzycki, Katarzyna Ratajczak-Wielgomas, Karolina Jabłońska, Tomasz Halski, Piotr Dzięgiel, Marzena Podhorska-Okolów</i> Wzrost ekspresji VEGF-A oraz FGF-2 w mięśniach szkieletowych wywołany masażem oraz ćwiczeniami fizycznymi .....	9
<i>Katarzyna Arkusz, Elżbieta Krasicka-Cydzik</i> Platforma immunosensora do bezpośredniej detekcji kompleksów antygen-przeciwciała na podłożu Ti/TiO <sub>2</sub> .....	11
<i>Ziemowit Bańkosz, Sławomir Winiarski</i> Ocena przebiegu ruchu w wybranych stawach w czasie uderzeń topspinowych w tenisie stołowym .....	13
<i>Marek Brodzki, Marta M. Czyżewska, Radosław Rutkowski, Magdalena Kisiel, Magdalena Jatczak, Jerzy W. Mozrzyimas</i> Porównanie właściwości kinetycznych i farmakologicznych podtypów $\alpha 1$ - $\gamma 2L$ i $\alpha 1$ - $\beta 2$ - $\gamma 2L$ rekombinowanych receptorów GABA(A) .....	15
<i>Renata Brykner-Ręczkowska, Lucja Cwynar-Zajac, Elżbieta Gębarowska, Marzena Podhorska-Okolów, Piotr Dzięgiel</i> Owocystatyna jako czynnik przeciwnowotworowy – badania na modelu in vitro .....	17
<i>Patrycja Brzdęk, Jerzy Mozrzyimas, Tomasz Wójtowicz</i> Wpływ aktywności metaloproteiny 3 na funkcję receptorów NMDA, napływ jonów wapnia i poziom białka wczesnej odpowiedzi komórkowej c-Fos w hipokampie myszy .....	19
<i>Karolina Burzyńska, Anna Bielat, Patrycja Grzybowska, Angelika Kobyłko, Jarosław Filipiak</i> Zastosowania techniki druku 3D w medycynie .....	21
<i>Alicja Cepiel, Agnieszka Noszczyk-Nowak, Adrian Janiszewski, Robert Pasławski, Urszula Pasławska</i> Badanie elektrofizjologiczne serca jako nowa metoda diagnostyczna w rozpoznawaniu zaburzeń przewodzenia wewnątrzsercowego u psów .....	23
<i>Lucja Cwynar-Zajac, Renata Brykner-Ręczkowska, Elżbieta Gębarowska, Marzena Podhorska-Okolów, Piotr Dzięgiel</i> Adhezja komórkowa w mysich nowotworach gruczołu mlekowego po terapii owocystatyną .....	25
<i>Dominik Drabik, Magdalena Przybyło, Marek Langner</i> Wpływ doxorubicyny na mechanikę błon liposomowych techniką fluorescent flicker-noise .....	27
<i>Andriy Dulibskyy, Bohdan Khorkavyy</i> Zastosowanie nowoczesnych środków pomiaru do oceny prędkości, siły i koordynacji piłkarzy nożnych .....	29
<i>Natalia Glatzel-Plucińska, Piotr Dzięgiel</i> Haspina i jej rola w komórkach nowotworowych .....	31
<i>Daria Głogocka, Magdalena Przybyło, Marek Langner</i> Wpływ jonów metali ciężkich na przepuszczalność dwuwarstwy lipidowej .....	33
<i>Katarzyna Grabowska, Rafał Mech, Anna Zięty, Jerzy Detyna</i> Wybrane aspekty badań właściwości biomechanicznych roślin .....	35

<i>Aleksandra Gular, Katarzyna Arkusz, Elżbieta Krasicka-Cydzik</i> Wpływ past wybielających na ścieralność szkliwa ludzkich zębów .....	37
<i>Katarzyna Haczekiewicz, Anna Drohomirecka, Tomasz Walski, Albert Czerski, Małgorzata Komorowska, Piotr Dzięgiel, Marzena Podhorska-Okołów</i> Ultrastrukturalne zmiany patologiczne w narządach podczas operacji kardiochirurgicznych z użyciem krążenia pozaustrojowego oraz z prewencyjnym wykorzystaniem promieniowania z zakresu bliskiej podczerwieni .....	39
<i>Magdalena Jateczak, Magdalena Kisiel, Marta M. Czyżewska, Marek Brodzki, Jerzy W. Mozzymas</i> Wpływ mutacji $\beta 2E155$ w obrębie miejsca wiążącego agonistę w receptorze GABAA na mechanizm działania tego receptora .....	41
<i>Agnieszka Kaczmarek-Pawelska, Anna Witkowska, Elżbieta Krasicka-Cydzik</i> Warstwy hybrydowe na powierzchni implantów jako regulator procesów osteointegracji .....	43
<i>Wojciech Kędzia, Emilia Kędzia, Alicja Kędzia</i> Anatomia i znaczenie kliniczne przyszczałkowego spłotu oponowego w okresie prenatalnym .....	45
<i>Wojciech Kędzia, Emilia Kędzia, Alicja Kędzia</i> Zlewisko żyłne namiotu mózdzku w okresie prenatalnym .....	47
<i>Liliana Kiczak, Urszula Pasławska, Ewa Walecka-Zacharska, Izabela Sambor, Tadeusz Stefaniak, Piotr Dzięgiel, Maciej Zacharski, Alicja Tomaszek, Ilona Rybińska, Jacek Bania</i> Expression of interleukin-1 $\beta$ splice variant in canine kidney, liver and lung in dogs with heart insufficiency .....	49
<i>Lech Kipiński, Małgorzata Mical-Strąk, Witold Pilecki, Jerzy Kolanko</i> Bezpieczne stosowanie przezczaszkowej stymulacji elektrycznej mózgu (CES) w warunkach domowych .....	51
<i>Lech Kipiński, Anna Bielous-Wilk, Witold Pilecki, Jerzy Kolanko</i> Wspomaganie leczenia uzależnienia od papierosów za pomocą przezczaszkowej stymulacji elektrycznej mózgu (CES) .....	53
<i>Barbara Kmiecik, Aleksander Blachut, Magdalena Bajgrowicz, Jerzy Detyna</i> Charakterystyka właściwości mechanicznych skóry na podstawie danych uzyskanych z modelu matematycznego .....	55
<i>Wojciech Kordecki, Cezary Sielużycki, Paweł Kordowski, Artur Matysiak, Lech Kipiński</i> Problemy parametryzacji bramkowania przed sygnałowego potencjałów wywołanych mózgu .....	57
<i>Benita Kostrzewa, Arleta Staszuk, Ewa Karuga-Kuźniowska, Zbigniew Rybak</i> Sztuczna zastawka żylna – problem do rozwiązania? .....	59
<i>Olga Kuwaldina, Oleh Rybak</i> Bezpieczna pozycja za kierownicą samochodu osobowego .....	61
<i>Aleksandra Kuzan, Agnieszka Chwilkowska, Jerzy Wiśniewski, Magdalena Kobielarz</i> Związek między wapnieniem tętnic a zawartością głównych białek budulcowych .....	63
<i>Maciej Łukawski, Magdalena Przybyło, Marek Langner</i> Optymalizacja metody ekstrakcji doksorubicyny z matryc biologicznych .....	65
<i>Marta Maciejewska</i> Wykorzystanie peptydów w procesie tworzenia nowych biomateriałów .....	67
<i>Agnieszka Mackiewicz, Grzegorz Sławiński, Romuald Będziński</i> Analiza ryzyka powstania urazów kręgosłupa szyjnego u żołnierzy w wyniku oddziaływania fali uderzeniowej na pojazdy militarne .....	69
<i>Joanna Mazur-Różycka, Jan Gajewski, Krzysztof Buško</i> Oddziaływanie zmęczenia na charakterystyki drżenia fizjologicznego i odruchu Hoffmanna u kajakarzy .....	71

<i>Przemysław Musz</i> Konstrukcja i pomiary balistokardiografu pneumatycznego oraz jego zastosowanie do nieinwazyjnej akwizycji wybranych sygnałów biomedycznych .....	73
<i>Agnieszka Noszczyk-Nowak, Alicja Cepiel, Adrian Janiszewski, Robert Pasławski, Urszula Pasławska, Józef Nicpoń</i> Ocena bezpieczeństwa stosowania dowieńcowego homogenatu porożogennych komórek macierzystych oraz jego wpływ na parametry elektrofizjologiczne serca zdrowych świń .....	75
<i>Aleksandra Nowak, Dominik Haus, Karolina Jabłońska, Bartosz Puła, Wojciech Witkiewicz, Marzenna Podhorska-Okolów, Janusz Ryś, Piotr Dzięgiel</i> Ekspresja nestyny w naczyniach krwionośnych w rakach gruczołu piersiowego .....	77
<i>Mateusz Olbromski, Jędrzej Grzegorzółka, Alina Jankowska-Konsur, Marzenna Podhorska-Okolów, Piotr Dzięgiel</i> Ekspresja czynnika transkrypcyjnego SOX18 w płaskonabłonkowym raku płuc .....	79
<i>Adam Oleszko, Julia Ostrowska, Małgorzata Skrzypecka, Sylwia Olsztyńska-Janus, Albert Czerski, Małgorzata Komorowska</i> Zmniejszenie skutków ubocznych pozaustrojowego obiegu krwi poprzez naświetlanie promieniowaniem z zakresu bliskiej podczerwieni .....	81
<i>Sylwia Olsztyńska-Janus</i> Metoda ATR jako szybkie narzędzie do badania układów biologicznych i nieorganicznych .....	83
<i>Krzysztof J. Opieliński, Piotr Pruchnicki, Jarosław Majewski, Włodzimierz Roguski</i> Multimodalny tomograf ultradźwiękowy: wyniki badań fantomów i struktur biologicznych .....	85
<i>Robert Pasławski, Andrzej Szuba, Adrian Janiszewski, Magdalena Kobielarz, Urszula Pasławska</i> Badania właściwości mechanicznych tętnic udowych świń żywionych dietą typu western .....	87
<i>Jan Procek, Paweł Grieb, Marek Langner</i> Porównanie metod zamykania disulfiramu w liposomach .....	89
<i>Monika Ratajczak, Romuald Będziński</i> Wpływ gwałtownych obciążeń mózgu na zaburzenia neurologiczne – badania numeryczne .....	91
<i>Daria Rudnik</i> Biomechaniczna analiza wybranych parametrów skoku startowego w pływaniu sportowym .....	93
<i>Agnieszka Rusak, Karolina Jabłońska, Jędrzej Grzegorzółka, Piotr Dzięgiel</i> YKL-40 w raku gruczołu piersiowego .....	95
<i>Michał Skowicki, Tomasz Lipiński</i> Biofunkcjonalizacja nanocząstek upkonwertujących – metody i zastosowania .....	97
<i>Arleta Staszuk, Benita Kostrzewa, Ryszard Tadeusiewicz, Ewa Karuga-Kuźniewska</i> Telerehabilitacja osób z niesprawnością kończyny górnej .....	99
<i>Arleta Staszuk, Benita Kostrzewa, Ryszard Tadeusiewicz</i> Modelowanie mechanizmów wytwarzania mowy patologicznej .....	101
<i>Artur Struzik, Jerzy Zawadzki</i> Sztwywność kończyn dolnych w odbiciu do skoku pionowego z zamachem kończynami górnymi oraz bez zamachu .....	103
<i>Kamila Szostak, Magdalena Przybyło, Marek Langner</i> Porównanie skuteczności działania neutralizatorów względem kationowego środka antyseptycznego .....	105
<i>Kamila Środa-Pomianek, Olga Wesołowska, Andrzej Pola, Piotr Świątek, Wiesław Malinka, Anna Uryga, Krystyna Michalak</i> Modelowanie molekularne i analiza QSAR fenotiazyn jako modulatorów oporności wielolekowej komórek nowotworowych .....	107

<i>Tomasz Świetlik, Krzysztof Opieliński</i> Ultradźwiękowa tomografia dopplerowska: możliwości zastosowania w diagnostyce medycznej .....	109
<i>Andrzej Teisseyre, Justyna Gąsiorowska, Anna Uryga, Krystyna Michalak</i> Modulacja aktywności kanałów potasowych typu Kv1.3 przez prenylowe pochodne biologicznie aktywnych związków polifenolowych - badania techniką <i>patch-clamp</i> .....	111
<i>Bogdan Vynogradskyi, Ali Abdulkarim Jasim Al-Ubayidi</i> Monitoring of human body temperature at the conditions of hot climate .....	113
<i>Olga Wesołowska, Kamila Środa-Pomianek, Jerzy Wiśniewski, Aleksandra Bielawska-Pohl, Maria Paprocka, Danuta Duś, Noëlla Duarte, Maria-José U.Ferreira, Krystyna Michalak</i> Modulatory oporności wielolekowej komórek nowotworowych wśród związków pochodzenia roślinnego .....	115
<i>Sławomir Winiarski</i> Przewidywanie kinematyki ruchu człowieka przy zastosowaniu analizy regresji liniowej .....	117
<i>Magdalena Wojtków, Małgorzata Żak, Celina Pezowicz</i> Analiza strukturalna płytki granicznej w modelu zwierzęcym .....	119
<i>Artur Wrona</i> Weryfikacja algorytmu procesu adaptacji funkcjonalnej tkanki gąbczastej techniką symulacji Monte Carlo .....	121
<i>Katarzyna Wysocka, Alicja Rutkowska-Kucharska</i> Parametry kinematyczne w ocenie obciążeń układu ruchu w step aerobiku .....	123
<i>Alina Zawiślak</i> Wpływ neuronów na ekspresję aldolazy fruktozo-1,6-bisfosforanu (ALDOA) w astrocytach .....	125
<i>Dorota Zyśko, Robert Pasławski<sup>2</sup>, Adrian Janiszewski, Urszula Pasławska, Andrzej Szuba</i> Zmienność rytmu serca u świń żywionych dietą typu western .....	127
<i>Matylda Żmudzińska</i> System nawigacji komputerowej w świetle widzialnym do zastosowań w biomechanice .....	129
<i>Magdalena Żulpo, Joanna Balbus, Artur Wrona, Krystian Kubica</i> Matematyczny model enterohepatycznego krążenia żółci .....	131

## Wzrost ekspresji VEGF-A oraz FGF-2 w mięśniach szkieletowych wywołany masażem oraz ćwiczeniami fizycznymi

WALDEMAR ANDRZEJEWSKI<sup>1,2</sup>, KRZYSZTOF KASSOLIK<sup>1,2</sup>, JĘDRZEJ GRZEGRZÓŁKA<sup>3</sup>, CHRISTOPHER KOBIERZYCKI<sup>3</sup>, KATARZYNA RATAJCZAK-WIELGOMAS<sup>3</sup>, KAROLINA JABŁOŃSKA<sup>3</sup>, TOMASZ HALSKI<sup>2</sup>, PIOTR DZIEGIEL<sup>1,3</sup>, MARZENA PODHORSKA-OKOŁÓW<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Katedra Fizjoterapii, Akademia Wychowania Fizycznego we Wrocławiu, al. Ignacego Jana Paderewskiego 35, 51-612 Wrocław, waldemar.andrzejewski@gmail.com, krzysztof.kassolik@awf.wroc.pl

<sup>2</sup>Państwowa Medyczna Wyższa Szkoła Zawodowa w Opolu, ul. Katowicka 68, 45-060 Opole, waldemar.andrzejewski@gmail.com, krzysztof.kassolik@awf.wroc.pl, rektorat@wsm.opole.pl

<sup>3</sup>Katedra Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, ul. Chałubińskiego 6a, 50-558 Wrocław, jedrzej.grzegzolka@gmail.com, ch.kobierzycki@gmail.com, katarzyna.ratajczak-wielgomas@umed.wroc.pl, karolka\_d@poczta.fm, piotr.dziegiel@umed.wroc.pl, marzenna.podhorska-okolow@umed.wroc.pl

**Słowa kluczowe:** angiogeneza, mięśnie szkieletowe, masaż, ćwiczenia fizyczne

### 1. Wstęp

Znane są liczne prace podejmujące próbę zdefiniowania roli masażu w przygotowywaniu do wysiłku fizycznego, ponadto przywracaniu sprawności po wysiłku a także zasadności wykorzystania masażu w rekonwalescencji pourazowej [1-2]. Czynnikiem stymulującym wzrost naczyń krwionośnych, co w efekcie poprawia ukrwienie i wpływa na regenerację tkanek, są: czynnik VEGF-A (ang. vascular endothelial growth factor) oraz FGF-2 (ang. fibroblast growth factor 2) [3-6]. Celem prezentowanej pracy było zbadanie czy masaż mięśni wykonywany przed i w trakcie treningu biegowego ma wpływ na poziom ekspresji VEGF-A oraz FGF-2 w badanych włóknach mięśniowych.

### 2. Materiał i metody

Badania przeprowadzono na grupie 75 szczurów rasy Buffalo. Wszystkie szczury odbyły 10. tygodniowy trening biegowy. Następnie zwierzęta podzielono na 3 grupy: grupa PM poddawana była masażowi w okresie poprzedzających trening, grupa M - w czasie trwania treningu, a grupa C stanowiła grupę kontrolną pozbawioną masażu. Masaż wykonywany był za pomocą wystandaryzowanego sprzętu w formie spiralnych ruchów wzdłuż podszwowej powierzchni mięśnia zginacza krótkiego palców kończyny tylnej. W celu określenia ekspresji VEGF-A w materiale tkankowym pozyskanym od wyżej opisanych szczurów, wykonano badania z wykorzystaniem techniki immunohistochemicznej, Western-blot oraz real time PCR. Ekspresję mRNA dla FGF-2 zbadano za pomocą techniki real time PCR. Analizę statystyczną wykonano przy użyciu programu Prism 5.0.

### 3. Wyniki

Po pierwszym tygodniu treningu biegowego zaobserwowano istotny wzrost ekspresji genu VEGF-A w grupie PM, a późniejszym okresie eksperymentu przeważający wzrost w grupie M. Wzrost ekspresji na poziomie białka obserwowany był w obu masowanych grupach po pierwszym tygodniu treningu. Ekspresja FGF-2 była istotnie wyższa w grupie szczurów masowanych w trakcie wysiłku (istotność różnicy w 1. i 3. oraz w 10. tygodniu eksperymentu). Wykazano średnią dodatnią korelację ekspresji genu i poziomu białka VEGF-A we wszystkich badanych grupach ( $r=0,389$ ,  $p<0,001$ ). Ponadto ekspresja VEGF-A oraz FGF-2 również wykazywała średnią dodatnią korelację ( $r=0,369$ ,  $p<0,001$ ).

#### 4. Wnioski

Wzrost ekspresji VEGF-A oraz FGF-2 - czynników odpowiedzialnych za regulację procesu angiogenezy, w wyniku synergistycznego wykonywania masażu i treningu biegowego, pozwala sądzić, że długotrwałe, wielokrotnie powtarzane zabiegi masażu mogą przyczynić się do rozwijania procesów adaptacyjnych/regeneracyjnych w poddanych wysiłkowi fizycznemu mięśniach szkieletowych.

**Źródła finansowania:** Badania częściowo finansowane ze środków Grantu Narodowego Centrum Nauki o numerze NN 404002839.

#### Piśmiennictwo

- [1] BEINER JM, JOKI P. *Muscle contusion injuries: current treatment options*. J Am Acad Orthop Surg 2001,9:227-937.
- [2] TIDUS P, SHOEMAKER J. *Effleurage massage, muscle blood flow and long time recovery*. Int J Sport Med 1995,16:478-183.
- [3] GUTE D, FRAGA C, LAUGHLIN MH, AMANN JF. *Regional changes in capillary supply in skeletal muscle of high-intensity endurance-trained rats*. J Appl Physiol 1996,81:619-626.
- [4] LLOYD PG, PRIOR BM, YANG HT, TERJUNG RL. *Angiogenic growth factor expression in rat skeletal muscle in response to exercise training*. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2003,284:1668-1678.
- [5] WAGNER PD. *The critical role of VEGF in skeletal muscle angiogenesis and blood flow*. Biochem Soc Trans 2011,39:1556-1559.
- [6] ANDRZEJEWSKI W, KASSOLIK K, DZIEGIEL P, PULA B, RATAJCZAK-WIELGOMAS K, JABLONSKA K, KURPAS D, HALSKI T, PODHORSKA-OKOLOW M. *Effects of synergistic massage and physical exercise on the expression of angiogenic markers in rat tendons*. Biomed Res Int 2014,2014:878095.

## Platforma immunosensora do bezpośredniej detekcji kompleksów antygen-przeciwciała na podłożu Ti/TiO<sub>2</sub>

KATARZYNA ARKUSZ<sup>1</sup>, ELŻBIETA KRASICKA-CYDZIK<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Uniwersytet Zielonogórski, Zakład Inżynierii Biomedycznej, ul. Licealna 9, 65-417 Zielona Góra, k.arkusz@ibem.uz.zgora.pl

**Słowa kluczowe:** biosensor, nanorurki ditlenku tytanu, cytokiny

### 1. Wstęp

Bezpośrednią immobilizację bioreceptorów na powierzchni ujemnie naładowanych nanorurek ditlenku tytanu (TNT) potwierdzono dotychczas wyłącznie dla białek posiadających ładunek dodatni [1-5]. Zważywszy na wartość punktu izoelektrycznego przeciwciał monoklonalnych (IP pH 5,5-7,0) charakteryzują się one ujemnym ładunkiem w roztworze ludzkiego i sztucznego osocza. W związku z powyższym opracowanie impedancyjnego immunosensora opartego na teście ELISA, z wykorzystaniem do immobilizacji przeciwciał na platformie TNT zjawiska fizysorpcji, konieczne jest użycie substancji biologicznych, których wartość punktu izoelektrycznego jest wyższa niż wartość pH absorbantu lub zastosowanie modyfikacji platformy biosensora. Celem przeprowadzonych badań jest przygotowanie platformy TNT, umożliwiającej wykrywanie wiązań antygen-przeciwciała na przykładzie interleukiny -6 (IL-6), interleukiny 8 (IL-8) oraz czynnika martwicy nowotworów (TNF $\alpha$ ), modyfikowanej termicznie w atmosferze argonu. Zastosowanie wyżarzania próbek ma na celu doprowadzenie do przemiany fazy amorficznej ditlenku tytanu w anataz. Ta odmiana TiO<sub>2</sub> charakteryzuje się lepszą przewodnością, co wynika z przewodzenia dziurowo jonowego.

### 2. Materiał i metody

#### *Formowanie nanorurek TiO<sub>2</sub>*

Warstwa nanorurek ditlenku tytanu została wytworzona w procesie anodowania elektrochemicznego folii tytanu (0,5 mm grubości, 99,6% czystości) w roztworze 85% glikolu etylenowego z dodatkiem 0,65 % wag. NH<sub>4</sub>F przez 3750 s stosując potencjał 17 V. Wytworzoną elektrodę poddano w dalszej części modyfikacji termicznej przez wyżarzanie w atmosferze argonu w temperaturze 550° C przez 2h. Obrazy SEM powierzchni tlenkowych wykonano z zastosowaniem skaningowej mikroskopii elektronowej, a ich charakterystykę elektrochemiczną przeprowadzono w standardowym układzie trójelektrodowym metodą elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej.

#### *Immobilizacja przeciwciał i antygenów wybranych cytokin*

Do immobilizację przeciwciał oraz antygenów IL-6, IL-8, TNF $\alpha$  na małej powierzchni próbki zastosowano metodę nakrapiania. Proces unieruchamiania receptora biologicznego na matrycy TNT przeprowadzono w dwóch etapach:

- bezpośrednia immobilizacja metodą nakrapiania 5  $\mu$ l standardowego roztworu ludzkich przeciwciał monoklonalnych (1  $\mu$ g/ml) oraz inkubowanie próbek w temperaturze 25 $\pm$ 2° C.
- bezpośrednia immobilizacja metodą nakrapiania 5  $\mu$ l standardowego roztworu antygenów oraz inkubowaniu próbek w temperaturze 25 $\pm$ 2° C.

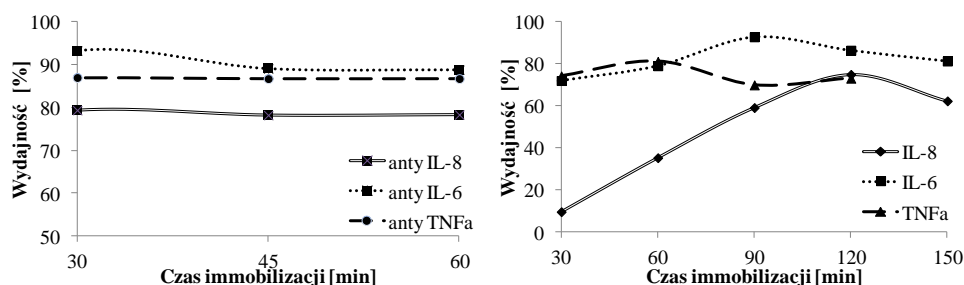
### 3. Wyniki

Z uzyskanych obrazów SEM wynika, że wyżarzanie próbek tytanowych w atmosferze argonu nie ma znaczącego wpływu na morfologię warstwy.

Zgodnie z procedurami testów ELISA wykorzystywanymi obecnie do oznaczania wybranych substancji, czas immobilizacji IL-6 oraz IL-8 określono jako 2,5 h, natomiast TNF $\alpha$  jako 2 h. Dla każdego z użytych antygenów (IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ ) wydajność procesu immobilizacji na powierzchni TNT osiągała wartość większą niż 75% w czasie krótszym niż stosowany w testach ELISA (**Ryc. 1**). Dla każdego ze stosowanych przeciwciał najkrótszy czas immobilizacji określono jako 30 min, natomiast czas immobilizacji antygenów stosowanych cytokin określono jako:

- IL-6: 90 min,
- IL-8: 120 min,
- TNF $\alpha$ : 60 min.

Na podstawie przeprowadzonych badań czasy te uznano za wystarczające do efektywnego połączenia substancji biologicznych z podłożem TNT.



**Ryc. 1.** Wydajność procesu immobilizacji przeciwciał (z lewej) oraz antygenów (z prawej) IL-6, IL-8 oraz TNF $\alpha$  w funkcji czasu

#### 4. Dyskusja

Uzyskane wyniki wskazują na dobre cechy elektrochemiczne badanych warstw. Przeprowadzona modyfikacja oprócz zmiany struktury krystalicznej i poprawy przewodnictwa elektrycznego spowodowała również zmianę wartości potencjału stacjonarnego ( $E_{\text{stac}} = 55$  mV), co umożliwia bezpośrednią immobilizację przeciwciał na powierzchni TNT.

Jednym z zadań związanych z opracowaniem platformy immunosensora na podłożu Ti/TiO $_2$  do detekcji cytokin stanu zapalnego była optymalizacja czasu immobilizacji substancji biologicznych na modyfikowanym termicznie podłożu TNT. Dla każdego etapu immobilizacji zarówno przeciwciał IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ , jak i antygenów IL-6, IL-8, TNF $\alpha$  czas immobilizacji niezbędny do efektywnego ich unieruchomienia na podłożu TNT okazał się znacznie krótszy, niż czas określony procedurami testów ELISA. Wyniki te potwierdzają, że podłoże TNT ze względu na swe unikalne właściwości, zdolność do wiązania protein i powinowactwo kationowe, może być użyte jako platforma biosensora.

**Źródła finansowania:** „Diamentowy Grant” MNiSW Nr 049/DIA/2012/41

#### Piśmiennictwo

- [1] OH S., BRAMMER K. S., LI Y. S., TENG D., ENGLER A., CHIEN S., JIN A., *Stem cell facet dictated solely by altered nanotube dimension*. PNAS, 2009:106, 7, 2130-2135.
- [2] GONGADZE E., KABASO D., BAUER S., SLIVNIK T., SCHMUKI P., *Adhesion of osteoblasts to a nanorough titanium implant surface*. International Journal of Nanomedicine, 2011: 6, 1801-1816.
- [3] GONGADZE E., KABASO D., BAUER S., JUNG P., SCHMUKI P., IGLIC A., *Adhesion of Osteoblasts to a Vertically Aligned TiO $_2$  Nanotube Surface*. Mini Reviews in Medicinal Chemistry, 2013: 13, 2 194-200.
- [4] HENDERSON M.A., *A surface perspective on self-diffusion in rutile TiO $_2$* . Surface Science, 1999: 419, 174, 2-3.
- [5] CHURPINA V. G., SHALYA I. M., ZENKOV V. S., *Oxidation of porous nanocrystalline titanium nitride I kinetics*. Powder metallurgy & Metal Ceramics, 2006: 45, 82-85.

## Ocena przebiegu ruchu w wybranych stawach w czasie uderzeń topspinowych w tenisie stołowym

ZIEMOWIT BAŃKOSZ<sup>1</sup>, SŁAWOMIR WINIARSKI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Katedra Dydaktyki Sportu, Akademia Wychowania Fizycznego we Wrocławiu, Al. I.J.Paderewskiego 35, 51-612 Wrocław, ziemowit.bankosz@awf.wroc.pl

<sup>2</sup> Katedra Biomechaniki, Akademia Wychowania Fizycznego we Wrocławiu, Al. I.J.Paderewskiego 35, 51-612 Wrocław, slawomir.winiarski@awf.wroc.pl

**Słowa kluczowe:** zakres ruchu, analiza ruchu, kinematyka

### 1. Wstęp

Tenis stołowy jest dyscypliną sportową, w której technika gry i jej kontrola odgrywa bardzo ważną rolę. Niewiele jest jednak [prac, które dotyczą obiektywnego (laboratoryjnego) określenia szczegółów przebiegu ruchu, skoordynowania poszczególnych segmentów ciała, wykorzystywanych, dokładnych zakresów ruchu w najważniejszych stawach, a te, które są oceniają jedynie niektóre aspekty techniki [1-5]. Celem badań była ocena przebiegu ruchu w poszczególnych segmentach ciała w następujących po sobie fazach ruchu podczas wykonywania uderzenia topspin forhend oraz określenie najbardziej istotnych różnic w przebiegu ruchu pomiędzy poszczególnymi odmianami tego uderzenia. Ocena ta obejmuje określenie: zakresu ruchu w wybranych stawach, wielkości kąta w określonych zdarzeniach (momentach) wykonywanych uderzeń (początek, moment kontaktu rakiетки z piłką, moment nawrotu – zmiany kierunku ruchu) oraz skoordynowania poszczególnych segmentów ciała w następujących po sobie fazach uderzenia.

### 2. Materiał i metody

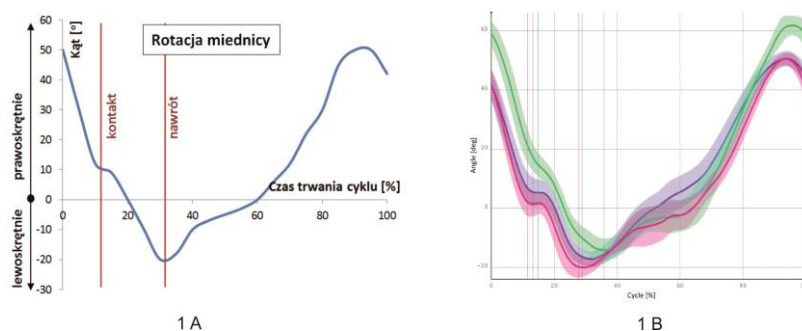
Materiał badań stanowiły cztery zawodniczki tenisa stołowego o dużym zaawansowaniu sportowym. Dwie z nich to zawodniczki ścisłej czołówki Polski, reprezentantki kraju w kategorii seniorskiej, w wieku 27 i 28 lat, ze stażem treningowym ok. 20 lat. Dwie kolejne to juniorki, należące do pierwszej 16-tki w kraju, w wieku 17 i 18 lat, ze stażem ok. 10 lat.

Stanowisko pomiarowe. W badaniu wykorzystano system analizy ruchu BTS Smart-E wyposażony w 6 kamer IR (1,1  $\mu\text{m}$ , 120Hz) i 2 kamery NetworkCam (zakres widzialny, 20Hz). Na ciele osoby badanej rozmieszczono 34 znaczniki filmowania. Znaczniki zostały także przyklejone do krawędzi rakiety w trzech miejscach: na końcu rakiety, na górnej krawędzi i na dolnej krawędzi i wyznaczały płaszczyznę rakiety. W celu określenia momentu kontaktu piłki z rakieta zastosowano czujnik akustyczny przymocowany do jednej z powierzchni rakiety. Każda zaprezentowała 3 odmiany uderzeń topspinowych: (F1) Topspin forhend z piłki bez rotacji, grany z siłą, szybkością i rotacją ok. 75%; (F2) Topspin forhend z piłki podciętej (z dolną rotacją), grany z siłą, szybkością i rotacją ok. 75%; (F3) Topspin forhend z piłki bez rotacji, grany z siłą, szybkością zbliżoną do maksymalnej (tzw. kończący). Każde zadanie składało się z 15 prezentowanych uderzeń. W cyklu uderzeń wyznaczono następujące fazy: (Ph1) faza od początku uderzenia (ruch do przodu) do momentu kontaktu z piłką; (Ph2) od kontaktu do nawrotu (koniec ruchu w przód); (Ph3) faza w tył.

Obliczenia. Na podstawie pomiarów antropometrycznych i zmiany położenia znaczników filmowania wyznaczono lokalne układy współrzędnych i osie obrotu oraz wyznaczono charakterystyki czasowe zakresów ruchu (Rycina 1A).

### 3. Wyniki

Na rycinie 1B przedstawiono przykładowe wyniki pomiaru zakresu rotacji miednicy podczas wykonania trzech uderzeń topspinowych.



Ryc. 1. Przykładowy przebieg ruchu rotacji miednicy podczas trzech prób uderzeń forhendowych

### 4. Dyskusja i wnioski

Początek lewoskrętnej rotacji miednicy wyprzedza o ok. 15% czasu trwania cyklu początek ruchu rakiety, w momencie kontaktu miednica zatrzymuje się na ok. 5% CTC, natomiast ruch rakiety do tyłu był zgodny z początkiem ruchu prawoskrętnego miednicy podczas nawracania.

Zakres ruchu był zbliżony w poszczególnych próbach, ale dla f2 miednica była bardziej zwrócona prawoskrętnie podczas całego ruchu.

Czas wystąpienia kontaktu rakiety z piłeczką był porównywalny, stwierdzono natomiast różnice w czasie trwania fazy drugiej (od kontaktu do nawrotu) i momentu nawrotu.

Wniosek: zaobserwowano różnice w czasowej charakterystyce przebiegu mierzonych kątów (w zakresach ruchu). Segmenty ciała położone przyśrodkowo mają większe przesunięcie czasowe w fazie początkowej (podczas zapoczątkowania ruchu) w stosunku do ruchu rakiety.

### Piśmiennictwo

- [1] ZHANG H. SHI Y. *Kinematics of forehand attack on accelerated loop techniques in table tennis - a case study*. International Symposium on Biomechanics in Sport (18th: 2000: Hong Kong). In Hong, Y. (ed.), Proceedings of XVIII International symposium on biomechanics in sports, Hong Kong, Department of Sports Science and Physical Education. The Chinese University of Hong Kong, c2000, p.1011. 1p.
- [2] YOICHI I., TAKEJI K. *Kinetics of the upper limb during table tennis topspin forehands in advanced and intermediate players*. Sports Biomechanics 2011; 10(4): 361–377
- [3] YOICHI I., TERUAKI M., TAKEJI K. *Contributions of upper limb rotations to racket velocity in table tennis backhands against topspin and backspin*. Journal of Sports Sciences, 2008; 26(3): 287 – 293
- [4] GRYCAN J. *Integralny tenis stołowy*. Wyd. J. Grycan Table Tennis Body Mind Training, Kraków, 2007: 81-174.
- [5] HUDETZ R. *Tenis stołowy 2000*. Wyd. Modest, Łódź. 2005.

## Porównanie właściwości kinetycznych i farmakologicznych podtypów $\alpha 1$ - $\gamma 2L$ i $\alpha 1$ - $\beta 2$ - $\gamma 2L$ rekombinowanych receptorów GABA(A)

MAREK BRODZKI<sup>1,2</sup>, MARTA M. CZYŻEWSKA<sup>2</sup>, RADOSŁAW RUTKOWSKI<sup>2</sup>, MAGDALENA KISIEL<sup>2</sup>,  
MAGDALENA JATCZAK<sup>1,2</sup>, JERZY W. MOZRZYMAS<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Fizjologii Molekularnej Zwierząt, Uniwersytet Wrocławski, ul. W. Cybulskiego 30, 50-205 Wrocław,  
e-mail: marek.brodzki@uni.wroc.pl

<sup>2</sup>Samodzielna Pracownia Biofizyki Układu Nerwowego, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu,  
ul. Chałubińskiego 3, 50-368 Wrocław

**Słowa kluczowe:** GABA, receptor GABA(A), kinetyka, modulacja

### 1. Wstęp

Receptory GABA typu A to główne jonotropowe receptory odpowiedzialne za inhibicję transmisji w ośrodkowym układzie nerwowym dorosłych ssaków. Te pentameryczne białka mogą składać się z wielu różnych podjednostek, jednakowoż najczęściej występującą kombinacją jest receptor złożony z podjednostek  $\alpha 1$ ,  $\beta 2$  i  $\gamma 2L$ . Dokonując ekspresji receptorów  $\alpha 1$ - $\beta 2$ - $\gamma 2L$  stwierdzono, że dochodzi również do ekspresji receptorów  $\alpha 1$ - $\gamma 2L$  [1], jednak ich właściwości kinetyczne i farmakologiczne nie zostały jak dotąd określone. Oba podtypy receptora GABA<sub>A</sub> wykazują podobieństwo kinetyczne, co oznacza że udział subpopulacji receptorów  $\alpha 1$ - $\gamma 2L$  może nie być znany eksperymentatorowi. Ponadto poziom ekspresji receptorów  $\alpha 1$ - $\gamma 2L$  w mózgu nie został dotąd określony. Te problemy skłoniły nas do dokładnego zbadania profilu kinetycznego i farmakologicznego receptorów  $\alpha 1$ - $\gamma 2L$ . Porównaliśmy charakterystykę odpowiedzi prądowych obu podtypów receptorów na wysycające stężenia GABA oraz określiliśmy efekt modulacji prądów GABAergicznym przez powszechnie używane modulatory: niskie zewnątrzkomórkowe pH, jony cynku i flurazepam. Porównaliśmy również prąd odbicia po podaniu wysycającego stężenia pentobarbitalu (prąd pojawiający się po odpłukaniu pentobarbitalu z otoczenia komórki).

### 2. Materiał i metody

**Ekspresja rekombinowanych receptorów GABA<sub>A</sub> w linii komórkowej HEK293.** Komórki HEK293 zostały poddane transfekcji plazmidowym DNA z sekwencjami kodującymi podjednostki receptora GABA<sub>A</sub> i gen reporterowy CD4. Transfekcję przeprowadzono metodą wytrącania fosforanu wapnia 48-72 godzin przed pomiarem.

**Pomiary elektrofizjologiczne.** Odpowiedzi prądowe zostały zarejestrowane dzięki użyciu techniki patch-clamp przy ustalonym napięciu w konfiguracji całej komórki (whole-cell) oraz oderwanej łatki błonowej (outside-out excised patch). Aplikacja roztworów przez dwudzielną kapilarę „theta-glass” odbywała się z zastosowaniem systemu ultraszybkiej perfuzji bazującego na translatorku piezoelektrycznym, co pozwalało na wymianę roztworu wokół badanej komórki (lub łatki błonowej) w czasie ~150  $\mu$ s.

### 3. Wyniki

Badane podtypy receptorów odznaczały się analogiczną zależnością dawka-odpowiedź względem GABA. Kinetycznie odpowiedzi prądowe w receptorach  $\alpha 1$ - $\beta 2$ - $\gamma 2L$  i  $\alpha 1$ - $\gamma 2L$  są podobne, jednakowoż w receptorach  $\alpha 1$ - $\gamma 2L$  odnotowano szybszy przebieg wolnej desensytyzacji i deaktywacji po długim podaniu agonisty, zaś deaktywacja po krótkim podaniu przebiegała wyraźnie wolniej. Obniżenie zewnątrzkomórkowego pH skutkowało w receptorach  $\alpha 1$ - $\beta 2$ - $\gamma 2L$  znacznym wzrostem

amplitudy prądów oraz wydłużeniem deaktywacji po krótkim pulsie agonisty. Oba te efekty były znacznie mniej uwidocznione w receptorach  $\alpha 1\text{-}\gamma 2\text{L}$ . Jony cynku obniżały amplitudę prądów w receptorach  $\alpha 1\text{-}\gamma 2\text{L}$  znacznie silniej niż w receptorach  $\alpha 1\text{-}\beta 2\text{-}\gamma 2\text{L}$ , jednakowoż w tych ostatnich obserwowano też zwiększony zanik prądu w czasie podawania agonisty, czego nie odnotowano w przypadku receptorów  $\alpha 1\text{-}\gamma 2\text{L}$ . Podanie wraz z agonistą benzodiazepiny – flurazepamu powodowało w receptorach  $\alpha 1\text{-}\beta 2\text{-}\gamma 2\text{L}$  niewielkie obniżenie amplitudy, zaś w receptorach  $\alpha 1\text{-}\gamma 2\text{L}$  zaobserwowano znaczne jej podwyższenie. Prąd odbicia wywołany odpłukaniem pentobarbitalu w wysokim stężeniu (10 mM) nie wykazywał istotnych różnic między próbami.

#### 4. Dyskusja

Obserwacje wskazujące na różnice kinetyczne receptorów  $\alpha 1\text{-}\beta 2\text{-}\gamma 2\text{L}$  i  $\alpha 1\text{-}\gamma 2\text{L}$  w przedstawianych przez nas badaniach są w zgodzie z informacjami literaturowymi [1], odnotowaliśmy jednak różnice w przebiegach wolnych składowych procesów desensytyzacji i deaktywacji, czego nie zaobserwowano wcześniej. Ten efekt mógł być jednak nie do zaobserwowania w poprzednich badaniach, gdyż nasze badania odznaczały się dużo lepszą rozdzielczością czasową, pozwalając na obserwację kinetyki prądów GABAergicznnych w warunkach zbliżonych do synaptycznych. Podwyższenie amplitudy oraz wydłużenie deaktywacji receptorów  $\alpha 1\text{-}\beta 2\text{-}\gamma 2\text{L}$  spowodowane zakwaszeniem środowiska zewnątrzkomórkowego było uprzednio obserwowane [2], efekty te manifestowały się mniej lub wcale w przypadku receptorów  $\alpha 1\text{-}\gamma 2\text{L}$ . Obecność podjednostki  $\gamma 2$  powszechnie uważano za czynnik znacznie osłabiający inhibicję odpowiedzi prądowych przez jony cynku [3]. Przeciwny efekt zaobserwowano w naszych badaniach w przypadku receptora  $\alpha 1\text{-}\gamma 2$ , który podlegał inhibicji w znacznie większym stopniu niż receptor  $\alpha 1\text{-}\beta 2\text{-}\gamma 2\text{L}$ . Również, w zgodzie z dotychczasowym stanem wiedzy, desensytyzacja uległa znacznemu pogłębieniu w receptorach  $\alpha 1\text{-}\beta 2\text{-}\gamma 2\text{L}$  [4], podczas gdy w  $\alpha 1\text{-}\gamma 2\text{L}$  nie dało się zaobserwować żadnej zmiany. Efekt benzodiazepin na amplitudy prądów wywołanych wysycającym [GABA] w receptorach  $\alpha 1\text{-}\beta 2\text{-}\gamma 2\text{L}$  pokrywa się z doniesieniami literaturowymi [5], jednakowoż w receptorach  $\alpha 1\text{-}\gamma 2\text{L}$  zaobserwowano niespodziewaną potencjację prądów przy wysycającym stężeniu agonisty. Prądy odbicia wywołane podaniem wysokiego stężenia pentobarbitalu wykazują dużą specyficzność względem składu podjednostkowego, jednak w naszych badaniach nie zauważono różnic w badanych próbach.

Podsumowując, podtypy  $\alpha 1\text{-}\beta 2\text{-}\gamma 2\text{L}$  i  $\alpha 1\text{-}\gamma 2\text{L}$  receptora  $\text{GABA}_A$ , pomimo różnic strukturalnych, cechują się podobną kinetyką, jednakowoż wykazują odmienne właściwości farmakologiczne.

**Źródło finansowania:** Grant NCN DEC-2013/11/B/NZ3/00983.

#### Piśmiennictwo

- [1] VERDOORN T.A., DRAGUHN A., YMER S., SEEBURG P.H., SAKMANN B. *Functional properties of recombinant rat GABA-A receptors depend upon subunit composition*. Neuron, 1990,4:919-928.
- [2] MOZRZYMAS J.W., ŻARMOWSKA E.D., PYTEL M., MERCIK K. *Modulation of GABA(A) receptors by hydrogen ions reveals synaptic GABA transient and a crucial role of the desensitization process*. Journal of Neuroscience, 2003, 22:7981-7992.
- [3] DRAGUHN A., VERDOORN T.A., EWERT M., SEEBURG P.H., SAKMANN B. *Functional and molecular distinction between recombinant rat GABA<sub>A</sub> receptor subtypes by Zn<sup>2+</sup>*. Neuron, 1990,5:781-788.
- [4] BARBERIS A., PETRINI E.M., CHERUBINI E., MOZRZYMAS J.W. *Allosteric interaction of zinc with recombinant  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$  and  $\alpha 1\beta 2$  GABA<sub>A</sub> receptors* Neuropharmacology, 2002,43:607-618.
- [5] MOZRZYMAS J.W., WÓJTOWICZ T., PIAST M., LEBIDA K., WYREMBEK P., MERCIK K. *GABA transient sets the susceptibility of mIPSCs to modulation by benzodiazepine receptor agonists in rat hippocampal neurons*. Journal of Physiology, 2007, 585:29-46.

## Owocystatyna jako czynnik przeciwnowotworowy – badania na modelu *in vitro*

RENATA BRYKNER-RĘCZKOWSKA<sup>1</sup>, LUCJA CWYNAR-ZAJĄC<sup>1</sup>, ELŻBIETA GĘBAROWSKA<sup>1</sup>,  
MARZENNA PODHORSKA-OKOŁÓW<sup>1</sup>, PIOTR DZIĘGIEL<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, ul. Chałubińskiego 6a, 50-368 Wrocław, renata\_brykner@wp.pl

**Słowa kluczowe:** owocystatyna, cystatyna z białka jaja, inhibitor proteaz cysteinowych, *in vitro*

### 1. Wstęp

Owocystatyna jest kurzym odpowiednikiem ludzkiej cystatyny C, która należy do rodziny endogennych inhibitorów proteaz cysteinowych. Główną jej rolą jest hamowanie aktywności proteaz cysteinowych, należących do rodziny papain (C1) (głównie katepsyn B, H, L i S) i leguminaz (C13) [1,6]. Stanowi ochronę przed bakteryjnymi i wirusowymi peptydazami cysteinowymi [7,8]. Poprzez swoją aktywność bierze udział w zewnętrz- jak i wewnątrzkomórkowej kontroli proteolitycznej, obejmującej stany chorobowe oraz prawidłowe. Cystatyna bierze udział w wielu procesach m.in. w: naturalnej obronie przed chorobotwórczymi egzogennymi proteazami cysteinowymi, przebudowie kości, rozwoju nowotworu, ochronie przed zmianami neurodegeneracyjnymi [1,2]. W związku z zaangażowaniem proteaz cysteinowych w nowotworową kaskadę proteolityczną, uwaga badaczy skupia się na inhibitorach proteaz cysteinowych jako potencjalnych czynnikach hamujących te patologiczne procesy [9]. Zaburzenia równowagi pomiędzy stężeniami proteaz cysteinowych oraz ich inhibitorami – cystatynami, może indukować proces nowotworowy i powodować jego progresję, włączając wczesne etapy transformacji, mechanizmy inwazji nowotworowej, angiogenezy oraz proces przerzutowania [3,4,5].

### 2. Materiał i metody

#### 2.1. Materiał

Owocystatynę otrzymano z Katedry Biochemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Badane białko miało dwie liofilizowane formy: monomer i dimer. Badaniom zostały poddane następujące ludzkie nowotworowe linie komórkowe: BM (czerniak), A549 (rak płuc), HepG2 (rak wątrobowokomórkowy), MCF-7 i MDA-MB-231 (rak gruczołu piersiowego). Jako kontrolną linię komórkową użyto prawidłową ludzką linię fibroblastów skórnych NHDF. Hodowle komórkowe prowadzono w standardowych warunkach laboratoryjnych (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

#### 2.2. Metody

W celu sprawdzenia cytotoksycznego wpływu owocystatyny na wybrane linie, komórki były traktowane szerokim zakresem jej stężeń. Przeprowadzono 48- i 72h godzinne ekspozycje na badane białko, a następnie wykonywano test MTT. Zbadano także poziom ekspresji białek zaangażowanych w proces apoptozy (metodą DotBlot) oraz badanie nasilenia apoptozy (metodą kolorymetrycznej detekcji apoptozy).

### 3. Wyniki

Analizując otrzymane wyniki zauważono istnienie przeciwnowotworowego wpływu owocystatyny na badane linie, w odniesieniu do monomeru jak i dimeru. Linia NHDF wykazała odmienną wrażliwość na obie formy badanego białka. Wyniki te pozwoliły na wytypowanie do

dalszych badań monomerycznej formy owocystatyny. Badając poziom nasilenia procesu apoptozy w komórkach linii nowotworowej i prawidłowej otrzymano wyniki wskazujące na apoptozę o słabym nasileniu. Rezultaty badania DotBlot nie wykazały wyraźnej różnicy w poziomie ekspresji białek zaangażowanych w proces apoptozy pomiędzy badaną a kontrolną linią.

#### 4. Dyskusja

Niniejsze wyniki badań potwierdzają cytotoksyczny wpływ monomerycznej oraz dimerycznej formy owocystatyny na wybrane linie komórkowe. Badania o podobnym charakterze prowadzone na komórkach linii raka szyjki macicy (HeLa) oraz raka płuc (A375) wykazały zbieżne wnioski [10].

**Źródła finansowania:** W ramach projektu „Innowacyjne technologie produkcji biopreparatów na bazie nowej generacji jaj (OVOCURA)” POIG, Poddziałanie 1.3.1.

#### Piśmiennictwo

- [1] TURK V., STOKA V., TURK D. *Cystatins: biochemical and structural properties, and medical relevance*. Front Biosci., 2008, 13:5406-20.
- [2] BODE W., ENGH R., MUSIL D., THIELE U., HUBER R., KARSHIKOV A., BRZIN J., KOS J., TURK V. *The 2.0 Å X-ray crystal structure of chicken egg white cystatin and its possible mode of interaction with cysteine proteinases*. EMBO J 7, 1988, 2593–2599.
- [3] FRIEDRICH B., JUNG K., LEIN M., TÜRK I., RUDOLPH B., HAMPEL G., SCHNORR D., LOENING S.A. *Cathepsins B, H, L and cysteine protease inhibitors in malignant prostate cell lines, primary cultured prostatic cells and prostatic tissue*. Eur J Cancer., 1999, 35(1):138–44.
- [4] EBERT E., WERLE B., JÜLKE B., KOPITAR-JERALA N., KOS J., LAH T., ABRAHAMSON M., SPIESS E., EBERT W. *Expression of cysteine protease inhibitors stefin A, stefin B, and cystatin C in human lung tumor tissue*. Adv Exp Med Biol, 1997, 421:259–65.
- [5] COULIBALY S., SCHWIHLA H., ABRAHAMSON M., ALBINI A., CERNI C., CLARK J.L., NG KM, KATUNUMA N., SCHLAPPACK O., GLÖSSL J., MACH L. *Modulation of invasive properties of murine squamous carcinoma cells by heterologous expression of cathepsin B and cystatin C*. Int J Cancer., 1999, 83 (4):526–31
- [6] HUH C.G., HÅKANSSON K., NATHANSON C.M., THORGEIRSSON U.P., JONSSON N., GRUBB A., ABRAHAMSON M., KARLSSON S. *Decreased metastatic spread in mice homozygous for a null allele of the cystatin C protease inhibitor gene*. Mol Pathol., 1999; 52(6):332-40.
- [7] WESIERSKA E., SALEH S., TRZISZKA T., KOPEC W., SIEWINSKI M., KORZEKWA K. *Antimicrobial activity of chicken egg white cystatin*. World J Microbiol Biotechnol, 2005; 21: 59–64.
- [8] KORANT B.D., TOWATORI T., IVANOFF L., PETTEWAY S. JR., BRZIN J., LANARCIC B., TURK V. *Viral therapy: prospects for protease inhibitors*. J Cell Biochem, 1986; 32: 91–95.
- [9] ROL J., KOPITZ C., KIRSCHENHOFER A., SCHMITT M., MAGDOLEN U., KRUGER A., MAGDOLEN *Inhibition of intraperitoneal tumor growth of human ovarian cancer by bi- and trifunctional inhibitors of tumor-associated proteolytic systems*. Biol Chem; 2003; 384: 1097–1102.
- [10] MALICKA-BLASZKIEWICZ M., FILIPCZAK N., GOŁĄB K., JUSZCZYŃSKA K., SEBZDA T., GBUREK J. *Ovocystatin affects actin cytoskeleton organization and induces proapoptotic activity*. Acta Biochim Pol. 2014; 61(4): 753-8.

## Wpływ aktywności metaloproteinazy 3 na funkcję receptorów NMDA, napływ jonów wapnia i poziom białka wczesnej odpowiedzi komórkowej c-Fos w hipokampie myszy

PATRYCJA BRZDAK<sup>1,2</sup>, JERZY MOZRZYMAS<sup>1,2</sup>, TOMASZ WÓJTOWICZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich, Samodzielna Pracownia Biofizyki Układu Nerwowego, ul. T. Chałubińskiego 3, 50-368 Wrocław

<sup>2</sup> Uniwersytet Wrocławski, Zakład Fizjologii Molekularnej Zwierząt, ul. W. Cybulskiego 30, 50-205 Wrocław, patrycja.brzdak@uni.wroc.pl

**Słowa kluczowe:** metaloproteinazy, receptory NMDA, hipokamp, c-Fos

### 1. Wstęp

Metaloproteinazy (MMP) odgrywają kluczową rolę w plastyczności synaptycznej, uczeniu się i pamięci [1]. W ośrodkowym układzie nerwowym ta grupa zależnych od cynku ( $Zn^{2+}$ ) proteaz uczestniczy w przebudowie środowiska zewnątrzkomórkowego i wspiera plastyczność synaptyczną poprzez aktywny udział w zmianach funkcjonalnych synaps pobudzających i strukturalnych (kształt, wielkość, ilość synaps). Jednak mechanizm tych zmian nie jest w pełni poznany.

Receptory glutaminianu typu NMDA są kluczowymi neuronalnymi kanałami wapniowymi i uczestniczą w indukcji zjawiska długoterminowego wzmocnienia synaptycznego (ang. LTP). Napływ jonów  $Ca^{2+}$  przez receptory NMDA indukuje kaskadę przemian biochemicznych we wnętrzu neuronu, niezbędnych do krótkotrwałych zmian wydajności synaps. Z kolei procesy następcze m.in. fosforylacja czynników transkrypcyjnych, zmiana ekspresji pewnych genów (m.in. c-Fos) i synteza nowych białek uznawane są za główne molekularne mechanizmy leżące u podstaw konsolidacji LTP i śladów pamięciowych.

Ostatnio wykazano, że MMP-3 dokonuje proteolitycznego cięcia podjednostki NR1 receptora NMDA [2]. Co więcej, iniekcja inhibitora MMP-3 NNGH osłabia uczenie się zwierząt w teście behawioralnym Morrisa [3].

Z tego powodu, mając na uwadze ciągle niepoznany mechanizm wspierania procesów plastyczności synaptycznej przez MMP, w niniejszej pracy badano wpływ aktywności wybranych MMP na funkcję receptorów NMDA, plastyczność synaptyczną i ekspresję białka c-Fos-markera procesów plastyczności w neuronach.

### 2. Materiał i metody

Badania prowadzono w żywych skrawkach mózgowych myszy szczepu C57BL6 lub w pierwotnej neuronalnej hodowli komórkowej jak opisano wcześniej [4]. Transmisję synaptyczną w projekcji Sch-CA1 hipokampa badano w temperaturze 32 °C poprzez drażnienie włókien aferentnych elektrodą bipolarną i pomiar wywoływanych pobudzających potencjałów postsynaptycznych (fEPSPs) elektrodą umieszczoną w obszarze CA1. W badaniach użyto inhibitor metaloproteinazy 3 (NNGH; 10  $\mu$ M) oraz substancje farmakologiczne: bloker receptorów AMPA/kainianowych (DNQX; 20  $\mu$ M), antagonist receptorów NMDA (50-100  $\mu$ M APV). Dodatkowo w badaniach wykorzystano technikę obrazowania wapnia ze znacznikiem Fura-2 (2  $\mu$ M) oraz metodę immunofluorescencji.

### 3. Wyniki

W celu zbadania interakcji MMP-3 i funkcji receptorów NMDA, inkubowano tkankę w roztworze 0mM  $Mg^{2+}$  w obecności blokerów pozostałych receptorów synaptycznych. W obecności NNGH, długotrwałe wzmocnienie sygnałów synaptycznych receptorów NMDA ( $LTP_{NMDA}$ ) wywołane

poprzez stymulację tetaniczną ( $4 \times 100\text{Hz}$ ) w apikalnych dendrytach neuronów regionu CA1 było istotnie upośledzone (CTR:  $144,7 \pm 16\%$  vs NNGH:  $74,2 \pm 2,9\%$  sygnału bazowego fEPSP<sub>NMDA</sub>,  $n=6$ ,  $p < 0,05$ ). W przypadku dendrytów bazalnych inhibicja aktywności MMP-3 nie miała żadnego wpływu na ekspresję LTP<sub>NMDA</sub> (CTR:  $124,5 \pm 15\%$  vs NNGH  $123,7 \pm 13\%$ ,  $n=6$ ,  $p < 0,05$ ). Następnie analizowano neuronalną ekspresję białka c-Fos, indukowaną m.in. napływem jonów  $\text{Ca}^{2+}$ . Stwierdzono istotnie niższy poziom białka c-Fos w tkance stymulowanej i inkubowanej z inhibitorem NNGH względem tak samo stymulowanej tkanki kontrolnej. Dlatego następnie w neuronalnych hodowlach komórkowych analizowano zmiany stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  wywołane aktywnością receptorów NMDA fluorescencyjnym znacznikiem Fura2AM. Stwierdzono, że NNGH zmniejsza amplitudę fali wapniowej i spowalnia czas jej narastania.

#### 4. Dyskusja

Niniejsze wyniki sugerują, że proteolityczna aktywność MMP-3 wspiera funkcję synaptycznych receptorów NMDA po epizodzie aktywności neuronalnej, regulując postsynaptyczny poziom jonów  $\text{Ca}^{2+}$  oraz białka c-Fos, kluczowego składnika czynnika transkrypcji genów kodujących białka istotne dla plastyczności długoterminowej.

Choć lista substratów MMP-3 zidentyfikowanych *in vitro* jest długa, niewiele wiadomo o roli tego enzymu *in vivo*. Różny wpływ inhibicji MMP-3 na LTP<sub>NMDA</sub> w obszarze dendrytów bazalnych i apikalnych może wskazywać na fakt iż to skład molekularny synapsy prawdopodobnie determinuje czy procesy w niej zachodzące wymagają aktywności MMP. Synapsy dendrytów bazalnych i apikalnych mają odmienny garnitur białek synaptycznych, np.: poziom ekspresji integryny  $\alpha 5$  czy receptora mózgowego czynnika wzrostu TrkB. A zatem niniejsze badania wskazują drogę do identyfikacji synaptycznych substratów MMP-3 *in vivo*.

W ostatnich latach wskazano na kluczową rolę aktywności metaloproteinaz jako czynników zaangażowanych w patomechanizm. Na przykład, MMP-3 degraduje  $\alpha$ -synukleinę, białko które odgrywa znaczącą rolę w etiopatogenezie choroby Parkinsona. Ponadto inhibitory MMP-9 stosuje się w terapiach ludzi cierpiących na chorobę FXS (Zespół łamliwego chromosomu X). Dlatego poznanie substratów, białek efektorowych i złożonego mechanizmu działania MMP *in vivo* jest w centrum dzisiejszych badań neuroplastyczności.

**Źródła finansowania:** Projekt wspiera grant NCN SONATA N0. DEC2014/13/D/NZ4/03045. Patrycja Brzdąk jest stypendystką Projektu „Akademia Rozwoju – kluczem wzmocnienia kadr polskiej gospodarki”, współfinansowanego przez Unię Europejską.

#### Piśmiennictwo

- [1] SONDEREGGER, P. AND K. MATSUMOTO-MIYAI. *Activity-controlled proteolytic cleavage at the synapse*. Trends Neurosci. 37(8): 413-23.
- [2] PAULY, T., ET AL. *Activity-dependent shedding of the NMDA receptor glycine binding site by matrix metalloproteinase 3: a PUTATIVE mechanism of postsynaptic plasticity*. PLoS One, 2008. 3(7): p. e2681.
- [3] MEIGHAN, S.E., ET AL. *Effects of extracellular matrix-degrading proteases matrix metalloproteinases 3 and 9 on spatial learning and synaptic plasticity*. J Neurochem, 2006. 96(5): 1227-41.
- [4] WOJTOWICZ, T. AND MOZRZYMAS J.W. *Matrix metalloprotease activity shapes the magnitude of EPSPs and spike plasticity within the hippocampal CA3 network*. Hippocampus. 24(2): 135-53.

## Zastosowanie techniki druku 3D w medycynie

KAROLINA BURZYŃSKA<sup>1</sup>, ANNA BIELAT<sup>2</sup>, PATRYCJA GRZYBOWSKA<sup>2</sup>, ANGELIKA KOBYŁKO<sup>2</sup>,  
JAROSŁAW FILIPIAK<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Inżynierii Biomedycznej, Mechatroniki i Teorii Mechanizmów, Politechnika Wrocławska,  
ul. Łukasiewicza 7/9, 50-371 Wrocław, karolina.burzynska@pwr.edu.pl

<sup>2</sup>Międzywydziałowe Koło Naukowe Biomechaników, Politechnika Wrocławska

**Słowa kluczowe:** druk 3D, medycyna

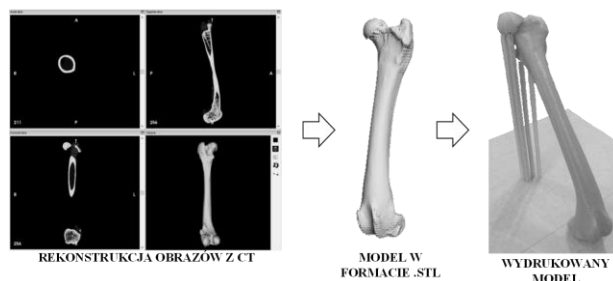
### 1. Wstęp

Technika druku 3D jest jedną z najszybciej rozwijających się technik prototypowania. Pomimo że podstawy techniki druku 3D zostały opracowane w latach 80. XX wieku, dopiero od kilku lat nastąpił jej rozkwit. W zależności od doboru techniki (SLA, FDM, SLS itd.) możliwy jest druk z różnych materiałów (PLA, ABS, Laybrick, Laywood, metal, żywica, papier, czekolada, beton, itd.) w różnorodnej postaci początkowej (ciecze, materiały stałe lite, materiały stałe sproszkowane). W literaturze znajdujemy szeroki zakres zastosowań druku 3D począwszy od wytwarzania modeli, makiet, elementów codziennego użytku, poprzez zastosowanie we wzornictwie przemysłowym, świecie mody jak również w budownictwie. Świat medycyny oraz weterynarii zaczął postrzegać metodę druku 3D jako narzędzie wspomagające proces leczenia na etapie planowania operacji, wytwarzania implantów indywidualnie dopasowanych do każdego pacjenta, a także urządzeń peryferyjnych dla osób niepełnosprawnych [1] [2].

### 2. Materiał i metody

#### 2.1. Zastosowanie druku 3d w planowaniu zabiegów weterynaryjnych

Celem pracy było utworzenie modelu 3D na podstawie danych z tomografu komputerowego (CT), a następnie wydrukowanie obiektu metodą FDM. Technika druku 3D FDM (Fused Deposition Modelling) polega na osadzaniu warstwa po warstwie topionego materiału, który dostarczany jest do głowicy drukarki w postaci filamentu z poli(L-laktydu) (PLA). Pierwszym zadaniem było zrekonstruowanie obrazu 3D fragmentu układu kostnego psa większej rasy na podstawie zarejestrowanego badania CT. Wstępny model 3D kości udowej oczyszczono z artefaktów oraz dostosowano do potrzeb druku. Następnie wygenerowano plik zawierający informacje o parametrach wydruku 3D takich jak: wysokość warstwy, grubość ścianek, rodzaj wypełnienia, rodzaj rusztowania wspierającego wydruk. Model został wykorzystany na etapie przygotowania szczegółów operacji korekcji osi kości.



**Ryc. 1.** Proces przygotowania modelu do druku metoda FDM

### 2.2 Zastosowanie druku 3d w konstruowaniu indywidualnie dopasowanych protez

Zadanie polegało na skonstruowaniu urządzenia wspomagającego jazdę na rowerze dziecka z wrodzonym ubytkiem ręki. Zaprojektowano protezę adaptacyjną umożliwiającą jazdę na rowerze w odpowiedniej wyprostowanej pozycji. Zamodelowano kilka koncepcji rozwiązań konstrukcyjnych. Każdy model składał się z kilku części, każda zaprojektowana z myślą o możliwości prostego wydruku konstrukcji. Następnie wygenerowano plik umożliwiający wydruk modeli metodą FDM.



Ryc. 2. Przykładowe rozwiązania konstrukcyjne protezy adaptacyjnej wspomagającej jazdę na rowerze dziecka z wrodzonym ubytkiem ręki

### 3. Wyniki

Opracowany oraz wydrukowany model kości pozyskanej z danego obrazowania medycznego pozwala lekarzom na wcześniejsze przygotowanie się do zabiegów, zaplanowanie poszczególnych nacięć, dokładne przemyślenie wdrażanego systemu stabilizacji. Wspomaganie zabiegów przy pomocy druku 3D podwyższa jakość świadczonych usług medycznych.

Zaprojektowano protezę adaptacyjną, indywidualnie dopasowaną do małego pacjenta z wrodzonym ubytkiem ręki, wspomagającą utrzymanie wyprostowanej postawy ciała w trakcie jazdy na rowerze. Spersonalizowanie poszczególnych protez oraz sprzętu medycznego jest wiodącym kierunkiem rozwoju przemysłu medycznego.

### 4. Dyskusja

Metoda druku 3D pozwala na wytwarzanie gotowych elementów prototypów przy niewielkim budżecie. Głównym argumentem dzięki któremu druk 3D zyskał wielu sympatyków jest możliwość druku skomplikowanych kształtów, które nie są możliwe do wytworzenia nawet przy pomocy nowoczesnych obrabiarek. Druk 3D coraz powszechniej znajduje zastosowanie w zagadnieniach medycznych. Może on pośrednio, a także bezpośrednio wspomagać lekarzy oraz przemysł medyczny.

### Piśmiennictwo

- [1] ŚCIGAŁA K., BĘDZIŃSKI R., FILIPIKA J., CHLEBUS E., DYBAŁA B. *Application of generative technologies in the design of reduced stiffness stems of hip joint endoprosthesis*. Archives of Civil and Mechanical Engineering, 2011, Vol. XI: No. 3
- [2] DUDA P., SŁUŻALEK G., KUBICA M. *Wykorzystanie RP do personalizacji urządzeń peryferyjnych dla osób dysfunkcyjnych*. Mechanik, 2013,02CD: R86.

## **Badanie elektrofizjologiczne serca jako nowa metoda diagnostyczna w rozpoznawaniu zaburzeń przewodzenia wewnątrzsercowego u psów**

**ALICJA CEPIEL<sup>1</sup>, AGNIESZKA NOSZCZYK-NOWAK<sup>1</sup>, ADRIAN JANISZEWSKI<sup>2</sup>, ROBERT PASLAWSKI<sup>3</sup>,  
URSZULA PASLAWSKA<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Katedra Chorób Wewnętrznych z Kliniką Koni Psów i Kotów Wydziału Medycyny Weterynaryjnej  
UP we Wrocławiu, pl. Grunwaldzki 47, 50-366 Wrocław, e-mail autora: alicja.cepiel@up.wroc.pl

<sup>2</sup>Centrum Diagnostyki Eksperymentalnej i Innowacyjnych Technologii Biomedycznych,

<sup>3</sup>Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Zawodowych i Nadciśnienia Tętniczego, Wydział Lekarski,  
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

*Słowa kluczowe: serce, pies, badanie elektrofizjologiczne.*

### **1. Wstęp**

Inwazyjne badanie elektrofizjologiczne (EPS) jest jednym z ważniejszych badań w diagnostyce zaburzeń rytmu serca. Jest ono szczególnie pomocne, gdy badanie za pomocą ambulatoryjnej lub długotrwałej rejestracji EKG jest niewystarczające. EPS jest również nieodzowną procedurą poprzedzającą i kończącą zabieg ablacji. Polega ono na rejestracji wewnątrzsercowych potencjałów elektrycznych podczas rytmu spontanicznego oraz w trakcie stymulacji poszczególnych obszarów serca. W medycynie weterynaryjnej badanie to wciąż nie jest dobrze znane i powszechnie stosowane w celach diagnostycznych. U psów, poza celami doświadczalnymi, EPS przeprowadzany jest najczęściej jako badanie poprzedzające zabieg ablacji prądem o częstotliwości radiowej [1]. Procedury przeprowadzane przed zabiegami ablacji RF są uproszczone i znacznie różnią się między sobą, ponieważ zależą od rodzaju leczonego zaburzenia rytmu. Pełny protokół diagnostyczny EPS, jak również zakres wartości referencyjnych dla badanych parametrów przewodzenia u psów nie zostały dotychczas opublikowane. Celem badania było ustalenie wartości referencyjnych parametrów przewodzenia wewnątrzsercowego w badaniu elektrofizjologicznym u psów.

### **2. Materiał i metody**

Materiał doświadczalny stanowiło 22 psów różnych ras, płci oraz wieku. Były to psy w wieku od 18 miesięcy do 12 lat (średnio 5,2 ±3.3), o masie ciała od 6,7 kg do 31 kg (średnio 16,1 kg ±8,9) oraz różnej płci (15 samic, 7 samców). EPS przeprowadzany był w znieczuleniu, do premedykacji został użyty midazolam w dawce 0,2-0,5 mg/kg i.v, do wprowadzenia w sen podstawowy - propofol w dawce 6-8 mg/kg i.v oraz w celu indukcji i podtrzymania znieczulenia ogólnego izofluran 1,5-2 Vol% wziewnie. Badanie elektrofizjologiczne przeprowadzono na systemie LABSYSTEM PRO firmy BARD Electrophysiology, a do badania używano czteropolowych elektrod diagnostycznych: Courmand Curve oraz Josephson Curve firmy BARD Electrophysiology. U wszystkich psów zostały wyznaczone podstawowe parametry przewodzenia wewnątrzsercowego.

Przeprowadzono analizę statystyczną przy pomocy oprogramowania STATISTICA 9.1 PL. Wartości referencyjne dla wymienionych parametrów obliczono jako średnia wartości ±2SD. Dla zmiennych powiązanych zastosowano test kolejności par Wilcoxon, w przypadku zmiennych nie powiązanych zastosowano test dla zmiennych nieparametrycznych U Manna-Whitneya. Poziom istotności statystycznej przyjęto dla p≤0,05.

### **3. Wyniki**

Wyznaczone wartości referencyjne ocenianych parametrów przewodzenia wewnątrzsercowego pokazane są w Tabeli 1. Zaobserwowano również zmiany poszczególnych parametrów zależnie od wieku i masy ciała (tab.2). U 13 (59%) psów stwierdzono obecność przewodzenia wstecznego.

## 3.1. Tabele

**Tab. 1.** Wartości referencyjne parametrów elektrofizjologicznych u psów. Wszystkie wartości podane w milisekundach (ms). SD – odchylenie standardowe

Parametr	Średnia	SD	Minimum	Maksimum
PA	11	3	5	17
AH	58	11	36	80
HV	34	6	22	46
SNRT	585	87	411	759
CSNRT	62	24	14	110
HRA-LA	31	7	17	45
HRA-LA 150	49	13	23	75
LA-HRA 150	51	14	23	79
AV Wenckebach	227	27	173	281
VA Wenckebach	353	53	247	459

PA – czas przewodzenia wewnątrzprzedsionkowego, AH – odstęp między pobudzeniem przedsionkowym a pęczkiem Hisa, HV – odstęp między pęczkiem Hisa a pobudzeniem komorowym, SNRT – czas powrotu rytmu zatokowego, CSNRT – skorygowany czas powrotu rytmu zatokowego, HRA – LA – czas przewodzenia międzyprzedsionkowego, z górnej części prawego przedsionka do lewego przedsionka, HRA – LA 150 – czas przewodzenia międzyprzedsionkowego na rytmie narzuconym 150/min, LA – HRA 150 – czas wstecznego przewodzenia międzyprzedsionkowego na rytmie narzuconym 150/min, od lewego przedsionka ku górnej części prawego przedsionka, AV Wenckebach – moment ustania przewodzenia przedsionkowo-komorowego w stosunku 1:1 VA Wenckebach – moment, ustania przewodzenia komorowo-przedsionkowego w stosunku 1:1

**Tab. 2** Zmiany w średnich wartościach wybranych parametrów elektrofizjologicznych związane z wiekiem oraz masą ciała u psów.

Parametr	Wiek [lata] > 6 Średnia ± SD	Wiek [lata] < 6 Średnia ± SD	Masa ciała [kg] > 20 Średnia ± SD	Masa ciała [kg] < 20 Średnia ± SD
HR [bpm]	114 ± 25	101 ± 24		
CSNRT [ms]	52 ± 17,8	79 ± 24,7		
AH [ms]	55 ± 10,6	62 ± 10,6	55 ± 9,9	63 ± 11,1
HRA-LA [ms]			30 ± 6,5	33 ± 7,9
HRA-LA 150 [ms]			44 ± 9,4	59 ± 13,4
LA-HRA 150 [ms]			46 ± 11	61 ± 12,7

## 4. Dyskusja

Badanie elektrofizjologiczne jest precyzyjne i może dostarczyć więcej informacji na temat funkcji układu przewodzenia serca, a co za tym idzie wykluczyć bądź potwierdzić możliwość wystąpienia arytmii oraz określić dalsze postępowanie. Dzięki ustaleniu protokołu badania oraz wartości referencyjnych parametrów przewodzenia wewnątrzsecowego, EPS jest kolejnym narzędziem diagnostycznym, które możemy wykorzystać, gdy inne nie przynoszą nam jednoznacznych i wystarczających informacji do postawienia diagnozy oraz rozpoczęcia efektywnego leczenia.

**Źródła finansowania:** Działalność statutowa, Dotacja celowa, UP we Wrocławiu

## Piśmiennictwo

- [1] SANTILLI RA, SANTOS LFN, PEREGO M. *Permanent junctional reciprocating tachycardia in a dog*. J. Vet Cardiol 2013, 15: 225-230.

## **Adhezja komórkowa w mysich nowotworach gruczołu mlekowego po terapii owocystatyną**

**LUCJA CWYNAR-ZAJĄC<sup>1</sup>, RENATA BRYKNER-RĘCZKOWSKA<sup>1</sup>, ELŻBIETA GĘBAROWSKA<sup>1</sup>,  
MARZENNA PODHORSKA-OKOŁÓW<sup>1</sup>, PIOTR DZIEGIEL<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, ul. Chałubińskiego 6a, 50-368 Wrocław, e-mail autora: lucja.cwynar-zajac@umed.wroc.pl

**Słowa kluczowe:** owocystatyna, adhezja komórkowa, rak gruczołu mlekowego

### **1. Wstęp**

Adhezja komórek ma zasadnicze znaczenie w prawidłowym przebiegu procesów takich jak wzrost, migracja oraz różnicowanie. Częsteczkami adhezji komórkowej biorą udział w oddziaływaniach komórka-komórka, jak również komórka-składniki macierzy pozakomórkowej. Utrata adhezji komórek przyczynia się m. in. do progresji nowotworu poprzez ich inwazję oraz przerzutowanie [1].

Liczne opublikowane badania wykazały odwrotną korelację pomiędzy stopniem zaawansowania procesu nowotworowego a poziomem cystatyn w komórkach guza. Z tego powodu w pracy badano adhezję komórek w przeszczepionych mysich nowotworach gruczołu mlekowego po zastosowaniu terapii cystatyną wyizolowaną z białka jaja kurzego, tzw. owocystatyną, gdyż inhibitor ten może hamować rozwój nowotworu [2,3].

### **2. Materiał i metody**

#### **2.1. Materiały**

##### **Linie komórkowe**

W badaniach wykorzystano mysie linie raka gruczołu mlekowego 4T1 oraz EMT6.

##### **Zwierzęta doświadczalne**

Badania zostały przeprowadzone z użyciem zwierząt doświadczalnych – myszy szczepu Balb/c.

##### **Owocystatyna**

W doświadczeniach *in vivo* stosowano monomer owocystatyny wyizolowany z białka jaja kurzego, rozpuszczony w soli fizjologicznej.

#### **2.2. Metody**

Zwierzętom podskórnie przeszczepiono komórki raka gruczołu mlekowego 4T1 oraz EMT6. W momencie osiągnięcia przez guzy rozmiaru o średnicy około 1cm, myszom rozpoczęto podawanie dootrzewnowo owocystatynę. Owocystatynę podawano co drugi dzień, w dawkach 2,5-10 mg/kg masy ciała. Po zakończeniu terapii owocystatyną tkanki nowotworowe pobrano i zabezpieczono do badań. Grupę badawczą stanowiły guzy pobrane od myszy otrzymujących badany związek, natomiast grupę kontrolną – myszy nieotrzymujące owocystatynę.

Na uzyskanym materiale przeprowadzono badania immunohistochemiczne (IHC) w celu oceny ekspresji markerów adhezji komórkowej  $\beta$ -kateniny oraz E-kadheryny. Badania IHC wykonano z użyciem Autostainera Link 48 (Dako), natomiast w ocenie reakcji immunohistochemicznych wykorzystano mikroskop świetlny Olympus BX-42.

### 2.3 Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wykonano za pomocą testu Kruskal-Wallisa. Przyjęto wartość istotną statystycznie dla  $p < 0,05$ .

### 3. Wyniki

Przeprowadzone badania wskazują na podwyższoną ekspresję markerów adhezji komórkowej  $\beta$ -kateniny oraz E-kadheryny w guzach nowotworowych myszy, którym podawano dootrzewnowo owocystatynę w zestawieniu z guzami kontrolnymi. Wyniki te dotyczą zarówno guzów przeszczepionych z komórek 4T1 oraz EMT6. Test Kruskal-Wallisa pokazuje istotnie statystycznie podwyższoną ekspresję  $\beta$ -kateniny w guzach EMT6 ( $p=0,026$ ) oraz E-kadheryny w guzach 4T1 ( $p=0,036$ ).

### 4. Dyskusja

Wyniki oceny ekspresji markerów adhezji komórkowej  $\beta$ -kateniny oraz E-kadheryny wskazują, że guzy pochodzące od myszy nieotrzymujących badanego związku charakteryzują się niższą ekspresją markerów adhezji komórkowych. Może być to związane z progresją nowotworu. Z kolei po zastosowaniu terapii owocystatyną guzy nowotworowe wykazują wyższą ekspresję tych białek adhezyjnych, co może świadczyć o działaniu onkostatycznym owocystatyny.

**Źródła finansowania:** Zadanie współfinansowane ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego

### Piśmiennictwo

- [1] TAKATSUGU OKEGAWA, REY-CHEN PONG, YINGMING LI, JER-TSONG HSIEH. *The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy*. Acta Biochimica Polonica; Vol.51 No.2 (2004).
- [2] COX J.L. *Cystatins and cancer*. Front Biosci (Landmark Ed). 2009 Jan 1;14:463-74.
- [3] JONATHAN P. SOKOL AND WILLIAM P. SCHIEMANN *Cystatin C Antagonizes Transforming Growth Factor  $\beta$  Signaling in Normal and Cancer Cells*. Mol Cancer Res March 2004 2; 183

## Wpływ doxorubicyny na mechanikę błon liposomowych techniką fluorescent flicker-noise

DOMINIK DRABIK<sup>1</sup>, MAGDA PRZYBYŁO<sup>2</sup>, MAREK LANGNER<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Katedra Inżynierii Biomedycznej, Politechnika Wrocławska, Wrocław, Polska, dominik.drabik@pwr.edu.pl

<sup>2</sup>Lipid Systems Sp.z.o.o., Wrocław, Polska, magda.przybylo@pwr.edu.pl

<sup>3</sup>Katedra Inżynierii Biomedycznej, Politechnika Wrocławska, Wrocław, Polska, marek.langner@pwr.edu.pl

**Słowa kluczowe:** błony lipidowe, mechanika, flicker-noise, doxorubicyna, DOPC

### 1. Wstęp

Błony biologiczne są niezbędnym składnikiem żywych układów, gdyż umożliwiają homeostacy przedziałów wewnątrz-komórkowych. W skali makroskopowej błona może być traktowana jako nieskończenie cienka powierzchnia opisana makroskopowymi parametrami materiałowymi takimi jak elastyczność, lepkość czy napięcie powierzchniowe. Parametry te są powiązane z mikroskopową strukturą błony, jej składem i stanem termodynamicznym [1]. Zmiana geometrii błony można być wynikiem deformacji elastycznych (zwiększenie powierzchni), odkształceń ścinających i zginających. Odkształcenia zginające są czynnikiem decydującym o kształcie błony i są ilościowo określane przez współczynnik elastyczności (ang. *bending coefficient*), który jest skorelowany z parametrami związanymi z tworzącymi błonę molekułami lipidów (np. giętkości i długości łańcuchów alkilowych czy oddziaływań pomiędzy ich grupami polarnymi). Przykładem nieinwazyjnej techniki pomiaru współczynnika elastyczności jest analiza spontanicznych drgań termicznych, wykorzystująca zależność termicznych fluktuacji od elastyczności błony, zwana *flicker-noise* [2-5]. W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie wpływem obecności białek i innych cząsteczek (np. leków) na mechanikę błon liposomowych [1]. Celem prezentowanych badań jest określenie wpływu amfifilowej Doxorubicyny na mechanikę liposomu zbudowanego z DOPC. Określenie wpływu doxorubicyny na mechanikę błon może dostarczyć informacji o wciąż niejasnym mechanizmie działania tego leku.

### 2. Materiał i metody

#### 2.1. Materiał

DOPC zostało zakupione z Avanti Polar Lipids (USA). Doxorubicyna medac została zakupiona w aptece szpitalnej. Gigantyczne jednowarstwowe pęcherzyki (GUV) zostały przygotowane techniką elektroformacji zgodnie z protokołem Angelovy [6]. 30  $\mu$ l DOPC w chloroformie (1.2 mM) zostało umieszczone w małych ilościach na platynowych elektrodach. Po odparowaniu rozpuszczalnika elektrody zostały zanurzone w roztworze wodnym i wystawione na działanie prądu zmiennego o częstotliwości 1 Hz na 15 godzin w teflonowych komorach (Lipid Systems, Polska). Pomiaru zostały wykonane na mikroskopie konfokalnym LSM 510 (Zeiss, Niemcy) wyposażonym w obiektyw 40 $\times$ /1.2 z wodną immersją i detektory PMT. Zbierano sekwencję tysięcy obrazów o rozdzielczości 300 $\times$ 300 pikseli z czasem zbierania wynoszącym 344 ms. Próbkę była wzbudzana laserem 488 nm (Lasos, Niemcy). Wszystkie obrazy zostały zebrane w temperaturze (22 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C).

#### 2.2. Metody

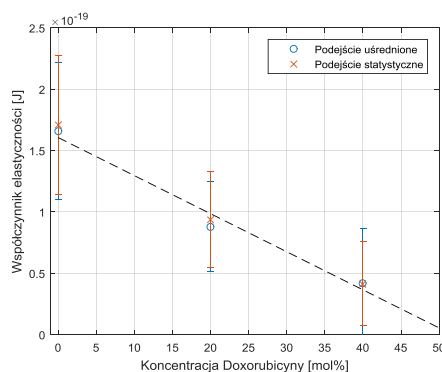
Z obrazów wyodrębniono kontury liposomów we współrzędnych biegunowych. Kontury posłużyły do wyliczenia funkcji autokorelacji (równanie 1), gdzie  $\rho(\varphi, t)$  jest odległością błony od środka pęcherzyka w danej chwili  $t$  przy danym kącie  $\varphi$ . Funkcje te były następnie analizowane podejściem uśrednionym (Average-based) lub podejściem statystycznym.

$$\xi(\gamma, t) = \frac{1}{2\pi^2 R^2} \int_0^{2\pi} [\rho(\varphi + \gamma, t) - \bar{\rho}(t)] \cdot [\rho(\varphi, t) - \bar{\rho}(t)] d\varphi \quad (1)$$

Ideą podejścia uśrednionego jest uzyskanie rozkładu funkcji autokorelacji znormalizowanymi wielomianami Legendre, a następnie wykorzystanie ich amplitud w funkcji modu drgań do wyznaczenia parametru elastyczności [3]. Ideą podejścia statystycznego jest wyznaczenie rozkładu funkcji autokorelacji szeregiem Fouriera, następnie wykreślenie histogramu częstotliwości zależnych od wartości amplitud funkcji trygonometrycznych, dopasowanie trendu dla każdego modu funkcją wykładniczą i wyznaczenie nachylenia funkcji wykładniczych w funkcji modu, które są wykorzystywane do wyznaczenia parametrów mechanicznych błony [4].

### 3. Wyniki

Przeanalizowano 5 pęcherzyków w celu zebranie wstępnej informacji o właściwościach całej populacji. Zbadano wpływ Doksorybiny w ilości 20 i 40 m% na błony DOPC. Wyniki przedstawiono na Ryc. 1.



Ryc. 1. Wpływ doxorubicyny na współczynnik elastyczności dwuwarstwowej lipidowej uformowanej z DOPC

### 4. Dyskusja

Zaobserwowano monotoniczną zależność współczynnika elastyczności od ilości doxorubicyny. Wynik ten pokazuje, że w warunkach *in vitro* zbyt duże stężenie doxorubicyny może doprowadzić do destabilizacji błony pęcherzyka.

**Źródła finansowania:** Praca sponsorowana przez grant Demonstrator+ UOD-DEM-1-027/001.

### Piśmiennictwo

- [1] BOUVRAIS, H., *Bending Rigidities of Lipid Bilayers: Their Determination and Main Inputs in Biophysical Studies*. Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes, ed. A. Iglic. Vol. 15. 2012, Oxford, UK: Elsevier Inc. 2-7.
- [2] HENRIKSEN, J., J.H. IPSEN, *Thermal undulations of quasi-spherical vesicles stabilized by gravity*. Eur Biophys J, 2002. 9: 365-374.
- [3] HENRIKSEN, J., A.C. ROWAT, J.H. IPSEN, *Vesicle fluctuation analysis of the effects of sterols on membrane bending rigidity*. Eur Biophys J, 2004. 33: 732-741.
- [4] MELEARD, P., *et al.*, *Advantages of statistical analysis of giant vesicle flickering for bending elasticity measurements*. Eur Biophys J. E, 2011. 34(116): 1-14.
- [5] BOUVRAIS, H., *et al.*, *Softening of POPC membranes by magainin*. Biophysical Chemistry 2008. 137: 7-12.
- [6] ANGELOVA, M., D.S. DIMITROV, *A mechanism of liposome electroformation*. Progress in Colloid & Polymer Science, 1988. 76: 59-67.

## Zastosowanie nowoczesnych środków pomiaru do oceny prędkości, siły i koordynacji piłkarzy nożnych

ANDRIY DULIBSKYY<sup>1</sup>, BOHDAN KHORKAVYY<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Lwowski Państwowy Uniwersytet Kultury Fizycznej, Ukraina, Lwów, Kościuszki, 11, dulibskyy\_andriy@ukr.net

<sup>2</sup>Lwowski Państwowy Uniwersytet Kultury Fizycznej, Ukraina, Lwów, Kościuszki, 11, khorkavybohdan@ya.ru

*Słowa kluczowe: piłka nożna, prędkość, siła, koordynacja.*

### 1. Wstęp

Dynamiczny rozwój współczesnej piłki nożnej wymaga od zawodników wysokiego poziomu zdolności motorycznych. W piłce nożnej charakterystyczne jest naprzemienne działanie graczy, gdzie gra o wysokiej intensywności przeplata się z niską aktywnością realizowanych założeń gry [1,2]. Podejmowane są próby monitorowania tych działań, a zwłaszcza kontroli przygotowania motorycznego [3].

Przy wysiłku fizycznym, który trwa dziewięćdziesiąt minut, a w wielu przypadkach i dłużej, gracze powinni charakteryzować się wysokim poziomem wydolności organizmu. Ponadto, z powodu szybko zmieniających się sytuacji na boisku, zawodnik musi szybko dostosować swoje działanie do zaistniałych warunków gry. Istnieje, zatem potrzeba monitorowania przygotowania motorycznego zawodników. Zmiana czynności gracza podczas gry następuje, co 3-5 s., i obejmuje: od 30 do 40 sprintów [1], ponad 700 zmian kierunku poruszania się gracza [4] oraz od 30 do 40 wyskoków do góry, co stanowi około 1330 czynności ruchowych, w tym 220 przemieszczeń z dużą prędkością [5, 3].

Od zdolności koordynacyjnych w dużej mierze zależy pomyślne nauczenie się nowych oraz doskonalenie poznanych już umiejętności. Jest rzeczą oczywistą, iż zdolności koordynacyjne decydują o łatwości przyswajania techniki ruchu, a w połączeniu z pozostałymi zdolnościami motorycznymi warunkują wysoki poziom sportowy.

Celem pracy było określenie czynności motorycznych piłkarzy o różnym poziomie mistrzostwa sportowego w czasie gry.

### 2. Materiał i metody

W badaniach wzięli udział juniorzy i zawodnicy młodzieżowych drużyn piłkarskich szkoły mistrzostwa sportowego oraz Akademii Klubu Piłkarskiego Karpaty Lwów. W celu określenia wpływu autorskich programów szkoleniowych na poziom gotowości piłkarzy w powyższych elementach gry, zastosowano następujące testy: bieg 30 metrów, bieg 30 metrów ze zmianą kierunku o 90° na każdych 10 m, skok wzwyż z zamachem rękami i bez zamachu. W badaniach zastosowano system „Microgate” oraz platformę „Kistler”. Wyznaczono następujące parametry: prędkości i przemieszczenia piłkarzy w czasie biegu oraz prędkość i przemieszczenie OSC podczas skoku

### 3. Wyniki

Całkowicie innowacyjny w koncepcji system transmisji radiowej LinkGate jest urządzeniem do bezprzewodowej transmisji sygnałów czasu state-of-the-art. System składa się z encodera (dla transmisji impulsów), który może być podłączony do dowolnej bramy, fotokomórki lub urządzenia i dekodera.

Platforma „Kistler” może być doskonałą pomocą dydaktyczną w procesie przygotowania motorycznego piłkarzy nożnych. Analiza pionowego skoku w górę może być stosowana w ocenie dynamiki odbicia piłkarzy nożnych. Wysokość skoku może być obliczona z czasu lotu i przedsta-

wiona w funkcji czasu. Jednocześnie badanie tych zależności daje informację o siłach działających na ciało, wartości przyspieszeń, prędkości i przemieszczenia organizmu. Testem oceniającym jednocześnie szybkość, moc oraz koordynację, i służącym do mierzenia anaerobowych komponent wydolności fizycznej, jest bieg 30 metrów ze zmianą kierunku o 90° na każdych 10 m. Test ten wysoko koreluje z takimi wskaźnikami mocy jak wyskok pionowy w górę.

#### 4. Dyskusja

Badania wpływu intensywności gry na poziom zdolności motorycznych graczy, na przykładzie małych gier prowadzonych podczas treningu wykazały, iż zmiana formy gry, poprzez postawienie konkretnych celów gry, czy zmiana liczby zawodników ma wpływ na zwiększenie fizjologicznych i fizycznych wymagań w stosunku do gracza. Zauważono również, iż poprawa wydolności fizycznej graczy budowana pod wpływem stosowania w treningu małych gier, miała bezpośredni wpływ na poprawę ich umiejętności technicznych a zwłaszcza na zwiększoną niezawodność wykonywania poszczególnych działań.

#### Wnioski

Nie bez znaczenia, szczególnie dla trenerów, są wyniki tzw. testów boiskowych, w których ocenia się poziom rozwoju specyficznych cech motorycznych, czy specjalnych umiejętności piłkarskich, obrazujących stan umiejętności technicznych zawodnika. Komerccjalizacja tej dyscypliny sportu powoduje jej dynamiczny rozwój, wymuszając polepszenie, jakości gry. Wiąże się to z poprawą wydolności fizycznej, dalszym rozwojem cech motorycznych, umiejętności technicznych i taktycznych. W ślad za tym czynione są poszukiwania metod kontroli przygotowania fizycznego piłkarza. Jest powszechnie wiadomym, że wysoko rozwinięta wydolność fizyczna piłkarza nożnego wpływa na precyzję jego zagrań technicznych oraz zwiększa możliwości taktyczne zespołu, a także obniża ilość kontuzji podczas kariery zawodniczej.

#### Piśmiennictwo

- [1] BANGSBO J. *Physiological Demands of Football*. Sports Science Exchange. 2014; 27(125): 1-6.
- [2] SOROKA A., STULA A. *The locomotor activity of football players based on playing positions during the 2010 World Cup*. Journal of Sports Medicine Physical and Fitness. 2014a; Oct 17. [Epub ahead of print].
- [3] RAMPININI E, IMPELLIZZERI FM, CASTAGNA C, COUTTS AJ, WISLØFF U. *Technical performance during soccer matches of the Italian Serie A league: Effect of fatigue and competitive level*. Journal of Science and Medicine in Sport. 2008; 12(1): 227-233.
- [4] O'DONOGHUE P, BOYD M., LAWLOR J, BLEAKLEY, E. *Time-motion analysis of elite, semi-professional and amateur soccer competition*. Journal of Human Movement Studies. 2001; 41(1): 1-12.
- [5] DI SALVO V, PIGOZZI F, GONZALEZ-HARO C, LAUGHLIN MS, DE WITT JK. *Match performance comparison in top English soccer leagues*. International Journal of Sports and Medicina. 2013. doi:10.1055/s-0032-1327660. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0032-1327660>.
- [6] CASTELLANO J, CASAMICHANA D, DELLAL A. *Influence of game format and number of players on heart rate responses and physical demands in small-sided soccer games*. Journal of Strength and Conditioning Research. 2013; 27(5): 1295–1303. <http://dx.doi.org/10.1519/JSC.0b013e318267a5d1>.

## Haspina i jej rola w komórkach nowotworowych

NATALIA GLATZEL-PLUCIŃSKA<sup>1</sup>, PIOTR DZIEGIEL<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, ul. Chałubińskiego 6a, 50-368 Wrocław, e-mail autora: n.m.glatzel@gmail.com; piotr.dziegiel@umed.wroc.pl

**Słowa kluczowe:** *haspina, mitoza, rak gruczołu piersiowego*

### 1. Wstęp

Haspina to kinaza serynowo-treoninowa, której jedynym znanym substratem jest treonina 3 histonu H3 [1], [2]. Bierze ona udział w segregacji chromosomów podczas podziałów komórkowych, zapewniając równy podział materiału genetycznego do komórek potomnych [1], [3]. Pierwsze doniesienia na temat haspiny pochodzą z roku 1994 [4] – od tego czasu poznano jej strukturę, funkcję i ogólny mechanizm działania, jednak dotyczących jej publikacji jest bardzo niewiele. Kodujący haspinę gen *Gsg2* (ang. *germ-cell specific gene 2*) podlega silnej ekspresji w komórkach jąder, początkowo uważano więc, że haspina jest białkiem charakterystycznym dla komórek haploidalnych [4]. Obecnie wiadomo, że występuje też w proliferujących komórkach diploidalnych, łącznie z nowotworowymi [5].

Nasilenie ekspresji genu *Gsg2* w komórkach nowotworowych nie zostało jeszcze dokładnie zbadane. Z danych eksperymentalnych wynika, że są one wrażliwe na wszelkie zaburzenia poziomu haspiny [2], [6]-[8]. Supresja genu *Gsg2* w komórkach HeLa prowadzi do nieprawidłowości w strukturze wrzeciona podziałowego i formowaniu płytki metafazalnej, a w konsekwencji do zatrzymania mitozy [2]. Doniesienia te pozwalają przypuszczać, że substancje powodujące deregulację poziomu lub aktywności haspiny w komórce mogą mieć działanie antymitotyczne.

Biorąc pod uwagę powyższe fakty oraz niewielką ilość doniesień na temat roli haspiny w chorobach nowotworowych, celem niniejszego projektu było wstępne ustalenie metodyki badań, pozwalających w dalszej perspektywie na analizę poziomu haspiny w różnych liniach komórek nowotworowych oraz ocenianie skutków jej inhibicji.

### 2. Materiał i metody

Badania przeprowadzone zostały na pięciu liniach komórek raka gruczołu piersiowego o różnym stopniu agresywności: MCF7, T47D, SKBR3, MDA-MB-231 i BO2. Jako kontrola została użyta linia prawidłowych komórek gruczołu piersiowego (hTERT-HME1).

Poziom haspiny w lizatach pochodzących z wymienionych wyżej linii komórkowych został oznaczony metodą Western Blot, natomiast poziom ekspresji genu *Gsg2* – metodą Real Time PCR.

### 3. Wyniki

Wyniki uzyskane metodą Western Blot potwierdzają lokalizację jądrową badanego białka – haspina jest obecna w lizatach pochodzących z frakcji jądrowych, brak jest jej natomiast w lizatach pochodzących z frakcji cytoplazmatycznych. Zarówno poziom haspiny, jak i ekspresja genu *Gsg2* w komórkach badanych linii są zróżnicowane.

### 4. Dyskusja

Aby ocenić znaczenie zróżnicowania poziomu haspiny i ekspresji genu *Gsg2* w badanych liniach komórkowych, konieczne jest przeprowadzenie dalszych eksperymentów.

### Piśmiennictwo

- [1] DAI J., HIGGINS J. M. G. *Haspin: a mitotic histone kinase required for metaphase chromosome alignment*. Cell Cycle, 2005, 5:665-668.
- [2] DAI J., SULTAN S., TAYLOR S. S., HIGGINS J. M. G. *The kinase haspin is required for mitotic histone H3 Thr 3 phosphorylation and normal metaphase chromosome alignment*. Genes Dev., 2005, 4:472-488.
- [3] WANG F., DAI J., DAUM J. R., NIEDZIAŁKOWSKA E., BANERJEE B., STUKENBERG P. T., GORBSKY G. J., HIGGINS J. M. G. *Histone H3 Thr-3 phosphorylation by Haspin positions Aurora B at centromeres in mitosis*. Science, 2010, 6001:231-235.
- [4] TANAKA H., YOSHIMURA Y., NISHINA Y., NOZAKI M., NOJIMA H., NISHIMUNE Y. *Isolation and characterization of cDNA clones specifically expressed in testicular germ cells*. FEBS Lett., 1994, 1:4-10.
- [5] HIGGINS J. M. G. *The Haspin gene: location in an intron of the Integrin  $\alpha E$  gene, associated transcription of an Integrin  $\alpha E$ -derived RNA and expression in diploid as well as haploid cells*. Gene, 2001, 1:55-69.
- [6] HUERTAS D., SOLER M., MORETO J., VILLANUEVA A., MARTINEZ A., VIDAL A., CHARLTON M., MOFFAT D., PATEL S., MCDERMOTT J., OWEN J., BROTHERTON D., KRIGE D., CUTHILL S., ESTELLER M. *Antitumor activity of a small-molecule inhibitor of the histone kinase Haspin*. Oncogene, 2012, 11:1408-1418.
- [7] WANG F., ULYANOVA N. P., DAUM J. R., PATNAIK D., KATENEVA A. V., GORBSKY G. J., HIGGINS J. M. G. *Haspin inhibitors reveal centromeric functions of Aurora B in chromosome segregation*. J. Cell Biol., 2012, 2:251-268.
- [8] DE ANTONI A., MAFFINI S., KNAPP S., MUSACCHIO A., SANTAGUIDA S. *A small-molecule inhibitor of Haspin alters the kinetochore functions of Aurora B*. J. Cell Biol., 2012, 2:269-284.

## Wpływ jonów metali ciężkich na przepuszczalność dwuwarstwy lipidowej

DARIA GŁOGOCKA<sup>1</sup>, MAGDALENA PRZYBYŁO<sup>1</sup>, MAREK LANGNER<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Inżynierii Biomedycznej, Politechnika Wrocławska, Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-377 Wrocław, [daria.glogocka@pwr.edu.pl](mailto:daria.glogocka@pwr.edu.pl)

**Słowa kluczowe:** przepuszczalność dwuwarstwy lipidowej, stopped-flow, metale ciężkie

### 1. Wstęp

Stosowane w medycynie metalowe implanty mogą stanowić źródło lokalnej i systemowej toksyczności dla organizmu człowieka. Mechanizm działania uwalnianych podczas zużycia chemicznego jonów metali ciężkich na różnego rodzaju struktury biologiczne nadal nie został do końca zbadany. Błona komórkowa i dwuwarstwa lipidowa, jako jej główny składnik, są barierą chroniącą komórkę przed wnikaniem jonów metali ciężkich do ich wnętrza. Brak możliwości penetracji dwuwarstwy lipidowej przez jony nie wyklucza ich specyficznego oddziaływania z nią. W celu określenia wpływu jonów metali ciężkich na transport wody przez dwuwarstwę lipidową przeprowadzono serię eksperymentów opartych o metodę wykorzystującą technikę zatrzymanego przepływu (ang. *stopped-flow*) [1].

### 2. Materiał i metody

#### 2.1. Materiał

W eksperymentach jako model dwuwarstwy lipidowej wykorzystano jednowarstwowe liposomy. Próbkę przygotowano w taki sposób, aby sole chromu, kobaltu i żelaza znajdowały się zarówno wewnątrz jak i na zewnątrz liposomów. Czynnikiem wywołującym gradient ciśnienia osmotycznego, i tym samym wpływ wody z wnętrza liposomów, była sacharoza.

#### 2.2. Metody

Technika zatrzymanego przepływu w trybie światła rozproszonego została użyta do wyznaczenia kinetyk procesu wypływu wody z liposomów wywołanego gradientem ciśnienia osmotycznego. Eksperyment polegał na podawaniu do komory mieszającej dwóch rodzajów próbek: zawiesiny liposomów i roztworu sacharozy. W wyniku różnicy stężeń sacharozy po obu stronach dwuwarstwy następował ruch wody z wnętrza liposomów na zewnątrz. Zmiany organizacji dwuwarstwy, spowodowane wpływem wody, powodowały zmianę intensywności światła odbitego od powierzchni liposomów. Kinetyka procesu była rejestrowana i poddana dalszej analizie.

### 3. Wyniki i dyskusja

Bazując na zależności strumienia wody od różnicy ciśnienia osmotycznego wyznaczono współczynnik przepuszczalności dwuwarstwy lipidowej dla poszczególnych jonów:

$$J(t) = \frac{dV(t)}{V_w S dt} = P(C_{in}(t) - C_{out}) \quad (1)$$

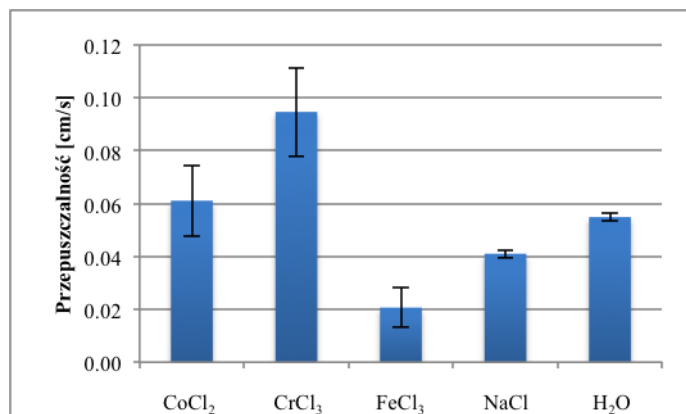
gdzie:

$J(t)$  – strumień wody w chwili  $t$ ,

$V(t)$  – objętości liposomu w chwili  $t$ ,

$P$  – współczynnik przepuszczalności dwuwarstwy lipidowej,

$S$  – pole powierzchni liposomu,  
 $C_{in}$ ,  $C_{out}$  – stężenie solutu wewnątrz i na zewnątrz liposomu.



**Ryc. 1.** Wartości przepuszczalności dwuwarstwy lipidowej w obecności soli różnych metali. Wartości zostały uśrednione dla 5 różnych gradientów sacharozy

Dane literaturowe wskazują na brak wpływu soli z szeregu Hofmeistera (NaBr, NaCr, NaSCN) na przepuszczalność dwuwarstwy lipidowej [1], z kolei uzyskane wyniki wskazują, że sole CrCl<sub>3</sub> oraz FeCl<sub>3</sub> w sposób istotny zwiększają lub zmniejszają przepuszczalność dwuwarstwy lipidowej (Ryc. 1). Może to sugerować specyficzne oddziaływanie jonów metali ciężkich z dwuwarstwą lipidową.

Ze względu na wstępny charakter badań konieczne jest opracowanie modelu, który wyjaśniłby mechanizm oddziaływania metali ciężkich z błoną komórkową. Uzyskane wyniki rzucają nowe światło na temat mechanizmu toksycznego działania metali ciężkich na organizm człowieka.

**Źródła finansowania:** Badania finansowane dzięki Narodowemu Centrum Badań i Rozwoju grant nr WND-DEM-1-027/00.

### Piśmiennictwo

- [1] PRZYBYŁO M., DRABIK D., ŁUKAWSKI M., LANGNER M. *Effect of monovalent anions on water transmembrane transport*. J. Phys. Chem. B, 2014, 118: 11470-11479.

## Wybrane aspekty badań właściwości biomechanicznych roślin

KATARZYNA GRABOWSKA<sup>1</sup>, RAFAŁ MECH<sup>1</sup>, ANNA ZIĘTY<sup>1</sup>, JERZY DETYNA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Mechaniki i Inżynierii Materiałowej, Politechnika Wrocławska, ul. Smoluchowskiego 25, 50-370 Wrocław, e-mail autora: katarzyna.grabowska@pwr.edu.pl

*Słowa kluczowe: rośliny, właściwości mechaniczne*

### 1. Wstęp

Owoce i warzywa są poddawane różnym rodzajom obciążenia statycznego, dynamicznego, a także udarowego podczas takich procesów jak: zbieranie, przeladowywanie, transportowanie oraz niezbędnych zabiegów do otrzymania końcowego wyrobu. Jakość otrzymanego surowca spada, gdy zauważymy na nim uszkodzenia, które są efektem wielokrotnie powtarzających się obciążeń np. ściskających.

Ściana komórkowa, a w szczególności jej właściwości mechaniczne ma znaczący wpływ na funkcjonowanie komórek roślinnych. To dzięki niej komórka jest w stanie zachować właściwy kształt, co wpływa na jej wytrzymałość oraz ochronę. W momencie kiedy podczas badań mechanicznych zostanie zaobserwowane wypłynięcie cieczy na zewnątrz komórki, możemy mówić o uszkodzeniu ściany komórkowej. Taki rodzaj zaobserwowanego zjawiska jest już nieodwracalny i powoduje uszkodzenie całkowite materiału. Efektem uszkodzenia jest spadek właściwości wytrzymałościowych [1], [2].

Właściwości mechaniczne roślin są zależne zarówno od specyficznych właściwości samych tkanek (stan błon komórkowych i ścian komórkowych, zawartość wody itp.), jak i od rodzaju zewnętrznego obciążania. Właściwości te zmieniają się wraz z etapem rozwoju rośliny. Jak również zależą od zastosowanego gatunku, oraz odmiany rośliny. Właściwości mechaniczne są różne dla poszczególnych części roślin, tzn. zmieniają się wraz z wysokością np. łodygi [3].

### 2. Główny cel badania właściwości mechanicznych roślin

Badania właściwości mechanicznych u roślin mają duże znaczenie. Jednym z nich jest znaczenie praktyczne, które umożliwia ocenę stopnia odporności surowca rolniczego na uszkodzenia związane z wielokrotnym obciążaniem. Wykorzystanie niniejszych badań może również pomóc w ocenie jakości surowca. Poznanie właściwości mechanicznych roślin uprawnych może także usprawnić prace hodowlane (podczas doboru parametrów pracy elementów i zespołów roboczych), a także pomóc w projektowaniu nowoczesnych maszyn. Czego efektem będzie minimalizacja strat podczas zbioru, a także przerobu, na skutek optymalizacji zbioru, składowania, a także przeróbki samego surowca [1], [4]. Istnieją doniesienia w literaturze, również na temat badania zależności energochłonności zgniatania ziarna, od jego wilgotności i temperatury. Takie zastosowanie pozwala na porównaniu wpływu różnych czynników np. procesu suszenia na właściwości mechaniczne poszczególnych części nasion [1].

### 3. Istniejące zastosowania badań właściwości mechanicznych roślin

#### 3.1. Wielokrotne obciążanie, a naciski powierzchniowe

Stopa i in. w swojej pracy sprawdzali zmiany wartości nacisków powierzchni w próbie ściskania korzenia marchwi przy zastosowaniu różnych obciążeń maksymalnych, prędkości wymuszenia obciążenia, a także średnic próbek. Następnie porównywali wyniki z wartościami teoretycznymi obliczonymi w oparciu o wzory Hertz'a. Do badań wykorzystano maszynę wytrzymałościową Instron 5566 z głowicą tensometryczną o zakresie pomiarowym do 1 kN podłączoną do komputera.

Na podstawie uzyskanych wyników zaobserwowano wpływ zarówno siły promieniowej, prędkości wymuszenia obciążenia, jak i średnicy próbek na uzyskaną wartość nacisków powierzchniowych podczas trwania kolejnych cykli obciążenia. Dowiedziono również, iż badania teoretyczne dwukrotnie zawyżyły wartość nacisku w porównaniu z badaniami eksperymentalnymi [5].

### 3.2. Energochłonność zgniatania

Romański i inni w swoich badaniach zbadali wpływ temperatury oraz wilgotności ziarniaków pszenicy na energochłonność zgniatania. Proces zgniatania wykonano na maszynie wytrzymałościowej Instron 5566. W eksperymencie zastosowano różne temperatury oraz poziomy wilgotności ziarniaków.

Na podstawie uzyskanych wyników odnotowano wpływ zmiany wilgotności na energochłonność procesu. A także wpływ temperatury na uzyskane wyniki. Wykazano, iż wykonywanie prac, przy których może dochodzić do uszkodzenia ziarna należy przeprowadzać w niskich temperaturach [1].

### 3.3. Czas przechowywania

Duber-Skvarska oraz Górka w swoich badaniach przedstawiły wpływ czasu przechowywania na właściwości mechaniczne ziemniaków. Do badań właściwości mechanicznych wykorzystano młot wahadłowy z wymiennymi końcówkami, który służył badaniom uszkodzeń płodów rolnych. Charakter niniejszych badań przypomina rzeczywiste warunki podczas krojenia, czy też transportowania.

Zaobserwowano zjawisko łamania próbek przygotowanych z bulw twardych, kiedy były jędrne (pierwsze dni przechowywania). Odształcenia z naderwaniami miały miejsce u próbek zwiędłych (niski turgor; ostatnie dni przechowywania). Na podstawie otrzymanych wyników dobrze widoczna jest zależność pomiędzy odpornością na zginanie i ścinanie ziemniaków, a czasem przechowywania [6].

## 4. Podsumowanie

Dzięki przeprowadzonym badaniom przez wielu naukowców udowodniono, że badanie właściwości mechanicznych tkanek roślinnych nie tylko jest możliwe ale przede wszystkim jest potrzebne. Właśnie te badania w znacznym stopniu przyczyniają się do poprawy jakości produktów spożywczych, ich bezpiecznego przetwarzania i przechowywania. Ostatnimi laty coraz więcej możliwości zastosowania badań mechanicznych roślin zostało przedstawionych w publikacjach naukowych. Istotny jest tutaj potencjał na nowe zastosowania metod biomechanicznych.

## Piśmiennictwo

- [1] ROMAŃSKI L., STOPA R., NIEMIEC A. I WIERCIOCH M., *Wpływ wilgotności i temperatury ziarniaków pszenicy na energochłonność zgniatania*, Inżynieria Rol., 2006, 4: 147-152.
- [2] NOWAKOWSKI T., *Właściwości fizyczne materiału roślinnego*, Technologie zbioru roślin energetycznych, 2010: 25-76.
- [3] CHATTOPADHYAY P. S. I PANDEY K. P., *Mechanical Properties of Sorghum Stalk in relation to Quasi-static Deformation*, J. Agric. Eng. Res., 1999, 73: 199-206.
- [4] GORZELANY J. AND PUCHALSKI C., *Próba zastosowania metody nieniszczącej do badań własności mechanicznych korzeni buraków cukrowych*, Acta Agrophysica, 2003, 2(1): 61-71.
- [5] STOPA R., STĘPIEŃ B., KOMARNICKI P. I PORCZYK M., *Wpływ wielokrotnego obciążania korzenia marchwi na wartość nacisków powierzchniowych*, Inżynieria Rol., 2012, 2(136): 315-324.
- [6] DUBER-SKVARSKA O. I GÓRKA E., *Stanowisko do badania uszkodzeń mechanicznych roślin korzeniowych i okopowych*, Acta Sci. Pol., 2012, 11(3-4): 3-12.

## Wpływ past wybielających na ścieralność szkliwa ludzkich zębów

ALEKSANDRA GULAR<sup>1</sup>, KATARZYNA ARKUSZ<sup>1</sup>, ELŻBIETA KRASICKA-CYDZIK<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Uniwersytet Zielonogórski, ul. Licealna 9 65-417 Zielona Góra, olcia.137@onet.eu,  
K.Arkusz@ibem.uz.zgora.pl, E.Krasicka@ibem.uz.zgora.pl

**Słowa kluczowe:** pasty wybielające, ścieralność szkliwa ludzkich zębów, elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna (EIS)

### 1. Wstęp

Celem pracy jest określenie wpływu past wybielających na ścieralność szkliwa ludzkich zębów oraz składu past wybielających na proces niszczenia tkanki zębowej. Problematyka środków wybielających szkliwo zębów została podjęta w licznych badaniach naukowych [...], były one przeprowadzane z wykorzystaniem różnych substancji i preparatów do wybielania, jednak nie były to pasty wybielające dostępne powszechnie na rynku. Nigdy nie odwzorowywano również samego procesu szczotkowania, ząb był jedynie zanurzany w badanym preparacie. Dzięki zastosowanej metodzie, czyli mechanicznemu szczotkowaniu w pracy opisano również jego wpływ na ścieralność szkliwa ludzkich zębów.

### 2. Materiał i metody

#### *Próbki poddane badaniu*

Zęby użyte do badania to ludzkie trzonowce, usunięte u pacjentów ortodontycznych, bez widocznych zmian próchnicznych. Zęby zostały oczyszczone z substancji biologicznych oraz przemyte alkoholem etylowym. Do czasu przeprowadzenia badań zęby przechowywane były w roztworze sztucznej śliny. W pracy zbadano wpływ dwóch rodzajów past wybielających, różniących się stężeniem fluorków, obecnością środków przeciwciernych i ekstraktów biologicznych, a ponadto wpływ mechanicznego szczotkowania na stan szkliwa zębowego.

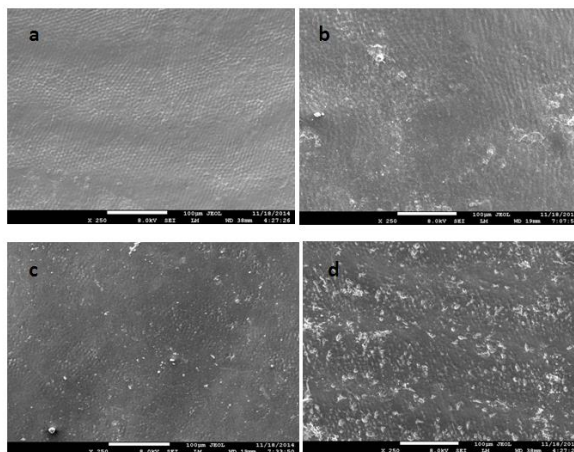
#### *Ocena ścieralności szkliwa*

Do oceny stanu powierzchni szkliwa zębowego poddanego szczotkowaniu z użyciem past wybielających wybrano metody elektrochemiczne - pomiar potencjału stacjonarnego oraz charakterystykę impedancyjną, a także badania mikroskopowe przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego.

### 3. Wyniki

Na podstawie uzyskanych zdjęć mikroskopowych zaobserwowano znaczący wpływ działania past wybielających na powierzchnię szkliwa ludzkich zębów.

Na powierzchni zęba (Ryc.1a) widoczna jest obecność równoległe przebiegających pryzmatów. Dodatkowo nie zaobserwowano żadnych zmian próchnicznych czy uszkodzeń mechanicznych, które miałyby wpływ na wyniki dalszych badań. Po 60-dniowym szczotkowaniu zębów przy użyciu szczoteczki elektrycznej (Ryc.1b) zaobserwowano niewielkie naruszenie warstwy szkliwa, którego struktura jest bardziej chropowata oraz częściowo zostały starte pryzmaty. Uszkodzenia te są jednak regenerowane w skutek przebiegającego w jamie ustnej procesu remineralizacji. Użycie pasty 1 zawierającej środki niwelujące ścieralność (Ryc.1c) zmniejszyło degradacyjne działanie procesu szczotkowania. Struktura szkliwa poddanego szczotkowaniu z użyciem pasty 2 (Ryc.1d) znacząco różni się od opisanych powyżej warstw. Występują w niej liczne, duże wżery i uszkodzenia.



**Ryc. 1.** Analiza mikroskopowa powierzchni szkliwa ludzkich zębów (pow.  $\times 250$ ) a) przed szczotkowaniem b) po szczotkowaniu c) po szczotkowaniu z użyciem pasty 1 d) po szczotkowaniu z użyciem pasty 2

Wyniki analizy mikroskopowej potwierdzone zostały również w analizie impedancyjnej, na podstawie której określono przebieg zmian kąta fazowego w zależności od czasu szczotkowania. Początkowo obserwowany spadek kąta fazowego świadczy o zmniejszeniu się porowatości powierzchni, czyli wyjściowo zostaje starta warstwa aglomeratów białkowych odsłaniając szkliwo i je polerując, a następnie porowatość warstwy wzrasta co świadczy o rysach i mikrouszkodzeniach szkliwa. Podczas szczotkowania z użyciem pasty 2 wartość kąta fazowego od razu wzrasta, czyli szybko następuje odsłonięcie szkliwa - już po 1 dniu. Gwałtowne obniżenie wartości kąta fazowego w 7. dniu świadczy o uszkodzeniu szkliwa, a dalszy wzrost tej wartości świadczy o przebicciu się wżerów aż do kolejnej warstwy zęba - zębiny. Najprawdopodobniej następuje to już po 7 dniach szczotkowania.

#### 4. Dyskusja

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że zarówno szczotkowanie, jak i stosowanie past wybielających ma wpływ na stan szkliwa ludzkich zębów.

Używanie szczoteczki powoduje ścieranie pryzmatów budujących szkliwo, wygładzając ich powierzchnię, jednak nie uszkadza ono tkanek zęba. Zniszczenia te zostają regenerowane w procesie remineralizacji, naturalnie występującym w jamie ustnej.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono że najbardziej degradujący wpływ na szkliwo ludzkich zębów posiadają fluorki.

#### Piśmiennictwo

- [1] YOUJIN CHEONG, SAMJIN CHOI, SO JUNG KIM, HUN-KUK PARK. *Nanostructural effect of acid-etching and fluoride application on human primary and permanent tooth enamels*, Materials Science & Engineering C 32, 2012, 1127-1132.
- [2] PENTA V., PIRVU C., DEMETRESCU I. *Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) Investigation on Dental Hard Tissue Whitening Process Using Fluoride and Non-Fluoride Carbamide Peroxide Gels*, APCBEE Procedia 7, 2013, 67-72.
- [3] YING-MIN LIAO, ZU-DE FENG, ZUO-LIANG CHEN, *In situ tracing the process of human enamel demineralization by electrochemical impedance spectroscopy (EIS)*, Journal of dentistry 35, 2007, 425-430.
- [4] JIANG Y., SPEARS I.R., MACHO G.A. *An investigation into fractured surfaces of enamel of modern human teeth: a combined SEM and computer visualisation study*, Archives of Oral Biology 48, 2003, 444-457.
- [5] KASIAK M., KASIAK M. *Pasty do zębów- skład i działanie*, Farm.Pol. T.65 nr 9, 2009, 665-672.

## Ultrastrukturalne zmiany patologiczne w narządach podczas operacji kardiologicznych z użyciem krążenia pozaustrojowego oraz z prewencyjnym wykorzystaniem promieniowania z zakresu bliskiej podczerwieni

KATARZYNA HACZKIEWICZ<sup>1</sup>, ANNA DROHOMIRECKA<sup>2,3</sup>, TOMASZ WALSKI<sup>3,4</sup>, ALBERT CZERSKI<sup>3,5</sup>,  
MAŁGORZATA KOMOROWSKA<sup>3,4</sup>, PIOTR DZIĘGIEL<sup>1,3</sup>, MARZENA PODHORSKA-OKOŁÓW<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, ul. Chałubińskiego 6a, 50-368 Wrocław, katarzyna.haczkiwicz@umed.wroc.pl

<sup>2</sup>Instytut Kardiologii, ul. Alpejska 42, 04-628 Warszawa

<sup>3</sup>Wojewódzki Szpital Specjalistyczny we Wrocławiu, Ośrodek Badawczo-Rozwojowy, ul. Kamińskiego 73a, 51-124 Wrocław

<sup>4</sup>Katedra Inżynierii Biomedycznej, Politechnika Wrocławska, Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław

<sup>5</sup>Katedra Biostruktury i Fizjologii Zwierząt, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław

**Słowa kluczowe:** krążenie pozaustrojowe, promieniowanie NIR, zmiany ultrastrukturalne

### 1. Wstęp

Operacje kardiologiczne z użyciem krążenia pozaustrojowego (z ang. *CardioPulmonary Bypass*, CPB) wiążą się z odpowiedzią zapalną organizmu, spowodowaną kontaktem krwi z powierzchnią niefizjologiczną (ryzyko zdarzenia zakrzepowo-zatorowego) oraz uszkodzeniem niedokrwiennie-reperfuzyjnym, które często prowadzi do dysfunkcji narządów [1]. W niniejszych badaniach przeprowadziliśmy na poziomie ultrastrukturalnym analizę zmian patologicznych w głównych organach w następstwie CPB na modelu świni domowej. Celem prewencji ww. procesów, zastosowaliśmy promieniowanie z zakresu bliskiej podczerwieni (z ang. *Near Infrared*, NIR). NIR zwiększa integralność błony komórkowej erytrocytów, hamuje reakcje zapalne, ma właściwości wazodylatacyjne, a także redukuje obrzęk tkanek [2].

### 2. Materiał i metody

Świnie zostały podzielone na dwie grupy: kontrolną oraz z naświetlaniem krwi przy użyciu NIR w krążeniu pozaustrojowym (po 12 osobników każda). Zwierzęta były znieczulane ogólnie (intubowane, podłączone do respiratora) i kaniulowane (naczynia szyjne). Oksygenator zapewniał prawidłowe utlenowanie krwi, respirator pełnił funkcję pomocniczą. Po 24 h od zakończenia zabiegu zwierzęta poddano eutanazji (przez ten czas były pod wpływem leków sedatywnych). W grupie naświetlanej, podczas krążenia pozaustrojowego, przepływająca przez oksygenator krew była poddana ekspozycji na działanie promieniowania NIR z zakresu długości fal 780 ÷ 1100 nm i dawce pochłoniętej 1,65 J/cm<sup>3</sup> krwi. Zastosowano standardową procedurę podwójnego utrwalania i zatopienia materiału do badań w transmisyjnym mikroskopie elektronowym (TEM).

### 3. Wyniki

W obydwu grupach zwierząt obserwowano cechy obrzęku oraz degeneracji pneumocytów I i II typu, kardiomiocytów, a także komórek śródbłonna naczyń włosowatych w płucach, w wątrobie, w nerce oraz w mięśniu sercowym. W świetle naczyń włosowatych występowały liczne erytrocyty świadczące o przekrwieniu, neutrofile, trombocyty, zwakuolizowane komórki i ciała apoptotyczne. Płyn obrzękowy obserwowany był w świetle pęcherzyków płucnych, w tkance śródmiąższowej płuc

oraz w przestrzeni moczowej. Dla wątroby charakterystyczne było drobnokropelkowe stłuszczenie hepatocytów. Przykłady patologicznych zmian zostały zamieszczone w tabeli 1.

**Tab. 1.** Analiza porównawcza zmian patologicznych w narządach w TEM w dwóch grupach świń

		Grupa kontrolna	Grupa NIR
	<b>PLUCO</b>		
Światło naczyń włosowatych bariery powietrze-krew	napływ neutrofilii, monocytów, płytek krwi, limfocytów	7/12	7/12
	zastój erytrocytów	7/12	5/12
	zdegenerowane fragmenty komórek	5/12	6/12
Komórki śródblonka	obrzęk	8/12	5/12
Tkanka śródmiąższowa płuc	obrzęk śródmiąższowy płuc	3/12	3/12
Pneumocyty I i II typu	zmiany degeneracyjne	5/12	6/12
Światło pęcherzyków płucnych	wysiłek osocza	2/12	5/12
	zdegenerowane fragmenty komórek	2/12	6/12
	<b>WĄTROBA</b>		
Światło sinusoidy	napływ neutrofilii, płytek krwi	6/12	6/12
	zastój erytrocytów	7/12	7/12
	zdegenerowane fragmenty komórek	8/12	4/12
Ultrastruktura hepatocytów	drobnokropelkowe stłuszczenie	8/12	7/12
	<b>NERKA</b>		
Światło naczyń włosowatych bariery filtracyjnej	napływ neutrofilii, płytek krwi, limfocytów	4/12	4/12
	zastój erytrocytów	3/12	5/12
	zdegenerowane fragmenty komórek	4/12	5/12
Komórki śródblonka	obrzęk	6/12	2/12
Podocyty	hipertrofia podocytów trzewnych	3/12	1/12
	nekroza podocytów ściennych	2/12	3/12
	<b>MIĘSIEŃ SERCOWY</b>		
Światło naczyń włosowatych	zastój erytrocytów	7/12	7/12
Ultrastruktura kardiomiocytów	zmiany nekrotyczne	9/12	6/12
	obrzęk mitochondriów	5/12	2/12

#### 4. Dyskusja

Ultrastrukturalnym wykładnikiem wzrostu ilości wewnątrzkomórkowego płynu w konsekwencji uszkodzenia niedokrwiennie-reperfuzyjnego są zmiany zapalne i degeneracyjne tkanek, pokazane w niniejszych badaniach oraz w pracach innych autorów [1, 3]. Istniały różnice w stopniu nasilenia tych zmian w obydwu analizowanych grupach. Obrzęk komórek śródblonka płuc oraz degeneracje kardiomiocytów odnosiły się do większej liczby świń kontrolnych. Natomiast zdegenerowane fragmenty komórek, wynaczynione erytrocyty oraz wysiłek w świetle pęcherzyków płucnych były charakterystyczne dla zwierząt z grupy naświetlanej NIR.

**Źródła finansowania:** Publikacja jest częścią projektu „Wrovasc-Zintegrowane Centrum Medycyny Sercowo-Naczyniowej”, współfinansowanego przez Europejski Fundusz Rozwoju Regionalnego, realizowanego w Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym we Wrocławiu.

#### Piśmiennictwo

- [1] TSAKIRIDIS K., ZAROGOLIDIS P., VRETZKAKIS G., MIKROULIS D., MPAKAS A., KESISIS G., ARIKAS S., KOLETTAS A., MOSCHOS G. et al. *Effect of lornoxicam in lung inflammatory response syndrome after operations for cardiac surgery with cardiopulmonary bypass*. J Thorac. 2014,6:7-20.
- [2] KOMOROWSKA M., CUISSOT A., CZARNOLESKI A., BIALAS W. *Erythrocyte response to near-infrared radiation*. J Photochem Photobiol B, 2002,68:93-100.
- [3] WASOWICZ M., SOBCZYŃSKI P., BICZYŃSKO W., SZULC R. *Ultrastructural changes in the lung alveoli after cardiac surgical operations with the use of cardiopulmonary bypass (CPB)*. Pol J Pathol, 1999,50:189-196.

## Wpływ mutacji $\beta 2E155$ w obrębie miejsca wiążącego agonistę w receptorze GABA<sub>A</sub> na mechanizm działania tego receptora

MAGDALENA JATCZAK<sup>1,2</sup>, MAGDALENA KISIEL<sup>1</sup>, MARTA M. CZYŻEWSKA<sup>1</sup>, MAREK BRODZKI<sup>1,2</sup>,  
JERZY W. MOZRZYMAS<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Uniwersytet Medyczny, ul. T. Chałubińskiego 3, 50-368 Wrocław, magdalena.jatczak@gmail.com

<sup>2</sup>Uniwersytet Wrocławski, Pl. Uniwersytecki 1, 50-137 Wrocław, magdalena.jatczak@gmail.com

**Słowa kluczowe:** receptor GABA<sub>A</sub>, etap preaktywacji,  $\beta 2E155$

### 1. Wstęp

Receptor GABA<sub>A</sub> odgrywa kluczową rolę w transmisji hamującej w mózgu dorosłych ssaków. Receptor ten jest heteropentamerycznym białkiem tworzącym kanał jonowy przepuszczalny dla jonów chlorkowych. Znanych jest 19 rodzajów podjednostek mogących wchodzić w skład receptora, jednak najbardziej powszechnym układem są dwie podjednostki  $\alpha_1$ , dwie  $\beta_2$  i jedna  $\gamma_2$  [1]. Ligandem dla receptora GABA<sub>A</sub> jest kwas  $\gamma$ -aminomasłowy (GABA), którego związanie, znajdujące się na styku podjednostek  $\beta$ - $\alpha$ , wyzwala energię indukującą ruchy aminokwasów znajdujących się w regionie miejsca wiążącego, które następnie są przekazywane w kierunku bramki kanału. Reszta  $\beta 2E155$  znajduje się w miejscu wiążącym GABA i bezpośrednio oddziałuje z tym neurotransmiterem [2]. Przypuszcza się, że  $\beta 2E155$  uczestniczy w inicjowaniu procesu otwarcia kanału [3]. W celu oceny wpływu mutacji tej reszty na mechanizm działania receptora GABA<sub>A</sub>, podstawiliśmy resztę glutaminianu resztą cysteinową. Zbadaliśmy wpływ tej mutacji na prądy makroskopowe płynące przez receptory typu  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$  i  $\alpha_1\beta_2$ .

### 2. Materiał i metody

#### 2.1. Materiał

Badania prowadzono na rekombinowanych receptorach GABA<sub>A</sub> o stechiometrii  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$  oraz  $\alpha_1\beta_2$ , ekspresjonowanych w linii komórkowej HEK293 (Human embryonic kidney cells). Komórki transfekowano przy użyciu metody wytrącania precipitatu DNA z fosforanami wapnia [4] z zachowanym stosunkiem wagowym plazmidów, odpowiednio  $\alpha:\beta:\gamma = 1:1:3$  [ $\mu\text{g}$ ] oraz  $\alpha:\beta = 1:1$  [ $\mu\text{g}$ ] razem z plazmidem kodującym antygen powierzchniowy CD4 (1  $\mu\text{g}$ ). Dzień po transfekcji, komórki przesiewano na szkiełka nakrywkowe pokryte poli-D-lizyną, a kolejnego dnia używano ich do pomiarów elektrofizjologicznych. Pomiaru te wykonano techniką patch-clamp przy ustalonym napięciu. Uzyskanie ultraszybkiej perfuzji było możliwe dzięki zastowaniu kapilary theta-glass osadzonej na piezoelektrycznym translatorze (wymiana roztworu w czasie około 100-200  $\mu\text{s}$ ). Prądy rejestrowano używając wzmacniacza Axopatch 200B (Molecular Devices) w konfiguracji pomiaru z całej komórki (whole-cell) lub łątki błonowej (outside-out). Sygnały filtrowane były przy 10 kHz i próbkowane przy 100kHz przy użyciu karty akwizycyjnej Digidata 1440 (Molecular Devices). Otrzymane dane analizowano przy pomocy oprogramowania Clampfit 10.3 (Molecular Devices). Symulacje przypuszczalnych modeli kinetycznych przeprowadzone zostały na podstawie flipowanego modelu Jones-Westbrook [5] przy pomocy programu Channel Lab (Synaptosoft).

### 3. Wyniki

W celu sprawdzenia wpływu mutacji na poszczególne etapy aktywacji receptora GABA<sub>A</sub>, wykonaliśmy i zanalizowaliśmy serię pomiarów prądów makroskopowych pozwalających wnioskować na temat mechanizmu działania receptora. Mutacja cysteinowa w  $\beta 2E155$  spowodowała

przesunięcie w prawo krzywej dawka-odpowiedź na podanie GABA dla obu typów receptorów ( $EC_{50}=39 \mu\text{M}$  dla  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ , z mutacją  $EC_{50}=44 \text{ mM}$ ,  $EC_{50}=10 \mu\text{M}$  dla  $\alpha_1\beta_2$ , z mutacją  $EC_{50}=52 \text{ mM}$ ), co wskazuje na upośledzenie wiązania agonisty. Analiza kinetyki otrzymanych prądów pozwoliła określić wpływ mutacji na dalsze etapy aktywacji (preaktywacja, bramkowanie). Dla zmutowanych receptorów  $\alpha_1\beta_{2E155C}\gamma_{2L}$  w porównaniu z receptorami natywnymi zaobserwowano redukcję szybkiej składowej makroskopowej desensytyzacji prądu w czasie aplikacji agonisty. Z kolei w przypadku  $\alpha_1\beta_2$  mutacja powodowała dużo mniejsze spowolnienie tej komponenty, co oznacza, że podjednostka  $\gamma$  odgrywa istotną rolę w modulacji etapu bramkowania receptora. Znaczne spowolnienie średniego czasu deaktywacji wystąpiło w obu typach receptorów po wprowadzeniu mutacji. Ponadto niestacjonarna analiza wariancji pozwoliła stwierdzić zmniejszenie maksymalnego prawdopodobieństwa otwarcia kanałów bez zmiany w przewodnictwie pojedynczych kanałów w receptorze typu  $\alpha_1\beta_{2E155C}\gamma_{2L}$  w porównaniu z natywnym receptorem. Zmiany te wskazują na modyfikacje stałych kinetycznych związanych z etapem bramkowania i preaktywacji receptora. Dodatkowo stwierdzono, że mutacja nie wpływa na aktywację receptorów  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$  przez pentobarbital, co oznacza, że aktywacja pentobarbitalem jest niezależna od miejsca wiązania GABA oraz zachodzące zmiany konformacyjne w receptorze nie dotyczą miejsca wiązania tego związku. Podanie pentobarbitalu pozwoliło również stwierdzić pojawienie się spontanicznej aktywności pod wpływem wprowadzonej mutacji.

#### 4. Dyskusja

Mutacja reszty  $\beta_{2E155}$  upośledza etap wiązania agonisty, o czym pisali Cromer i wsp., 2002 [2] i na co wskazuje przesunięcie w prawo krzywej dawka-odpowiedź. Jednocześnie przeprowadzona przez nas analiza kinetyki prądów makroskopowych - a więc spowolnienie szybkiej składowej desensytyzacji i wydłużenie czasu średniego deaktywacji, czy redukcja maksymalnego prawdopodobieństwa otwarcia kanałów - pozwoliła stwierdzić, że mutacja wpływa również na etap bramkowania receptora. Wstępne analizy i symulacje modeli kinetycznych uwzględniających etap preaktywacji, obejmujący przejście od związania agonisty do otwarcia receptora, sugerują, że bardzo prawdopodobnym mechanizmem modulacji etapu bramkowania jest wpływ na etap preaktywacji. Dodatkowo należy podkreślić istotną rolę, jaką wydaje się tu odgrywać obecność podjednostki  $\gamma_2$  w receptorze, która powoduje redukcję szybkiej składowej desensytyzacji, jak również pojawienie się spontanicznej aktywności receptorów z wprowadzoną mutacją. Mamy nadzieję, że dalsze pomiary prądów makroskopowych, a także, bardzo ważne dla dalszego wnioskowania, pomiary pojedynczych kanałów, umożliwią nam dokładniejszy opis wpływu mutacji reszty  $\beta_{2E155}$  na mechanizm aktywacji receptora  $GABA_A$ .

**Źródła finansowania:** grant NCN DEC-2013/11/B/NZ3/00983 i grant ministerstwa Pbm135

#### Piśmiennictwo

- [1] SIEGHART W., SPERK G. *Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes*. Current topics in medical chemistry. 2:795-816.
- [2] CROMER BA, MORTON CJ, PARKER MW, *Anxiety over GABAA receptor structure relieved by AChBP*. Trends Biochem Sci, 2002, 27:280-287
- [3] NEWELL JG, MCDEVITT RA, CZAJKOWSKI C, *Mutation of glutamate 155 of the GABAA receptor beta2 subunit produces a spontaneously open channel: a trigger for channel activation*. J Neurosci, 2004, 4(50):11226-35
- [4] CHEN C., OKAYAMA H. *High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA*. Mol Cell Biol, 1987, 7:2745-2752
- [5] SZCZOT M, KISIEL M, CZYZEWSKA MM, MOZRZYMAS JW.  *$\alpha 1F64$  Residue at GABA(A) receptor binding site is influencing the receptor flipping transitions*. J Neurosci, 2014, 34(9):3193-209

## Warstwy hybrydowe na powierzchni implantów jako regulator procesów osteointegracji

AGNIESZKA KACZMAREK-PAWELSKA<sup>1</sup>, ANNA WITKOWSKA, ELŻBIETA KRASICKA- CYDZIK

<sup>1</sup>Uniwersytet Zielonogórski, ul. Licealna 9, 65-417 Zielona Góra, e-mail autora: a.kaczmarek@ibem.uz.zgora.pl

**Słowa kluczowe:** warstwa hybrydowa, nanorurki tlenkowe, BMP-2, bALP, osteointegracja

### 1. Wstęp

Dominujące problemy w procesie interakcji tkanek z implantami metalicznymi to różnice w składzie chemicznym materiałów i tkanek oraz związane z tym występowanie bardzo zróżnicowanych oddziaływań na granicy fazy organicznej (tkanki i płynu fizjologicznego) i nieorganicznej (powierzchni implantu). Procesy zachodzące w układzie tkanka-implant mają ścisły związek z polarnością elektryczną i chemiczną molekuł wchodzących w skład warstwy powierzchniowej materiału [1,2]. Właściwości i morfologia warstwy wierzchniej wpływa w różnym stopniu na adhezję białek, a przez to na proces osteointegracji. Dodatkowym czynnikiem zwiększającym bioakceptowalność jest formowanie powłok tlenkowych na stopach tytanu, które w warunkach *in vitro* sprzyja rozmnażaniu komórek osteoblastów, śródbłonna i mięśni gładkich [3,4], jednak z uwagi na zróżnicowane właściwości elektrochemiczne i morfologię w różnym stopniu wpływają na adhezję białek, oraz dalszą osteointegrację. Zastosowanie hybrydowej dwuwarstwy na powierzchni implantu metalowego składającej się z tlenków w postaci nanorurek (TNT) oraz elementu białkowego, który zainicjuje osteointegrację, może regulować wzrost komórek oraz transport jonów metali w układzie implant- tkanka- płyn fizjologiczny. Aby zbudować dwuwarstwę o optymalnych cechach elektrochemicznych, biologicznych i fizycznych, należy dobierać odpowiedni element białkowy, które bezpośrednio i trwale wiąże się z warstwą nanorurek.

### 2. Materiał i metody

Materiałem implantowym zastosowanym w badaniach był stop Ti6Al4V. Nanorurki na powierzchni stopu formowano poprzez anodowanie próbek w roztworach organicznych: glikolu etylenowego oraz glicerolu z dodatkiem 0,6% wag. NH<sub>4</sub>F. Anodowanie prowadzono w układzie trój elektrodowym, przy potencjałach 20V i 30V aby uzyskać odpowiednio nanorurki o średnicach 50 i 100nm. Zdecydowano się na zbadanie tych wielkości średnic z uwagi na sprzeczne doniesienia literaturowe opisujące zależność między wielkością średnicy a ilością wiązanych protein i szybkością wzrostu osteoblastów. Otrzymane warstwy nanorurek zostały scharakteryzowane w badaniach elektrochemicznych (pomiar OCP, CV, EIS) oraz poddane obserwacjom SEM i analizie EDS. Przeprowadzono również pomiary hydrofilności. Kolejnym etapem było związanie elementu białkowego do warstwy nanorurek tlenkowych na powierzchni stopu Ti6Al4V. Do badań wytypowano dwa białka swoiste dla procesów osteosyntezy: drugie białko morfogenetyczne kości (BMP-2) oraz frakcję kostną fosfatazy alkalicznej (bALP). Proces związania elementu proteinowego obejmował w pierwszej kolejności bezpośrednią immobilizację na warstwie nanorurek przeciwciał swoistych dla bALP i BMP-2, oraz białek. Aby ocenić ilościową wydajność związania przeciwciał i protein do warstwy na stopie Ti6Al4V proces prowadzono dla różnych stężeń: bALP 1-10 ng/ml, BMP-2 500-1000 pg/ml. Ocena stopnia związania elementów białkowych wchodzących w skład dwuwarstwy hybrydowej prowadzona była w oparciu o wyniki analiz spektrofotometrycznych i impedancyjnych.

### 3. Wyniki

Wyniki prowadzonych badań wskazały, że nanorurki tlenkowe o średnicach 50 i 100 nm na powierzchni stopu Ti6Al4V wykazują różne własności elektrochemiczne przed i po modyfikacji termicznej. Warstwa nanorurek przed modyfikacją termiczną ma ujemny potencjał korozyjny -270 mV, z kolei po wyżarzaniu przyjmuje on wartość dodatnią +10 mV. Dane uzyskane podczas badań voltametrycznych i impedancyjnych wskazują, że warstwy przed i po modyfikacji w zakresie niskich częstotliwości mają różną pojemność elektryczną, co może wpływać na interakcje z elementem białkowym. Wszystkie badania elektrochemiczne były prowadzone w roztworze PBS. Wartość kąta zwilżenia dla badanych warstw nanorurek przyjmuje wartość ok. 40°, co wskazuje, że są one hydrofilne, w rezultacie sprzyjając związaniu elementów proteinowych z roztworu. Wydajność immobilizacji przeciwciał swoistych dla bALP oraz BMP-2 na warstwie nanorurek na stopie Ti6Al4V była różna dla badanych średnic i wyniosła w przypadku anty-bALP 83% dla TNT 50nm i 57% dla TNT 100 nm. Odwrotną sytuację zaobserwowano w przypadku immobilizacji przeciwciał BMP-2, osiągnięto wydajność 60% dla nanorurek o średnicy 50 nm oraz 81% dla TNT o średnicach 100nm. W oparciu o uzyskane rezultaty do ostatniego etapu badań- immobilizacji bALP i BMP-2 wytypowano dwie warstwy nanorurek na stopie Ti6Al4V, nanorurki o średnicy 50 nm po modyfikacji termicznej w azocie dla bALP oraz niemodyfikowane o średnicy 100 nm dla BMP-2. W wyniku przeprowadzonej immobilizacji frakcji kostnej fosfatazy alkalicznej oraz drugiego białka morfogenetycznego kości otrzymano dwuwarstwy hybrydowe, w których element białkowy został trwale związany z powierzchnią nanorurek, niezależnie od jego stężenia a wydajność immobilizacji to ok. 80% dla każdej badanej ilości bALP i BMP-2. Otrzymana dwuwarstwa została poddana badaniom impedancyjnym, które potwierdziły jej morfologię oraz wykazały, że wraz ze wzrostem stężenia elementu białkowego w roztworze liniowo maleje wartość kąta fazowego oraz modułu z impedancji, co świadczy o trwałym ilościowym bezpośrednim związaniu elementu proteinowego z nanorurkami uformowanymi anodowo na stopie Ti6Al4V.

### 4. Dyskusja

W trakcie prowadzonych badań wykazano, że możliwe jest wytworzenie na powierzchni stopu Ti6Al4V dwuwarstwy składającej się z elementu nieorganicznego- tlenku w postaci nanorurek i organicznego- białek BMP-2 i bALP. Otrzymane wyniki dowodzą, że możliwe jest trwała integracja elementów białkowych do warstwy nanorurek tlenkowych, jednak stopień związania zależy od średnicy nanorurek, i jest on różny w zależności od budowy białka. O ile przeciwciała swoiste dla BMP-2 oraz bALP wiążą się w zbliżonym stopniu z nanorurkami o średnicy 50 i 100nm, o tyle bALP ilościowo łączy się z warstwą nanorurek o średnicach 50nm modyfikowaną termicznie i dodatnio naładowaną. Drugie białko morfogenetyczne kości wykazuje większe powinowactwo do warstwy nanorurek o średnicach 100nm i naładowanej ujemnie. Obydwie badane proteiny odgrywają istotną rolę w procesie osteosyntezy, jednak nie są one w stanie równocześnie występować na powierzchni implantu jako element dwuwarstwy hybrydowej. Badania impedancyjne pokazują, że pomimo różnic, hamują one transport masy w układzie powierzchnia Ti6Al4V- warstwa nanorurek- element proteinowy- roztwór PBS. Otrzymane dwuwarstwy hybrydowe kwalifikują się do dalszych badań oceny odpowiedzi komórkowej.

### Piśmiennictwo

- [1] SUL Y-T., KWON D.H., KANG B-S., OH S-J., JOHANSSON C. *Experimental evidence for interfacial biochemical bonding in osteointegrated titanium implants*. Clin. Oral Impl. Res, 2011,24:8-19.
- [2] ARVIDSSON A., MALBERG P., KJELLIN P., CURRIE F., ARVIDSSON M., STENPORT V.F. *Early interactions between leukocytes and three different potentially bioactive titanium surface modifications*. J. Biomed. Mater. Res. Part B, 2011,97B:364-372.
- [3] MINAGAR S., WANG J., BERNDT C.C., IVANOVA E.P., WEN C. *Cell response of anodized nanotubes on titanium and titanium alloys*. J Biomed. Mater. Res. A, 2013,9:2726-2739.
- [4] ZHONG, S., LUO R., WANG X., TANG L., WU J., WANG J., HUANG R., SUN H., HUANG N. *Effects of polydopamine functionalized titanium dioxide nanotubes on endothelial cell and smooth muscle cell*. Coll. Surf.B: Biointerf, 2014,116:553-560.

## Anatomia i znaczenie kliniczne przystrzałkowego spłotu oponowego w okresie prenatalnym

WOJCIECH KĘDZIA<sup>1</sup>, EMILIA KĘDZIA<sup>2</sup>, ALICJA KĘDZIA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Zawodowych i Nadciśnienia Tętniczego, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

<sup>2</sup>II Klinika Anestezjologii i Intensywnej Terapii Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

<sup>3</sup>Katedra i Zakład Anatomii Prawidłowej Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

**Słowa kluczowe:** spłot oponowy przystrzałkowy, płód

### 1. Wstęp

Mózgowie otaczają opony, są to łącznotkankowe twory. Opona twarda (*dura mater*) najmocniejsza, ze wszystkich opon ze składa się z dwóch blaszek: zewnętrznej i wewnętrznej. Blaszka zewnętrzna stanowi okostną powierzchnię wewnętrznej czaszki a wewnętrzna jest zwrócona do mózgowia. Bekow [2] szczegółowo opisywał zatokę strzałkową górną i jej połączenia z oponą twardą, bez uwzględnienia jednak okresu płodowego i starczego. Ciekawe są informacje Balo [1] o istnieniu „jamistych przestrzeni” w tylnej części zatoki strzałkowej górnej, ograniczające żylny odpływ i wpływające na powstanie przekrwienia żylnego. Naczynia żyłne opony twardej mózgu są również słabo poznane. Obserwacje Pfeifera [9] wskazują na „wielopiętrowość” naczyń tętniczych i żylnych położonych w oponie twardej i specyfikę morfologii. Badania te były przeprowadzone na materiale zaledwie dwóch opon w wieku starczym, a dokumentację stanowią jedynie szkice. Dane Gomeza i Potts [3] przemawiają za znacznymi zmianami w morfologii ziarnistości pajęczynówki w zależności od ciśnienia płynu mózgowo-rdzeniowego. Prace Paget [8] podkreślają powstanie zatok ze spłotów żylnych. Badania [4,6,7,10] wskazują na istnienie znacznych odrębności w okresie prenatalnym w anatomii opony twardej w porównaniu z wiekiem dojrzałym. Obserwacje na temat opony twardej w okresie prenatalnym i noworodkowym były nieliczne i związane głównie z próbami wyjaśnienia patomechanizmu krwiałków podtwardówkowych. Wiąże się to prawdopodobnie z ogromnymi trudnościami w uzyskaniu materiału badawczego, obecnie jest to niemożliwe.

**Cel pracy** stanowiła ocena anatomii przystrzałkowego spłotu podoponowego w okresie prenatalnym.

### 2. Materiał i metoda

**2.1. Materiał** stanowiło 50 płodów o długości v-tub od 89 do 229 mm, bez widocznych wad rozwojowych. Znaczna część płodów z powodu krwawień do i okołokomorowych wynikających z niedojrzałości naczyń macierzy przykomorowej była niedostępna do badań.

**2.2. Metoda badań** iniekcyjna wypełnianie naczyń kolorowymi mieszaninami lateksu syntetycznego LBS 3022. Należy podkreślić, że wykorzystywane były płody niezakonserwowane. Badania te były obciążone dużymi trudnościami technicznymi z uwagi na istnienie zastawek żylnych i bardzo cienkie światło naczyń. Analizę wykonano za pomocą systemu Scion Image for Windows 4.0.3.2 i Image J z zastosowaniem różnych przekształceń liniowych i nieliniowych.

### 3. Wyniki

Opona twarda w okresie prenatalnym wykazuje wiele odrębności w porównaniu z wiekiem dojrzałym. U płodów do około piątego miesiąca brak jest „lacunae laterales”, tj. zachyłków bocznych zatoki strzałkowej górnej. Pierwsze ich zarysy mają kształt łuków. Początkowo są one płaskie i pojedyncze bez ukorzenienia, podobne do wypukleń w odcinku czołowym zatoki strzałkowej górnej w dojrzałym wieku. W miarę wzrostu mózgu pojawia się większa liczba włókien i następuje zmiana ich kształtu na paraboliczny i kolisty. Okres prenatalny cechuje brak wewnątrzoponowego

przebiegu żył mózgu przed ich ujściem do zatok. Okolica zatoki strzałkowej górnej i zatoki poprzecznej należy do miejsc o silnie rozwiniętej przyzatkowej sieci oponowej. We wszystkich badanych przypadkach odnotowano obecność rozległej sieci „intraduralnych” kanałów od 0,02 do 2,0 mm średnicy. Kanały albo były połączone do systemu sinus sagittalis superior w odstępach wzdłuż ściany bocznej lub odprowadzane bezpośrednio do lakun bocznych, która przedłużyła się do 3 cm od linii środkowej. Unaczynienie tych okolic u niemowlęcia i u płodu jest znacznie bardziej obfite niż powszechnie się uważa. Cechuje go spłotowatość. Naczynia te spełniają rolę dodatkową w odpływie płynu mózgowo-rdzeniowego, ponieważ nie są wykształcone ziarnistości pajęczynówki. We wczesnych okresach życia płodowego – od trzeciego miesiąca zwraca uwagę duża średnica przystrzałkowych żył oponowych. Światło żył oponowych ulega w trakcie rozwoju znacznej redukcji (nawet dziesięciokrotnej). Obserwowano w badanym materiale od trzeciego miesiąca wykształcenie się „żył mostkowych” tj. końcowych odcinków żył biegnących luźno w przestrzeni podtwardówkowej, pozbawionych dopływów, prowadziły one krew do zatoki strzałkowej górnej i były okolone wianuszkami drobnych naczyń oponowych. W wieku dojrzałym obok zatoki strzałkowej górnej wykształcony jest „parasinus”, który biegnie równoległe do zatoki strzałkowej górnej (6) i może stanowić źródło krwawień przy zabiegach operacyjnych w tej okolicy.

Uchodzą do niego drobne, cienkie żyły mostkowe. Zlokalizowany jest głównie w okolicy czołowej i ciemieniowej. Naczynia żyłne cechują się dużą rozciągliwością, zwłaszcza dotyczy to sieci kapilarnej, która odznacza się znaczną zmiennością średnicy, obecnością licznych zwężeń, rozszerzeń, wypukleń, istnieniem ślepo kończących się wyrostków i przypomina budową układ chłonny. Powierzchnia naczyń jest nierówna, u płodów ta ampułkowatość naczyń była mniej zaznaczona niż u osób w dojrzałym wieku. Sieć żylna przewyższa wielokrotnie swoim obszarem sieć tętniczą, co pozwala na szybkie wyrównanie biernego przekrwienia. Ziarnistości pajęczynówki pojawiają się dopiero w trzecim roku życia i liczba ich stale rośnie. Pierwsze połączenia nadoponowe, żyły wypustowe) wykształcają się w szóstym miesiącu życia prenatalnego, są one ograniczone do obszaru zatoki strzałkowej górnej są proste, pozbawione odgałęzień i stanowią dodatkową drogę odpływu.

### Wniosek

Opona twarda w okresie prenatalnym cechuje się odrębną anatomią, a spłoty żyłne spełniają prawdopodobnie dodatkową funkcję, związaną z odpływem płynu mózgowo-rdzeniowego, zastępując niewykształcone ziarnistości pajęczynówki.

### Piśmiennictwo

- [1] BALO J. *The dural venous sinuses*. Anat. Rec. 1950, 106, 319-325.
- [2] BEKOW A. *Atlas weneznoy systemy golownowo mozga czeloweke*. Medicina Moskwa 1965.
- [3] GOMEZ D.G., POTTS D.G., DEONARINE V. *Arachnoid granulations of the sheep. Structural and ultrastructural changes with varying pressure differences*. Arch. Neurol. 1974, 30, 169-175.
- [4] FOXA J., WALJI A.H., MIELKE B., ET AL *Anatomic details of intradural channels in the parasagittal dura: a possible pathway for flow of cerebrospinal fluid*. Neurosurgery, 1996, 39:84-90.
- [5] KAPLAN H.A., BROWDER J., KRIEGER A.J. *Venous channels within the intracranial dural partitions*. Radiology, 1975, 115:641-645.
- [6] KĘDZIA A. *Układ żylny mózgu człowieka i jego znaczenie kliniczne* Wrocław: Urban & Partner, 2004; XIII, 198.
- [7] MACK J., SQUIER W., JAMES T. *Anatomy and development of the meninges: implications for subdural collections and CSF circulation* Pediatr Radiol (2009) 39(3)200-210.
- [8] PADGET D.H. *The development of the cranial venous system in man from the viewpoint of comparative anatomy*. Contrib Embryol, 1957, 36:79-140.
- [9] PFEIFFER G. *Grundlegende Untersuchungen für die Angioarchitektur des menschlichen Gehirns*. Springer J., Berlin 1930.
- [10] SQUIER W., LINDBERG E., MACK J., DARBY S. *Demonstration of fluid channels in human dura and their relationship to age and intradural bleeding*, Childs Nerv Syst, 2009, 25 (8): 925-931.

## Zlewisko żylnie namiotu mózdzku w okresie prenatalnym

WOJCIECH KĘDZIA<sup>1</sup>, EMILIA KĘDZIA<sup>2</sup>, ALICJA KĘDZIA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Zawodowych i Nadciśnienia Tętniczego, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

<sup>2</sup>II Klinika Anestezjologii i Intensywnej Terapii Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

<sup>3</sup>Katedra i Zakład Anatomii Prawidłowej Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

**Słowa kluczowe:** namiot mózdzku, zlewisko żylnie, płód

### 1. Wstęp

Namiot mózdzku jest poprzecznym pasem nośnym opony twardej, który oddziela tylną-dolną część półkul mózgu od mózdzku i przenosi obciążenia z płatów potylicznych na sztywne kości sklepienia czaszki. Należy do pierwszych wypustek opony twardej, które rozwijają się u człowieka. Markowski [8,9] podaje, że pojawia się on u embriona długości 15,5 mm jako poprzeczna płytka w obrębie całego dołu środkowego czaszki. U płodu o dł. 19 mm sięga do torebki labiryntu, a u płodu o dł. 33 mm przybiera wygląd pierścienia otaczającego śródmózgowie. Jest to przyszyły zawiązek wcięcia namiotu. Namiot mózdzku cechuje się początkowo dużym wcięciem i przypomina literę U. Bull [3] zaznacza, że namiot mózdzku spełnia, wspólnie z ciałem modzelowatym, ważną rolę konstrukcyjną i przenośnika ciężaru mózgu. Hochstetter [7] stwierdzał, że w początkowej fazie wzrostu namiotu mózdzku zwiększa się głównie jego szerokość. W momencie pojawienia się sierpu u embriona o długości 46 mm rozpoczyna się zrastanie jego tylnych brzegów niemal o połowę, rola namiotu jako czynnika wyłączniczo wzmocniającego konstrukcję czaszki kończy się, włącza się wykształcający się sierp mózgu. Namiot mózdzku odgrywa również ważną rolę w krążeniu żylnym, stanowi miejsce zlewiska żylnego nadnamiotowego i podnamiotowego. Naczynia żylnie mózgowia mają cienkie ściany o słabo rozwiniętej warstwie mięśniowej. Dzięki temu są one w stanie pomieścić znaczną objętość krwi, spełniając funkcję naczyń pojemnościowych. Dane z literatury wykazały, że większość prac dotyczy wieku dojrzałego [1,2,4,5], natomiast jest niewiele doniesień [3,5,6-10] dotyczących okresu prenatalnego w tym rejonie.

**Cel pracy** stanowiła analiza anatomii rozdroża naczyniowego namiotu mózdzku w okresie prenatalnym.

### 2. Materiał i metody

**2.1 Materiał** badany stanowiło 50 płodów od 4 do 7 miesiąca.

**2.2. Metoda:** naczynia wypełniano barwnymi mieszaninami polskiego lateksu syntetycznego LBS 3022, następnie opracowywano w systemach przetwarzania obrazu Image I i Scion for Windows 98. Należy podkreślić, że znaczna część materiału była niedostępna do badań z uwagi na wylewy do i okołokomorowe, które uszkadzały struktury mózgowia.

### 3. Wyniki

Topografia namiotu jest związana z wysokim ułożeniem guzowatości potylicznej zewnętrznej. Namiot u płodu biegnie ukośnie, wyżej z tyłu, niżej z przodu. W związku z przesuwaniem się tylnego punktu przyczepu zatoki prostej wykonuje ona obrót o około 60°. U dorosłego płaszczyzna namiotu biegnie odwrotnie wyżej z przodu, niżej z tyłu. Dół tylny czaszki w okresie prenatalnym zmienia swój pierwotny, lejkowaty kształt, związane jest to z rozwojem mózdzku i wykształcaniem się zbiorników pajęczynówki. zauważono, że namiot mózdzku jest strefą rozdroża naczyniowego. W jego obrębie biegnie zatoka żyła namiotowa. Jest to duże naczynie o szerokości 2-4 mm o łukowatym przebiegu łączące żyły okolicy wyspy z zatoką poprzeczną. W świetle własnych

spostrzeżeń stwierdzono, że żyła ta może przebiegać dwojako: w odcinku przednim zewnątrz, w tylnym wewnątrzoponowo. Najsilniejszy jej rozwój zaznacza się w okresie od czwartego do szóstego miesiąca. Obserwowano jej esowaty przebieg z charakterystyczną pętlą w przednim odcinku, następnie stopniowe przemieszczenie się w kierunku przyśrodkowym, wydłużenie i stopniowy zanik. Określenie „zatoka namiotowa” nie jest trafne z uwagi na topografię, bardziej celowa byłaby nazwa „zatoka dołu środkowego czaszki”. Początkowy odcinek tej zatoki przekształca się później w zatokę klinowo-ciemieniową: „sinus sphenopetrosus”. Żyły mostkowe warunkują topografię żył powierzchniowych mózgu. Cały mózg jest „zawieszony” na żyłach mostkowych. Istniały różnorodne podziały żył powierzchniowych mózgu w wieku dojrzałym, wydaje się, że przyjęcie kryterium morfologii żył mostkowych jest najbardziej celowe i daje wiarygodną ocenę typologii żył. W obrębie namiotu mózdzku są wewnątrznamiotowe zatoki, które dzielą się na boczne i przyśrodkowe. Spełniają one rolę adaptacyjną, mają kształt odwróconego stożka lub formy prostoliniowe. Do bocznych zatok namiotowych uchodzą żyły mostkowe płata skroniowego tworzące formę wachlarza, reprezentujące obszar nadnamiotowy. Do przyśrodkowych zatok namiotowych dochodzą żyły mostkowe podnamiotowe pod kątem ostrym. W obrębie żył podnamiotowych można wyróżnić trzy systemy: a) system przedni, żyły kąta mostkowo-mózdkowego, b) system boczny-półkulowy, c) system tylny-robakowy. Żyły przednie kąta mostkowo-mózdkowego uchodzą do zatoki skalistej górnej, są pojedyncze, lub podwójne, przebiegają w sąsiedztwie nerwu trójdzielnego, położone za n.V, lub bocznie od niego. Mają one różne mianownictwo: „żyła skalista”, „żyła kłaczkowa”, „żyła wielka mózdzku”. System boczny półkulowy – żyły mostkowe uchodzą do zatoki poprzecznej, za pośrednictwem zatok wewnątrznamiotowych, które u płodu są położone strzałkowo, następnie wykonują obrót i przyjmują układ horyzontalny. System tylny-robakowy: żyły mózdzku uchodzą do zatoki prostej, odznaczają się ujściem pod kątem prostym, są pojedyncze. W okresie płodowym zanika zatoka namiotowa (położona była w dole środkowym czaszki), zmienia się topografia zatok namiotowych (intraduralnych położonych w namiocie). Namiot mózdzku stanowi miejsce różnokierunkowego przepływu krwi, łączy obszar nad i podnamiotowy i jest zlewiskiem żylnym. W wieku dojrzałym przebieg n.V w pobliżu żyły skalistej może być źródłem konfliktu naczyniowo-nerwowego (ucisk naczyń na nerw V) i prowadzić do neuralgii nerwu trójdzielnego, która jest przyczyną najsilniejszych zespołów bólowych.

### Wniosek

Namiot mózdzku spełnia dwojaką rolę: jedną – elementu konstrukcyjnego, jest to rola mechaniczna i druga – stanowi również miejsce rozdroża przepływu krwi żyłnej, który łączy dwa obszary: nad i podnamiotowy.

### Piśmienictwo

- [1] BALO J. *The dural venous sinuses*. Anat. Rec. 1950, 106, 319-325.
- [2] BEKOW A. *Atlas wenożnoj sistemy golownowo mozga czelowieka*. Medicina Moskwa 1965
- [3] BULL J.W.D. *Tentorium cerebella* Proc R Soc Med, 1969 62(12): 1301-10
- [4] KAPLAN H.A., BROWDER J., KRIEGER A.J. *Venous channels within the intracranial dural partitions*. Radiology, 1975, 115:641-645.
- [5] KĘDZIA A. *Układ żylny mózgu człowieka i jego znaczenie kliniczne*. Wrocław: Urban & Partner, 2004: XIII, 198.
- [6] NOWAKOWSKA-KOTAS M., KĘDZIA A., KRZYSZTOF D. *Development of external surfaces of human cerebellar lobes in the fetal period*. Cerebellum, 2014 Vol.13 no.5: 541-548
- [7] HOCHSTETTER F. *Über die Entwicklung und Differenzierung der Hüllen des menschlichen Gehirnes*. Morf.Jahrbuch, 1939, 1-25.
- [8] MARKOWSKI J. *Entwicklung der sinus durae matris und der Hirnvenen des Menschen. 1. Teil Embryonen aus dem 2 und 3. Monate unter Teilweiser Berücksichtigung von 4-7 monatlichen Foeten*. Bull. International de l'Acad.Pol.des Sciences et des Lettres Suppl.Imprimerie de l'Universite Cracovie 1922.
- [9] MARKOWSKI J. *Über die Entwicklung der Falx cerebri und des Tentorium cerebelli des Menschen mit Berücksichtigung ihrer venosen Sinus* Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte 1931, 94: 394-439.
- [10] PAGET D.H. *The development of the cranial venous system in man from the view point of comparative anatomy*. Contrib Embryol, 1957, 36:79-140.

## Expression of interleukin-1 $\beta$ splice variant in canine kidney, liver and lung in dogs with heart insufficiency

LILIANA KICZAK<sup>1</sup>, URSZULA PASLAWSKA<sup>2</sup>, EWA WALECKA-ZACHARSKA<sup>3</sup>, IZABELA SAMBOR<sup>1</sup>,  
TADEUSZ STEFANIAK<sup>4</sup>, PIOTR DZIĘGIEL<sup>5</sup>, MACIEJ ZACHARSKI<sup>1</sup>, ALICJA TOMASZEK<sup>7</sup>, ILONA  
RYBIŃSKA<sup>6</sup>, JACEK BANIA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Wrocław, Poland, liliana.kiczak@up.wroc.pl

<sup>2</sup>Department of Internal and Parasitic Diseases with Clinic for Horses, Dogs, and Cats, Faculty of Veterinary Medicine, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Wrocław, Poland,

<sup>3</sup>Department of Food Hygiene and Consumer Protection, Faculty of Veterinary Medicine, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Wrocław, Poland.

<sup>4</sup>Department of Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Wrocław, Poland

<sup>5</sup>Department of Histology and Embryology, Wrocław Medical University, Wrocław, Poland

<sup>6</sup>Department of Heart Diseases, Wrocław Medical University, Wrocław, Poland

**Key words:** CDVD; interleukin-1 $\beta$ ; alternative splicing; liver, lung, inflammation

### 1. Introduction

We previously reported that IL-1 $\beta$  gene can be alternatively spliced with the intron 4 retention, giving IL-1 $\beta$  splice variant 1 (IL-1 $\beta$ sv1)[1]. This transcript was significantly up-regulated in failing myocardium from dogs with chronic degenerative valvular disease (CDVD) and its levels in different heart chambers reflected the order of appearance of pathological changes during the progression of heart failure (HF). The present study was designed to look for the expression of IL-1 $\beta$ sv1 in other organs, affected by HF.

### 2. Material and methods

IL-1 $\beta$ sv1 transcript level was determined in the kidneys, liver and lung from CDVD dogs (n=35) and control animals (n=20) without HF by Real-time PCR. Using the antibody directed against epitope originating from retained intron, western blotting and immunohistochemical analysis of the same organs was conducted. Stable transfectans of macrophage canine DH82 cell line overexpressing IL-1 $\beta$ sv1 were obtained to study the biological function of this protein.

### 3. Results

IL-1 $\beta$ sv1 mRNA was detected in all studied tissues of both control and CDVD animals. In CDVD group the highest IL-1 $\beta$ sv1 mRNA level was observed in lung, the medium in liver and the lowest in kidneys. What is more, these differences were reflected on IL-1 $\beta$ sv1 protein level. No positive immunohistochemical staining was observed in kidneys. IL-1 $\beta$ sv1 protein was localized in liver hepatocyte cytoplasm. In lungs we found IL-1 $\beta$ sv1 expression in cytoplasm and nucleus of bronchioli epithelial and smooth muscle cells. Epithelial cells in alveolar sacs also gave a strong, nuclear signal. What is more, in alveolar sacs we observed cytoplasmatic and nuclear expression of IL-1 $\beta$ sv1 in macrophages. Overexpression of IL-1 $\beta$ sv1 in DH82 cell line led to decrease of pro-inflammatory response upon LPS stimulation.

#### **4. Discussion**

Our results indicate that IL-1 $\beta$ sv1 is constitutively expressed in normal and HF-affected tissues. Presence of IL-1 $\beta$ sv1 in tissues exposed to invading agents and its anti-inflammatory activity in DH82 cells suggest that it can play an immunomodulatory role *in vivo*.

#### **Literature**

- [1] KICZAK L, PASLAWSKA U, BANIA J, UGORSKI M, SAMBOR I, KOCHMAN A, BLACH J, CHELMONSKA-SOYTA A. *Increased expression of interleukin-1beta and its novel splice variant in canine hearts with volume overload.* Cytokine. 2008 Dec;44(3):352-60.

## Bezpieczne stosowanie przezczaszkowej stymulacji elektrycznej mózgu (CES) w warunkach domowych

LECH KIPIŃSKI<sup>1,2,3</sup>, MAŁGORZATA MICAL-STRAK<sup>1</sup>, WITOLD PILECKI<sup>1</sup>, JERZY KOLANKO<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Katedra i Zakład Patofizjologii, lech.kipinski@umed.wroc.pl

<sup>2</sup>Dolnośląski Szpital Specjalistyczny im. T. Marciniaka we Wrocławiu, Oddział Neurologii z Pododdziałem Udarowym

<sup>3</sup>IN-NEURO Innowacje w Neurologii, Aparatura Elektromedyczna, Praktyka Lekarska

<sup>4</sup>Politechnika Wroclawska, Katedra Inżynierii Biomedycznej

**Słowa kluczowe:** przezczaszkowa stymulacja elektryczna, CES, elektroterapia, stymulator

### 1. Wstęp

Przezczaszkowa stymulacja elektryczna mózgu (Cranial Electrophtherapy Stimulation, CES) jest nieinwazyjną metodą terapii przy pomocy prądu elektrycznego o małej mocy, podawanego naskalpowo, którego rozplyw w różnych obszarach mózgu wywołuje pobudzenie jąder podstawy do wydzielania neuroprzekaźników wywołując efekt terapeutyczny. Zwiększenie produkcji neuroprzekaźników w mózgu działa przeciwstresowo, nasila procesy uwagi i sprawność procesów myślowych, wywołuje uczucie odprężenia, działa wspomagająco na jakość snu. Stymulacja CES zwiększa aktywność przywspółczulnego układu nerwowego oraz wywołuje działanie podobne do endorfin, wyciszając procesy powiązane z odczuwaniem emocji, stąd gro zastosowań w psychiatrii, gdzie CES wykorzystywana jest w terapii takich schorzeń jak depresja, lęk, bezsenność (w USA jest dopuszczona przez FDA) ale znajduje też zastosowanie w leczeniu wielu innych schorzeń, przede wszystkim uzależnień.

W pierwszych 3 z wymienionych schorzeń terapia CES ma zastosowanie w użytku publicznym (dopuszczona przez FDA w Stanach Zjednoczonych jako terapia „na receptę” w warunkach domowych). Leczenie uzależnień stosowane jest niemal wyłącznie w lecznictwie stacjonarnym a inne zastosowania to głównie terapie eksperymentalne. W Polsce nie stosuje się CES w lecznictwie.

Celem podjętych prac było określenie warunków w jakich można bezpiecznie prowadzić terapię CES w warunkach domowych przy pomocy niewielkich stymulatorów elektrycznych, dla wybranych schorzeń z zakresu neurologii i psychiatrii.

### 2. Materiał i metody

W założeniu aplikacje CES oparto o możliwości aparatu CES-3 opracowanego przez firmę IN-NEURO. Jest to przenośne urządzenie zasilane baterią 9V, które wytwarza w półminutowych odstępach 30-sekundową serię fal prostokątnych o częstotliwości 0,5, 70 lub 90 Hz (zależnie od trybu pracy) z modulacją przebiegiem 300 Hz. Zastosowano źródło prądowe ograniczające prąd pacjenta do 700  $\mu$ A. Urządzenie spełnia normę dla aparatury elektromedycznej EN PN 60601, zostało przebadane w niezależnym ośrodku pod względem kompatybilności elektromagnetycznej i posiada znak CE.

Przeszukano bazę PubMed pod kątem stosowanych na świecie parametrów elektrostymulacji i programów terapii z wykorzystaniem CES. Przeanalizowano doniesienia nt. terapii w: depresji, zespołach lękowych, nadmiernym stresie, bezsenności, bólu przewlekłym (w tym fibromialgii), napięciowych i migrenowych bólach głowy, zaburzeniach poznawczych, padaczce i stwardnieniu rozsianym. Następnie, w oparciu o dane literaturowe i specyfikację stymulatora CES-3, opracowano schematy leczenia dla wybranych schorzeń oraz kryteria włączania pacjentów do programu terapeutycznego i oceny efektów terapii. Szczególny nacisk położono na przeciwskazania CES i możliwe działania niepożądane.

### 3. Wyniki

U chorych z uzależnieniami stosuje się impulsy o częstotliwości 70-200Hz, co odpowiada 2 trybom pracy aparatu CES-3. Czas trwania terapii wynosi kilka dni do kilku tygodni i jest najkrótszy u chorych z nikotynizmem. Stosuje się sesje, zwykle kilkudziesięciominutowe, lub terapię ciągłą. Terapia CES w zwalczaniu depresji, lęku i bezsenności powinna być prowadzona zgodnie z wytycznymi FDA, które legalizuje jej zastosowanie w tych schorzeniach. W leczeniu bólu przewlekłego i migreny należy oprzeć się o dane eksperymentalne, ponieważ w literaturze są rozbieżności na ten temat. Odnośnie terapii CES w stwardnieniu rozsianym stwierdzono, że w literaturze brak wystarczających danych aby potwierdzić skuteczność CES w tej chorobie.

FDA określa działania niepożądane CES jako nieistotne statystycznie. Mimo to uznano, że należy wykluczać z terapii chorych z wszczepionymi elektrostymulatorami by uniknąć ewentualnych interakcji między urządzeniami. W czasie terapii pacjent nie powinien stosować innych zabiegów prądoleczniczych. Rekomenduje się nie stosować CES u chorych z guzami mózgu oraz padaczką – brak jest danych literaturowych na ten temat ale elektrostymulacja mózgu wydaje się być jednym z mechanizmów mogących wywoływać napady drgawkowe u tych chorych. CES nie należy stosować w ostrych stanach chorobowych CUN, jak urazy czaszkowo-mózgowe, udary mózgu lub neuroinfekcje. Możliwość podjęcia leczenia przez osoby po przebytych incydentach tego typu należy oceniać indywidualnie. Należy zachować ostrożność przy alergiach i zmianach skóry w miejscu typowej lokalizacji elektrod. Przeciwwskazaniem jest też obecność metalowych protez kości czaszki lub implantów wewnątrzczaszkowych, które mogą mieć wpływ na propagację impulsów.

Na podstawie danych literaturowych przygotowano autorską ankietę kwalifikacyjną do terapii CES, dotyczącą czynników ryzyka dla terapii i schorzeń przewlekłych. Jej wypełnienie i ocena przez lekarza powinny być wymagane każdorazowo przed podjęciem terapii. Opracowano także schematy leczenia w uzależnieniu od papierosów, alkoholu i narkotyków o także bezsenności i zaburzeń lękowych oraz sposób oceny skuteczności terapii za pomocą ankiet i badań elektrofizjologicznych.

### 4. Dyskusja

Aparaty CES są alternatywą dla konwencjonalnej terapii wielu schorzeń. Stymulacja CES może odbywać się w sesjach, podczas snu lub całodobowo. Uważamy, że metoda ta jest bezpieczna i może być stosowana samodzielnie przez pacjenta w warunkach domowych, ale powinna odbywać się pod kontrolą lekarza wg jasno wytyczonych zasad. Obecnie prowadzone jest badanie kliniczne wśród chorych z nikotynizmem, którego wyniki posłużą do rejestracji aparatów CES w Polsce jako produktu medycznego z zastosowaniem w walce z nałogiem papierosowym.

**Podziękowania:** Badanie było współfinansowane z środków Unii Europejskiej w ramach projektu „Kluczowy Stażysta – edycja druga” prowadzonego przez Poznański Akademicki Inkubator Przedsiębiorczości.

### Piśmiennictwo

- [1] PATTERSON M.A., FIRTH J., GARDINER R. *Treatment of drug, alcohol and nicotine addiction by neuroelectric therapy: analysis of results over 7 years.* Journal of Bioelectricity, 3(1-2), 193-221, 1984.
- [2] KIRSCH D.L., SMITH R. *Cranial Electrotherapy Stimulation for Anxiety, Depression, Insomnia, Cognitive Dysfunction, and Pain.* [w] Bioelectromagnetic Medicine, P.J. Rosch, Ed. M. Dekker, New York, 727-740, 2004. KOLANKO J., KUPIŃSKI L. *Przezskórna elektrostymulacja czaszkowa (CES) – zastosowania i rozwiązania techniczne* Materiały XVIII Krajowej Konferencji Naukowej „Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna”, Gdańsk 2013, red. A. Bujnowski, J. Wtorek.

## Wspomaganie leczenia uzależnienia od papierosów za pomocą przezczaszkowej stymulacji elektrycznej mózgu (CES)

LECH KIPIŃSKI<sup>1,2,3</sup>, ANNA BIELOUS-WILK<sup>1</sup>, WITOLD PILECKI<sup>1</sup>, JERZY KOLANKO<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Katedra i Zakład Patofizjologii, lech.kipinski@umed.wroc.pl

<sup>2</sup>Dolnośląski Szpital Specjalistyczny im. T. Marciniaka we Wrocławiu, Oddział Neurologii z Pododdziałem Udarowym

<sup>3</sup>IN-NEURO Innowacje w Neurologii, Aparatura Elektromedyczna, Praktyka Lekarska

<sup>4</sup>Politechnika Wroclawska, Katedra Inżynierii Biomedycznej, kontakt: lech.kipinski@umed.wroc.pl

**Słowa kluczowe:** CES, elektroterapia, uzależnienie, papierosy, nikotynizm

### 1. Wstęp

Terapia CES (Cranial Electrophotherapy Stimulation) polega na przezczaszkowej stymulacji mózgu przy użyciu mikropola elektrycznego podawanego przez elektrody przyklejane na skórę głowy. Spośród wielu schorzeń neurologiczno-psychiatrycznych, które mogą być leczone za pomocą CES należy wymienić terapię uzależnień, w tym uzależnienie od tytoniu.

Aktualnie dzięki współpracy firmy IN-NEURO oraz Katedry Patofizjologii na Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu prowadzone jest badanie nt. oceny skuteczności terapii CES w walce z nałogiem nikotynowym. Wykorzystywane w badaniu aparaty CES-3 zostały opracowane zgodnie z krajowymi normami bezpieczeństwa i przebadane pod względem kompatybilności elektromagnetycznej i bezpieczeństwa. Urządzenie posiada deklarację zgodności z normami dla wyrobów medycznych i znak CE. Realizowany projekt badawczy dotyczy sprawdzenia wpływu jaki kilkutygodniowa terapia CES wywiera na palaczy papierosów. Badany jest zarówno efekt kliniczny terapii jak i wpływ przezczaszkowej elektrostymulacji na czynność bioelektryczną mózgu.

### 2. Materiał i metody

Badaniem objęto dorosłych z potwierdzonym w badaniu ankietowym nałogiem nikotynowym i wyrażających chęć wyjścia z uzależnienia. Dla każdego pacjenta oceniony był wyjściowy stopień uzależnienia od papierosów za pomocą testu Fagerströma (FTND). W rekrutacji uwzględnione zostały kryteria wykluczenia w oparciu o schorzenia towarzyszące, przy których wpływ zewnętrznego pola elektrycznego byłby teoretycznie niepożądany, jak u pacjentów z wszczepionymi stymulatorami elektrycznymi (np. rozrusznikiem serca), padaczką, zmianami skórnymi, aktywną chorobą nowotworową czy w czasie ciąży. Badanie prowadzone jest wg zasad podwójnie ślepej próby z wykorzystaniem działających stymulatorów CES-3 i aparatów „placebo”. Terapia CES odbywa się w warunkach domowych przez okres 2 tygodni, po uprzednim przeszkoleniu badanego względem obsługi urządzenia. Aparaty skonfigurowano na stymulację prądem o impulsach prostokątnych o częstotliwości 90 Hz z modulacją 300 Hz i amplitudzie 0,7 mA. Stymulacja odbywa się w sposób ciągły przez 30 s z przerwami między okresami stymulacji 30 s. Pacjenci mieli polecane włączać aparat przed snem i wyłączać rano, po przebudzeniu się oraz odnotowywać czas stosowania aparatu w dzienniczku. Do stymulacji używano uniwersalne, jednorazowe elektrody skórne.

Ponieważ CES może wpływać na procesy uwagi oraz funkcje poznawcze, u badanych wykonywane były badania EEG, późnolatencyjnych potencjałów wywołanych mózgu P300 i MMN, oraz pomiary bramkowania słuchowych potencjałów korowych wywołanych parą bodźców. Wykonanie pomiarów przed rozpoczęciem terapii i tuż po jej zakończeniu pozwala na ocenę wpływu elektroterapii CES na czynność bioelektryczną mózgu. W czasie stosowania aparatu prowadzony był

monitoring leczenia z szczególnym uwzględnieniem ewentualnych zdarzeń niepożądanych, a po zakończeniu terapii powtórnie zbierano dane ankietowych.

### 3. Wyniki

Zebrano cząstkowe dane po przeprowadzeniu badania u ponad 50 osób uzależnionych od papierosów i deklarujących chęć wyjścia z nałogu nikotynowego przy pomocy CES. Analizowano wyniki uzyskane w całej badanej grupie (bez sprawdzenia czy pacjent był poddany elektroterapii czy stosował aparat „placebo”).

Stwierdzono, że około ¼ ankietowanych posiada przeciwwskazania medyczne do terapii. Wśród osób poddanych leczeniu stwierdzono: rzucenie palenia u 25%, zmniejszenie ilości wypalonych papierosów u 25%, brak efektu u 50%, zwiększenie liczby wypalanych papierosów u 0%. Stwierdzono korzystny wpływ aparatów CES na nastrój a zwłaszcza na sen.

Efekty niepożądane terapii zaobserwowano u 14%. Było to nieprzyjemne odczucie elektrostymulacji i podrażnienie skóry w miejscu przyklejenia elektrody czynnej. 2 osoby zaprzestały stosowania aparatów CES ze względu na odczuwalnie nieprzyjemny charakter elektrostymulacji. Ponadto pojedyncze osoby zgłaszały ból głowy, dyskomfort związany z zaplątaniem się podczas snu w zbyt długie kable od elektrod oraz budzenie przez świecąca diodę od aparatu (2 osoby).

Zarejestrowano duży zbiór sygnałów elektroencefalograficznych mierzonych przed i po terapii CES. Nie przeprowadzono analizy porównawczej tych zapisów na obecnym etapie badania.

### 4. Dyskusja

Zdobyto wstępne informacje na temat skuteczności terapii CES w terapii uzależnienia od papierosów oraz problemach związanych z prowadzeniem leczenia i kontrolą nad procesem terapeutycznym. Uzyskano potwierdzenie, że terapia CES może być pomocna nie tylko w zwalczaniu nałogu nikotynowego ale także bezsenności.

Uzyskanie dokładniejszych/ostatecznych wyników na tym etapie nie jest możliwe, ponieważ badanie jest kontynuowane na większej próbie osób a odtajnienie informacji dotyczących użytych egzemplarzy aparatów CES-3 spowodowałoby złamanie zasad badania podwójnie zaślepionego.

Poznanie negatywnych opinii badanych na temat używania stymulatorów CES-3 może okazać się bardzo przydatne w kontekście dalszego przeprowadzania eksperymentu badawczego oraz dopuszczenia produktu do użytku publicznego w przyszłości.

Autorzy sądzą, że terapię CES można bezpiecznie stosować w warunkach domowych a proponowana metoda może znaleźć praktyczne zastosowanie w wspomaganiu zwalczania nałogu tytoniowego.

**Podziękowania:** Badanie było współfinansowane z środków Unii Europejskiej w ramach projektu „Laboratorium biznesu” prowadzonego przez Dolnośląską Agencję Rozwoju Regionalnego S.A.

### Piśmiennictwo

- [1] PATTERSON M.A., FIRTH J., GARDINER R. *Treatment of drug, alcohol and nicotine addiction by neuroelectric therapy: analysis of results over 7 years*, Journal of Bioelectricity, 3(1-2), 193-221, 1984.
- [2] SMITH R.B. *Cranial Electrotherapy Stimulation: It's First Fifty Years, Plus Three: A Monograph*, Tate Publishing & Enterprises, 2007.
- [3] KOLANKO J., KUPIŃSKI L. *Przezskórna elektrostymulacja czaszkowa (CES) – zastosowania i rozwiązania techniczne*. Materiały XVIII Krajowej Konferencji Naukowej Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna, Gdańsk 2013, red. A. Bujnowski, J. Wtorek.

## Charakterystyka właściwości mechanicznych skóry na podstawie danych uzyskanych z modelu matematycznego

BARBARA KMIĘCIK<sup>1</sup>, ALEKSANDER BŁACHUT<sup>1</sup>, MAGDALENA BAJGROWICZ<sup>1</sup>, JERZY DETYNA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Mechaniki i Inżynierii Materiałowej, Wydział Mechaniczny, Politechnika Wroclawska, ul. Smoluchowskiego 25, Wrocław, e-mail autora: barbara.kmiecik@pwr.edu.pl, aleksander.blachut@pwr.edu.pl, magdalena.bajgrowicz@pwr.edu.pl, jerzy.detyna@pwr.edu.pl

*Słowa kluczowe: skóra, właściwości mechaniczne, modelowanie analityczne*

### 1. Wstęp

Inżynier spostrzega ciało ludzkie jako mechanizm przenoszący obciążenia. Składowymi biorącymi udział w tym procesie są tkanki miękkie, które zbudowane są z komórek, pozakomórkowej sieci naczyń oraz wody. Wiele badań mechanicznych wykazało, że analizowane materiały biologiczne są lepko-sprężyste, anizotropowe i charakteryzują się nieliniowym rozciąganiem [1], [2].

### 2. Główny cel modelowania

Przedstawienie w postaci równań matematycznych możliwego zachowania się tkanki miękkiej pod wpływem czynników mechanicznych ma ogromne znaczenie dla symulacji medycznych. Modelowanie analityczne i metoda elementów skończonych (MES) mogą odgrywać niepodważalną rolę w zrozumieniu reakcji mechanicznych skóry. Aktualne modele analityczne materiałów pochodzenia biologicznego są opisywane za pomocą skomplikowanych równań matematycznych, które nie odzwierciedlają w pełni jej rzeczywistej struktury i funkcji.

### 3. Istniejące modele matematyczne skóry

#### 3.1. Model charakteryzujący właściwości mechaniczne tkanek miękkich

Liu i Kerdok w swojej pracy starali się opisać zachowanie skóry pod wpływem dużych obciążeń, za pomocą metody wykorzystującej nacisk punktowy. Zaproponowany przez nich model matematyczny wymagał podania dwóch stałych materiałowych, które mogłyby odzwierciedlać zachowanie się warstw leżących niżej.

Wykorzystując program ABAQUS zdecydowali się oni zanalizować model osiowosymetrycznego sztywnego wgłębniaka, który powoduje deformację badanej tkanki miękkiej. Analizowany materiał biologiczny został dodatkowo opisany za pomocą dwóch parametrów materiałowych (włókna kolagenowe i elastyna), które znacząco wpływają na jego zachowanie podczas pomiaru. Warunki brzegowe zostały określone na podstawie hiperelastycznego modelu Arruda-Boyce. Uzyskane przez autorów wyniki są bardzo obiecujące i pozwalają na charakterystykę właściwości mechanicznych badanej tkanki [3].

#### 3.2. Model matematyczny skóry umożliwiający przewidywanie uszkodzeń termicznych skóry

Dai i Wang w swojej pracy zdecydowali się zamodelować czas termalnej relaksacji tkanki. Za jego pomocą możliwe jest przewidywanie uszkodzeń termicznych skóry w wyniku promieniowania czy ogrzewania. W modelu tym czas relaksacji termicznej jest bardzo długi i wynosi od 100 do 300 s. Dodatkowo skutki analizowanego promieniowania cieplnego na skórę zostały w nim opisywane za pomocą prawa Maxwella-Cattaneo w połączeniu z IV-tym prawem energetycznym. W analizowanym modelu tkanka jest rozważana w 3D jako trójwarstwowa struktura. Uzyskane przez autorów wyniki

są bardzo obiecujące i pokazują jak dodanie pewnych elementów strukturalnych (m.in. obecności naczyń krwionośnych) pozwala zwiększyć dokładność modelu [4].

### 3.3. Penetracja leku przez skórę

Przenikanie leku przez skórę może być bardzo szczegółowo opisywane za pomocą prostego schematu analitycznego. Równania charakteryzujące ten model opisują transport leku przez domeny lipidowe w stratum corneum. Przenikalność tej substancji jest opisana za pomocą równań charakteryzujących dyfuzję. Proces ten jest związany z objętością masową leku i jego możliwościami transportowymi przez domeny lipidowe, których objętość jest zmienna. Te dwa czynniki są ze sobą powiązane i prowadzą do otrzymania równania opisującego przepuszczalność w zakresie właściwości fizycznych [5].

## 4. Podsumowanie

Dzięki połączonym wysiłkom wielu badaczy, modelowanie matematyczne skóry stało się podstawowym elementem badań. W ciągu ostatnich kilku lat wiele odmiennych modeli tkanek miękkich zostało zaprezentowanych przez naukowców. Najważniejsze jest jednak to, że zdajemy osoby te zdają sobie sprawę z ich ograniczeń i z tego że cały czas konieczne jest ich aktualizowanie.

### Piśmiennictwo

- [1] FLYNN C., RUBIN M.B., AND NIELSEN P. *A model for the anisotropic response of fibrous soft tissues using six discrete fibre bundles*. International Journal for Numerical Methods in Biomedical Engineering, vol. 27, no. 11, pp. 1793-1811, Nov. 2011.
- [2] T. EL SAYED, MOTA A., FRATERNALI F., AND ORTIZ M. *A variational constitutive model for soft biological tissues*. Journal of Biomechanics, vol. 41, pp. 1458-1466, 2008.
- [3] LIU Y., KERDOK A., AND HOWE R. *A nonlinear finite element model of soft tissue indentation*. Med. Simul., 2004.
- [4] DAI W., WANG H., AND JORDAN P. *A mathematical model for skin burn injury induced by radiation heating*. International Journal of Heat and Mass Transfer, vol. 51, no. 23-24, 2008.
- [5] POTTS R.O. AND GUY R.H., *A Predictive Algorithm for Skin Permeability: The Effects of Molecular Size and Hydrogen Bond Activity*. Pharmaceutical Research, vol. 12, no. 11, pp. 1628-1633, 1995.

## Problemy parametryzacji bramkowania przed sygnałowego potencjałów wywołanych mózgu

WOJCIECH KORDECKI<sup>1</sup>, CEZARY SIELUŻYCKI<sup>2</sup>, PAWEŁ KORDOWSKI<sup>3</sup>, ARTUR MATYSIAK<sup>4</sup>,  
LECH KIPÍŃSKI<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Państwowa Wyższa Szkoła Zawodowa im. Witelona w Legnicy, ul. Sejmowa 5A, 59-220 Legnica, wojciech.kordecki@pwsz-legnica.eu

<sup>2</sup>Normal and Abnormal Motor Control Team, ICM Brain and Spine Institute, Sorbonne University, Pierre-and-Marie-Curie University (Paris 6), INSERM UMR1127, CNRS, UMR7225, Hôpital Pitié Salpêtrière, 47 bd de l'Hôpital, 75013 Paris, France, sieluzyc@o2.pl

<sup>3</sup>Uniwersytet Warszawski, Wydział Fizyki, Instytut Fizyki Doświadczalnej, Paweł.Kordowski@fuw.edu.pl

<sup>4</sup>Leibniz Institute for Neurobiology, Special Lab Non-invasive Brain Imaging, Brenneckestraße 6, 39118 Magdeburg, Germany, amatysia@lin-magdeburg.de

<sup>5</sup>Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Katedra i Zakład Patofizjologii oraz Dolnośląski Szpital Specjalistyczny im. T. Marciniaka we Wrocławiu, Oddział Neurologii z Pododdziałem Udarowym, lech.kipinski@umed.wroc.pl

**Słowa kluczowe:** potencjały wywołane, bramkowanie, multivariate matching pursuit

### 1. Wstęp

Bramkowanie przed sygnałowe (ang. sensory gating) jest fizjologicznym zjawiskiem zachodzącym w mózgu bezwiednie w czasie przetwarzania informacji o charakterze nadmiarowym. Polega ono na hamowaniu przetwarzania redundantnych lub niepotrzebnych bodźców spośród wszystkich docierających do mózgu bodźców. W badaniu potencjałów wywołanych mózgu bramkowanie objawia się zmniejszeniem amplitudy i zatarciem morfologii załamków potencjału bramkowanego w porównaniu z odpowiedzią mózgu na bodziec bramkujący. Wykorzystuje się do tego celu stymulację parą jednakowych bodźców generowanych w krótkim odstępie, aby przetwarzanie pierwszego, bramkującego bodźca przez sieć neuronalną mózgu wpływało na przetwarzanie bodźca drugiego, bramkowanego. Typowy obraz elektrofizjologiczny bramkowania wykazuje osłabienie odpowiedzi mózgu na bodziec bramkowany poprzedzony bodźcem bramkującym.

Obecny stan wiedzy umożliwia opis bramkowania potencjałów wywołanych w oparciu o parametry elektrofizjologiczne opracowane dla danych uśrednionych. Zwykle bada się załamek P50 odpowiedzi słuchowej wywołanej bodźcem typu klik. Zaburzenia bramkowania towarzyszą wielu patologiom, w tym chorobom psychicznym. Zjawisko bramkowania jest też przedmiotem badań neurobiologicznych, ponieważ ma związek z procesami uwagi oraz zapamiętywaniem informacji.

### 2. Materiał i metody

W pracy wykorzystano rzeczywiste dane pomiarowe EEG rejestrowane w warunkach wielokrotnej stymulacji parą jednakowych bodźców dźwiękowych typu klik. W przeciwieństwie do standardowych metod parametryzacji bramkowania analizowano dane nieuśrednione.

Sprawdzając bramkowanie do osłabienia odpowiedzi wywołanej bodźcem bramkowanym w stosunku do poprzedzającej ją odpowiedzi bodźcem bramkującym, można założyć, że kształt obu odpowiedzi jest podobny, a różnice dotyczą „siły” (np. amplitudy) odpowiedzi bez istotnego wpływu na latencje. Podobieństwo kształtu obu odpowiedzi sugeruje, że można je opisać za pomocą tych samych funkcji, odzwierciedlających rozkład ich energii w czasie. Do opisu takich sygnałów można posłużyć się metodą *multivariate matching pursuit* (MMP), tak aby każde przybliżenie sygnału było warunkowane maksymalizacją pewnej miary aproksymacji pary odpowiedzi.

Sygnal  $x$  jest najlepszym dopasowaniem funkcji z określonego słownika  $D$  – zwykle funkcji Gabora,

$$g_{\lambda_i}(t) = K(\lambda) e^{-\pi\left(\frac{t-u}{s}\right)^2} \sin(\omega(t-u) + \phi), \quad (1)$$

gdzie  $\lambda = \{u, \omega, s, \phi\}$  – do wielowymiarowych danych. Podstawowa idea polega na reprezentacji sygnału  $x$  z przestrzeni Hilberta  $H$  jako ważonej sumy funkcji  $g_{\lambda_i}$  (zwanymi atomami) ze słownika  $D$ . W praktyce używane jest tylko skończone rozwinięcie:

$$x \approx \sum_{n=0}^{N-1} \langle R^n x, g_{\lambda_n} \rangle g_{\lambda_n}. \quad (2)$$

### 3. Wyniki

W referacie przedstawione zostaną wyniki aproksymacji danych pomiarowych metodą MMP w dwóch wariantach: ze stałą i ze zmienną fazą. Pokazane zostaną mapy energii sygnału bramkującego i bramkowanego w dziedzinie czasu i częstotliwości oraz omówione będą trudności ich interpretacji.

### 4. Dyskusja

Należy zauważyć, że przy badaniu potencjałów uśrednionych identyfikacja załamka P50 często jest trudna, ponieważ u części osób jest on słabo widoczny lub nieobecny oraz cechuje się zmienną (w zakresie 30-80 ms) latencją. Ponadto analiza uśrednionych potencjałów wywołanych powoduje utratę informacji o zmianach stanu funkcjonalnego mózgu w czasie badania przeprowadzanego w warunkach wielokrotnej stymulacji.

Proponowana metoda parametryzacji redukuje te problemy. Pozwoli także wyeliminować wady związane ze standardową parametryzacją zjawiska bramkowania. Dotychczas wykorzystuje się jako miary różnice amplitud lub stosunek amplitud potencjału bramkowanego i bramkującego. Oba parametry mają słabe strony. Aktualne badania wykazują, że niezawodność dla różnicy amplitud wynosi do 72%, zaś dla ilorazu amplitud do 44%, przy czym silnie zależy ona od metody wyznaczania amplitudy załamka. Wyznacza się ją albo jako wartość międzyszczytową (ang. peak-to-peak, PP), która jest wrażliwa na zakłócenia, albo jako odległość od linii bazowej (ang. peak-to-baseline, PB), która dla potencjału bramkującego i bramkowanego nie musi być stała, a algorytmy jej korekcji wprowadzają do obliczeń trudne do oszacowania błędy. Jeżeli korzysta się z metody PB, a szczyt załamka odpowiedzi bramkowanej znajduje się poniżej linii bazowej (co, jak wynika z naszej praktyki, jest częstym zjawiskiem), to taki przypadek należy wykluczyć z analizy, co z powodów praktycznych jest niepożądane. Z drugiej strony wartość różnicy amplitudy silnie zależy od bezwzględnej wielkości potencjału wywołanego, która jest bardzo zmienna i podlega dużym indywidualnym wahaniom (np. u jednej zdrowej osoby może osiągać duże wartości, a u innej zdrowej stosunkowo małe).

Autorzy sądzą, że proponowana metoda opisu bramkowania potencjałów wywołanych wprowadzi nową jakość w opisie tego zjawiska, a także przyczyni się do lepszego poznania neurofizjologii i zwiększenia przydatności naukowej pomiarów.

### Piśmiennictwo

- [1] CROMWELL H., R. MEARS R., WAN L., AND BOUTROS N. *Sensory gating: A translational effort from basic to clinical science*. Clinical EEG and Neuroscience, 39(2):69–72, 2008.
- [2] FUERST D., GALLINAT J., AND BOUTROS M. *Range of sensory gating values and test-retest reliability in normal subjects*. Psychophysiology, 44:620–626, 2007.
- [3] DALECKI A., CROFT R.J., JOHNSTONE S.J. *An evaluation of P50 paired-click methodologies*. Psychophysiology, 2011, 48, 1692–1700.

## Sztuczna zastawka żylna – problem do rozwiązania?

**BENITA KOSTRZEWA<sup>1</sup>, ARLETA STASZUK<sup>2</sup>, EWA KARUGA-KUŹNIEWSKA<sup>1</sup>, ZBIGNIEW RYBAK<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Zakład Chirurgii Eksperymentalnej i Badania Biomateriałów, ul. Poniałowskiego 2, Wrocław 50-326, benita.kostrzewa@gmail.com

<sup>2</sup>Akademia Górniczo-Hutnicza im. S. Staszica w Krakowie, Katedra Automatyki i Inżynierii Biomedycznej, al. Mickiewicza 30, Kraków 30-059

**Słowa kluczowe:** implanty, metody numeryczne, przewlekła niewydolność żylna, sztuczna zastawka żylna

### 1. Wstęp

Przewlekła niewydolność żylna (PNŻ) jest chorobą cywilizacyjną XXI wieku. Podwyższone wartości ciśnienia w naczyniach żylnych kończyn dolnych obserwowane podczas PNŻ prowadzą do uszkodzeń ścian naczyń oraz zastawek żylnych. Niewydolne zastawki żylnie powodują zastój i nie zapobiegają refleksowi krwi żyłnej, przyczyniając się do dalszego rozwoju choroby. Metody leczenia PNŻ można podzielić na chirurgiczne oraz niechirurgiczne [1].

Nowym trendem w leczeniu niewydolności układu żylnego kończyn dolnych jest zastępowanie uszkodzonych zastawek żylnych sztucznymi wszczepami. Na rynku medycznym brak jest komercyjnie dostępnej sztucznej zastawki żyłnej. Dotychczas zaprojektowane modele są wciąż w fazie badań biologicznych *in vivo*.

Zastawka żylna w naczyniu niezmiennym, to fałd błony wewnętrznej pokryty śródbłonkiem. Najczęściej obserwuje się budowę dwupłatkową, trójpłatkową bądź jednopłatkową [1]. Projektowanie i konstrukcja sztucznej zastawki żyłnej jest problematyczna. Od połowy XX wieku z powodzeniem wykorzystywane są w kardiochirurgii sztuczne zastawki, jednak są to wyroby diametralnie różne od projektowanych zastawek żylnych. Żyła udowa – miejsce docelowe implantacji projektowanego wyrobu medycznego, jest naczyniem o trzykrotnie mniejszej średnicy w stosunku do średnicy aorty w miejscu standardowego wszczepiania sztucznej zastawki aortalnej.

W ramach projektu przeprowadzono badania nad sztuczną zastawką żylną oparte na modelowaniu numerycznym. Wykorzystanie metod MES i CFD pozwala na wielokrotne powtarzanie testów modelowanych wyrobów bez konieczności wykonywania fizycznych prototypów i badań *in vivo*.

### 2. Materiał i metody

W środowisku CAD opracowano trójwymiarowy model sztucznej zastawki żyłnej. Zastawka zbudowana jest z trzech płatków umieszczonych na stencie. Wybór kształtu oparto na występowaniu anatomicznych trójpłatkowych zastawek żylnych oraz popularności konstrukcji trójpłatkowej w sztucznych zastawkach serca.

Geometrię zaprojektowanej sztucznej zastawki przebadano z wykorzystaniem modelowania interakcji ciała stałe/ciecz (FSI), będącego połączeniem symulacji wykonywanych za pomocą obliczeniowej mechaniki płynów (CFD) dla cieczy oraz metody elementów skończonych (MES) dla ciała stałego. W badaniu zastosowano pojedynczy model naczynia krwionośnego o średnicy żyły udowej.

### 3. Wyniki

Modelowanie numeryczne wykorzystane zostało do doboru kształtu płatków zastawki, umożliwiającego szczelne domknięcie światła naczynia i stawienie oporu cofającej się krwi. Pierwszy

prototyp był trójpłatkową zastawką umieszczoną na pierścieniu. Ze względu na wysokie ryzyko wykrzepiania krwi wokół pierścienia zdecydowano o zamianie pierścienia na stent.

Wykonano testy przepływu krwi przez naczynie przy różnych stopniach otwarcia zastawki (100%, 75%, 50%, 25%). Według danych dostępnych w literaturze średni przepływ krwi w żyłę udowej wynosi 13,87 cm/s [2]. Wartość ta została zastosowana jako parametr wejściowy dla przeprowadzonych symulacji. Ciecz opisano za pomocą modelu Carreau – jednego z lepiej odwierciadających zachowanie krwi.

Symulacje wykonane dla uzyskanej geometrii pozwoliły na lokalizację miejsc stagnacji i potencjalnego wykrzepiania krwi. Obszary takie występują w okolicach połączeń płatków oraz środkowych części płatków w miejscach mocowania do stentu. Ukazały także miejsca płatków, w których występują największe naprężenia.

#### 4. Dyskusja

Zastosowanie pojedynczego modelu naczynia krwionośnego zamiast całego układu żylnego kończyn dolnych pozwoliło na zmniejszenie czasu realizacji eksperymentów numerycznych oraz przebadanie różnych modyfikacji zastawki. Przeprowadzone symulacje pozwoliły na wizualizację przepływu krwi z wykorzystaniem linii prądu, obszarów potencjalnego wykrzepiania krwi wokół zastawki oraz określenie naprężeń płatków. Podobne obserwacje poczyniono w pracy Józwicka i wsp., jednakże autorzy w badaniach wykorzystali trójpłatkowy model zastawki sztucznej komory serca, a jako płyn testowy stosowali ciecz nienewtonowską [3]. W badaniach własnych wykorzystano model cieczy o właściwościach zbliżonych do krwi, co skutkowało uzyskaniem wyników wierniej odwierciadających układ żywego organizmu.

W projekcie przebadano model przy różnych stopniach otwarcia zastawki. Dokonano analizy różnicy ciśnienia na wlocie i wylocie fragmentu modelowanego naczynia bez zastawki oraz po jej umieszczeniu. W miarę zbliżania się płatków zastawki ciśnienie malało. Poczynione obserwacje pozwoliły oszacować wpływ implantowanej zastawki na zmniejszenie ciśnienia w świetle żyły. Podobne różnice ciśnień odnotowano w badaniach Józwicka i wsp. oraz Moszkowskiego i wsp. [3,4]. Obserwowana różnica ciśnień w badanych układach odpowiada stanowi faktycznemu w naczyniach żylnych z wydolnymi zastawkami. Przy każdej wykonanej symulacji sprawdzano miejsca potencjalnego wykrzepiania krwi. W badaniach prowadzonych w latach 2011 przy współpracy z FRK i AGH, z wykorzystaniem modelu zastawki sercowej Medtronic Hall zaobserwowano wykrzepianie krwi na powierzchni dysku oraz na pierścieniu zastawki [4]. W odniesieniu do ww. badań, projektując zastawkę żylną zwrócono szczególną uwagę na problem wykrzepiania w okolicy pierścienia. W opracowanej zastawce wyeliminowano pierścień zastępując go stentem, przez co zmniejszono liczbę miejsc potencjalnego wykrzepiania krwi.

Opracowany model zastawki żylniej trójpłatkowej należy również poddać analizie z wykorzystaniem dwukierunkowego sprzężenia między strukturą ciała stałego, a przepływem cieczy (Two-way FSI) w celu pełnego określenia interakcji zastawka – krew krążąca.

#### Piśmiennictwo

- [1] KOSTRZEWA B., RYBAK Z. *Sztuczne zastawki żyłne*. Polimery w Medycynie, 2013,43(3):175-181.
- [2] FRONEK A., CRIQUI M.H., DENENBERG J., LANGER R.D. *Common femoral vein dimensions and hemodynamics including Valsalva response as a function of sex, age, and ethnicity in a population study*. J Vasc Surg, 2001,33(5):1050-1056.
- [3] JÓZWIK K., OBIDOWSKI D., REOROWICZ P., KŁOSIŃSKI P., WITKOWSKI D., WAJMAN T., BUJOK W., KAPIS A., KUSTOSZ R. *Wykorzystanie metod numerycznych w konstrukcji układu przepływowego pozaustrojowej pompy wspomagania serca ReligaHeart EXT [w] Polskie protezy serca, opracowanie konstrukcji, badania kwalifikacyjne, przedkliniczne i kliniczne. Program Polskie Sztuczne Serce, Epigraf, Zabrze 2013, 78-128.*
- [4] MOSZKOWSKI T., JAWOREK M., KOSTRZEWA B., LALIK K., DARŁAK M., ALTYNTSEV J., KUSTOSZ R., *Flow analysis within mechanical heart valve – Medtronic Hall – and validation of results by numerical modeling*. Journal of Medical Informatics & Technologies, 2011,17:295-302.

## Bezpieczna pozycja za kierownicą samochodu osobowego

OLGA KUWALDINA<sup>1</sup>, OLEH RYBAK

<sup>1</sup>Lwowski Państwowy Uniwersytet Kultury Fizycznej, Lwów, ul. Kościuszki 11, rybakrally@yandex.ru

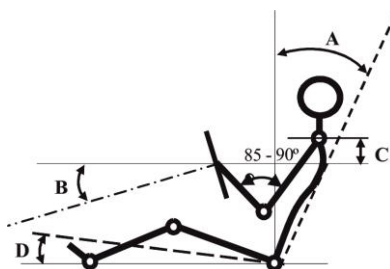
**Słowa kluczowe:** *samochód, bezpieczeństwo, kierowca, pozycja za kierownicą*

### 1. Wstęp

Prawidłowa pozycja ciała za kierownicą samochodu, dostosowana do indywidualnych antropometrycznych parametrów kierowcy, jest bardzo ważna dla bezpieczeństwa ruchu drogowego. Prawidłowa pozycja ciała daje kierowcy możliwość otrzymania pełnej informacji o sytuacji na drodze, „zachowaniu się” samochodu, oraz szybkiej reakcji na zachodzące zmiany. Ponadto jazda w takiej pozycji jest mniej uciążliwa dla organizmu, zmniejszając statyczne i dynamiczne przeciążenia oraz zmęczenie, co też istotnie podwyższa bezpieczeństwo kierowcy, pasażerów oraz innych użytkowników dróg. Prawidłowa pozycja kierowcy zmniejsza również skutki sytuacji awaryjnych, chroniąc najcenniejsze – zdrowie i życie człowieka [1]. Bogate wieloletnie doświadczenie kierowców rajdowych w tej dziedzinie bardzo rzadko wykorzystują instruktorzy jazdy i zwykli użytkownicy dróg publicznych, chociaż może to zwiększyć bezpieczeństwo ruchu drogowego [2, 3].

### 2. Materiał i metody

W ciągu ostatnich dziesięciu lat zbadano parametry pozycji kierowców rajdowych za kierownicą (ryc. 1) 18 historycznych samochodów wyprodukowanych w latach 1982-1996 r. [2,4], 32 „rajdówek”, które uczestniczyły w Mistrzostwach świata 2002-2004 i 2014 r., 42 samochodów rajdowych podczas Mistrzostw Ukrainy 2003-2004 r. [1] oraz 14 samochodów podczas Pucharu Ukrainy 2014 r. [5].



Ryc. 1. Główne parametry pozycji kierowcy w samochodzie osobowym

Wnętrza samochodów były fotografowane podczas oczekiwania załóg przed wjazdami do stref kontroli czasu.

### 3. Wyniki

W ciągu ostatnich 30 lat pozycja kierowcy w rajdowym samochodzie uległa istotnym zmianom. Nachylenie oparcia siedzenia A ( $23,0^\circ$ ) zmniejszyło się prawie do pionowego ( $4,9^\circ$ ), oś kierownicy, nachylona pod kątem  $32,3^\circ$  (B), istotnie przybliżyła się do pozycji poziomej (do kąta  $14,8^\circ$ ). Środek kierownicy uniósł się do góry na  $5,5$  cm (prawie do poziomu środków stawów ramiennych). Jedynie pozycja podstawy siedzenia nie uległa istotnej zmianie.

**Tab. 1.** Ewolucja kinematycznych parametrów pozycji kierowców za kierownicą samochodów rajdowych w ciągu ostatnich trzydziestu lat

Nr	Lata, samochody	Parametry pozycji za kierownicą			
		A [°]	B [°]	C [cm]	D [°]
1	1982-1986 r., samochody historyczne ([4]) – 9 sam.	23,00	32,30	7,78	7,30
2	1992-1996 r., samochody historyczne ([4]) – 9 sam.	18,60	30,10	7,89	7,00
3	2003-2004 r., Mistrzostwa świata ([1]) – 14 sam.	13,90	-	5,86	-
4	2003-2004 r., Mistrzostwa Ukrainy ([1]) – 42 sam.	12,60	25,40	6,64	4,80
5	2014 r., Puchar Ukrainy ([5]) – 14 sam.	9,80	23,90	4,93	0,90
6	Model prognostyczny parametrów pozycji w 2019 r. ([4])	7,46	21,95	4,50	0,72
7	2014 r., Mistrzostwa Świata – 18 sam.	4,86	14,78	2,12	1,33

#### 4. Dyskusja

Model prognostyczny parametrów pozycji kierowcy w samochodzie rajdowym, zaproponowany w pracy Hradusov i wsp. [4], nie odpowiada parametrom sprawdzonej na zawodach najwyższej rangi pozycji najlepszych kierowców rajdowych świata. Zgodnie z zaleceniami autorów [6], nie kierowca powinien dopasować własną pozycję do konstrukcji samochodu, a przeciwnie. Dlatego najpierw ustawiamy podstawę siedzenia naszego samochodu poziomo (pochylenie do tyłu na kąt 1-2°) a następnie posuwając siedzenie do przodu lub do tyłu, wybieramy pozycje, w której stopami opartymi na podłodze, możemy naciskać na pedały, nie prostując nóg w stawach kolanowych. W szczególnych przypadkach wskazane jest, by przymocować do podłogi dodatkowa płytę by przybliżyć stopy do pedałów. Następnie maksymalnie prostujemy oparcie siedzenia, a w końcu regulujemy kierownicę tak, aby była jak najwyżej i jak najbardziej poziomo. Kąt w stawach łokciowych (ręce w pozycji 9:30-14:30 godz. zegara) powinien wynosić 85-90°. Dla osób z krótszymi rękami wskazane są specjalne przekładki, wydłużające oś kierownicy.

Dla wielu kierowców (i nie tylko amatorów) taka pozycja nie od razu wyda się wygodną, ale właśnie ona gwarantuje bezpieczeństwo podczas jazdy samochodem [2].

#### Piśmiennictwo

- [1] РYBAK O. *Безпека змагальної діяльності в автомобільному спорті: монографія* / O. Ю. Рибак. – Л.: ЛДУФК, 2013. – 420 с., іл.
- [2] ZASADA S. *Szerokiej drogi: doskonalenie techniki jazdy* / Sobiesław Zasada. – Bielsko-Biala: Wydawnictwo Studio STO, 2009: 198.
- [3] RYBAK O. *Udoskonalenie aktywnego bezpieczeństwa zawodów, jako czynnik dalszego rozwoju sportu samochodowego*. Wychowanie Fizyczne i Sport, 2002, T. XLVI, cz. 1.: 321.
- [4] HRADUSOV V., VYNOGRADSKYY B., RYBAK O. *Еволюція робочої пози водіїв за кермом ралійних автомобілів* / Спортивна наука України: електронне видання. – 2014. – №6 (64). – С. 8–12 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://sports-science.ldufk.edu.ua/index.php/snu/article/view/181>
- [5] VYNOGRADSKYY B., MUZYKA F., RYBAK L. *Кінематична модель робочої пози спортсменів-ралістів*. Вісник Чернігівського національного педагогічного університету. Серія: Педагогічні науки. Фізичне виховання та спорт. – Чернігів, 2014. – Вип. 118. – С. 31–34.
- [6] ROSS B. *Speed secrets / Ross Bentley*. – USA: Motor Books International, 1998: 160.

## Związek między wapnieniem tętnic a zawartością głównych białek budulcowych

ALEKSANDRA KUZAN<sup>1</sup>, AGNIESZKA CHWILKOWSKA<sup>1</sup>, JERZY WIŚNIEWSKI<sup>1</sup>,  
MAGDALENA KOBIELARZ<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, ul. Chalubińskiego 10, 50-368 Wrocław, aleksandra.kuzan@gmail.com

<sup>2</sup>Politechnika Wroclawska, Wydział Mechaniczny, Katedra Inżynierii Biomedycznej, Mechatroniki i Teorii Mechanizmów, ul. Łukasiewicza 7/9, 50-371 Wrocław, magdalena.kobielarz@pwr.wroc.pl

<sup>3</sup>Wojewódzki Szpital Specjalistyczny we Wrocławiu, Ośrodek Badawczo-Rozwojowy, ul. Kamieńskiego 73a, 51-124 Wrocław

**Słowa kluczowe:** *kalcyfikacja tętnic, miażdżycza, kolagen, elastyna.*

### 1. Wstęp

Wapnienie tętnic jest patologicznym zjawiskiem związanym najczęściej z cukrzycą bądź miażdżycą. Zmiany te istotnie wpływają na właściwości biomechaniczne tętnic, sprawiając, że naczynia te są sztywniejsze i bardziej kruche, mniej zdolne do plastycznego odkształcania się pod wpływem siły ścinającej warunkowanej pulsacyjnym przepływem krwi. Powstające w przebiegu tego procesu depozyty wapnia złożone są głównie z hydroksypapatytu - minerału budującego kości. Postuluje się, że wapnienie tętnic może mieć wiele innych cech wspólnych z mineralizacją kości [1]. W niniejszej pracy skupiono się na analizie składu głównych białek macierzy zewnątrzkomórkowej w tętnicach objętych kalcyfikacją w porównaniu do tych gdzie nie obserwuje się wapnienia. Badaniem objęto typowe białka budujące tkankę łączną tj. elastynę, fibrylarny kolagen typu I i III oraz kolagen błon podstawnych typu IV, jak również kolagen charakterystyczny dla chrząstki - typu II oraz aminokwas markerowy dla kolagenu – hydroksyproliny, a także prolinę.

### 2. Materiał i metody

Materiałem badawczym było 80 tętnic pobranych post mortem w Zakładzie Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego od ludzi zmarłych śmiercią nagłą (nr pozwolenia komisji bioetycznej 220/2010). Podzielono je na dwie części, tj. takie, w której makroskopowo widoczne były ogniska kalcyfikacji oraz tętnice bez widocznych zwapnień. Dla osiągnięcia zaplanowanego celu zastosowano trzy metody badawcze: ELISA (ilościowa analiza zawartości kolagenu typu I, II, III, IV oraz elastyny w homogenatach tętnic), metoda immunohistochemiczna (jakościowa analiza zawartości i lokalizacji kolagenu typu I, II, III, IV oraz elastyny w tętnicach) oraz chromatografia cieczowa sprzęgnięta ze spektrometrią mas (ilościowa analiza zawartości proliny i hydroksyproliny w hydrolizatach tętnic). Różnice pomiędzy dwoma grupami próbek analizowano przy pomocy testu Manna-Whitney'a.

### 3. Wyniki

Istotne statystycznie zależności stwierdzono pomiędzy kalcyfikacją a zawartością kolagenu typu II (ilość tego białka jest istotnie większa w tętnicach objętych kalcyfikacją), stosunkiem ilości kolagenu typu I do II (osoby z kalcyfikacją mają istotnie niższy ten parametr), stosunkiem ilości kolagenu typu II do III (osoby z kalcyfikacją mają istotnie wyższy ten parametr), stosunkiem ilości kolagenu typu II do IV (osoby z kalcyfikacją mają istotnie wyższy ten parametr), proliną (ilość proliny jest istotnie niższa w grupie z kalcyfikacją) oraz stosunkiem ilości proliny do hydroksyproliny (istotnie niższy w grupie z kalcyfikacją). Barwienia immunohistochemiczne potwierdzają obecność tego białka w próbkach aort, nie zaobserwowano jednak bezpośredniego związku między lokalizacją

i intensywnością wybarwienia preparatów a stopniem zaawansowania miażdżycy i występowaniem depozytów wapnia.

#### 4. Dyskusja

Z uzyskanych danych można wywnioskować, że kolagen typu II- jego ilość, a także stosunek jego ilości do innych głównych białek macierzy zewnątrzkomórkowych, jest istotny w procesie kalcyfikacji. Na podstawie tych badań, a także tych przeprowadzonych przez Qiao i wsp. [2] czy Shanahan i wsp. [3], można przypuszczać, że kalcyfikacja, przynajmniej w niektórych przypadkach, przebiega według mechanizmu tzw. kostnienia endochondralnego. Jest to jednak teoria dyskutowana w literaturze przedmiotu, przeciw której świadczą wyniki np. Aiger i wsp [4]. W celu weryfikacji tej teorii wymagane są następne liczne badania. Jest to istotne zagadnienie, gdyż dokładne poznanie mechanizmu kalcyfikacji pozwoliłoby na opracowanie nowych strategii terapeutycznych w leczeniu chorób sercowo- naczyniowych [5].

**Źródło finansowania:** Publikacja jest częścią projektu “Wrovasc- Zintegrowane Centrum Medycyny Sercowo-Naczyniowej”, współfinansowanego przez Europejski Fundusz Rozwoju Regionalnego, w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka na lata 2007-2013 realizowanego w Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym we Wrocławiu, Ośrodku Badawczo-Rozwojowym.

#### Piśmiennictwo

- [1] DEMER L.L., TINTUT Y. *Vascular calcification: pathobiology of a multifaceted disease*. *Circulation*, 2008, 117(22):2938-2948.
- [2] QIAO J.H., MERTENS R.B., FISHBEIN M.C., GELLER S.A. *Cartilaginous metaplasia in calcified diabetic peripheral vascular disease: morphologic evidence of enchondral ossification*. *Hum Pathol.*, 2003, 34(4):402-407.
- [3] SHANAHAN C.M., CARY N.R., SALISBURY J.R., PROUDFOOT D., WEISSBERG P.L., EDMONDS M.E. *Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Monckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification*. *Circulation*, 1999, 100:2168–2176.
- [4] AIGNER T., NEUREITER D., CÂMPEAN V., SODER S., AMANN K. *Expression of cartilage-specific markers in calcified and non-calcified atherosclerotic lesions*. *Atherosclerosis*, 2008, 196(1):37-41.
- [5] MAGNE D., JULIEN M., VINATIER C., MERHI-SOUSSI F., WEISS P., GUICHEUX J. *Cartilage formation in growth plate and arteries: from physiology to pathology*. *Bioessays*, 2005, 27(7):708-716.

## Optimalizacja metody ekstrakcji doksorubicyny z matryc biologicznych

MACIEJ ŁUKAWSKI<sup>1</sup>, MAGDALENA PRZYBYŁO<sup>1,2</sup>, MAREK LANGNER<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Politechnika Wrocławska, Wyb. Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław, e-mail: maciej.lukawski@pwr.edu.pl

<sup>2</sup>Lipid Systems Sp. z o.o., ul. Duńska 9, 54-427 Wrocław

**Słowa kluczowe:** doksorubicyna, matryce biologiczne, SPE, spektrofotometria

### 1. Wstęp

Określenie biodostępności i profilu farmakokinetycznego substancji aktywnej jest niezbędnym etapem każdej pracy nad nowym lekiem, lub zmodyfikowanym nośnikiem znanej cząsteczki [1]. Właściwe określenie tych parametrów wymaga skutecznych metod oznaczania stężenia substancji w matrycach biologicznych [2]. Metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej zapewniają wysoką precyzję i dokładność analiz, jednak w pracach rozwojowych często pojawia się konieczność zastosowania tanich, szybkich i dokładnych metod analitycznych, w celu obniżenia kosztów i zwiększenia wydajności.

Ekstrakcja do ciała stałego jest często stosowaną metodą umożliwiającą wychwycenie analizowanej substancji z tkanek, jednak wymaga stosowania standardu wewnętrznego, względem którego oznacza się stężenie analitu [3]. W metodach chromatograficznych, w których następuje rozdział składników analizowanej mieszaniny, stosowanie standardu wewnętrznego jest zasadne, jednak w przypadku metod niespecyficznych, takich jak analizy spektroskopowe, konieczne jest wyeliminowanie substancji wpływających na uzyskane widmo. Przystosowanie metod ekstrakcji z ciała stałego do zastosowania w celu oznaczenia stężenia doksorubicyny z krwi, za pomocą spektroskopii absorpcyjnej, wymaga rewizji i adaptacji istniejących procedur.

W pracy wykonano serie analiz stężenia substancji aktywnej farmaceutycznie – chlorowodoru doksorubicyny – z próbek osocza ludzkiego, w oparciu o przygotowane na potrzeby doświadczenia procedury ekstrakcji i analizy.

### 2. Materiały i metody

#### 2.1. Materiały

Chlorowodorek doksorubicyny (Synbias Pharma, Ukraina), bufor PBS (Sigma-Aldrich, USA), krew ludzka (przekazana do celów badawczych przez PCK), kolumny do ekstrakcji SOLA SPE (Thermo Scientific, USA). Roztwory chlorowodoru doksorubicyny, oraz rozcieńczenia wolnej i liposomowej doksorubicyny przygotowano w buforze PBS pH = 7,4. Osocze oddzielono od krwi według standardowych procedur wirowania próbek krwi.

#### 2.2. Metody

Jako metodę ekstrakcji analizowanej substancji wykorzystano kolumny SPE (Solid Phase Extraction), modyfikując procedurę elucji i przygotowania roztworu do oznaczenia stężenia. Stężenie substancji oznaczono za pomocą spektrofotometru Evolution1000 (Thermo Scientific, USA). Widma zbierano w zakresie 400-600 nm, co 1 nm z prędkością 3800 nm/min. Pomiarów wykonano w kuwetach kwarcowych z drogą optyczną długości 1 cm. Miarą stężenia doksorubicyny w roztworze była absorbancja przy długości fali 495 nm.

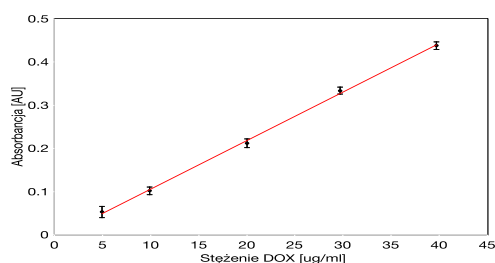
### 3. Wyniki

Porównano odzysk analizowanej substancji względem próbki wyjściowej dla dwóch protokołów ekstrakcji, uzyskane wyniki zestawiono w tabeli 1.

**Tab. 1** Kryteria jakości oznaczania stężenia surowca dla testowanych procedur

Metoda	%RSD	% Odzysku
1	9,76	86,6 ± 8,5
2	2,04	127,0 ± 5,9

Wykonano krzywą kalibracyjną stężenia dokсорubicyny w roztworach, wykorzystując roztwory wzorcowe w PBS i poddając je procedurze ekstrakcji. W oparciu o absorbancję roztworów otrzymanych po ekstrakcji, wyznaczono liniową zależność  $A_{495}(C_{dox})$ , przedstawioną na wykresie 1.



**Ryc. 1.** Krzywa kalibracyjna stężenia dokсорubicyny

Zmierzone stężenie związku po ekstrakcji w oparciu o uzyskaną krzywą kalibracyjną, otrzymano następujące parametry jakości oznaczania: %RSD = 2,74, %Odzysku = 102,7 ± 2,8.

### 4. Dyskusja

Metoda SPE ekstrakcji substancji czynnych z matryc biologicznych może być wykorzystana do przygotowania próbek z przeznaczeniem do analiz spektrofotometrycznych. Odpowiednie przystosowanie protokołu ekstrakcji umożliwia pominięcie konieczności stosowania standardu wewnętrznego, co umożliwia zastosowanie prostej metody detekcji stężenia substancji w postaci pomiaru absorbancji roztworu dla wybranej długości fali. Metoda ekstrakcji i detekcji ma zastosowanie przy badaniach oddziaływania substancji z elementami morfotycznymi krwi, oraz skuteczności i stabilności nośników leku.

**Źródła finansowania:** Grant NCBiR Demonstrator+, nr. WND-DEM-1-027/00

### Piśmiennictwo

- [1] LIM S. B., et. Al. *Improvement of drug safety by the use of lipid-based nanocarriers*. Journal of Controlled Release, 2012,163(1): 34-45.
- [2] REN S. *Comparison of pharmacokinetics, tissue distribution and pharmacodynamics of liposomal and free doxorubicin in tumour-bearing mice following intratumoral injection*. The Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2014,66(9): 1231-9.
- [3] YAMAMOTO E., et. Al. *Direct, simultaneous measurement of liposome-encapsulated and released drugs in plasma by on-line SPE-SPE-HPLC*. Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2011,879(30): 3620-5.

## Wykorzystanie peptydów w procesie tworzenia nowych biomateriałów

MARTA MACIEJEWSKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Politechnika Wroclawska, Wydziałowy Zakład Biochemii, Wyb. Wyspiańskiego 27,  
maciejewska0405@gmail.com

**Słowa kluczowe:** biomineralizacja, biomateriały, Starmaker

### 1. Wstęp

Biominaerały to kryształy powstające pod biologiczną kontrolą. Ze względu na właściwości biominaerałów, takie jak wysoka elastyczność i odporność na ścieranie, mogą one znaleźć liczne zastosowania w projektowaniu nowych materiałów dla przemysłu i medycyny. Wiele materiałów ceramicznych, syntetycznych polimerów czy naturalnych biopolimerów, bada się pod kątem tworzenia ograniczono-mineralnych hybryd naśladowujących biominaerał [1]. Biomateriały inspirowane biominaerałami znajdują zastosowanie w implantologii kości czy zębów [2]. Służą nie tylko, jako materiał zastępczy, ale posiadają zdolność indukcji naprawy uszkodzonej tkanki. Wiedza dotycząca biomineralizacji, pozwoliła na stworzenie tzw. *smart materials*, które mogą służyć do selektywnego dostarczania i uwalniania leków [1]. Na szczególne zainteresowanie zasługują prace dotyczące samoorganizujących się peptydów, na których dochodzi do procesów mineralizacyjnych i tym samym możliwa jest odbudowa kości czy szkliwa [3]. Wiedza zdobyta na temat białek zaangażowanych w biomineralizację, jest niezbędna przy tworzeniu biomateriałów bazujących na aktywnych peptydach.

Białko Starmaker (Stm) bierze udział w biomineralizacji otolitów, czyli kryształów węglanu wapnia w uchu Danio pręgowanego. W sekwencji aminokwasowej Stm, można wyróżnić regiony, takie jak tandemowe powtórzenia i fragment bogaty w reszty kwasu asparaginowego i seryny, ale ich funkcja jest nieznana [4]. Kwaśne reszty białka, są szczególnie interesujące z punktu biomineralizacji, ponieważ im przypisuje się zdolność wiązania jonów wapnia. Wiadomo też, że Stm jest fosforylowane przez kinazę kazeinową 2 (CK2), ale nie badano, które regiony Stm podlegają fosforylacji. Celem pracy było oczyszczenie fragmentów Stm, N-końcowego zawierającego tandemowe powtórzenia (Stm1-231) i C-końcowego bogatego w D i S (Stm232-603) oraz zbadanie, który fragment ulega fosforylacji przez CK2, co przybliży poznanie funkcji poszczególnych regionów białka.

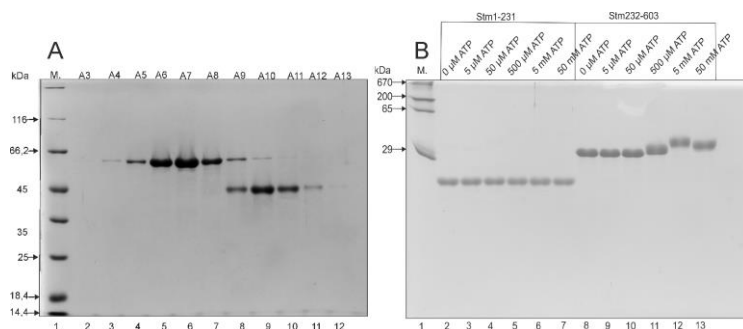
### 2. Materiały i metody

Mutant białka Stm z miejscem trawienia trombiną (StmT227) ekspresjonowano za pomocą szczepu *E.coli* BL21(DE3)pLysS i oczyszczano przez frakcjonowanie stałym siarczanem amonu, sączenie molekularne i chromatografię na hydroksyapatycie [6]. Oczyszczone białko StmT227 trawiono trombiną (28U/1 mg StmT227) przez 48 h, w temperaturze pokojowej, przy obrotach 400 rpm. Fragmenty białka (Stm1-231 i Stm232-603) rozdzielono za pomocą filtracji żelowej na kolumnie HiLoad 16/60 Superdex 200 pg. Oczyszczone fragmenty białka StmT227 fosforylowano przy użyciu CK2, dla 6 różnych stężeń ATP. Poziom fosforylacji analizowano przy pomocy SDS-PAGE z odczynnikiem Phos-tag.

### 3. Wyniki

Zastosowana metoda ekspresji i oczyszczania białka, pozwoliła na otrzymanie 3 mg białka StmT227 z trzech litrów hodowli komórkowej. Optymalizacja warunków trawienia trombiną pozwoliła na całkowite trawienie preparatu StmT227 (wyników nie pokazano). Rozdział fragmentów

po trawieniu (Stm1-231 i Stm232-603) przy pomocy filtracji żelowej przedstawiono na Ryc. 1(A). Otrzymany rozdział fragmentów był wystarczający do przeprowadzenia fosforylacji *in vitro* obu białek.



**Ryc. 1.** Elektroforeza frakcji po rozdzieleniu fragmentów białka StmT227 za pomocą filtracji żelowej (A). Rozdział ufosforylowanych fragmentów białka StmT227 w żelu z odczynnikami Phos-tag (B)

Ryc. 1 (B) przedstawia stopień fosforylacji fragmentów Stm1-231 i Stm232-603 przez CK2 w zależności od stężenia ATP. Phos-tag użyty podczas SDS-PAGE jest odczynnikiem, który wiąże ufosforylowane białka, przez co migrują one w żelu wolniej od swoich niefosforylowanych odpowiedników.

#### 4. Dyskusja

Białko Stm ma zdolność do kontrolowania wzrostu kryształów węgla wapnia *in vivo* i *in vitro* [4][5]. Jednak, ze względu na swoją dużą masę cząsteczkową, jego produkcja w dużej skali byłaby dość droga. Dlatego postanowiono zlokalizować fragment odpowiedzialny za aktywność biomineralizacyjną w białku Stm. Wstępne badania nad aktywnością fragmentów wskazują, że Stm232-603 jest fragmentem ulegającym fosforylacji. Fosforylacja jest częstą modyfikacją post-translacyjną białek zaangażowanych w biomineralizację stąd wniosek, że fragment Stm232-603 może odgrywać kluczową rolę w tworzeniu kryształów [5]. Dalsze badania nad aktywnością fragmentów Stm pozwolą na poszerzenie wiedzy dotyczącej mechanizmów kontrolujących powstawanie biominerałów. Zlokalizowanie sekwencji aminokwasowej Stm odpowiedzialnej za aktywność biomineralizacyjną białka pozwoli natomiast na konstruowanie nowych, aktywnych peptydów.

**Źródło finansowania:** Praca finansowana z dotacji Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego na działalność statutową Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej.

#### Piśmiennictwo

- [1] LUZ G.M., MANO, J.F., *Mineralized structures in nature: Examples and inspirations for the design of new composite materials and biomaterials*, Composites Science and Technology, 70, (2010).
- [2] PADOVANO J.D. ET AL., *DMPI-derived Peptides Promote Remineralization of Human Dentin*, Journal of Dental Research, 94, 4, (2015).
- [3] JAIN A., ET AL., *Molecular Dynamics Simulations of Peptides at the Air-Water Interface: Influencing Factor on Peptide-Templated Mineralization*, Langmuir, 30, (2014).
- [4] SÖLLNER C., ET AL., *Control of Crystal Size and Lattice Formation by Starmaker in Otolith Biomineralization*, Science, 302, (2003).
- [5] WOJTAS M., ET AL., *Phosphorylation of Intrinsically Disordered Starmaker Protein Increases Its Ability To Control the Formation of Calcium Carbonate Crystals*, Cryst. Growth Des., 12, (2012).
- [6] KAPLON T., ET AL., *Starmaker Exhibits Properties of an Intrinsically Disordered Protein*, Biomacromolecules, 9, 8, (2008).

## **Analiza ryzyka powstania urazów kręgosłupa szyjnego u żołnierzy w wyniku oddziaływania fali uderzeniowej na pojazdy militarne**

**AGNIESZKA MACKIEWICZ<sup>1</sup>, GRZEGORZ SŁAWIŃSKI<sup>2</sup>, ROMUALD BĘDZIŃSKI<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Uniwersytet Zielonogórski, 65-417 Zielona Góra, ul. Licealna 9, e-mail autora: a.mackiewicz@ibem.uz.zgora.pl, r.bedzinski@ibem.uz.zgora.pl,

<sup>2</sup>Wojskowa Akademia Techniczna, 00-908 Warszawa, ul. Gen. S. Kaliskiego 49, e-mail autora: grzegorz.slawinski@wat.edu.pl

*Słowa kluczowe: kręgosłup szyjny, obciążenia dynamiczne, kryterium urazów szyi, konflikt zbrojny*

### **1. Wstęp**

Do najczęstszych przyczyn powstania urazów na polu bitwy zalicza się wypadki związane eksplozją min lub improwizowanych materiałów wybuchowych (IED) oraz kolizją pojazdów militarnych [1]. Autorzy wielu raportów podają, że dysfunkcje kręgosłupa szyjnego to około 25% odnotowanych przypadków uszkodzeń ciała żołnierzy.

Pojazdy wojskowe są narażone na oddziaływanie silnej fali uderzeniowej, wywołanej eksplozją ładunków, która powoduje gwałtowne zmiany położenia kadłuba – w tym również wywrócenia [2,3]. Celem pracy była analiza wpływu zastosowania pasów bezpieczeństwa na ryzyko powstania urazów kręgosłupa szyjnego u kierowcy i pasażerów pojazdu militarnego w wyniku eksplozji spowodowanej najechemaniem na ładunek wybuchowy.

### **2. Materiał i metody**

W celu oceny zagrożenia żołnierzy, wywołanego wybuchem miny-pułapki pod prawym kołem pojazdu opancerzonego KTO Rosomak, przeprowadzono dynamiczną analizę numeryczną w programie LS-DYNA, wykorzystującym metodę jawnego całkowania do rozwiązywania zagadnień szybkozmiennych w czasie. W pierwszym etapie opracowana została uproszczona geometria pojazdu KTO Rosomak wraz z uwzględnieniem prawidłowego rozmieszczenia foteli, w przedziale desantowym przeznaczonym dla pasażerów (P2,P3,P4,P5) oraz w przedziale kierowcy (P1).

W drugim etapie rozpatrywano wpływ detonacji ładunku na ciała żołnierzy w dwóch przypadkach z zapiętymi pasami i z ich pominięciem. Jako model ciał wykorzystano manekin typu Hybrid III 50<sup>th</sup> Male Dummy. W trakcie analizy rejestrowano zmianę działającej siły oraz trajektorii przemieszczenia punktu pomiarowego umiejscowionego na części szyjnej kręgosłupa w czasie 140 ms.

### **3. Wyniki**

Analiza skutków wybuchu pod pojazdem opancerzonym na znajdujące się wewnątrz pojazdu modele żołnierzy wykazała wyraźny wpływ na możliwość powstania urazów w części szyjnej kręgosłupa. Wpływ fali uderzeniowej na odpowiedź pojazdu KTO Rosomak zauważalny był przez zmianę przemieszczenie kadłuba w osi pionowej, co wiąże się z uniesieniem pojazdu w górę oraz niewielkie obroty (nieprzekraczające 0,1m) w osi prostopadłej do kierunku jazdy.

Wyniki pozyskane podczas analizy zostały przedstawione jako charakterystyki zmiany położenia oraz siły dla rozpatrywanego punktu pomiarowego zależne od czasu. Zauważalna jest różnica wartości zakresu siły i przemieszczeń dla składowych kierunkowych. W przypadku żołnierza-kierowcy, który nie zapiął pasa bezpieczeństwa składowe siły osiągają wartości prawie pięciokrotnie wyższe w kierunku pionowym (oś z) niż w przypadku z zapiętym pasem biodrowym, co świadczy o zwiększeniu ryzyka powstania urazów kompresyjnych kręgosłupa szyjnego oraz głowy (uderzenie

głową w sufit pojazdu). Najmniejszą różnicę zmiany wartości siły obserwuje się w kierunku jazdy (oś x) oraz w kierunku prostopadłym (oś y) – wartości zmierzone dla wariantu z pasem bezpieczeństwa jaki i bez są na poziomie zbliżonym. Warto zwrócić uwagę, że znacznie większe wartości składowej x siły zostały zarejestrowane podczas odgięcia głowy w tył niż w przypadku zgięcia w przód. Jest to szczególnie widoczne przy modelu z zapiętym pasem biodrowym. W przypadku zamiany położenia najmniejsze przemieszczenie kręgosłupa szyjnego (wartości oscylują w granicach od 0 do około 100mm), obserwuje się wzdłuż osi y, co zwraca uwagę, że podczas wybuchu następuje znacznie mniejsze przesunięcie się kierowcy na boki, niż w kierunku jazdy oś x (mechanizm urazu zgięciowo-przeprostnego whiplash) czy kierunku pionowym.

#### 4. Dyskusja

79% urazów szyi odnotowanych w okresie 2006-2010 w wojnie w Afganistanie spowodowanych jest przez eksplozję ładunków wybuchowych (w tym 41% żołnierzy poniosło śmierć). W wyniku eksplozji IED pod pojazdem silna oscylacja ciśnienia fali wybuchu wprowadza w drgania elementy kadłuba oraz wyposażenia pojazdu m.in. siedzenia załogi. Siły generowane przyspieszeniami siedzisk oraz uderzenia głową o burty i strop pojazdu powodują uszkodzenia kręgosłupa żołnierzy [4,5].

W przypadku oceny urazów szyi w wyniku uderzenia z obiektem fizycznym najpopularniejszym kryterium jest parametr  $N_{ij}$  określający skomplikowane obciążenie szyi podczas urazu, określane wzorem (1)[6]:

$$N_{ij} = \frac{F_z}{F_{int}} + \frac{M_y}{M_{int}} \quad (1)$$

gdzie:  $F_z$  -obciążenie osiowe (ściskające, rozciągające),  $M_y$  -moment zginający.  $F_{in}$ -wartość krytyczna obciążenia osiowego.  $M_{int}$  -wartość krytyczna momentu zginającego.

Za graniczną przyjmuje się wartość  $N_{ij}=1,0$  oznaczającą 15% ryzyka na wystąpienie poważnej kontuzji. Na podstawie powyższego kryterium oraz analizy mechanizmu urazu określono ryzyko na jakie narażeni są żołnierze przebywający w opancerzonych wozach bojowych w chwili wybuchu. Analizując uzyskane wyniki autorzy stwierdzają, że większym obciążeniom poddany jest model kierowcy niż żołnierzy siedzących w przedziale desantowym. Podkreślić należy również ryzyko wystąpienia odmiennych mechanizmów urazu. We wszystkich przypadkach w związku z uniesieniem pojazdu istnieje duże prawdopodobieństwo uderzenia głową w sufit, tym samym powstania urazu kompresyjnego. Jednocześnie autorzy stwierdzają na podstawie analizy trajektorii punktu pomiarowego znacznie większe ryzyko urazu zgięciowo-przeprostnego dla kierowcy niż żołnierzy-pasażerów.

**Źródła finansowania:** Badania finansowane z projektu NCBiR: DOBR-BIO/22/13149/2013

#### Piśmiennictwo

- [1] CROSS J.D., FICKE J.R., HSU J.R. *Battlefield orthopaedic injuries cause the majority of long-term disabilities*. J Am Acad Orthop Surg 2011;19:S1–7.
- [2] RAMASAMY A, MIDWINTER M., MAHONEY P, CLASPER J. *Learning the lessons from conflict: pre-hospital cervical spine stabilisation following ballistic neck trauma*, Injury. 2009 Dec;40(12):1342-5.
- [3] YOGANANDAN N., STEMPEL B.D., PINTAR F.A., MAIMAN D.J., MCENTIRE B.J., CHANCEY V.C. *Cervical spine injury biomechanics: Applications for under body blast loadings in military environments*, Clinical Biomechanics 28 (2013) 602–609.
- [4] WADE A.L., DYE J.L., MOHRLE C.R., GALARNEAU M.R. *Head, face, and neck injuries during Operation Iraqi Freedom II: results from the US Navy-Marine Corps Combat Trauma Registry*. J Trauma 2007;63: 836–40.
- [5] BREEZE J., MIDWINTER M.J., POPE D., PORTER K., HEPPEL A.E., CLASPER J. *Developmental framework to validate future designs of ballistic neck protection*. British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 51 (2013) 47–51.
- [6] BOSTRÖM O., BOHMAN K., HALAND Y., KULLGREN A, KRAFFT M. *New AIS-1 long-term neck injury criteria candidates based on real frontal crash analysis*, Proc. IRCOBI, 2000; 28: 249-264.

## Oddziaływanie zmęczenia na charakterystyki drżenia fizjologicznego i odruchu Hoffmanna u kajakarzy

JOANNA MAZUR-RÓŻYCKA<sup>1</sup>, JAN GAJEWSKI<sup>1,2</sup>, KRZYSZTOF BUŚKO<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Instytut Sportu, ul. Trylogii 2/16, Warszawa, e-mail autora: joanna.mazur@insp.waw.pl

<sup>2</sup>Akademia Wychowania Fizycznego Józefa Piłsudskiego w Warszawie, ul. Marymoncka 34, Warszawa, jan.gajewski@awf.edu.pl

<sup>3</sup>Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy, ul. Jana Karola Chodkiewicza 30, Bydgoszcz, krzysztof.busko@insp.waw.pl

*Słowa kluczowe: odruch Hoffmanna, drżenie mięśniowe, kajakarstwo*

### 1. Wstęp

Jednym z objawów zmęczenia jest wzmożone drżenie mięśniowe. Wartości zmian amplitudy i częstotliwości drżenia zależą od rodzaju wysiłku i czasu jego trwania [1]. Fattorini i wsp. [2] tłumaczą zmiany w niskoczęstotliwościowym zakresie widma sygnału EMG (ok. kilkunastu herców) synchronizacją pobudzeń jednostek motorycznych i wiążą ją [3] z oddziaływaniem odruchu na rozciąganie.

Celem pracy było zbadanie związku pomiędzy zmianami drżenia fizjologicznego po wysiłku i zmianami właściwości odruchu na rozciąganie.

### 2. Materiał i metody

W badaniach wzięło udział 19 młodych mężczyzn uprawiających wyczynowo kajakarstwo (wiek  $16,4 \pm 0,7$  lat, masa ciała  $74,4 \pm 6,7$  kg, wysokość ciała  $182,1 \pm 4,3$  cm, staż treningowy  $4,8 \pm 1,6$  lat). Żaden z badanych nie cierpiał na jakiegokolwiek dolegliwości o podłożu neurologicznym. Schemat badania: 1. Badania spoczynkowe (pomiar odruchu Hoffmanna z mięśnia płaszczkowatego, pomiar drżenia fizjologicznego kończyny dolnej). 2. Test stopniowany na ergometrze kajakarskim. 3. Pomiar odruchu Hoffmanna z mięśnia płaszczkowatego bezpośrednio po wysiłku oraz w 10 i 25 minucie po wysiłku. 4. Pomiar drżenia fizjologicznego w 5, 15 i 30 minucie po wysiłku.

Do badań drżenia zastosowano metodę akcelerometryczną. Przebiegi badanych sygnałów rejestrowano za pomocą Zestawu Pomiarowego Przyspieszeń ZPP-3D/BC; JBA Zb. Staniak. Akcelerometr umieszczony był na przedniej części pierszeli badanego. Podczas pomiarów drżenia kończyny dolnej badani znajdowali się w pozycji stojącej śródstopiem na 2 centymetrowym podwyższeniu mając podparty tułów opierając łopatki o ścianę. Pomiar trwał 32 sekundy. Próbkowania dokonywano z częstotliwością 200 Hz. Sygnał przyspieszenia, po konwersji analogowo-cyfrowej, poddawano analizie częstotliwościowej, której celem było uzyskanie funkcji gęstości widmowej mocy (Power Spectral Density – PSD). Funkcja ta opisuje rozkład wariancji sygnału w dziedzinie częstotliwości. Do estymacji PSD wykorzystano procedurę szybkiej transformaty Fouriera (Fast Fourier Transform – FFT) za pomocą programu MatLab R2007a.

Aktywność mięśnia płaszczkowatego określano za pomocą EMG (Digitimer D360, Hertfordshire, England) przy użyciu dwubiegunowych elektrod powierzchniowych (AmbuBlu Sensor N, Ag/AgCl, Ballerup, Denmark) oddalonych od siebie o ok. 2 cm zgodnie z zaleceniami SENIAM (1999). Przed umieszczeniem elektrod, skórę ogolono, naskórek starto peelingiem oraz przemyto środkiem dezynfekcyjnym z alkoholem. Impedancja pomiędzy elektrodami nie przekraczała 5 k $\Omega$ . Elektrode uziemającą umieszczono na głowie kości strzałkowej. Do wywołania odruchu H i fali M w mięśniu płaszczkowatym stymulowano nerw pierszelowy w dole podkolanowym (Digitimer DS7A stimulator) bodźcem trwającym 1 ms, zwiększając natężenie prądu o 2 mA co 8 s do momentu zaniku odruchu H, a następnie zwiększając natężenie prądu co ok. 5 mA do momentu osiągnięcia

maksymalnej amplitudy fali M (Mmax). W taki sposób wykreślono krzywą rekrutacji odruchu H i fali M. Podczas stymulacji katodę (1,5×1,5 cm) umieszczano w dole podkolanowym w miejscu stymulacji, natomiast anodę (5×8 cm) nad rzepeką. Z krzywej rekrutacji odruchu H do dalszej analizy brano maksymalną wartość amplitudy odruchu H (Hmax) i fali M (Mmax), z czego wyliczano stosunek Hmax/Mmax. Krzywą rekrutacji wykreślano dla każdego z badanych zarówno w warunkach spoczynkowych, jak i po wysiłku. Podczas pomiaru odruchu Hoffmanna w mięśni płaszczkowatym badani znajdowali się w pozycji leżącej na brzuchu na leżance. Aby zachować neutralną, poziomą pozycję badany twarz miał umieszczoną w specjalnym wycięciu w leżance. Kończyny górne ułożone były symetrycznie, równoległe do linii tułowia.

### 3. Wyniki

**Tab. 1.** Średnie (±SD) maksymalnej amplitudy odruchu H, amplitudy fali M oraz stosunku maksymalnych wartości Hmax i Mmax dla pomiarów spoczynkowych, bezpośrednio po wysiłku oraz w 10 i 25 minucie po wysiłku n=19

	Spoczynkowe	Bezpośrednio po wysiłku	10 min po wysiłku	25 min po wysiłku
Mmax [mV]	5,18 ± 1,90	5,09 ± 1,81	5,06 ± 1,71	5,00 ± 1,87
Hmax [mV]	2,93 ± 1,76	2,27 ± 1,69 <sup>a</sup>	2,45 ± 1,55 <sup>a</sup>	2,60 ± 1,67 <sup>ab</sup>
Hmax/Mmax	0,56 ± 0,20	0,43 ± 0,22 <sup>a</sup>	0,48 ± 0,22 <sup>ab</sup>	0,51 ± 0,22 <sup>ab</sup>

Istotne (p<0,05) w stosunku do: <sup>a</sup> - spoczynkowe, <sup>b</sup> - bezpośrednio po wysiłku

**Tab. 2.** Średnie (±SD) częstotliwości f2-5 i f6-10 uzyskane w kolejnych pomiarach

	Spoczynkowe	5 min po wysiłku	15 min po wysiłku	30 min po wysiłku
f <sub>2-5</sub> [Hz]	3,66 ± 0,11	3,60 ± 0,13	3,60 ± 0,14	3,63 ± 0,12
f <sub>6-10</sub> [Hz]	7,93 ± 0,36	8,45 ± 0,35 <sup>a</sup>	8,19 ± 0,39 <sup>ab</sup>	7,93 ± 0,30 <sup>bc</sup>

Istotne (p<0,05) w stosunku do: <sup>a</sup> - spoczynkowe, <sup>b</sup> - 5 min po wysiłku, <sup>c</sup> - 15 min po wysiłku

### 4. Dyskusja

Stwierdzono, że zarówno parametry odruchu Hoffmanna, jak i parametry drżenia fizjologicznego istotnie zmieniają się w wyniku zmęczenia spowodowanego wysiłkiem fizycznym. Nie stwierdzono przy tym wzajemnego, ilościowego związku pomiędzy oboma zjawiskami. Wyniki doświadczenia zdają się potwierdzać tezę o braku związku między odruchem na rozciąganie a drżeniem fizjologicznym [4].

**Źródła finansowania:** Projekt MNiSW nr N RSA1 001051 (lata realizacji: 2012-2015)

### Piśmiennictwo

- [1] SAXTON J.M., CLARKSON P.M., JAMES R., MILES M., WESTERFER M., CLARK S., DONNELLY A.E. *Neuromuscular dysfunction following eccentric exercise* Med Sci Sports Exerc, 1995,27, 1185-1193.
- [2] FATTORINI L., FELICI F., FILLIGOI G.C., TRABALLESI M. *Influence of high motor unit synchronization levels on non-linear and spectral variables of the surface EMG*. J Neurosci Methods, 2005,143: 133-9.
- [3] BACHER M., SCHOLTZ E., DIENER H.C. *24 Hours continuous tremor quantification based on EMG recording*. Electroncephalog Clin Neurophysiol, 1989,72: 176-183.
- [4] VERNOOIJ C. A., REYNOLDS R. F., LAKIE M A *dominant role for mechanical resonance in physiological finger tremor revealed by selective minimization of voluntary drive and movement*. J Neurophysiol, 2013,109(9), 2317-2326.

## Konstrukcja i pomiary balistokardiografu pneumatycznego oraz jego zastosowanie do nieinwazyjnej akwizycji wybranych sygnałów biomedycznych

PRZEMYSŁAW MUSZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Wydział Podstawowych Problemów Techniki, ul. Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław, e-mail autora: przemyslawmusz@gmail.com

*Słowa kluczowe: balistokardiografia, biosygnaly, pomiary sygnałów, hemodynamika, ciśnienie*

### 1. Wstęp

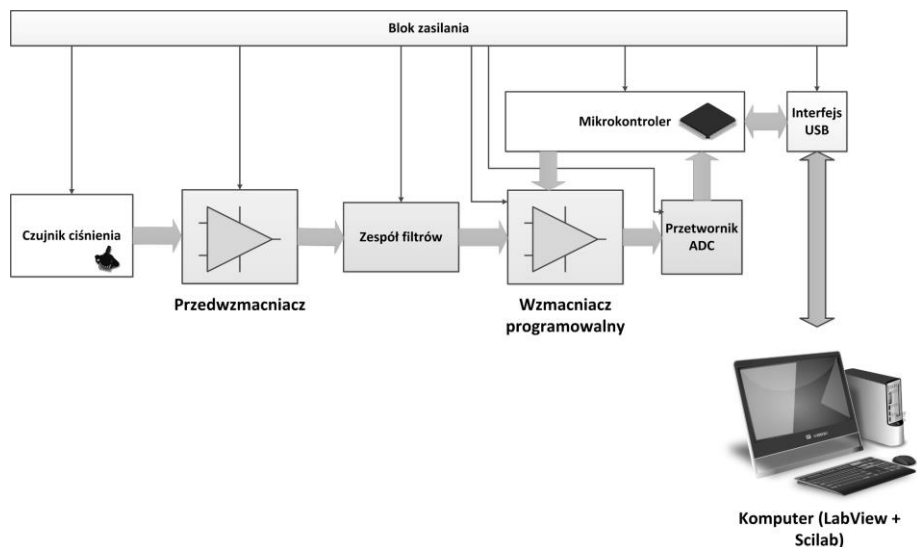
Balistokardiografia jest całkowicie nieinwazyjną, mechanokardiograficzną metodą badania czynności mechanicznej serca, opierającą się na pomiarze siły odrzutu, działającej na ciało człowieka podczas przemieszczania objętości wyrzutowej krwi z lewej komory serca do dużych naczyń [1]. Często spotykanym rozwiązaniem technologicznym we współczesnej balistokardiografii jest układ pomiarowy, wykorzystujący zestaw piezoelektrycznych lub tensometrycznych czujników nacisku wraz ze współpracującym z nimi urządzeniem do akwizycji i przetwarzania uzyskiwanych sygnałów. Najczęściej opisywanym, współczesnym zastosowaniem prezentowanej metody jest wspomaganie badania snu [2,3], zastępujące w niektórych przypadkach złożone pomiary polisomnograficzne, w tym EEG [4]. Przedstawiony system rezygnuje z konwencjonalnych czujników na rzecz zamkniętego układu pneumatycznego, w którym akwizycja sygnału opiera się na pomiarze przebiegu zmian ciśnienia w układzie w funkcji czasu.

### 2. Materiał i metody

Badania wykonano przy użyciu opracowanego w tym celu cyfrowego balistokardiografu pneumatycznego z interfejsem USB, którego schemat blokowy przedstawiono na **Ryc. 1**. Sygnał zmiennego ciśnienia był rejestrowany w dwóch układach pneumatycznych, zawierających (wymienne) poduszkę nadmuchiwaną lub nadmuchiwany materac jednokomorowy. Opracowany balistokardiograf umożliwił uzyskanie szerokiego zakresu dynamiki pomiaru przy częstotliwości próbkowania równej 250Hz. Dane z balistokardiografu były przesyłane do komputera przenośnego i wizualizowane w czasie rzeczywistym za pomocą oprogramowania, pracującego w środowisku LabView. Następnie, zapisy z programu były poddawane analizie numerycznej w środowisku Scilab. Badania odpowiedzi częstotliwościowej systemu przeprowadzono za pomocą mechanicznego układu pobudzającego, wprowadzającego układ pneumatyczny w drgania harmoniczne o regulowanej częstotliwości. W pomiarach wykorzystano silnik prądu stałego o regulowanej prędkości, z zamontowanym na osi obciążnikiem mimośrodowym. Następnie zarejestrowano sygnały rzeczywiste, odpowiadające zmianom ciśnienia (będącym wynikiem efektu balistokardiograficznego), kolejno w poduszce oraz w materacu powietrznym, na którym ułożono ochotnika.

### 3. Wyniki

Uzyskane wyniki pomiarów wykazały przydatność opracowanej metody w nieinwazyjnej detekcji tętna na podstawie efektu balistokardiograficznego w układzie pneumatycznym. Sygnał zmian ciśnienia w układzie wymaga zastosowania odpowiednich algorytmów przetwarzania danych, gdyż – jak w większości nieinwazyjnych metod biosygnalowych – istotnym problemem są silne artefakty, wynikające z ruchów ciała pacjenta.



Ryc. 1. Schemat blokowy opracowanego balistokardiografu

## Piśmiennictwo

- [1] SZCZEKLIK A *Diagnostyka chorób wewnętrznych*, wyd. VII. PZWL, Warszawa 1979.
- [2] MENDEZ M.O, MATTEUCCI M, CERUTTI S, BIANCHI A.M, KORTELAINEN J. M. *Automatic Detection of sleep macrostructure based on bed sensors*, 31st Annual International Conference of the IEEE EMBS, Minneapolis, Minnesota, USA, September 2-6, 2009.
- [3] PAALASMAA J, WARIS M, TOIVONEN H, LEPPÄKORPI L, PARTINEN M. *Unobtrusive Online Monitoring of Sleep at Home*, In 34th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, EMBC'12.
- [4] WEBSTER J. G. et. al.. *Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentation*, second edition, Vol. 6 and Vol. 3, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2006.

## Ocena bezpieczeństwa stosowania dowieńcowego homogenatu porożogennych komórek macierzystych oraz jego wpływ na parametry elektrofizjologiczne serca zdrowych świń

AGNIESZKA NOSZCZYK-NOWAK<sup>1</sup>, ALICJA CEPIEL<sup>1</sup>, ADRIAN JANISZEWSKI<sup>2</sup>, ROBERT PASLAWSKI<sup>3</sup>,  
URSZULA PASLAWSKA<sup>1</sup>, JÓZEF NICPOŃ<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Katedra Chorób Wewnętrznych z Kliniką Koni Psów i Kotów Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP we Wrocławiu, pl. Grunwaldzki 47 50-366 Wrocław, e-mail autora: agnieszka.noszczyk-nowak@up.wroc.pl

<sup>2</sup>Centrum Diagnostyki Eksperymentalnej i Innowacyjnych Technologii Biomedycznych,

<sup>3</sup>Biuro organizacyjno-finansowe UPWr - Demonstrator+, ul. Norwida 25 50-375 Wrocław, Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Zawodowych i Nadciśnienia Tętniczego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, ul. Borowska 213, 50-556 Wrocław

**Słowa kluczowe:** serce, świnia, porożogenne komórki macierzyste.

### 1. Wstęp

W 1998 roku odkryto, że w mięśniu sercowym znajdują się komórki nieodróżniane, dzięki czemu serce posiada powolny mechanizm regeneracyjny. Od tego czasu trwają prace nad przyspieszeniem procesów naprawczych poprzez podanie komórek macierzystych do naczyń wieńcowych serca [1,2]. Efekt ten był tym lepiej widoczny im bardziej uszkodzone było serce. W dotychczasowych badaniach wykorzystywano komórki macierzyste szpiku kostnego lub tkanki tłuszczowej. Celem badań była ocena bezpieczeństwa dowieńcowego stosowania homogenatu porożogennych komórek macierzystych i jego wpływ na przewodzenie wewnątrzsercowe u zdrowych świń.

### 2. Materiał i metody

Materiał do badań stanowiło 12 świń domowych (*Sus domesticus*) o początkowej masie ciała 25-30 kg. U wszystkich świń wykonano badanie morfologiczne i biochemiczne krwi, badanie echokardiograficzne oraz inwazyjne badanie elektrofizjologiczne serca (EPS). Badania przeprowadzono w znieczuleniu ogólnym: midazolam 1-2 mg/kg m.c. (i.m.), propofol 2-4 mg/kg m.c. w indukcji znieczulenia, później w bolusie 0,5-1 mg/kg m.c. według efektu działania i.v., fentanyl 2-4 µg/kg m.c. i.v. oraz izofluran wzięwicie 2-4vol%. 6 świń stanowiło kontrolę (grupa I), a u kolejnych 6 po wykonanych procedurach podano dowieńcowo 1 ml homogenatu komórek macierzystych w stężeniu  $1 \times 10^7$  komórek/1 ml (grupa II). Codziennie przeprowadzano badanie kliniczne zwierząt, a po 3 tygodniach od podania homogenatu w obu grupach powtórzono wszystkie badania. Przeprowadzono analizę statystyczną przy pomocy oprogramowania STATISTICA 9.1 PL. Dla zmiennych powiązanych zastosowano test kolejności par Wilcozona, w przypadku zmiennych nie powiązanych zastosowano test dla zmiennych nieparametrycznych U Manna-Whitneya. Poziom istotności statystycznej przyjęto dla  $p \leq 0,05$ .

### 3. Wyniki

Nie stwierdzono zmian istotnych statystycznie pomiędzy ilością leukocytów i stężeniem CRP w obu grupach (tab. 1). Nie stwierdzono zmian istotnych statystycznie po między stosunkiem wielkości lewego przedsionka i aorty (LA/Ao), wielkości późnorozkurczowej lewej komory (LVIDD) oraz frakcji skracania (FS) pomiędzy grupami (tab. 2). Zaobserwowano jednak trend do wzrostu FS po dowieńcowym podaniu homogenatu porożogennych komórek macierzystych. Nie stwierdzono

istotnych statystycznie różnic w oznaczonych parametrach elektrofizjologicznych oraz wyzwolonych rodzajach arytmii u badanych zwierząt.

### 3.1. Tabele

**Tab. 1.** Średnie wartości oraz odchylenie standardowe ilości leukocytów oraz stężenia CRP przed i po podaniu homogenatu porożogennych komórek macierzystych

Parametr	WBC G/l	WBC G/l po 3 tyg.	CRP mg/l	CRP mg/l po 3 tyg.
Grupa I	13,38±2,39	14,8±0,94	4,22±0,44	4,56±1,15
Grupa II	13,90±2,45	13,38±1,64	3,71±0,68	2,8±1,1

Grupa I - świnię zdrowe kontrolne, grupa II - świnię zdrowe, otrzymujące homogenat porożogennych komórek macierzystych

**Tab. 2.** Średnie wartości oraz odchylenie standardowe wielkości lewego przedsionka i aorty (LA/Ao), wielkości późnorozkurczowej lewej komory (LVIDd) oraz frakcji skracania (FS) przed i po podaniu homogenatu porożogennych komórek macierzystych.

Parametr	LA/Ao	LA/Ao po 3 tyg.	LVIDd(mm)	LVIDd(mm) po 3 tyg.	FS (%)	FS (%) po 3 tyg.
Grupa I	1,41±0,22	1,3±0,10	34,2±3,56	42,6±1,14	27,6±7,01	30,1±6,55
Grupa II	1,51±0,21	1,5±0,21	34,6±3,2	39,3±3,38	22,9±5,01	34,1±4,65

**Tab. 3.** Średnie wartości oraz odchylenie standardowe wybranych parametrów elektrofizjologicznych po podaniu homogenatu porożogennych komórek macierzystych.

Parametr	CSNRT	AH (ms)	HV (ms)	ERP V 150 (ms)	ERP A 150 (ms)	ERP AVN 150 (ms)
Grupa I	98±27,67	75,2 ±7,82	51±11,4	182±13	153,3±25	232,5±25
Grupa II	113±85,49	71,6±8,01	44,83±6,08	188,3±21,3	140±20	245±29,5

## 4. Dyskusja

Mimo wielu przeprowadzonych doświadczeń wciąż jeszcze niewiele wiemy o roli komórek macierzystych w chorobach serca, odległym wpływie terapii komórkami macierzystymi na mięsień sercowy i odległych powikłaniach tego leczenia. Przedstawione wyniki potwierdzają bezpieczeństwo stosowania homogenatu porożogennych komórek macierzystych i są podstawą do dalszych badań, już w modelu kardiomiopatii doświadczalnej u świń.

**Źródła finansowania:** Projekt pt. „Opracowanie prototypów wyrobów medycznych na bazie surowców otrzymanych z porożogennych komórek macierzystych” dofinansowany przez NCBiR w ramach przedsięwzięcia pilotażowego: Wsparcie badań naukowych i prac rozwojowych w skali demonstracyjnej Demonstrator+

## Piśmiennictwo

- [1] DUCKERS H. J., HOUTGRAAF J., HEHRLEIN C., SCHOFER J., WALTENBERGER J., GERSHLICK A., BARTUNEK J., NIENABER C., MACAYA C., PETERS N., SMITS P., SIMINIAK T., VAN MIEGHEM W., LEGRAND V., SERRUYS P.W. *Final results of a phase IIa, randomized, open-label trial to evaluate the percutaneous intramyocardial transplantation of autologous skeletal myoblasts in congestive heart failure patients: the SEISMIC trial.* EuroIntervention 2011, 6, 805-812.
- [2] ORLIC D., KAJSTURA J., CHIMENTI S., JAKONIUK I., ANDERSON S.M., LI B., PICKEL J., MCKAY R., NADAL-GINARD B., BODINE D.M., LERI A., ANVERSA P. *Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium.* Nature, 2001, 410, 701-705.

## **Ekspresja nestyny w naczyniach krwionośnych w rakach gruczołu piersiowego**

**ALEKSANDRA NOWAK<sup>1</sup>, DOMINIK HAUS<sup>2</sup>, KAROLINA JABŁOŃSKA<sup>1,3</sup>, BARTOSZ PUŁA<sup>1,3</sup>, WOJCIECH WITKIEWICZ<sup>3</sup>, MARZENNA PODHORSKA-OKOŁÓW<sup>1,3</sup>, JANUSZ RYS<sup>4</sup>, PIOTR DZIĘGIEL<sup>1,3,5</sup>**

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich, Wrocław, alexandra.m.nowak@gmail.com, marzenna.podhorska-okolow@umed.wroc.pl, piotr.dziegiel@umed.wroc.pl

<sup>2</sup>Dolnośląskie Centrum Onkologii, Wrocław

<sup>3</sup>Ośrodek Badań i Rozwoju, Wojewódzki Szpital Specjalistyczny, Wrocław

<sup>4</sup>Zakład Patomorfologii Nowotworów, Centrum Onkologii Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Kraków

<sup>5</sup>Zakład Fizjoterapii i Terapii Zajęciowej w Medycynie Zabiegowej i Onkologii, Akademia Wychowania Fizycznego we Wrocławiu, al. Ignacego Jana Paderewskiego 35, 51-612 Wrocław, piotr.dziegiel@umed.wroc.pl

*Słowa kluczowe: nestyna, rak gruczołu piersiowego, angiogeneza*

### **1. Wstęp**

Badania nad ekspresją nestyny w guzach nowotworowych sugerują jej potencjalną wartość diagnostyczną i prognostyczną. Nestyna jest filamentem pośrednim typu VI, w literaturze opisywanym jako marker neuronalnych komórek macierzystych i progenitorowych [1]. Ekspresja nestyny jest charakterystyczna dla komórek niezróżnicowanych i ulega zahamowaniu w procesie różnicowania. W raku gruczołu piersiowego ekspresja nestyny w komórkach nowotworowych związana jest z wyższym stopniem złośliwości histologicznej, występowaniem przerzutów do węzłów chłonnych i gorszym rokowaniem [2]. Ponadto, nestynie przypisuje się ważną rolę w procesie angiogenezy z uwagi na jej silną ekspresję w proliferujących komórkach śródbłonna naczyniowego. Ekspresja nestyny w naczyniach oraz w komórkach o charakterze progenitorowym pozwoliły uznać ją za marker nowopowstających naczyń krwionośnych [3]. Ocena stopnia intensywności angiogenezy jest istotnym czynnikiem prognostycznym w przypadku wielu nowotworów. Jednakże, dotychczas stosowane markery (CD34, CD31) nie są specyficzne dla nowopowstających naczyń krwionośnych, ponieważ ich ekspresja zachodzi również we wcześniej już istniejących naczyniach [4]. Dlatego też nestyna, której ekspresja ogranicza się głównie do proliferujących komórek śródbłonna, może stanowić bardziej specyficzny marker angiogenezy [5]. W naszych badaniach dokonaliśmy oceny gęstości naczyń (MVD) wykazujących ekspresję nestyny w zmianach mastopatycznych oraz w rakach gruczołu piersiowego.

### **2. Materiał i metody**

Badania przeprowadzono na blockach parafinowych zawierających fragmenty raka gruczołu piersiowego przedinwazyjnego i inwazyjnego (DCIS, n=26; IDC, n=39) oraz przerzuty do węzłów chłonnych (N+, n=90). Grupę kontrolną stanowiły zmiany mastopatyczne (NBTL, n=19). Reakcje immunohistochemiczne przeprowadzono z wykorzystaniem przeciwciała poliklonalnego przeciwko nestynie w automatycznym systemie Autostainer Link48.

### **3. Wyniki**

Zaobserwowano cytoplazmatyczną ekspresję nestyny w śródbłonku naczyń krwionośnych. Znacząco wyższa wartość MVD była obserwowana w grupach IDC i N+ w odniesieniu do grupy kontrolnej (p<0,001 i p<0,05). Ponadto, wyższą wartość MVD stwierdzono w guzach IDC, które jednocześnie dały przerzuty do węzłów chłonnych (p=0,017).

#### 4. Wnioski

Ekspresja nestyny w śródbłonku naczyń krwionośnych w obrębie zmiany nowotworowej, koreluje z występowaniem przerzutów do węzłów chłonnych. Ocena gęstości naczyń wykazujących ekspresję nestyny może być istotnym markerem służącym do oceny stopnia angiogenezy u pacjentek chorych na raka gruczołu piersiowego.

**Źródła finansowania:** Badania finansowane w ramach projektu WroVasc – Zintegrowane Centrum Medycyny Sercowo-Naczyniowej w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka 2007-2013.

#### Piśmiennictwo

- [1] MICHALCZYK K., ZIMAN, M. *Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation*, *Histol Histopathol*, 2005, 20:665-671.
- [2] LIU C., CHEN B., ZHU J., ZHANG R., YAO F., JIN F., XU H., LU P. *Clinical implications for nestin protein expression in breast cancer*. *Cancer Sci*, 2010, 101(3):815-9.
- [3] KIM H. S., KANG H. S., MESSAM C. A., MIN K. W., PARK C. S. *Comparative evaluation of angiogenesis in gastric adenocarcinoma by nestin and CD34*, *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2002, 10:121-127.
- [4] MEERT A. P., PAESMANS M., MARTIN B., DELMOTTE P., BERGHMANS T., VERDEBOUT J. M., LAFITTE J. J., MASCAUX C., SCULIER J. P. *The role of microvessel density on the survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis*, *Br J Cancer*, 2002, 87:694-701.
- [5] MOKRY J., CIZKOVA D., FILIP S., EHRMANN J., OSTERREICHER J., KOLAR Z., ENGLISH D. *Nestin expression by newly formed human blood vessels*, *Stem Cells Dev*, 2004, 13:658-664.

## Ekspresja czynnika transkrypcyjnego SOX18 w płaskonabłonkowym raku płuc

MATEUSZ OLBROMSKI<sup>1</sup>, JĘDRZEJ GRZEGRZÓŁKA<sup>1</sup>, ALINA JANKOWSKA-KONSUR<sup>2</sup>, MARZENNA PODHORSKA-OKOŁÓW<sup>1</sup>, PIOTR DZIEGIEL<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, ul. T. Chałubińskiego 6a, 50-368 Wrocław: mateusz.olbromski@umed.wroc.pl, jedrzej.grzegorzolka@gmail.com, marzenna.podhorska-okolow@umed.wroc.pl, piotr.dziegiel@umed.wroc.pl

<sup>2</sup>Katedra i Klinika Dermatologii, Wenerologii i Alergologii, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, ul. T. Chałubińskiego 1, 50-368 Wrocław: alina.jankowska-konsur@umed.wroc.pl

<sup>3</sup>Katedra Fizjoterapii i Terapii Zajęciowej, w Medycynie Zachowawczej i Zabiegowej, Akademia Wychowania Fizycznego we Wrocławiu, al. I.J. Paderewskiego 35, 51-612 Wrocław

**Słowa kluczowe:** SOX18, płaskonabłonkowy rak płuc, SQC, mikroRNA

### 1. Wstęp

Geny z rodziny *SOX* (ang. *SRY-related HMG-box*) charakteryzują się obecnością konserwatywnej domeny HMG (ang. *High Mobility Group box*) odkrytej pierwotnie w genie warunkującym płęć – *SRY* (ang. *sex determining region Y*) [1]. Składa się ona z 79 aminokwasów i charakteryzuje się 50-cio procentową homologią w genach grupy *SOX* w stosunku do genu *SRY*.

Do rodziny *SOX* należy około 20 białek, podzielonych na 8 grup od A do H [2,3]. Pomiędzy grupami występuje niska homologia sekwencji. Jednakże, białka w obrębie grup wykazują przynajmniej 80% homologię domeny HMG, jak również posiadają inne domeny konserwatywne dla danej grupy. Białko SOX18, obok SOX7 i SOX17, należy do grupy SOX F i jest zaangażowane głównie w procesy rozwoju układu sercowo-naczyniowego podczas embriogenezy [4-6].

Ekspresję białek *SOX* wykazano w wielu tkankach na różnych etapach embriogenezy, gdzie pełnią rolę czynników transkrypcyjnych. Ekspresję SOX18 wykazano w liniach nowotworowych gruczolakoraków żołądka, trzustki oraz jelita grubego [7]. Dotychczas prognostyczną rolę ekspresji SOX18 zbadano wyłącznie w gruczolakorakach żołądka, gdzie wysoka ekspresja tego czynnika w podścielisku guzów związana była z gorszym rokowaniem pacjentów.

### 2. Materiały i metody

Celem pracy było określenie ekspresji *SOX18* na poziomie mRNA i białka w materiale klinicznym 25 par: płaskonabłonkowego raka płuc (ang. *squamous cell lung carcinoma* – SQC) oraz w odpowiadającym im tkankom płucnym niezmiennym nowotworowo (ang. *non-malignant lung tissue* - NMLT) z wykorzystaniem techniki Real Time PCR (RT PCR), western blot (WB) oraz immunohistochemii (IHC).

### 3. Wyniki

Wyniki reakcji immunohistochemicznych przeprowadzonych na 25 przypadkach pooperacyjnych raków płuc wykazały jądrową, jądrowo-cytoplazmatyczną oraz cytoplazmatyczną ekspresję białka SOX18 w komórkach nowotworowych raka płaskonabłonkowego płuc, brak ekspresji w podścielisku guzów oraz słabą ekspresję w śródbłonku naczyń krwionośnych w obrębie guzów.

W większości badanych parach (guz-tkanka prawidłowa) przypadków SQC (22 pary, 88%) poziom ekspresji genu *SOX18* był wyższy w tkance prawidłowej w porównaniu z tkanką nowotworową ( $p < 0.0001$ , test Mann-Whitney'a). Z kolei w przypadku pomiaru poziomu białka techniką western blot w badanych 25-ciu parach obserwowany był statystycznie wyższy poziom

SOX18 w tkance nowotworowej w porównaniu do tkanki niezmięnionej nowotworowo (24 pary, 96%) zarówno w całej grupie badanej ( $p < 0.0001$ , test Wilcoxon'a) jak i w poszczególnych parach guz-tekanka prawidłowa ( $p < 0.0001$ , test Mann-Whitney'a).

#### 4. Dyskusja

Powyższe wyniki wskazują na skomplikowany i odmienny mechanizm regulacji ekspresji czynnika transkrypcyjnego SOX18 w płaskonabłonkowym raku płuc. Dysproporcja pomiędzy poziomem ekspresji genu a poziomem białka SOX18 w komórkach raka w stosunku do tkanki prawidłowej może być efektem inhibicji transkryptu genu *SOX18* poprzez cząsteczki mikroRNA.

**Źródła finansowania:** Zadanie współfinansowane ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego

#### Piśmiennictwo

- [1] GUBBAY J., COLLIGNON J., KOOPMAN P., CAPEL B., ECONOMUS A., MUNSTERBERG A., VIVIAN N., GOODFELLOW P., LOVELL-BADGE R. *A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes.* Nature 1990;346:245-250.
- [2] WEGNER M. *From head to toes: The multiple facets of Sox proteins.* Nucleic Acids Res 1999;27:1409-1420.
- [3] BOWLES J., SCHEPERS G., KOOPMAN P. *Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators.* Dev Biol 2000;227:239-255.
- [4] TANIGUCHI K., HIRAOKA Y., OGAWA M., SAKAI Y., KIDO S., AISO S. *Isolation and characterization of a mouse SRY-related cDNA, mSox7.* Biochim Biophys Acta 1999;1445:225-231.
- [5] KANAI Y., KANAI-AZUMA M., NOCE T., SAIDO T.C., SGIROISHI T., HAYASHI Y., YAZAKI K. *Identification of two Sox17 messenger RNA isoforms, with and without the high mobility group box region, and their differential expression in mouse spermatogenesis.* J Cell Biol 1996;133:667-681.
- [6] DUNN T.L., MYNETT-JOHNSON L., WRIGHT E.M., HOSKING B.M., KOOPMAN P.A., MUSCAT G.E.O. *Sequence and expression of Sox-18 encoding a new HMG-box transcription factor.* Gene 1995;161:223-225.
- [7] ZHOU ZY, XU L, LI HG, TIAN JH, JIAO LJ, YOU SF, HAN ZF, JIANG Y, GUO HR, LIU H. *Chemotherapy in conjunction with traditional Chinese medicine for survival of elderly patients with advanced non-small-cell lung cancer: protocol for a randomized double-blind controlled trial.* J Integr Med. 2014;12(3):175-81.

## Zmniejszenie skutków ubocznych pozaustrojowego obiegu krwi poprzez naświetlanie promieniowaniem z zakresu bliskiej podczerwieni

ADAM OLESZKO<sup>1</sup>, JULIA OSTROWSKA<sup>1</sup>, MALGORZATA SKRZYPECKA<sup>1</sup>,  
SYLWIA OLSZTYŃSKA-JANUS<sup>1</sup>, ALBERT CZERSKI<sup>2</sup>, MALGORZATA KOMOROWSKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Inżynierii Biomedycznej, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, Politechnika Wroclawska, Plac Grunwaldzki 13, 50-377 Wrocław, e-mail autora: adam.oleszko@pwr.edu.pl

<sup>2</sup>Katedra Biostruktury i Fizjologii Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław

**Słowa kluczowe:** NIR, krew, krzepnięcie

### 1. Wstęp

Podczas zabiegów z zastosowaniem pozaustrojowego obiegu krwi, takich jak hemodializa, dochodzi do uszkodzenia elementów morfotycznych na skutek: stresu oksydacyjnego („wybuch tlenowy” neutrofilii), mechanicznych uszkodzeń komórek wywołanych pracą pompy oraz aktywacji układu krzepnięcia. Powierzchnia biomateriału w wyniku kontaktu z krwią zostaje natychmiast pokryta warstwą białek. Adsorpcja białek osocza na powierzchni biomateriału decyduje o aktywacji układu krzepnięcia prowadząc do adhezji płytek krwi i leukocytów do sztucznego podłoża oraz tworzenia skrzepów.

Struktura białek ma wpływ na ich właściwości adsorpcyjne, a zmiana konformacji może oddziaływać na ich właściwości powierzchniowe. Jednym z czynników modyfikujących struktur II-rzędowych białek w roztworach wodnych może być promieniowanie z zakresu bliskiej podczerwieni (NIR, ang. *Near Infrared*). Dowiedziono [1], że działanie NIR na czystą wodę ma wpływ na wartość jej iloczynu jonowego, zwiększając prawdopodobieństwo transferu jonów H<sup>+</sup> wzdłuż wiązania wodorowego między dwiema cząsteczkami, a czas separacji jonów jest dłuższy niż 2000 μs. Jeśli naświetlaniu poddany zostanie wodny roztwór białka, wówczas na skutek zmiany iloczynu jonowego wody i wzmożonego transferu jonów H<sup>+</sup> między cząsteczkami wody a białkiem, zmianie może ulec przestrzenny rozkład ładunków w cząsteczce, a w konsekwencji jej struktura. W związku z tym naświetlanie promieniowaniem NIR roztworu zawierającego białka (takiego jak osocze lub krew), może spowodować zmianę ich struktury i właściwości adsorpcyjnych, a w konsekwencji na adhezję płytek krwi i leukocytów.

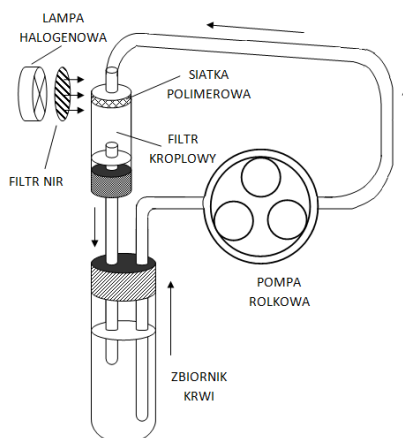
### 2. Materiał i metody

Badania wykonano na krwi owczej, pobieranej na roztwór cytrynianu disodowego jako antykoagulantu. Pobraną od jednego osobnika krew rozdzielano do dwóch zbiorników (po 25 ml), będącymi częściami dwóch niezależnych układów: kontrolnego (nienaświetlanego) i poddawanego naświetlaniu NIR promieniowaniem polichromatycznym o paśmie powyżej 750 nm i gęstości mocy 6 mW/cm<sup>2</sup>. Zbiorniki termostatowano na poziomie 37°C. Krew w obu układach poddawano krążeniu przez 2 godz. (schemat na ryc. 1), a w układzie NIR również ciąglemu naświetlaniu. Praca pompy wymuszała przepływ krwi od zbiornika w kierunku komory kroplowej, gdzie w miejscu siatki polimerowej filtrującej skrzepliny miało miejsce naświetlanie. Następnie krew spływała z powrotem do zbiornika. Próbkę pobierano na początku eksperymentu oraz po 5, 15, 30, 60 i 120 min. krążenia.

W pobranych próbkach przy użyciu weterynaryjnego analizatora hematologicznego Mindray BC-2800Vet oznaczano ilość płytek krwi, leukocytów, erytrocytów i hematokryt. Za pomocą aparatu do ACT z serii Actalyke Mini II wyznaczano również aktywowany czas krzepnięcia (ACT) – mniejsze wartości ACT świadczą o silniejszym pobudzeniu układu krzepnięcia na skutek

cyrkulacji w sztucznym układzie. Ponadto spektrofotometrycznie badano poziom hemoglobiny w osoczu metodą Drabkina. Wzrost absorbancji przy 540 nm świadczy o osłabieniu i hemolizie erytrocytów na skutek ich uszkodzenia.

Po 2 godzinach cyrkulacji oba układy opróżniano z krwi i przepłukiwano 0,9% roztworem NaCl, po czym rozciano komory kroplowe i wyjmowano z nich siatki polimerowe, filtrujące skrzepliny. Siatki suszono przez godzinę w 37°C w suszarce laboratoryjnej, a następnie ważono przy użyciu wagi analitycznej. Wzrost masy siatki świadczy o ilości skrzepów powstałych w układzie.



Ryc. 1. Schemat układu obiegu krwi (opracowanie własne)

### 3. Wyniki

Zaobserwowano stopniowy spadek liczby leukocytów i płytek krwi podczas krążenia oraz wykładniczy wzrost hemolizy erytrocytów w obu układach, ale w przypadku naświetlania NIR wzrost ten był mniej znaczący, a po 120 minutach krążenia poziom hemolizy był mniejszy o 14% w porównaniu z grupą kontrolną (nienaświetlaną).

Średnia masa nowej siatki polimerowej wynosi  $6,19 \pm 0,13$  mg. Po krążeniu w wyniku osadzania się na jej powierzchni skrzepów i białek jej sucha masa wynosi średnio 7,12 mg w układzie kontrolnym oraz 6,90 mg w układzie NIR, zatem masa skrzepów w układzie naświetlanym była mniejsza o 23%.

### 4. Dyskusja

Uzyskane wyniki świadczą o zmniejszeniu uszkodzeń elementów morfotycznych krwi pod wpływem naświetlania NIR. Konieczne więc jest przeprowadzenie szczegółowych badań wpływu naświetlania NIR na strukturę białek.

**Źródła finansowania:** Badania finansowane były przez Katedrę Inżynierii Biomedycznej Politechniki Wrocławskiej we Wrocławiu. Do badań wykorzystano przystawkę ATR zakupioną w ramach grantu MNiSW „Wyposażenie aparaturowe Środowiskowego Laboratorium Biooptyki w Instytucie Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej Politechniki Wrocławskiej” Nr 6180/IA/119/2012.

### Piśmiennictwo

- [1] NATZLE W., MOORE B., GOODALL D., FRISCH W., HOLZWARTE J. *Dissociative ionization of water induced by single-photon vibrational excitation*, J. Phys. Chem., 1981,85:2882-2884.

## Metoda ATR jako szybkie narzędzie do badania układów biologicznych i nieorganicznych

SYLWIA OLSZTYŃSKA-JANUS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Inżynierii Biomedycznej, Politechnika Wrocławska, pl. Grunwaldzki 13, 50-372 Wrocław, sylwia.olsztynska-janus@pwr.edu.pl

**Słowa kluczowe:** ATR, FTIR, spektroskopia oscylacyjna

Poszukiwanie nowych, nieinwazyjnych, a zarazem szybkich narzędzi diagnostycznych stanowi istotny problem we współczesnej medycynie. Zaawansowane techniki spektroskopowe dają możliwość uzyskania zarówno jakościowych jak i ilościowych informacji o strukturze, oddziaływaniach cząsteczkowych, czy procesach zachodzących na poziomie molekularnym. Na szczególną uwagę zasługują techniki spektroskopii oscylacyjnej, które są metodami spektroskopowymi o najbardziej uniwersalnym zastosowaniu, poczynając od fizyki ciała stałego po zaawansowane metody diagnostyczne w medycynie. Umożliwiają one czułą analizę składu badanego materiału, włącznie z jego obrazowaniem, stanowiąc bardzo nowoczesną metodę diagnostyczną, np. tkanek. Techniki spektroskopii oscylacyjnej stają się konkurencyjne wobec metod obecnie stosowanych w medycynie z uwagi na możliwość prowadzenia badań i analiz materiałów biologicznych bez powodowania ich destrukcji. Są stosunkowo szybkie, a niektóre z nich umożliwiają również badania *in vivo*. Pozwalają one na wykrywanie patologicznych zmian w tkankach już na wczesnym etapie ich powstawania, w związku z tym mogą być zastosowane do diagnostyki procesów chorobowych czy monitorowania zastosowanej terapii bądź leczenia.

Wśród metod spektroskopii oscylacyjnej duże zainteresowanie budzi metoda osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia (ATR, ang. *Attenuated Total Reflection*). Metoda ATR jest jedną z technik spektroskopii oscylacyjnej w podczerwieni (FTIR, ang. *Fourier Transform Infrared*) polegającą na pomiarze widm poprzez obserwację wiązki promieniowania odbitej od powierzchni stałej lub ciekłej próbki (tzw. metoda refleksyjna). Jest to bardzo czuła metoda umożliwiająca wykrycie nawet najmniejszych zmian w biochemicznych właściwościach badanych próbek oraz modyfikacji w oddziaływaniach molekularnych. Zaletami techniki ATR są poza tym niewielka ilość materiału wymaganego do wykonania pomiarów oraz krótki czas otrzymania [1]. Nadaje się do badań struktur biologicznych [2–5], jak i materiałów nieorganicznych [6,7]. Technika ATR stosowana jest powszechnie do badania materiałów silnie absorbujących promieniowanie IR, w tym również do roztworów wodnych i składników tkanek (takich jak np. białka, lipidy, kwasy nukleinowe). Silna absorpcja wody w zakresie podczerwieni uniemożliwia bowiem uzyskanie zwykłych widm absorpcyjnych roztworów wodnych w tym zakresie widmowym, utrudnia też analizę układów biologicznych.

W prezentowanej pracy pokazane zostanie wykorzystanie metody ATR do wyjaśnienia pierwotnego i wtórnego mechanizmu działania światła z zakresu bliskiej podczerwieni (NIR) na wybrane układy biologiczne. Badania wykazały, że charakter działania takiego światła jest fotochemiczny choć dotychczas sądzono, że obserwowane efekty są jedynie termiczne. Udowodniły one również zachodzenie transferu protonu w układach biologicznych oraz występowanie procesu modyfikacji struktury wody związanej i globalnej pod wpływem promieniowania z zakresu bliskiej podczerwieni.

Przedstawione zostaną także inne aspekty użycia spektroskopii ATR-FTIR w badaniach biologicznych i medycznych:

- wyznaczanie wartości  $pK_a$  aminokwasów przy pomocy nowej, autorskiej metody;
- badanie mechanizmu dehydratacji zachodzącej podczas procesu suszenia aminokwasów;

- badania wywołanych promieniowaniem NIR zmian konformacyjnych w strukturze aminokwasów, białek i tkanek.

**Źródła finansowania:** Badania finansowane były przez Katedrę Inżynierii Biomedycznej Politechniki Wrocławskiej we Wrocławiu. Do części badań wykorzystano przystawkę ATR zakupioną w ramach grantu MNiSW „Wyposażenie aparaturowe Środowiskowego Laboratorium Biooptyki w Instytucie Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej Politechniki Wrocławskiej” Nr 6180/IA/119/2012.

### Piśmiennictwo

- [1] OLSZTYŃSKA-JANUS S. *Metoda osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia ATR*. W: Chemia fizyczna, tom 4, rozdział 7.8, Laboratorium fizykochemiczne, Praca zbiorowa pod red. L. Komorowskiego i A. Olszowskiego, PWN Warszawa, 2013: 214-217.
- [2] OLESZKO A., OLSZTYŃSKA-JANUS S., WALSKI T., GRZESZCZUK-KUĆ K., BUJOK J., GALECKA K., CZERSKI A., WITKIEWICZ W., KOMOROWSKA M. *Application of FTIR-ATR spectroscopy to determine the extent of lipid peroxidation in plasma during haemodialysis*, Biomed Research International. 2015, art. 245607, s. 1-8.
- [3] OLSZTYŃSKA-JANUS S. *Widmo oscylacyjne*. W: Chemia fizyczna, tom 4, rozdział 17.8, Laboratorium fizykochemiczne, Praca zbiorowa pod red. L. Komorowskiego i A. Olszowskiego, PWN Warszawa, 2013: 669–674,
- [4] OLSZTYŃSKA-JANUS S., GAŚSIOR-GŁOGOWSKA M., SZYMBORSKA-MALEK K., CZARNIK-MATUSEWICZ B., KOMOROWSKA M. *Specific applications of vibrational spectroscopy in Biomedical Engineering*. Rozdział 4, W: Biomedical Engineering, Trends, Research and Technologies/Book 3, Eds.: M. Komorowska i S. Olsztyńska-Janus, InTech, Rijeka, Croatia, 2011: 91-120.
- [5] OLSZTYŃSKA-JANUS S., GAŚSIOR-GŁOGOWSKA M., SZYMBORSKA-MALEK K., WALSKI T., KOMOROWSKA M., WITKIEWICZ W., PEZOWICZ C., KOBIELARZ M., SZOTEK S. *Spectroscopic techniques in the study of soft tissues and their components. Part I: IR spectroscopy*, Acta of Bioengineering and Biomechanics (review), 2012, 14(3): 101-115.
- [6] PASZKOWSKI M., OLSZTYŃSKA-JANUS S., WILK I. *Studies of the kinetics of lithium grease microstructure regeneration by means of dynamic oscillatory rheological tests and FTIR-ATR spectroscopy*, Tribol. Lett., 2014, 56: 107-117.
- [7] PASZKOWSKI M., OLSZTYŃSKA-JANUS S. *Grease thixotropy: evaluation of grease microstructure change due to shear and relaxation*, Ind Lub Tribol, 2014, 2(66): 223-237.

## Multimodalny tomograf ultradźwiękowy: wyniki badań fantomów i struktur biologicznych

KRZYSZTOF J. OPIELIŃSKI<sup>1</sup>, PIOTR PRUCHNICKI<sup>1</sup>, JAROSŁAW MAJEWSKI<sup>2</sup>, WŁODZIMIERZ ROGUSKI<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Wydział Elektroniki, Politechnika Wrocławska, Wyb. Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław, krzysztof.opielinski@pwr.edu.pl, piotr.pruchnicki@pwr.edu.pl

<sup>2</sup>Wydział Telekomunikacji, Informatyki i Elektrotechniki, Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy, ul. Ks. Kordeckiego 20, 85-225 Bydgoszcz, jaromaj@mail.utp.edu.pl

<sup>3</sup>DRAMIŃSKI S.A., ul. Owocowa 17, 10-860 Olsztyn, roguski@draminski.com

**Słowa kluczowe:** tomografia ultradźwiękowa, obrazowanie struktury piersi kobiet

### 1. Wstęp

Tomografia ultradźwiękowa z przeznaczeniem do wizualizacji struktury tkanki miękkiej rozwijana jest przez zespół Pracowni Techniki Ultradźwięków obecnej Katedry Akustyki i Multimediów na Wydziale Elektroniki Politechniki Wrocławskiej od 1991r. [1]. W ciągu ostatnich kilku lat, w ramach współpracy z firmą DRAMIŃSKI S.A. (producent urządzeń medycznych), opracowany został model tomografu ultradźwiękowego [2]. Urządzenie przeznaczone jest do diagnostyki zmian patologicznych piersi kobiet *in vivo* z możliwością pozyskiwania dwuwymiarowych i trójwymiarowych obrazów tkanki piersi w trzech różnych modalnościach obrazowania ultradźwiękowego, za pomocą: ultradźwiękowej tomografii transmisyjnej, ultradźwiękowej tomografii odbiciowej [3], ultrasonografii wycinków przekroju piersi w czasie rzeczywistym oraz ultrasonografii dookólnej przekrojów koronalnych [4,5]. Urządzenie to jest jedynym rozwiązaniem w Polsce i jednym z kilku rozwiązań wdrażanych obecnie w świecie [2].

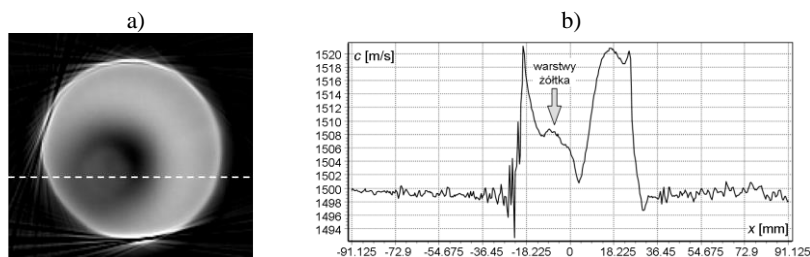
### 2. Materiał i metody

Metoda ultradźwiękowej tomografii transmisyjnej (UTT – *ultrasound transmission tomography*) oraz ultradźwiękowej tomografii odbiciowej (URT – *ultrasound reflection tomography*) stosowana we wdrażanym tomografie wykorzystuje fale ultradźwiękowe o częstotliwości 2 MHz, zbliżonej do częstotliwości fal używanych w tradycyjnej metodzie USG (ultrasonografia). Główne różnice dotyczą sposobu akwizycji danych i rekonstrukcji obrazów. Metody UTT i URT mogą z powodzeniem zostać wykorzystane do wykrywania i diagnozowania zmian ogniskowych w piersiach kobiet. Minimalny czas badania w celu tomograficznego zobrazowania struktury wewnętrznej 3D całej objętości piersi wynosi około 60 ÷ 100 s dla modalności UTT+URT i mniej więcej tyleż samo dla modalności USG. Zmiany niemożliwe do uwidocznienia w klasycznej metodzie USG są możliwe do uwidocznienia metodą UTT. Łączy ona zalety USG (brak jonizującego promieniowania X i konieczności dożylnego podawania pacjentom środków kontrastujących, a także brak przeciwwskazań takich jak implanty ferromagnetyczne, brak kompresji mechanicznej piersi) z techniką transmisyjną stosowaną w komputerowej tomografii rentgenowskiej TK, stając się nowatorską i (co najważniejsze) niezwykle czułą ilościową metodą obrazowania. Wdrażany tomograf ultradźwiękowy jest wyłącznie urządzeniem diagnostycznym, przeznaczonym do wykrywania i diagnozowania *in vivo* patologicznych zmian tkanki w piersiach kobiet, często we wczesnej fazie rozwoju.

W pracy dokonano oceny jakości i rozdzielczości obrazowania za pomocą opracowanego tomografu ultradźwiękowego, analizując uzyskane obrazy przekrojów biopsyjnego elastograficznego fantomu piersi, fantomu agarowego oraz ugotowanego na twardo i pozbawionego skorupki jaja kurzego.

### 3. Wyniki

Na **Ryc. 1** przedstawiono przykładowy wynik ilościowego ultradźwiękowego transmisyjnego obrazowania tomograficznego przekroju poprzecznego ugotowanego na twardo i pozbawionego skorupki jaja kurzego, zanurzonego w wodzie destylowanej.



**Ryc. 1.** Wyniki ilościowego ultradźwiękowego transmisyjnego obrazowania tomograficznego jaja kurzego: a) przekrój poprzeczny, b) wartości pikseli obrazu (a) w postaci prędkości ultradźwięków wzdłuż zaznaczonej linii przerywanej

W uzyskanym przekroju jaja kurzego wyraźnie widoczna jest struktura kuli żółtka w białku (**Ryc. 1a**), umożliwiającą wyróżnienie warstw żółtka białego i żółtego (**Ryc. 1b**).

### 4. Dyskusja

W tomograficznych ultradźwiękowych obrazach transmisyjnych rozkładu prędkości ultradźwięków uzyskano bardzo dobrą rozdzielczość kontrastową, umożliwiającą rozróżnianie minimalnych zmian około 0,4 m/s. Transmisyjne obrazy rozkładu lokalnych wartości tłumienia ultradźwięków mają charakter ilościowo-jakościowy i wizualizują lepiej granice niejednorodności niż ich strukturę. Tomograficzne ultradźwiękowe obrazy odbiciowe wizualizują badane struktury w sposób jakościowy umożliwiając jednak szacowanie rozmiarów niejednorodności ze względu na wyostrenie ich granic. Fuzja obrazów uzyskanych za pomocą różnych modalności ultradźwiękowych umożliwia kompleksowe charakteryzowanie badanej tkanki.

Na podstawie uzyskanych wyników przewiduje się, że badania piersi za pomocą tomografu ultradźwiękowego mogą przyczynić się do właściwego diagnozowania i charakteryzowania wykrytych zmian patologicznych pod kątem ich złośliwości i zagrożenia związanego z ich rozwojem. Badania te powinny prowadzić do ograniczenia inwazyjnych biopsji tkanki piersi. Możliwe będzie stosowanie ich w charakterze badań przesiewowych i profilaktycznych. Ze względu na nieszkodliwość, nieinwazyjność oraz krótki czas skanowania, nie istnieją ograniczenia związane z populacją pacjentów.

### Piśmiennictwo

- [1] OPIEŁIŃSKI K. J. *Analiza możliwości skanowania obiektów*. Materiały XX Krajowej Konferencji Badań Nieniszczących, Szczyrk, 1991:139-142.
- [2] OPIEŁIŃSKI K. J., PRUCHNICKI P., GUDRA T., PODGÓRSKI P., KURCZ J., KRAŚNICKI T., SAŚIADEK M., MAJEWSKI J. *Imaging results of multi-modal ultrasound computerized tomography system designed for breast diagnosis*. *Comput Med Imag Grap*, 2015 (in press).
- [3] KAK A. C., SLANEY M. *Principles of Computerized Tomographic Imaging*. IEEE Press, New York, 1988.
- [4] ENTREKIN R., JACKSON P., JAGO J. R., PORTER B. A. *Real Time Spatial Compound Imaging in Breast Ultrasound: Technology and Early Clinical Experience*. *MedicaMundi*, 1999, 43(3):35-43.
- [5] OPIEŁIŃSKI K. J. *Full angle ultrasound spatial compound imaging*. 7<sup>th</sup> Forum Acusticum 2014 joined with 61<sup>st</sup> Open Seminar on Acoustics and Polish Acoustical Society - Acoustical Society of Japan Special Session Stream, Kraków, 2014.

## Badania właściwości mechanicznych tętnic udowych świń żywionych dietą typu western

ROBERT PASLAWSKI<sup>1</sup>, ANDRZEJ SZUBA<sup>1</sup>, ADRIAN JANISZEWSKI<sup>2</sup>, MAGDALENA KOBIELARZ<sup>3</sup>,  
URSZULA PASLAWSKA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Zawodowych i Nadciśnienia Tętniczego, Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, ul. Borowska 213, 50-556 Wrocław, e-mail autora: robertpaslawski@wp.pl

<sup>2</sup>Katedra Chorób Wewnętrznych z Kliniką Koni Psów i Kotów Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, UP we Wrocławiu

<sup>3</sup>Politechnika Wrocławska, Wydział Mechaniczny, Katedra Inżynierii Biomedycznej, Mechatroniki i Teorii Mechanizmów

**Słowa kluczowe:** *świnia, miażdżyca, wytrzymałość tętnic*

### 1. Wstęp

Miażdżyca jest jednym z najważniejszych problemów współczesnej medycyny. Jest ona złożonym procesem, który prowadzi do tworzenia się na błonie wewnętrznej blaszek złożonych z lipidów, cholesterolu oraz soli wapnia, a następnie zwężenia światła naczyń tętniczych z upośledzeniem przepływu krwi. Miażdżyca prowadzi do zmian właściwości ścian tętnic. Dotychczas przeprowadzane badania wykazały, że wzrost sztywności naczyń może być wczesnym wskaźnikiem zmian miażdżycowych [1, 2].

### 2. Materiał i metody

Badano 3 grupy zwierząt: grupa „Kontrola” (K) składała się z 12 świń żywionych 12 miesięcy standardową karmą. Grupa „Dieta” (D) składała się z 18 świń żywionych dietą typu „western” tj. bogato-tłuszczową i –węglowodanową. Grupa ta została podzielona po 9 miesiącach na dwie podgrupy po 9 zwierząt (D „Dieta” – żywionych nadal przez 3 miesiące dietą typu „western” i R „Regresja” – żywionych przez 3 miesiące karmą standardową). Badania właściwości mechanicznych tętnic biodrowych przeprowadzono na maszynie wytrzymałościowej Synergie 100, MTS z czujnikiem siły o zakresie pomiarowym: 0÷500 N. Pomiary grubości ścian naczyń krwionośnych wykonywano mikroskopem stereoskopowym SteREO Discovery V20, Zeiss. Próbkę były wstępnie napięte siłą o wartości 0,05 N, w celu uzyskania powtarzalnych warunków pomiarowych dla wszystkich preparatów bez względu na stan zaawansowania zmian chorobowych. Pomiar składał się z dwóch etapów: procesu cyklicznego obciążania i odciążania oraz właściwego testu jednoosiowego rozciągania. Proces wstępnego obciążania polegał na odkształceniu badanej próbki do wartości 10 % jej długości początkowej a następnie jej odciążeniu. Pełny cykl powtarzano pięciokrotnie. Po zakończeniu tego etapu automatycznie realizowany był test jednoosiowego rozciągania, który prowadzono aż do zniszczenia badanych próbek. Zastosowana prędkość, w obu etapach testu, była stała i wynosiła 16 mm/min. Na podstawie wymiarów geometrycznych próbek obliczono naprężenia Lagrangian’a ( $\sigma_L$ ), odkształcenie Green’a, naprężenia Cauchy’ego ( $\sigma$ ), odwodowy moduł sieczny  $E_s$ , obwodowy moduł styczny. Dane były analizowane statystycznie przy użyciu programu Statistica 10.0. W przypadku porównywania dwóch grup, których rozkład był normalny stosowano test t-Studenta. W przypadku, gdy rozkład nie był normalny różnice pomiędzy parametrami były analizowane przy użyciu testu U Manna-Whitney’a. Korelacje były testowane przy użyciu testu Spearmana. Analiza pomiędzy 3 grupami zwierząt była wykonywana przy użyciu testu Anova. Wartości p poniżej 0,05 były uważane za istotne.

### 3. Wyniki

Wyniki pomiarów współczynników mechanicznych tętnic udowych. Dane przedstawiono jako średnia  $\pm$  odchylenie standardowe. K – grupa kontrolna, D – grupa dieta, R – grupa regresja

Grupa	$\sigma_L$ naprężenie Lagrangian'a	$\varepsilon$ odkształcenie Green'a	$\sigma$ naprężenie Cauchy'ego	ES obwodowy moduł sieczny	Et obwodowy moduł styczny
K	2,25 $\pm$ 1,10	1,32 $\pm$ 0,38	4,37 $\pm$ 2,33	1,55 $\pm$ 0,70	7,38 $\pm$ 5,02
D	1,58 $\pm$ 0,33	1,25 $\pm$ 0,27	2,98 $\pm$ 0,76	1,38 $\pm$ 0,33	5,27 $\pm$ 0,80
R	1,69 $\pm$ 0,33	1,18 $\pm$ 0,22	3,12 $\pm$ 1,13	1,28 $\pm$ 0,44	5,97 $\pm$ 2,95

Nie stwierdzono istotnych różnic właściwości mechanicznych tętnic pomiędzy badanymi grupami.

### 4. Dyskusja

Właściwości mechaniczne ścian tętnic są przede wszystkim uzależnione od stanu składników strukturalnych błony środkowej takich jak: kolagen, elastyna i włókna mięśniowe. Wpływ błony wewnętrznej i przydanki jest znacząco mniejszy. Włókna mięśniowe wspomagają ruch ścian tętnic, ale to właśnie kolagen i elastyna w największym stopniu wpływają na właściwości mechaniczne ściany naczynia. Miażdżycza jest chorobą, która rozwija się przez wiele lat. W tak długim czasie dochodzi do głębokiej przebudowy ścian naczynia, zmieniającej jego właściwości mechaniczne. W przeprowadzonym badaniu udokumentowano, że wczesne zmiany miażdżycowe, do jakich dochodzi po roku spożywania diety bogatej w tłuszcze i dwucukry, nie powodują istotnych zmian właściwości mechanicznej.

### Piśmiennictwo

- [1] LAURENT S, BOUTOUYRIE P, ASMAR R, GAUTIER I, LALOUX B, GUIZE L, DUCIMETIERE P, BENETOS A. *Aortic stiffness is an independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in hypertensive patients*. Hypertension.2001;37:1236-1241.
- [2] LAURENT S, COCKCROFT J, VAN BORTEL L, BOUTOUYRI P, GIANNATTASIO C, HAYOZ D. *On behalf of the European Network for Non-invasive Investigation of Large Arteries. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications*. Eur Heart J, 2006; 27: 2588-2605.

## Porównanie metod zamykania disulfiramu w liposomach

JAN PROCEK<sup>1</sup>, PAWEŁ GRIEB<sup>2</sup>, MAREK LANGNER<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Politechnika Wroclawska, Wyb. Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław, e-mail: jan.procek@pwr.edu.pl

<sup>2</sup>Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN, Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa

<sup>3</sup>Lipid Systems Sp. z o.o., ul. Duńska 9, 54-427 Wrocław

**Słowa kluczowe:** *disulfiram, enkapsulacja, liposomy*

### 1. Wstęp

Dehydrogenazy aldehydowe są enzymami katalizującymi m.in. przekształcanie grup aldehydowych do kwasowych oraz hydrolizę wiązania estrowego. Pełnią one w organizmie człowieka szereg funkcji np. rozkładają toksyczny acetaldehyd do kwasu octowego, są zaangażowane w metabolizm dopaminy oraz regulują cykl komórkowy poprzez syntezę kwasu retinolowego. Odkryto, iż niektóre dehydrogenazy aldehydowe pełnią funkcję regulacyjną i sygnałową w komórkach nowotworowych. Zwiększony poziom ich ekspresji w nowotworowych komórkach macierzystych pozwala na samoregulację cyklu komórkowego [1].

Jednym z inhibitorów dehydrogenaz aldehydowych jest disulfiram, lek stosowany w leczeniu chronicznego alkoholizmu. Disulfiram i jego metabolity wykazują największą efektywność w hamowaniu aktywności dehydrogenazy aldehydowej 1A1, drugiego pod względem wydajności enzymu przekształcającego aldehyd octowy do kwasu octowego. Uważa się, iż aktywność dehydrogenaz aldehydowych 1A1 oraz 3A1 odpowiedzialna jest za nabywanie lekooporności przez komórki rakowe [2]. Dodatkowo disulfiram jest chelatorem jonów niektórych metali ciężkich np. miedzi i cynku przez co może hamować enzymy zależne od jonów tych metali np. karboksylesterazy i cholinoesterazy, a sam kompleks jest silnym inhibitorem proteasomu [3]. Rosnące zainteresowanie aktywnością przeciwnowotworową disulfiramu doprowadziło do przeprowadzenia badań klinicznych nad wykorzystaniem go w leczeniu raka prostaty, płuc, wątroby i glejaka wielopostaciowego [4]. Zakończone badania nad zastosowaniem disulfiramu w leczeniu raka prostaty wykazały, że tradycyjna metoda podawania disulfiramu w formie tabletek (250 lub 500 mg/dzień) nie powoduje statystycznie istotnej poprawy u pacjentów [5]. Uzyskany negatywny wynik może być związany z biodostępnością doustnej postaci leku. Trudność ta można rozwiązać poprzez zaprojektowanie innej postaci dla disulfiramu.

Disulfiram jest substancją bardzo słabo rozpuszczalną w wodzie o wysokim współczynniku podziału ( $\log P$ ), a zatem wykorzystanie liposomów jako nośnika wydaje się być uzasadnione. W prezentowanej pracy omówione zostaną trzy różne metody zamykania disulfiramu w liposomach. Zamykanie bierne z wykorzystaniem dwuwarstwy lipidowej jako rozpuszczalnika. Zamykanie aktywne z wykorzystaniem gradientu jonów miedzi oraz zamykanie metodą żelu liposomowego z wykorzystaniem cyklodekstryn zamkniętych w liposomach jako rozpuszczalnika.

### 2. Materiał i metody

Lipidy zakupione zostały w Lipoid GmbH (Phospholipon 90G, SPC-100, HSPC) oraz Avanti Polar Lipids Inc. (DOPC, DOPE, DMPG, Lizo-PC, DOTAP). Siarczan miedzi i glikol propylenowy zakupione zostały w Chempur. Hydroksypropyl- $\beta$ -cyklodekstryny zakupione zostały w Sigma Aldrich.

*Zamykanie bierne:* Zawiesina multilamelarnych liposomów z disulfiramek została przygotowana metodą uwodnienia suchego filmu lipidowego, którą następnie ekstrudowano przez filtr poliwęglanowy o średnicy porów 100nm. Wydajność zamykania oceniona została metodą HPLC-UV-ELSD.

*Aktywne ładowanie:* Liposomy w roztworze jonów miedzi przygotowano metodą uwodnienia suchego filmu lipidowego i ekstruzji. Za pomocą ultrafiltracji zewnętrzna część jonów miedzi podstawiona została izoosmotycznym roztworem sacharozy, po której następowało dodanie disulfiramu w glikolu propylenowym. Wydajność tworzenia kompleksu oceniona została metodą spektrofotometryczną.

*Zamykanie metodą żelu:* Lipidy i disulfiram rozpuszczono w glikolu propylenowym, który następnie zmieszano z hydroksypropylo- $\beta$ -cyklodekstrynami rozpuszczonymi w wodzie. Uzyskany żel ekstrudowano przez filtr poliwęglanowy. Wydajność zamykania oceniona została metodą HPLC-UV-ELSD.

### 3. Wyniki i dyskusja

Pomimo wysokiego współczynnika podziału oktanol/woda ( $\log P=3,88$ ) otrzymane wyniki sugerują, iż disulfiram nie wbudowuje się w dwuwarstwę lipidową liposomów co przekłada się na niską, wynoszącą około 4,5 mol% w stosunku do lipidu, wydajność zamykania. Dodatkowo wydajność zamykania jest niezależna od rodzaju lipidów użytych do wytworzenia liposomów. Otrzymany wynik jest zgodny z obserwacjami prezentowanymi w literaturze [6]. Jednakże, wykazanie w sposób systematyczny, że wydajność zamykania disulfiramu w liposomach nie zależy od rodzaju lipidu użytego do formowania liposomów jest wynikiem wcześniej nie publikowanym.

Aktywne ładowanie z wykorzystaniem gradientu jonów miedzi jest potencjalnie najlepszą metodą zamykania disulfiramu w liposomach, ponieważ takie liposomy mogą dostarczyć inhibitor proteasomu do masy guza z wykorzystaniem efektu wzmożonej przepuszczalności i retencji (ang. enhanced retention and permeability effect). Otrzymane wyniki sugerują jednak, iż wytworzone kompleksy disulfiram-jon miedzi są niestabilne w liposomach, szczególnie w wyższych stężeniach.

Ekstruzja żelu lipidowego jest nową metodą zamykania związków w wnętrzu liposomów, która zapewnia praktycznie 100% wydajność zamykania substancji hydrofilowych. Zastosowanie cyklodekstryn jako dodatkowego rozpuszczalnika powinno zwiększyć rozpuszczalność disulfiramu, poprzez przyjęcia formy agregatów supramolekularnych. Otrzymane wyniki pokazują, iż zastosowanie zamykania metodą żelu zwiększa wydajność zamykania disulfiramu w błonach lipidowych do 33%. Uzyskane wyniki pokazały, że dodanie cyklodekstryn nie wpływa na dalszą poprawę wydajności zamykania disulfiramu w liposomach.

**Źródła finansowania:** Prace współfinansowane ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego oraz środków Wydziałowych Politechniki Wrocławskiej.

### Piśmiennictwo

- [1] KOPPAKA V. I WSP. *Aldehyde Dehydrogenase Inhibitors: a Comprehensive Review of the Pharmacology, Mechanism of Action, Substrate Specificity, and Clinical Application*”, *Pharmacol Rev* 64:520–539, 2012
- [2] HONOKI K. I WSP. *Possible involvement of stem-like populations with elevated ALDH1 in sarcomas for chemotherapeutic drug resistance*. *Oncol Rep*. 2010 Aug;24(2):501-5
- [3] LÖVBORG H. I WSP. *Inhibition of proteasome activity, nuclear factor-KappaB translocation and cell survival by the antialcoholism drug disulfiram*. *Int J Cancer*. 2006 Mar 15;118(6):1577-80
- [4] [ClinicalTrials.gov](http://ClinicalTrials.gov)
- [5] SCHWEIZER M.T. *Pharmacodynamic study of disulfiram in men with non-metastatic recurrent prostate cancer*. *Prostate Cancer and Prostatic Disease* (2013) 16, 357–361
- [6] ITO Y I WSP. *Effects of lipid composition on the transcorneal penetration of liposomes containing disulfiram, a potential anti-cataract agent, in the rabbit*. *Biol Pharm Bull*. 2000 Mar;23(3):327-33.

## Wpływ gwałtownych obciążeń mózgu na zaburzenia neurologiczne – badania numeryczne

MONIKA RATAJCZAK<sup>1</sup>, ROMUALD BĘDZIŃSKI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Uniwersytet Zielonogórski, Wydział Mechaniczny, ul. Prof. Z. Szafrana 4, 65-516 Zielona Góra, e-mail autora: m.ratajczak@iizp.uz.zgora.pl, e-mail autora: r.bedzinski@ibem.uz.zgora.pl

**Słowa kluczowe:** biomechanika mózgu, metoda elementów skończonych, dysfunkcje neurologiczne

### 1. Wstęp

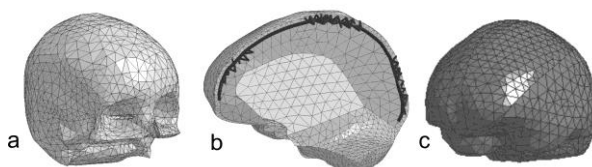
Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) urazowe uszkodzenie mózgu jest kluczowym problemem zdrowia publicznego na całym świecie. WHO przewiduje, że do roku 2020 TBI prześcignie wiele chorób i stanie się główną przyczyną śmierci i niepełnosprawności [1]. Wiodącym powodem destrukcji struktur mózgowych są wypadki komunikacyjne, sportowe oraz konflikty zbrojne. Gwałtowne przeciążenia powodują przekroczenie wytrzymałości struktur głowy powodując urazy otwarte oraz częściej zamknięte. Urazy zamknięte powstają w wyniku szybkich zmian przyspieszeń mózgu względem czaszki oraz przeniesienia zewnętrznej energii z kostnej pokrywy czaszki na tkanki miękkie. W efekcie dochodzi do przemieszczeń tkanek i nadmiernych odkształceń neuronów i naczyń krwionośnych, powodując ich uszkodzenia i krwawienia wewnątrzczaszkowe. Przemieszczenia tkanek mózgowych z ich fizjologicznych obszarów oraz wylewy krwi wpływają na zaburzenia w systemie autoregulacji krążenia krwi i płynu mózgowo-rdzeniowego, wywołując wzmożone ciśnienie śródczaszkowe oraz rozległe obszary niedokrwienia. Wpływ gwałtownych obciążeń na struktury mózgowia inicjuje kaskadę zmian neurologicznych, często prowadzących do poważnych dysfunkcji. Mechanizmy degradacji tkanek mózgowych w warunkach impulsowych nie są do końca poznane. Badania eksperymentalne oraz numeryczne dają pewny wgląd w biomechanikę uszkodzeń tkanek mózgowych. Powszechnie stosowana w mechanice metoda elementów skończonych (MES) coraz częściej znajduje zastosowanie w układach biologicznych. Nie mniej jednak, z uwagi na wielofazową i skomplikowaną budowę struktur mózgowia, w literaturze modeli numerycznych głowy nie jest zbyt wiele [2,3,4]. Równocześnie te istniejące są upraszczane i nie wyjaśniają wielu zjawisk destrukcji tkankowej w szybkozmiennych warunkach obciążeniowych.

W pracy autorzy podjęli badania modelowe struktur mózgowych. W eksperymencie numerycznym analizowano zmiany parametrów i charakterystyk mechanicznych struktur głowy w warunkach gwałtownych przeciążeń.

### 2. Materiał i metody

Obrazy DICOM pozyskane z tomografii komputerowej zostały przetworzone w programie Mimics do trójwymiarowej geometrii. Następnie plik głowy w 3D zaimportowano do programu LS-DYNA, gdzie utworzono szczegółową geometrię. Model głowy składa się z czaszki, mózgowia, opon mózgowych, naczyń, sierpa mózgu i namiotu mózdzku (ryc. 1). Charakterystyki mechaniczne struktur mózgowych pozyskano z badań eksperymentalnych [2,3]. Wybrane fragmenty modelowania tkanek mózgowych z zastosowaniem MES pokazano na rys. 1. W badaniu odtworzono przykładową trajektorię ruchu głowy żołnierza i zderzenie się jej z ciałem niesprężystym w pojeździe opancerzonym podczas eksplozji ładunku wybuchowego pod transporterem. Warunki brzegowe uzyskano z rzeczywistych warunków bojowych z Afganistanu, badań poligonowych oraz symulacyjnych wybuchów ładunków wybuchowych o różnej wielkości ładunku pod kadłubem pojazdów. Wartości użyte w symulacji odczytano z czujników umieszczonych na głowie i szyi

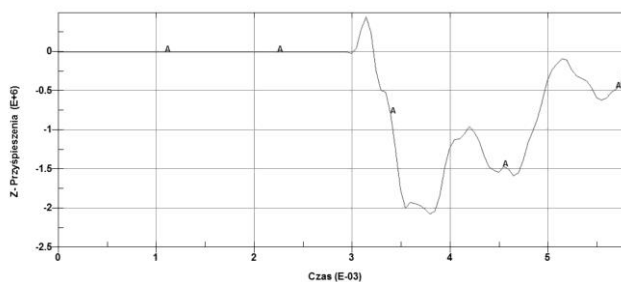
manekina antropometrycznego HYBRID III, który podczas eksplozji znajdował się w transporterze opancerzonym.



Ryc. 1. Model głowy: a) czaszka, b) przekrój głowy w płaszczyźnie strzałkowej, c) rzut izometryczny mózgu

### 3. Wyniki

Analizę numeryczną przeprowadzono dla przykładowego impulsowego obciążenia głowy żołnierza w wyniku eksplozji ładunku wybuchowego pod pojazdem opancerzonym. W wyniku przeprowadzonej analizy numerycznej uzyskano krytyczne wartości odkształceń, naprężeń oraz zmian energii w poszczególnych tkankach mózgowych. Analiza numeryczna wykazała znaczne zróżnicowania charakterystyk w poszczególnych regionach głowy. Na ryc. 2 przedstawiono przykładową charakterystykę przyspieszeń tkanki mózgowej w czasie, w wyniku uderzenia z prędkością 3m/s głowy o dach transportera.



Ryc. 2. Przyspieszenie [ $m/s^2$ ] tkanki mózgowej w czasie [s]

### 4. Dyskusja

Wyniki badań wskazują, że najbardziej narażonymi obszarami jest pień mózgu i region czołowy. Nadmierne odkształcenia przyczyniają się do uszkodzeń wyściółki naczyń i destrukcji neuronów. Gwałtowne zmiany parametrów mechanicznych w strukturach mózgowia mogą powodować proces mechanotransdukcji i prowadzić do poważnych zmian neurologicznych.

**Źródła finansowania:** Badania finansowane w ramach grantu: DOBR-BIO/22/13149/2013

#### Piśmiennictwo

- [1] WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Projections of Mortality and Burden of Disease to 2030*. Deaths by Income Group. Geneva, 2002:12/01/06.
- [2] KLEIVEN S., HARDY W.N. *Correlation of an FE model of the human head with local brain motion – consequences for injury prediction*. Stapp Car Crash J. 46, 2002: 123-144.
- [3] BRANDS D.W.A., BOVENDEERD P.H.M., WISMANS J.S.H.M. *On the potential importance of non-linear viscoelastic material modelling for numerical prediction of the tissue response: test and application*. Stapp Car Crash J. 46 (SAE 2002-22-0006), 2002:103-121.
- [4] RATAJCZAK M., BĘDZIŃSKI R. *An investigation of brain structure deformations under impact loading*, International Conference of the Polish Society of Biomechanics, Łódź, Poland, 2014: 183-184.

## Biomechaniczna analiza wybranych parametrów skoku startowego w pływaniu sportowym

DARIA RUDNIK<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Akademia Wychowania Fizycznego we Wrocławiu, 51-612 Wrocław, al. I.J. Paderewskiego 35, d.rudnik.awf@gmail.com

**Słowa kluczowe:** biomechanika, pływanie, skok startów

### 1. Wstęp

Skok startowy jest elementem technicznym rozpoczynającym w pływaniu sportowym wyścig pływacki. Skuteczność skoku startowego jest szczególnie istotna w wyścigach sprinterskich czyli na dystansie 50 i 100 metrów, gdzie poprawnie wykonany start może zmniejszyć całkowity czas wyścigu nawet o 0,1s [1, 2]. Na skok startowy w pływaniu składa się kilka elementów takich jak; pozycja ciała zawodnika na platformie startowej, szybkość reakcji na sygnał startowy, faza lotu oraz faza poślizgu. Zarówno ilość elementów składających się na skok startowy oraz możliwość ich pomiaru powoduje, że skok startowy jest przedmiotem wielu badań biomechanicznych [3, 4, 5]. Przedmiotem oceny są zazwyczaj związki korelacyjne poszczególnych elementów skoku z czasem uzyskanym przez zawodnika na dystansie 15 m, który zgodnie z przepisami FINA jest granicznym dystansem zezwalającym zawodnikowi na przebywanie pod powierzchnią wody.

W pracy podjęto ocenę skuteczności skoku startowego na dystansie 5,5 m wychodząc z założenia, że jest to odległość od której po starcie zawodnik powinien rozpocząć ruchy napędowe kończynami dolnymi [6]. Przyjęto założenie, że takie postępowanie pozwoli na obiektywną ocenę technicznych elementów skoku, eliminując wpływ ruchów napędowych na efekt końcowy skoku startowego.

Celem badań było określenie wartości parametrów biomechanicznych, decydujących o skuteczności skoku startowego w pływaniu sportowym.

### 2. Materiał i metody

W badaniach wzięło udział 16 zawodników pływania, członków klubu AZS-AWF Wrocław. Badani byli w wieku  $21,5 \pm 1,26$  lat, charakteryzowali się wysokością ciała  $178,2 \pm 8,21$  cm oraz masą ciała  $71,6 \pm 9,9$  kg.

Zadaniem osoby badanej było wykonanie skoku startowego- track start, z platformy startowej. Po przecięciu lustra wody zawodnik pozostawał w pozycji biernego poślizgu, nie wykonywał żadnych ruchów napędowych, jak to ma miejsce w wyścigu pływackim. Każda osoba wykonywała pięć prób odbywających się na sygnał startera. Do monitorowania sposobu rozwiązania zadania ruchowego wykorzystano metodę filmową oraz specjalistyczne oprogramowanie komputerowe do analizy ruchu SIMI Motion. Do rejestracji skoku startowego użyto dwóch kamer VHS, które umieszczono nieruchomo na bocznej ścianie niecki basenowej, w odległości 4m od platformy startowej. Sposób rozmieszczenia kamer pozwalał na rejestrację wszystkich faz składających się na skok startowy zarówno nad jak i pod powierzchnią wody. Dodatkowo dokonywano pomiaru czasu na dystansie 5,5 m. Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej w programie Statistica 10, dokonując statystyk opisowych oraz określając współczynnik korelacji prostej Pearsona ( $\alpha=0,05$ ).

### 3. Wyniki

W tabeli 1 przedstawiono wartości średniej ( $\bar{x}$ ) oraz odchylenia standardowego (sd) badanych parametrów: czas kontaktu z platformą startową – BT (s), czas lotu – FT (s), czas w którym domniemany środek ciężkości ciała pływaka CM znajdował się w powietrzu – AT (s), czas w którym CM znajdował się w wodzie – UT (s), długość lotu – FD (m), kąt odbicia – offA ( $^{\circ}$ ), kąt przecięcia lustra wody – AE ( $^{\circ}$ ), maksymalna uzyskana głębokość – DP (m), prędkość w momencie oderwania kończyn dolnych od platformy startowej – offV (m/s), prędkość końcowa fazy powietrznej – VEA (m/s), maksymalna prędkość fazy podwodnej – VBU (m/s), prędkość końcowa – VE (m/s), czas uzyskany na dystansie 5,5m – T5,5 (s).

**Tab. 1.** Zestawienie średnich wartości oraz odchylenia standardowego (sd) analizowanych parametrów

	BT	FT	AT	UT	FD	OffA	AE	DP	OffV	VEA	VBU	VE	T5,5
x	0,83	0,27	1,23	1,2	2,92	35	39	0,99	4,16	4,04	3,53	1,64	2,43
sd	0,11	0,07	0,14	0,32	0,31	9	6	0,23	0,37	0,73	0,56	0,45	0,44

**Tab. 2.** Wartości współczynnika korelacji pomiędzy badanymi parametrami a prędkością końcową (V) oraz czasem uzyskanym na dystansie 5,5m (T)

	BT	FT	AT	UT	FD	OffA	AE	DP	OffV	VEA	VBU	T5,5
R dla V	-0,28	-0,24	-0,54	-0,67	0,75	-0,47	-0,63	0,25	0,55	0,83	0,67	-0,67
R dla T	0,68	0,22	0,67	0,98	-0,54	0,43	0,63	-0,05	-0,18	-0,67	-0,77	-

### 4. Dyskusja

Kluczowym parametrem wpływającym na czas uzyskany na dystansie 5,5 m, jest czas w którym pływak przebywa pod powierzchnią wody. Czynnikiem, warunkującym ten parametr jest prędkość maksymalna uzyskana w czasie poślizgu. Zarówno czas uzyskany na dystansie 5,5 m, jak i czas w którym pływak przebywa pod powierzchnią wody w dużym stopniu zależą od kąta wejścia ciała do wody oraz długości lotu ciała. Osoby, które wykonały odbicie z platformy startowej pod kątem w przedziale 26-30 stopni, utrzymując dostatecznie długi lot ciała w powietrzu w taki sposób, aby kąt wejścia ciała do wody był zbliżony do  $32^{\circ}$ , najdłużej utrzymywały wysoką wartość prędkości horyzontalnej ciała pod wodą. Kąt wybicia z platformy startowej, w dużym stopniu warunkuje wartości takich elementów jak: prędkość i czas trwania lotu oraz kąt wejścia ciała pływaka do wody. Należy pamiętać, że skok startowy składa się z kilku elementów, a zmiany wartości parametru jednego elementu skoku, nie pozostaną bez wpływu na pozostałe. Za istotne uznano takie elementy jak kąt i prędkość odbicia, ponieważ to one decydują o skuteczności pozostałych elementów skoku startowego.

#### Piśmiennictwo

- [1] COSSOR J., MASON B. *Swim start performances at the Sydney 2000 Olympic Games*. In: Proceedings of XIX Symposium on Biomechanics in sports. San Francisco: University of California, 2001: 25-30.
- [2] MAGLISCHIO E.W. *Swimming fastest*. Human Kinetics, 2003: 275.
- [3] RUSCHEL C., ARAUJO L.G., PEREIRA S.M., ROESLER H. *Kinematical analysis of the swimming start: block, flight and underwater phases*. XXV ISBS Symposium, 2007: 385-388.
- [4] ZATSIORSKY V.M., BULGAKOVA N.Z., CHAPLINSKY N.M. *Biomechanical analysis on starting techniques in swimming*. In: Terauds J., Bedingfield E.W. (eds) *Swimming III*. Baltimore, 1979: 199-206.
- [5] BARLOW H., HALAKI M., STUELECKEN M., GREENE A., SINCLAIR P.J. *The effect of Different kick start position on OMEGA OSB11 blocks on free swimming time to 15m in developmental level swimmers*. Human Movement Science 34, 2014: 178-186.
- [6] ELIPOTM., HELLARD P., TARIAR R., BOISSIERE E., REY J.L., LECAT S., HOUEL N. *Analysis of swimmers' velocity during the underwater gliding motion following grab start*. Journal of Biomechanics, 2009: 1367-1370.

## YKL-40 w raku gruczołu piersiowego

AGNIESZKA RUSAK<sup>1</sup>, KAROLINA JABŁOŃSKA<sup>1</sup>, JĘDRZEJ GRZEGRZÓŁKA<sup>1</sup>, PIOTR DZIĘGIEL<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich, ul. T. Chałubińskiego 6a, 50-368 Wrocław, e-mail: rusakagn@gmail.com

<sup>2</sup>Katedra Fizjoterapii, Akademia Wychowania Fizycznego we Wrocławiu, Al. Ignacego Jana Paderewskiego 35, 51-612 Wrocław, piotr.dziegiel@umed.wroc.pl

*Słowa kluczowe:* rak gruczołu piersiowego, YKL-40, biomarker

### 1. Wstęp

YKL-40 (CH3L1) jest sekrecyjną glikoproteiną (40 kDa) należącą do rodziny nieaktywnych katalitycznie chitynaz CLP (chitinase-like protein). Podwyższony poziom YKL-40 w surowicy krwi obserwowany jest u pacjentów z różnorodnymi schorzeniami, m.in. rakiem jajnika, gruczołu piersiowego, czy glejakiem oraz stanem zapalnym [1]. Uważa się, że YKL-40 może być czynnikiem prognostycznym w chorobach nowotworowych. Mechanizm, w którym uczestniczy YKL-40, wiązany jest z procesem powstawania nowych naczyń krwionośnych guza (angiogeneza) [1], [2].

### 2. Materiał i metody

#### 2.1. Western Blot

Badania przeprowadzono na liniach komórkowych raka gruczołu piersiowego: MCF-7, SK-BR-3, MDA-MB-231 i BO2 oraz linii prawidłowego nabłonka gruczołu piersiowego hTERT-HME1. Do badań włączono także homogenaty tkankowe z materiału mrożonego (rak gruczołu piersiowego, rak żołądka, rak jelita grubego) oraz białko precypitowane z medium po hodowlach komórkowych. Poziom białka oznaczono metodą Western Blot.

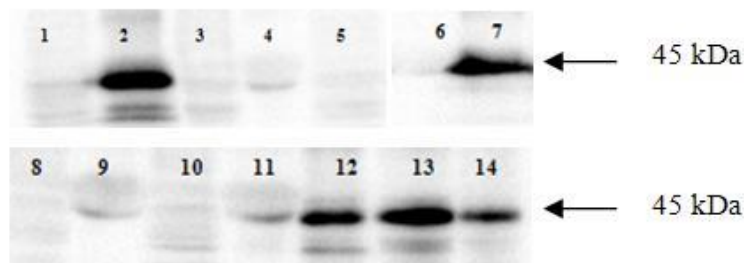
#### 2.2. Real-time PCR

Reakcję real-time PCR przeprowadzono na materiale mrożonym raków gruczołu piersiowego o stopniu złośliwości histologicznej G1, G2 i G3 z zastosowaniem primerów dla YKL-40 i  $\beta$ -aktyny jako kontroli endogennej. Reakcję real-time PCR przeprowadzono także dla ww. linii komórkowych. Obliczenia zmian w poziomie ekspresji mRNA zostały przeprowadzone z zastosowaniem metody  $\Delta\Delta Ct$ .

### 3. Wyniki

#### 3.1. Western Blot

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały brak obecności YKL-40 w lizatach komórkowych oraz możliwą sekrecję białka do medium przez linię h-TERT-HME1. Z kolei YKL-40 oznaczono w homogenatach tkankowych raków gruczołu piersiowego, żołądka i jelita grubego (**Ryc.1**).



**Ryc.1.** Western Blot. Lizaty komórkowe oraz białko precipitowane z medium

Legenda:

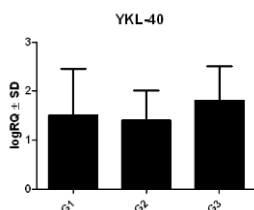
1 – hTERT-HME1, 2 – hTERT-HME1 medium, 3 – MCF-7, 4 – MCF-7 medium, 5 – SK-BR-3, 6 – SK-BR-3 medium, 7 – MEBM medium, 8 – MDA-MB-231, 9 – MDA-MB-231 medium, 10 – BO2, 11 – BO2 medium.

Homogenaty tkankowe: 12 – rak gruczołu piersiowego, 13 – rak żołądka, 14 – rak jelita grubego

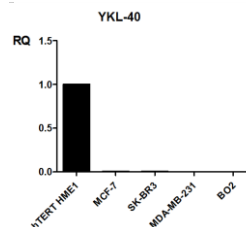
Widoczny specyficzny prążek na wysokości 45 kDa dla YKL-40 dla próbek 12-14. Obecność YKL-40 w medium MEBM znad hodowli h-TERT-HME1 -2 oraz bez hodowli – 7 może wynikać ze specyficznego składu tego medium oraz sekrecji białka przez komórki.

### 3.2. Real-time PCR

Reakcja real-time PCR wykazała różnicę w ekspresji mRNA YKL-40 pomiędzy stopniami złośliwości histologicznej guzów G2 i G3 bliską istotności statystycznej ( $p=0,067$ ) (**Ryc.2**). Z badanych linii komórkowych najwyższy poziom ekspresji mRNA YKL-40 wykazała linia hTERT-HME1 (**Ryc.3**).



**Ryc.2.** Poziom ekspresji mRNA YKL-40 w rakach gruczołu piersiowego o stopniu złośliwości G1 (n=6), G2 (n=20) i G3 (n=20); G2 vs G3  $p=0,067$ ; t-test. Przedstawione wyniki są średnią z trzech pomiarów



**Ryc.3.** Poziom ekspresji mRNA YKL-40 w liniach raka gruczołu piersiowego; ANOVA z poprawką Bonferroni; hTERT-HME1 vs MCF-7, SK-BR-3, MDA-MB-231 lub BO2  $p<0,0001$ . Przedstawione wyniki są średnią z trzech pomiarów

## 4. Dyskusja

Przeprowadzone badania wykazały ekspresję mRNA YKL-40 w guzach raków gruczołu piersiowego o zróżnicowanym stopniu złośliwości. Wyniki otrzymane dla linii komórkowych są zgodne z dotychczas opublikowanymi pracami innych autorów.

### Piśmiennictwo

- [1] SHAO R. *YKL-40 acts as an angiogenic factor to promote tumor angiogenesis*. Front Physiol 2013, 4:122.
- [2] RIABOV V., GUDIMA A., WANG N., MICKLEY A., OREKHOV A., KZHYSHKOWSKA J. *Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis*. Front Physiol 2014, 5:75.

## Biofunkcjonalizacja nanocząstek upkonwertujących – metody i zastosowania

MICHAŁ SKOWICKI<sup>1</sup>, TOMASZ LIPIŃSKI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej, Polska Akademia Nauk, ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114, Wrocław, e-mail: [michal.skowicki@eitplus.pl](mailto:michal.skowicki@eitplus.pl)

<sup>2</sup>Wrocławskie Centrum Badań EIT+, ul. Stabłowicka 147, 54-066 Wrocław, e-mail: [tomasz.lipiński@eitplus.pl](mailto:tomasz.lipiński@eitplus.pl)

**Słowa kluczowe:** *upkonwersja, nanocząstki konwertujące w górę, biofunkcjonalizacja*

### 1. Wstęp

Postęp w rozwoju technik diagnostycznych i metod bioobrazowania stwarza stale rosnące zapotrzebowanie na nowe, efektywne, fotostabilne znaczniki fluorescencyjne. Konwertujące w górę nanoluminofory domieszkowane jonami lantanowców przyciągają uwagę wielu badaczy ze względu na swoje wyjątkowe właściwości fluorescencyjne. Nanocząstki te posiadają wiele korzystnych cech, dzięki którym przewyższają powszechnie stosowane znaczniki fluorescencyjne, a nawet kropki kwantowe. W procesie upkonwersji konwertujące w górę nanocząstki (UCNPs – *up-converting nanoparticles*) absorbując promieniowanie elektromagnetyczne w zakresie długości fal IR - NIR emitują promieniowanie o krótszych falach, w zakresie UV – IR. Dzięki temu UCNP wykazują większy kontrast sygnału w stosunku do tła [1]. Zwiększona zdolność do penetracji promieniowania elektromagnetycznego w zakresie podczerwieni umożliwia wzbudzenie UCNP poprzez warstwy materiału biologicznego np. skórę, przy czym wzbudzenie UCNP podczerwienią nie uszkadza materiału biologicznego. UCNP nie ulegają zjawisku fotowysielania, a także wykazują niewielką toksyczność w systemach biologicznych, dzięki czemu są obiecującym narzędziem w bioobrazowaniu [2]. Pomimo zalet jakie oferują UCNP większość z opisywanych w literaturze metod ich funkcjonalizacji skutkuje otrzymaniem cząstek wykazujących tendencję do precypitacji w płynach ustrojowych, co utrudnia ich zastosowanie w bioobrazowaniu, szczególnie niewielkich struktur, takich jak receptory komórkowe. Z tego powodu wiele uwagi poświęca się opracowywaniu nowych, skutecznych metod funkcjonalizacji i koniugacji UCNP. W ramach prowadzonych badań opracowano nowe, skuteczne metody funkcjonalizacji UCNP, a także zaprezentowano przykładowe aplikacje uzyskanych w ten sposób cząstek.

### 2. Materiał i metody

#### 2.1. Materiał

Nanocząstki upkonwertujące: NaYF<sub>4</sub> 2%Er 20%Yb, core shell:20%Yb

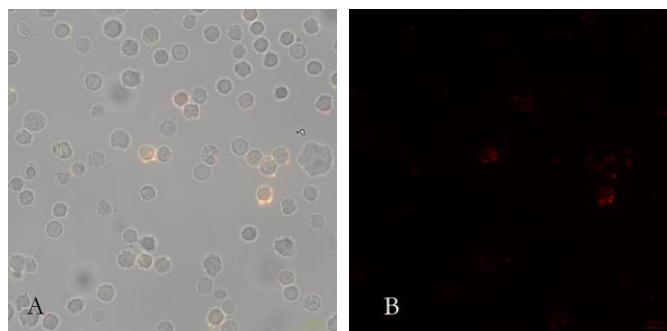
Fotopolimer: poliwinylpirolidon z ugrupowaniami ANB-NOS

#### 2.1. Metody

Metoda funkcjonalizacji powierzchni UCNP polega na pokrywaniu ich fotopolimerem, który w wyniku aktywacji promieniowaniem UV ulega koniugacji z aminowanym dekstranem, przez co dochodzi do usieciowania wytworzonej w ten sposób powłoki. Obecność aminowanego dekstranu na powierzchni umożliwia przyłączenie do nanocząstek dodatkowych molekuł poprzez wolne grupy aminowe dekstranu. Do tak zmodyfikowanych cząstek podłączono kowalencyjnie białko G.

### 3. Wyniki

UCNP sfunkcjonalizowane białkiem G wykorzystano do obrazowania receptorów BCR na mysich splenocytach. Do barwienia wykorzystano nanocząstki z białkiem G inkubowane uprzednio z kozimi przeciwciałami rozpoznającymi mysie immunoglobuliny (ryc.1).



**Ryc. 1.** Obrazowanie receptorów BCR na splenocytach myszy Balb/c za pomocą UCNP. Splenocyty myszy Balb/c uprzednio immunizowanej toksoidem tężcowym inkubowano z UCNP skoniugowanymi z białkiem G ze związanymi kozimi przeciwciałami wyznakowanymi Alexa 480, rozpoznającymi mysie IgG. **A** – obraz w świetle widzialnym z nałożoną fluorescencją; **B** – sygnał pochodzący z upkonwersji

Sfunkcjonalizowane za pomocą białka G UCNP wykorzystano także do wykrywania cząsteczek na membranie nitrocelulozowej (technika dot-blot). Na membranę nanoszono różne stężenia mysich immunoglobulin, po czym inkubowano ją w roztworze zawierającym UCNP sfunkcjonalizowane białkiem G. Opisana metoda pozwala na wykrywanie białka z dużą czułością. Najniższa wykrywana ilość przeciwciał wynosiła 0,4 ng.

### 3. Dyskusja

Opracowano nowe, skuteczne metody funkcjonalizacji umożliwiające uzyskanie cząstek UCNP tworzących stabilny, dobrze rozdyspergowany koloid, bez znacznych tendencji do agregacji w płynach ustrojowych czy mediach hodowlanych. Ponadto, tak funkcjonalizowane cząstki UCNP posiadają grupy funkcyjne umożliwiające dalsze sprzężanie z biomolekułami. W ramach przedstawionych prac przyłączyliśmy do cząstek UCNP białko G i wykazaliśmy ich przydatność w obrazowaniu fluorescencyjnym niewielkich struktur komórkowych, takich jak receptory błonowe oraz możliwość zastosowania w technikach typu blotting, gdzie uzyskano wysoką czułość detekcji. Dalsze badania, uwzględniające m.in. cytotoksyczność i biodystrybucję będą prowadzone w kierunku innych aplikacji np. obrazowania guzów nowotworowych czy teranostyce.

**Źródła finansowania:** <sup>1</sup>Praca współfinansowana ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu. <sup>2</sup>Praca współfinansowana ze środków Wrocławskiego Centrum Badań EIT+ w ramach realizacji projektu NanoMat – „Wykorzystanie nanotechnologii w nowoczesnych materiałach”, (POIG.01.01.02-02-002/08) współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego (Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka, Poddziałanie 1.1.2).

### Piśmiennictwo

- [1] DACOSTA M.W., DOUGHAN S., *Lanthanide upconversion nanoparticles and applications in bioassays and bioimaging: a review*. Anal Chim Acta. 2014, 832:1-33
- [2] ZHOU J. C., YANG Z. L., DONG W., TANG R. J., SUN L. D., YAN C. H., *Bioimaging and toxicity assessments of near-infrared upconversion luminescent NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm nanocrystals*. Biomaterials 2011, 32(34): 9059-67;

## Telerehabilitacja osób z niesprawnością kończyny górnej

ARLETA STASZUK<sup>1</sup>, BENITA KOSTRZEWA<sup>2</sup>, RYSZARD TADEUSIEWICZ<sup>1</sup>, EWA KARUGA-KUŹNIEWSKA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Akademia Górniczo-Hutnicza im. S. Staszica w Krakowie, Katedra Automatyki i Inżynierii Biomedycznej, al. Mickiewicza 30, Kraków 30-059, arleta.staszuk@gmail.com

<sup>2</sup>Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Zakład Chirurgii Eksperymentalnej i Badania Biomateriałów, ul. Poniałowskiego 2, Wrocław 50-326

**Słowa kluczowe:** telerehabilitacja, zdalna rehabilitacja, niedowład kończyny górnej

### 1. Wstęp

Telerehabilitacja jest dynamicznie rozwijającą się gałęzią telemedycyny, która pozwala na rehabilitację osób poza placówką medyczną, pod zdalnym nadzorem lekarza i/lub rehabilitanta. Zdalna opieka rehabilitacyjna ma szczególne znaczenie dla pacjentów, którzy po hospitalizacji wymagają kontynuacji ćwiczeń w domu [1, 2]. Takimi pacjentami są osoby po przebytych udarach mózgu, który może prowadzić do niedowładu kończyny górnej przy zaniechaniu rehabilitacji.

Duża część badań prezentowanych w literaturze koncentruje się na zdalnej rehabilitacji z wykorzystaniem specjalistycznych urządzeń [3, 4]. W niniejszej pracy przedstawiono autorską metodę zdalnej rehabilitacji. Metoda nie wymaga zakupu dodatkowego specjalistycznego sprzętu medycznego. Pacjent prowadzi rehabilitację w domu, używając komputera osobistego wyposażonego w kamerę oraz podłączonego do sieci Internet.

### 2. Materiał i metody

*Aspekt medyczny:* Na etapie projektowania oprogramowania prowadzono konsultacje z rehabilitantem oraz pacjentem w wieku 24 lat z niedowładem kończyny górnej spowodowanym dziecięcym porażeniem mózgowym. Szczegółowej analizie poddano ruchy manipulacyjne ręki – nadgarstka i palców.

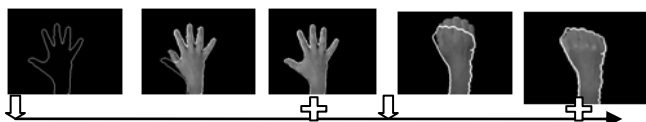
*Aspekt techniczny:* Opracowane rozwiązanie wykorzystuje komputer osobisty wyposażony w kamerę i podłączony do Internetu. Oprogramowanie oparto na algorytmach cyfrowego przetwarzania obrazów tj. binaryzacji, filtracji, przekształceniu przestrzeni barw, wykrywaniu koloru skóry na obrazie oraz wykrywaniu konturu kształtu.

### 3. Wyniki

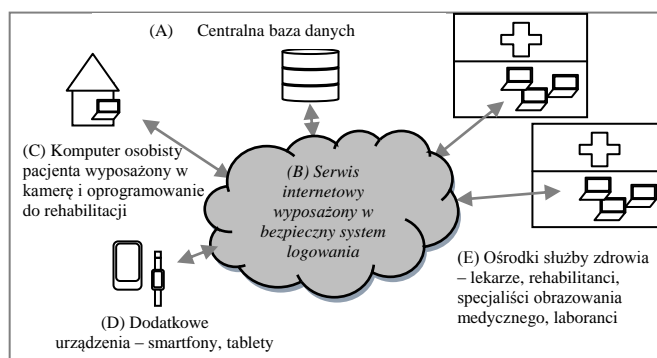
Opracowane oprogramowanie do telerehabilitacji charakteryzuje się łatwością dopasowania do rehabilitowanego pacjenta. Stworzony proces telerehabilitacji składa się z dwóch etapów. Etap I to przygotowanie ćwiczeń: pacjent w kontakcie osobistym lub zdalnym z rehabilitantem układa dłoń w zasięgu kamery według wskazań i po prawidłowym wykonaniu ćwiczenia zrobione zostaje zdjęcie. Pacjent zmienia ułożenie dłoni na kolejne zalecane przez rehabilitanta pozycje, które także dokumentowane są fotograficznie. Wykonane zdjęcia cyfrowe po odpowiednim przetworzeniu stanowią szablony poprawnie wykonanych ćwiczeń dla poszczególnych pacjentów i są przechowywane na serwerach internetowych wraz z opisem kolejności i ilości powtórzeń danego ćwiczenia.

Etapem II jest wykonywanie ćwiczeń przez pacjenta. Po uruchomieniu oprogramowania pacjent widzi załadowany z serwera internetowego zestaw ćwiczeń przygotowany w pierwszym etapie i rozpoczyna sesję rehabilitacyjną. Na ekranie wyświetlane są kontury prawidłowego ułożenia dłoni wydobyte ze zdjęć. Pacjent próbuje ułożyć swoją dłoń zgodnie z szablonem. Po poprawnym zrealizowaniu ćwiczenia automatycznie ładowane jest kolejne zadanie. Po wykonaniu wszystkich

powtórzeń generowany jest raport. Oprogramowanie pozwala na ustawienie stopnia trudności będącego miarą dokładności, z jaką pacjent musi zrealizować ćwiczenie, aby zostało uznane za prawidłowo wykonane. Przykładowe ćwiczenie pokazano na **rycynie 1**. Na **rycynie 2** przedstawiono architekturę systemu wykorzystującego opracowane oprogramowanie.



**Ryc. 1.** Przykładowe ćwiczenie koncentrujące się na głównych problemach przy spastyczności dłoni – maksymalnym rozsunięciu palców dłoni, a następnie maksymalnym zaciśnięciu pięści. Strzałki na osi poziomej oznaczają automatyczne wczytanie nowego szablonu, plusy oznaczają prawidłowo wykonane ćwiczenie



**Ryc. 2.** Architektura systemu telerehabilitacji z uwzględnieniem komponentu rehabilitacji dłoni (C)

#### 4. Dyskusja

Badania przeprowadzone przez Tonga i Connellego wskazują na aktualność zagadnienia telerehabilitacji [3, 4]. Tong proponuje do rehabilitacji zdalnej użycie specjalnie zaprojektowanego ramienia robota, Connelly zaprojektowaną rękawicę i wykorzystanie wirtualnej rzeczywistości. Zakup dodatkowego sprzętu rehabilitacyjnego stanowić może problem natury ekonomicznej. Proponowane rozwiązanie pozwala na osiągnięcie wartości terapeutycznej przy zastosowaniu jedynie komputera osobistego pacjenta. Prowadzenie długotrwałej oraz prawidłowej rehabilitacji w warunkach domowych skutkować będzie znaczną poprawą stanu pacjenta i obniżeniem kosztów związanych z ponowną hospitalizacją i/lub rehabilitacją konwencjonalną.

#### Piśmiennictwo

- [1] TADEUSIEWICZ R. *Systemowe podejście do wybranych zagadnień telemedycyny*. Techniki informacyjne w badaniach systemowych, Warszawa, 2007.
- [2] PRAMUKA M., VAN ROOSMALEN L. *Telerehabilitation Technologies: Accessibility and Usability*. Int J Telerehabilitation 2009;1(1):25–36.
- [3] TONG K.Y., HO S.K., PANG P.K., HU X.L., TAM W.K., FUNG K.L., ET AL. *An Intention Driven Hand Functions Task Training Robotic System*, 32nd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 2010.
- [4] CONNELLY L., JIA Y., TORO M.L., STOYKOV M.E., KENYON R.V., KAMPER D.G. *A pneumatic glove and immersive virtual reality environment for hand rehabilitative training after stroke*, IEEE Trans Neural Syst Rehab Eng 2010, 18(5):551–59.

## Modelowanie mechanizmów wytwarzania mowy patologicznej

ARLETA STASZUK<sup>1</sup>, BENITA KOSTRZEWA<sup>2</sup>, RYSZARD TADEUSIEWICZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Akademia Górniczo-Hutnicza im. S. Staszica w Krakowie, Katedra Automatyki i Inżynierii Biomedycznej, al. Mickiewicza 30, Kraków 30-059, arleta.staszuk@gmail.com

<sup>2</sup>Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Wydział Lekarsko-Stomatologiczny, ul. Poniatowskiego 2, 50-326 Wrocław

**Słowa kluczowe:** mowa patologiczna, modelowanie

### 1. Wstęp

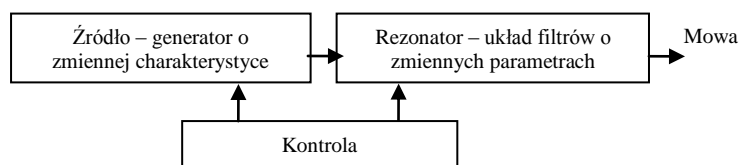
Celem modelowania mechanizmów wytwarzania mowy patologicznej jest znalezienie analogii pomiędzy konfiguracją traktu głosowego, a mierzalnymi cechami akustycznymi wygenerowanego sygnału. Punktem startowym jest stworzenie modelu wytwarzania prawidłowej mowy. Sygnał mowy powstaje w procesie fonacji i artykulacji [1, 2, 3]. Modyfikacje parametrów modelu, które reprezentują narządy fonacji (płuca, krtani) i artykulacji (tract głosowy) pozwalają na odzwierciedlenie zmian patologicznych w obrazie akustycznym wygenerowanego sygnału mowy [4, 5]. W niniejszej pracy przeanalizowano elementy modelu źródło-filtr pod kątem zmian patologicznych. Modelowanie mechanizmów wytwarzania mowy patologicznej może być przydatne w diagnostyce i terapii schorzeń narządu mowy.

### 2. Materiał i metody

Patologie mowy mogą mieć źródło w nieprawidłowym funkcjonowaniu układu oddechowego, fałdów głosowych, elementów traktu głosowego lub mogą mieć podłoże psychiczne. Analizę oparto o model źródło-filtr wytwarzania mowy prawidłowej.

### 3. Wyniki

Prawidłowe wytwarzanie głosu wymaga sprawnie funkcjonujących narządów układu oddechowego, mechanizmu drgającego i przestrzeni rezonansowych o poprawnej budowie. Ton krtaniowy powstaje poprzez przepływ powietrza z dużym ciśnieniem podgłośniowym oraz odpowiednią pracą mięśni krtaniowych wywołujących drgania fałdów głosowych, które wytwarzają falę akustyczną o niskiej częstotliwości zależnej od masy fałdów głosowych, ich długości i napięcia. **Rycina 1** prezentuje zaproponowany przez Dudley [6] model wytwarzania mowy. Sygnał mowy jest splotem przebiegu czasowego sygnału z głośni i odpowiedzi impulsowej kanału głosowego.



**Ryc. 1.** Model źródło-filtr wytwarzania mowy

Schorzenia związane z nieprawidłowym funkcjonowaniem układu oddechowego wpływają na siłę źródła sygnału i jego energię. Gdy siła wydechu jest niewystarczająca, powstaje zbyt małe ciśnienie powietrza i fala akustyczna docierająca do ucha odbiorcy jest niezrozumiała. Spłycony oddech towarzyszący wielu chorobom, jak również stresowi utrudnia fonację. W modelu źródła należy

uwzględnić regulację intensywności generowanego sygnału, którego charakterystyka zależy od głośni. Znaczący odsetek wszystkich chorób krtani związany jest z pracą w warunkach podwyższonego ryzyka chorób narządu mowy, w zawodach takich jak nauczyciel, aktor, dziennikarz, śpiewak. Wzrost napięcia mięśniowego gardła i podniebienia poprzez ciągłe nadmierne obciążanie fałdów głosowych prowadzi do chrypienia, okresowych zaników głosu, zawężenia skali głosu i zmniejszenia dźwięczności głosu poprzez ograniczony rezonans. Schorzenia krtani obejmują dodatkowe narośla na fałdach głosowych zwiększające ich masę. Parametrami zmiennymi w modelu są masa, długość oraz napięcie fałdów głosowych. W przypadku dysfonii przydatna jest osobna analiza ruchu dla każdego z fałdów głosowych, gdyż jeden fałd obciążony cystą ma większą masę i drga z inną częstotliwością niż drugi fałd. Model traktu głosowego prezentowany jest zazwyczaj jako superpozycja cylindrów, których przekroje są w przybliżeniu zgodne z rzeczywistymi wymiarami. Schorzenia języka i jamy nosowej powodują zniekształcenie kanału głosowego i wpływają na parametry filtrów.

W pracy podjęto badania nad dostosowaniem istniejących modeli mowy prawidłowej do warunków patologicznych. Zwrócono uwagę na elementy, które zazwyczaj są pomijane w modelowaniu mechanizmów wytwarzania mowy prawidłowej, ale mają istotne znaczenie w modelowaniu schorzeń.

#### 4. Dyskusja

Źródła literaturowe [1, 2, 3, 4, 6] prezentują wiedzę z zakresu modelowania mechanizmów wytwarzania prawidłowej mowy. Jest to punkt wyjściowy dla modelowania patologii. Im dokładniejszy jest model, tym więcej różnic można uchwycić w obrazie akustycznym, kosztem większej złożoności obliczeniowej.

Modelowanie mechanizmów wytwarzania mowy potrzebne jest do zrozumienia, jakie zjawiska zachodzą podczas generowania głosu. Odpowiednie zamodelowanie źródła nieprawidłowości może mieć zastosowanie w diagnostyce schorzeń narządu mowy. W wielu przypadkach zrozumienie pochodzenia danego sygnału może być wsparciem dla prac nad poprawą jakości sygnału mowy, co z kolei może mieć zastosowanie w korygowaniu zrozumiałości mowy osoby z patologią.

Wykorzystanie stworzonych modeli do symulacji działania traktu głosowego podczas wytwarzania mowy może dostarczać wartości terapeutycznych dla osób, które poprzez obserwację i próby naśladowania prawidłowego ułożenia narządów artykulacyjnych mogą poprawić jakość i zrozumiałość wytwarzanej mowy.

#### Piśmiennictwo

- [1] TADEUSIEWICZ R. *Sygnal mowy*. Wydawnictwa Komunikacji i Łączności, Warszawa, 1988.
- [2] BENESTY J., SONDEHI M. M., HUANG Y. *Springer handbook of speech processing*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2008.
- [3] LEVINSON S. E. *Mathematical models of speech technology*, John Wiley & Sons, Ltd, 2005.
- [4] WSZOŁEK W., *Automatic understanding of acoustic speech signal pathology*. Archives of Acoustics, 2007, 32: 147-163.
- [5] TADEUSIEWICZ R. *Automatic understanding of signal*. Wydawnictwa Komunikacji i Łączności, Warszawa, 1988.
- [6] DUDLEY H. *The vocoder*, J. Acoust. Soc. Amer., 1930.

## Sztywność kończyn dolnych w odbiciu do skoku pionowego z zamachem kończynami górnymi oraz bez zamachu

ARTUR STRUZI<sup>1</sup>, JERZY ZAWADZKI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra Zespołowych Gier Sportowych, Akademia Wychowania Fizycznego, ul. Adama Mickiewicza 58, 51-684 Wrocław, e-mail: artur.struzik@awf.wroc.pl

<sup>2</sup>Katedra Biomechaniki, Akademia Wychowania Fizycznego, ul. Adama Mickiewicza 58, 51-684 Wrocław, e-mail: jerzy.zawadzki@awf.wroc.pl

**Słowa kluczowe:** cykl rozciągnięcie-skurcz, koszykówka, sprężystość

### 1. Wstęp

Prawidłowe wykonanie skoku pionowego CMJ (*countermovement jump*) polega na skoku w górę z miejsca z pozycji stojącej, poprzedzonego szybkim ugięciem kończyn dolnych i odbiciem obunóż wraz ze skoordynowanym z pozostałymi częściami ciała zamachem kończynami górnymi. Istnieje również odmiana skoku CMJ, w której dłonie spoczywają przez cały czas trwania skoku na biodrach, tzw. *akimbo countermovement jump*. Maksymalna możliwa do uzyskania wysokość skoku ACMJ jest przeważnie o około 10% mniejsza niż podczas skoku wykonanego z zamachem kończynami górnymi [1-3]. Jednak mechanizm odpowiedzialny za to zjawisko nie jest jeszcze całkowicie wyjaśniony. Przyczyną może być wzrost wykonanej przez kończyny dolne pracy, wynikającej z dodatkowego ich obciążenia, spowodowanego przez zamach kończynami górnymi [2, 3]. Harman i wsp. [1] odnotowali dodatkowo towarzyszący zamachowi kończyn górnych wzrost maksymalnej siły reakcji podłoża. Można zatem postawić pytanie czy wzrost siły reakcji podłoża jest skutkiem większej wartości sztywności kończyn dolnych spowodowanej przez wykonanie zamachu kończynami górnymi? Czy zatem wartość sztywności kończyn dolnych będzie większa podczas skoku CMJ niż ACMJ?

Celem pracy jest porównanie wartości sztywności kończyn dolnych w fazie zamachu i odbicia podczas skoków CMJ i ACMJ.

### 2. Materiał i metody

Badania zostały przeprowadzone na grupie 30 drugoligowych koszykarzy. Grupa badawcza charakteryzowała się następującymi średnimi wartościami wielkości ( $\pm$ SD); wysokość ciała: 190,9  $\pm$  8,2 cm, masa ciała: 82,5  $\pm$  9,9 kg, wiek: 19,3  $\pm$  1,7 lat. Staż treningowy wynosił 6,8  $\pm$  2,5 lat.

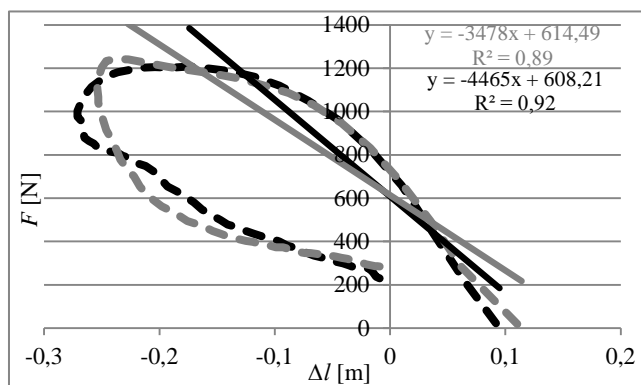
W pomiarach wykorzystano platformę dynamometryczną firmy Kistler oraz system analizy ruchu BTS SMART. Każdy z badanych wykonał trzy skoki CMJ i ACMJ. Do dalszych analiz wykorzystano najwyższy skok CMJ i ACMJ każdego z badanych. Wysokość skoku została obliczona na podstawie czasu trwania fazy lotu. Sztywność kończyn dolnych w fazie zamachu i odbicia wyznaczono jako stosunek zmian wartości siły reakcji podłoża do odpowiadającej jej zmiany wysokości krętarza większego kości udowej (umowna górna granica kończyn dolnych) [4].

Do analizy różnic pomiędzy zmiennymi wykorzystano test *t* istotności różnic dla zmiennych zależnych na poziomie istotności  $\alpha = 0,05$  ze względu na rozkład normalny zmiennych.

### 3. Wyniki

Tabela 1 zawiera średnie wartości zarejestrowanych zmiennych dla skoków CMJ i ACMJ. Sztywność kończyn dolnych podczas fazy odbicia okazała się istotnie statystycznie większa podczas skoku CMJ niż ACMJ (ryc. 1). Różnica dla sztywności kończyn dolnych w fazie zamachu nie była istotna statystycznie. Nie odnotowano również istotnych statystycznie różnic dla maksymalnego kąta

ugięcia kończyn dolnych w stawach kolanowych pomiędzy skokami CMJ i ACMJ. Dodatkowo skoki CMJ były istotnie statystycznie wyższe od ACMJ.



**Ryc. 1.** Siła reakcji podłoża kończyny dolnej lewej jednego z badanych w zależności od pionowego przemieszczenia krętarza większego kości udowej względem podłoża dla skoku CMJ (przerywana linia czarna) i ACMJ (przerywana linia szara), z naniesionymi liniami trendu obrazującymi wartości sztywności kończyn dolnych w fazie odbicia

**Tab. 1.** Średnie wartości (±SD) sztywności kończyn dolnych w fazie zamachu ( $K_z$ ), sztywności kończyn dolnych w fazie odbicia ( $K_o$ ), maksymalnego kąta ugięcia kończyn dolnych w stawach kolanowych ( $\alpha_{max}$ ) oraz wysokości skoków ( $h$ ) CMJ i ACMJ

Rodzaj skoku	$K_z$ (kN/m)	$K_o$ (kN/m)	$\alpha_{max}$ (°)	$h$ (m)
CMJ	7,1 ± 2,3	7,4 ± 1,0*	76,7 ± 9,4	0,45 ± 0,05**
ACMJ	7,3 ± 2,7	7,0 ± 1,2*	76,4 ± 9,4	0,37 ± 0,05**

\*, \*\* - istotne statystycznie różnice dla  $p < 0,05$

#### 4. Dyskusja

Zamach kończynami górnymi w fazie odbicia pomaga w uzyskaniu większej wartości przyspieszenia środka masy ciała oraz siły odbicia. Większe wartości sztywności kończyn dolnych w fazie odbicia dla skoku CMJ w porównaniu do ACMJ mogą więc być skutkiem wykonania zamachu kończynami górnymi. Powyższe stwierdzenie wymaga założenia, iż wzorzec ruchu pozostałych części ciała podczas skoku CMJ i ACMJ był do siebie zbliżony. Zdaje się to potwierdzać brak istotnych statystycznie różnic dla maksymalnego kąta ugięcia kończyn dolnych w stawach kolanowych pomiędzy skokami CMJ i ACMJ. Zatem zamach kończynami górnymi ma dodatni wpływ zarówno na wysokość skoku jak i sztywność kończyn dolnych. Wartość sztywności kończyn dolnych ulega więc zmianie w zależności od sposobu wykonania skoku.

#### Piśmiennictwo

- [1] HARMAN E. A., ROSENSTEIN M. T., FRYKMAN P. N., ROSENSTEIN R. M. *The effects of arms and countermovement on vertical jumping*. Med. Sci. Sport. Exer, 1990,22(6):825-833.
- [2] HARA M., SHIBAYAMA A., TAKESHITA D., FUKASHIRO S. *The effect of arm swing on lower extremities in vertical jumping*. J. Biomech, 2006,39(13):2503-2511.
- [3] HARA M., SHIBAYAMA A., TAKESHITA D., HAY D. C., FUKASHIRO S. *A comparison of the mechanical effect of arm swing and countermovement on the lower extremities in vertical jumping*. Hum. Movement Sci, 2008,27(4):636-648.
- [4] STRUZIŁ A., ZAWADZKI J. *Leg stiffness during phases of countermovement and take-off in vertical jump*. Acta Bioeng. Biomech, 2013,15(2):113-118.

## Porównanie skuteczności działania neutralizatorów względem kationowego środka antyseptycznego

KAMILA SZOSTAK<sup>1,2</sup>, MAGDALENA PRZYBYŁO<sup>1,2</sup>, MAREK LANGNER<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Politechnika Wrocławska, Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław, kamila.szostak@pwr.edu.pl

<sup>2</sup>Lipid Systems sp. z o. o., ul. Duńska 9, 54-427 Wrocław

**Słowa kluczowe:** dichlorowodorek oktenidyny, Octenisept®, antyseptyk, neutralizacja

### 1. Wstęp

Dichlorowodorek [N,N'-(1,10 dekanedildi)-1[4H]- pirydynylo-4 – ilideno] bis-91-oktanaminowy lub dichlorowodorek oktenidyny, został po raz pierwszy zsyntezowany w 1982 roku kiedy to poszukiwano zastępstwa dla diglukonianu chlorheksydyny w antyseptyce jamy ustnej [1]. Potrzeba wprowadzenia nowej substancji czynnej wynikała ze wzmożonego wzrostu oporności mikroorganizmów na ten powszechnie stosowany środek. Od czasu wprowadzenia oktenidyny, wykazano jej działanie bakteriobójcze w stosunku do takich szczepów jak: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis* oraz drożdży *Candida albicans* [2-8]. Szerokie spektrum działania, stwierdzona niewielka penetracja w głąb organizmu oraz brak indukowania oporności przez metycyliny- oraz wankomycyno oporne szczepy *Staphylococcus aureus* [4] stały się głównymi czynnikami rozpowszechnienia preparatów na bazie oktenidyny, zarówno w praktyce szpitalnej, jak i produktach przeznaczonych dla gospodarstw domowych.

Popularnym, komercyjnie dostępnym środkiem zawierającym ten związek jest Octenisept® (0,1% dichlorowodorek oktenidyny, 2% fenoksyetanol), jednak ze względu na drażniące działanie fenoksyetanolu, odchodzi się od stosowania go w preparatach farmaceutycznych i szuka nowych rozwiązań wychodząc na przeciw oczekiwaniom rynku. Świetnym rozwiązaniem problemu jest zastosowanie naturalnie występujących struktur biologicznych, jako nośników substancji aktywnej (oktenidyny). Są nimi agregaty lipidowe – liposomy.

W trakcie prezentacji przedstawię analizę porównawczą neutralizatorów służących do wyznaczania kinetyki działania bakteriobójczego związku kationowego (dichlorowodoru oktenidyny) oraz porównanie skuteczności preparatu oferowanego przez firmę Schulke z nowym produktem firmy Lipid Systems opartym o formulację liposomową. Obie analizy przeprowadzono w oparciu o metodę rozcieńczenia-neutralizacji proponowaną przez normę zharmonizowaną PN-EN 13727+A1 [9] z 2013 roku.

### 2. Materiały i metody

Analizę mikrobiologiczną przeprowadzono z wykorzystaniem szczepu *Escherichia coli* K1, z kolekcji Uniwersytetu Wrocławskiego. Preparaty poddawane badaniu to Octenisept® firmy Schulke oraz Lipooctenisept® firmy Lipid Systems. Hodowla bakteryjna przygotowywana była poprzez zawieszenie świeżych kolonii (z posiewu redukcyjnego, hodowla 20-godzinna) w soli fizjologicznej z dodatkiem tryptonu. Po doprowadzeniu do odpowiedniej gęstości optycznej, komórki zwirowano, a następnie zawieszono w roztworze wybranego preparatu komercyjnego. W każdym przypadku stężenie oktenidyny wynosiło 0,1%. Po wyznaczonym czasie kontaktu antyseptyku z mikroorganizmami (15, 30, 45, 60 oraz 90 sekund) pobierano była odpowiednią ilość mieszaniny reakcyjnej i wprowadzano do roztworu neutralizatora, którego skuteczność zatrzymywania reakcji badano. Testowano trzy układy neutralizujące:

Neu1: 30 g/L polisorbato 80, 30 g/L saponiny oraz 3 g/L lecytyna

Neu2: 30 g/L polisorbat 80, 4 g/L laurylosiarczan sodu oraz 3 g/L lecytyna

Neu3: 30 g/L polisorbat 80, 30 g/L saponiny, 1 g/L L-histydyna oraz 1 g/L L-cysteina

Następnie po 5-cio minutowej inkubacji pobierano 100 mg roztworu i wysiewano na podłoże agarowe TSA (*Tryptone Soy Agar*). Wynik to postępujące biobójcze działanie przejawiające się spadkiem ilości żywych mikroorganizmów zdolnych formować kolonie w funkcji czasu ekspozycji na działanie antyseptyku.

**Źródła finansowania:** Lipid Systems sp. j.

### Piśmiennictwo

- [1] BAILEY M., DE GRAZIA D., HOFF J., SCHULENBERG L., O'CONNOR R., PARIS A., SLEE M. *Bispyridinamines: a new class of topical antimicrobial agents as inhibitors of dental plaque*; J. Med. Chem. 1984. 27:1457-1464.
- [2] SEDLOCK D., BAILEY D.: *Microbicidal Activity of Octenidine Hydrochloride, a New Alkanediybis[Pyridine] Germicidal Agent*. Antimicrob Agent Chem 1985, 28(6):786-780
- [3] AMALARADJOU, M.A.R., C.E. NORRIS, AND K. VENKITANARAYANAN, *Effect of Octenidine Hydrochloride on Planktonic Cells and Biofilms of Listeria monocytogenes*. Applied and Environmental Microbiology, 2009. 75(12): 4089-4092.
- [4] AL-DOORI, Z., ET AL., *Low-level exposure of MRSA to octenidine dihydrochloride does not select for resistance*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2007. 59: 1280-1282.
- [5] KOBURGER, T., ET AL., *Standardized comparison of antiseptic efficacy of triclosan, PVP-iodine, octenidine dihydrochloride, polyhexanide and chlorhexidine digluconate*. J Antimicrob Chemother, 2010. 65: 1712-1719.
- [6] ROHRA, U., ET AL., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus wholebody decolonization among hospitalized patients with variable site colonization by using mupirocin in combination with octenidine dihydrochloride*. Journal of Hospital Infection, 2003. 54: 305-309.
- [7] TIRALI, R.E., ET AL., *In vitro antimicrobial activity of several concentrations of NaOCl and Octenisept in elimination of endodontic pathogens*. Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontology, 2009. 108(5): p. E117-E120.
- [8] RESMIYE E. TIRALI, ET AL., *Evaluation of the antimicrobial activities of chlorhexidine gluconate, sodium hypochlorite and octenidine hydrochloride in vitro*. Aust Endod J, 2013. 39: 15-18.
- [9] PN-EN 13727:2012+A1 *Chemiczne środki dezynfekcyjne i antyseptyczne. Ilościowa zawieszinowa metoda określania bakterioobójczego działania w obszarze medycznym. Metoda badania i wymagania (faza 2, etap 1)*.

## Modelowanie molekularne i analiza QSAR fenotiazyn jako modulatorów oporności wielolekowej komórek nowotworowych

KAMILA ŚRODA-POMIANEK<sup>1</sup>, OLGA WESOŁOWSKA<sup>1</sup>, ANDRZEJ POŁA<sup>1</sup>, PIOTR ŚWIĄTEK<sup>2</sup>, WIESŁAW MALINKA<sup>2</sup>, ANNA URYGA<sup>1</sup>, KRYSZYNA MICHALAK<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Biofizyki, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, ul. Chalubińskiego 10, 50-368 Wrocław, e-mail autora: [kamila.sroda-pomianek@umed.wroc.pl](mailto:kamila.sroda-pomianek@umed.wroc.pl)

<sup>2</sup>Katedra Chemii Leków, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, ul. Borowska 203, 50-368 Wrocław

**Słowa kluczowe:** QSAR (*Quantitative structure–activity relationship*), oporność wielolekowa, fenotiazyny.

### 1. Wstęp

Rak jelita grubego jest coraz częściej spotykanym nowotworem złośliwym przewodu pokarmowego. Jak dotąd, pomimo postępu w terapii onkologicznej, nie udało się znaleźć w pełni skutecznej metody leczenia tego typu nowotworu. Chemioterapia jest zazwyczaj częścią leczenia skojarzonego obok radioterapii i leczenia operacyjnego. Zjawisko oporności wielolekowej towarzyszące chemioterapii nowotworów, jest istotnym klinicznie problemem zwiększającym odsetek zgonów z powodu chorób nowotworowych.

Białka oporności wielolekowej z grupy białek ABC (transportery wielolekowe) skutecznie ograniczają wnikanie leków przeciwnowotworowych do komórek zmienionych nowotworowo, a także mają wpływ na przenikanie różnych innych leków (niekoniecznie z grupy leków stosowanych w chemioterapii nowotworów) przez takie naturalne bariery, jak np. bariera krew-mózg czy nabłonek jelitowy. Aktywność transporterów wielolekowych, o szerokiej specyficzności substratowej, może być hamowana przez szereg związków chemicznych, w tym przez wiele farmaceutyków, co z kolei może zmieniać farmakokinetykę innych stosowanych równolegle leków.

W związku z trudnościami występującymi przy stosowaniu chemioterapii w leczeniu nowotworów, nieustannie poszukuje się nowych związków o potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej lub ograniczających oporność wielolekową. Przy testowaniu nowych substancji, oprócz mało wydajnej metody przesiewowej, wykorzystuje się badanie zależności struktura – aktywność SAR (ang. *Structure Activity Relationship*). Określenie zależności pomiędzy strukturą a aktywnością biologiczną stanowi ważny etap nie tylko przy projektowaniu całkiem nowych związków, ale również wskazaniu sposobów chemicznej modyfikacji znanych już leków.

Z uwagi na rosnącą liczbę doniesień literaturowych wskazujących na możliwość wykorzystania leków przeciwdepresyjnych jako środków wspomagających w prewencji i terapii nowotworów, w przedstawianej pracy wybrano do badań *in vitro* na komórkach nowotworowych nowo zsyntezowane pochodne fenotiazyny. W testach na komórkach nowotworowych, fenotiazyny wykazują działanie anyproliferacyjne, jak również zwiększają cytotoksyczne działanie leków stosowanych w chemioterapii (obniżanie oporności wielolekowej). W pracy określono wybrane parametry fizykochemiczne pochodnych fenotiazyn przy zastosowaniu oprogramowania do modelowania molekularnego (SPARTAN), a następnie zbadano korelację struktura-funkcja w grupie związków wykazujących najsilniejszy wpływ na komórki nowotworowe.

### 2. Materiały i metody

#### 2.1. Materiały

Badania zostały przeprowadzone z wykorzystaniem pary linii komórkowych pochodzących z ludzkiego raka gruczołowego jelita grubego LoVo i LoVo/Dx, odpowiednio wrażliwej i odpornej na

cytostatyki. Badane związki: SM1, SM3, SM8, SM9, SM12 należą do nowo zsyntezowanych pochodnych flufenazyny należących do grupy fenotiazyn.

## 2.2. Metody

Obliczenia teoretyczne dla nowo zsyntezowanych pochodnych flufenazyny zostały przeprowadzone przy użyciu pakietu obliczeniowego SPARTAN 10 V.1.1.0 (Wavefunction, Inc., USA). Optymalizacja struktury cząsteczki badanych związków oraz deskryptory QSAR były wyznaczane metodą DFT (*density functional theory*) z zastosowaniem bazy funkcyjnej (*basis set*) 6-31+G\*. Niektóre z wyznaczanych parametrów fizykochemicznych mogą przekładać się na biologiczną aktywność badanych związków. W ramach pracy wyznaczano teoretycznie: różnicę energii między orbitalami LUMO i HOMO (*energy gap*), elektroujemność  $c$ , oporność (*absolute hardness* -  $h$ ) na deformację lub polaryzację chmury elektronowej cząsteczki oraz elektrofilowość cząsteczki. Wpływ badanych związków na cytotoksyczność leków przeciwnowotworowych zbadano przy użyciu testu SRB. Zmiany w poziomie ekspresji mRNA transporterów ABC wykazano przy zastosowaniu półilościowej reakcji łańcuchowej polimeryzacji (PCR). Analizę wpływu pochodnych flufenazyny na aktywację procesu apoptozy przeprowadzono przy użyciu komercyjnie dostępnego zestawu odczynników ENZ Chek Caspaze3 Assay Kit. Sprawdzone również cytotoksyczność badanych związków wobec komórek badanych linii nowotworowych, a także ich wpływ na cytotoksyczność doxorubicyny w tych komórkach.

## 3. Wyniki

Wykazano, że pochodna fenotiazyny o symbolu SM8 charakteryzuje się wyższą wartością momentu dipolowego niż pochodna SM3, podczas gdy wartość współczynnika podziału  $\log P$  dla SM8 jest niższa niż dla SM3. W badaniach na komórkach nowotworowych stwierdzono, że pochodne fenotiazyny o wyższym momencie dipolowym cechuje wyższa cytotoksyczność wobec opornych komórek ludzkiego gruczołowego raka jelita grubego w porównaniu z innymi pochodnymi fenotiazyny. Zauważono także, że związki o wyższym momencie dipolowym, charakteryzujące się niższą wartością  $\log P$ , w większym stopniu wpływają na poziom ekspresji transporterów ABC, jak również posiadają zdolność odwracania zjawiska oporności wielolekowej, co zaobserwowano na przykładzie wzrostu cytotoksyczności doxorubicyny w obecności pochodnej SM8, w komórkach odpornej sublinii linii LoVo/Dx. Testy na aktywność kaspazy 3 pokazały, że wszystkie spośród badanych związków wykazują aktywność proapoptotyczną, przy czym najsilniej działają pochodne SM1 i SM3, a najsłabiej - SM8 i SM9.

## 4. Dyskusja

Zdolność do modulacji aktywności transportowej białek oporności wielolekowej i tym samym potencjalnej możliwości odwracania oporności wielolekowej są związane z takimi cechami fizykochemicznymi, jak: rodzaj podstawników, rozmiar cząsteczki, ładunek, polaryzowalność czy rozpuszczalność w wodzie i tłuszczach. Jedną z możliwych modyfikacji struktury fenotiazyn, której wprowadzenie utrudni pokonanie bariery krew-mózg (a przez to prawdopodobnie obniży niepożądane objawy ze strony OUN w przypadku zastosowań badanych substancji innych niż leczenie antydepresyjne) jest modyfikacja w łańcuchu bocznym pochodnych fenotiazyny w pozycji 10. W pracy przedstawiono różnice w odpowiedzi na działanie doxorubicyny komórek gruczolakoraka jelita grubego, lekoopornych LoVo/Dx i wrażliwych na cytostatyki - LoVo w obecności pochodnych fenotiazyny, różniących się podstawnikiem w hydroksypropylowym łańcuchu bocznym.

**Źródła finansowania:** Grant dla Młodych Pracowników Nauki Pbm78.

## Ultradźwiękowa tomografia dopplerowska: możliwości zastosowania w diagnostyce medycznej

TOMASZ ŚWIETLIK<sup>1</sup>, KRZYSZTOF J. OPIELIŃSKI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Wydział Elektroniki, Politechnika Wroclawska, Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław, tomasz.swietlik@pwr.edu.pl, krzysztof.opielinski@pwr.edu.pl

**Słowa kluczowe:** tomografia dopplerowska, ultradźwiękowa tomografia fali ciągłej, obrazowanie struktur odbijających, diagnostyka medyczna

### 1. Wstęp

Obecnie istnieje wiele sposobów pozyskiwania informacji obrazowych z wnętrza ciała człowieka, przydatnych do oceny stanu pacjenta i pomocnych w postawieniu trafnej diagnozy. Sposoby te opierają się na różnych zjawiskach fizycznych, jak promieniowanie rentgenowskie, izotopy promieniotwórcze, magnetyczny rezonans jądrowy, ultradźwięki, zmiany elastyczności, temperatury i impedancji elektrycznej tkanek, tłumienie i modulacja fal świetlnych [1,2]. Równolegle rozwijane są coraz to nowsze techniki obrazowania dodatkowych parametrów i mechanizmów umożliwiających kontrastowanie tkanek w celu pozyskania szerszej ich charakterystyki, komplementarnej do informacji zbieranej za pomocą istniejących już metod. Bardzo ważną rolę pod tym względem odgrywają techniki ultradźwiękowe, które obecnie rozwijane są intensywnie w postaci tomograficznych metod obrazowania tkanki miękkiej [3].

Jedną z nowoczesnych tomograficznych metod ultradźwiękowych, znajdujących się w fazie wstępnych badań nad możliwościami zastosowań m.in. w diagnostyce medycznej jest tzw. tomografia dopplerowska (*Doppler tomography* - DT), zwana też ultradźwiękową tomografią fali ciągłej (*Continuous Wave Ultrasonic Tomography* - CWUT) [4].

### 2. Materiał i metody

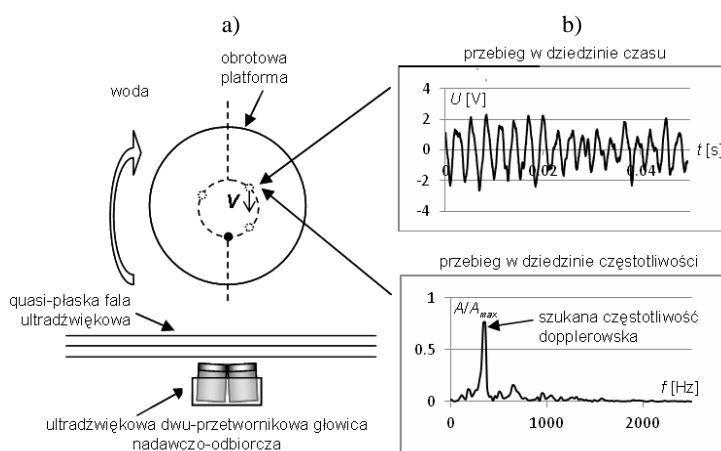
Metoda tomografii dopplerowskiej znacząco różni się od klasycznej metody dopplerowskiego obrazowania przepływu krwi lub fizjologicznego ruchu tkanek. Ruch dwu-przetwornikowej nadawczo-odbiorczej głowicy ultradźwiękowej względem tkanki o strukturze rozpraszającej ultradźwięki umożliwia tomograficzną rekonstrukcję obrazu przekroju tejże tkanki na podstawie rejestracji częstotliwości dopplerowskich. Zależnie od rodzaju ruchu głowicy względem badanego obiektu można wyróżnić dwie metody obrazowania: okrężną i liniową [3,4].

W niniejszej pracy wykorzystano geometrię okrężną i falę ultradźwiękową o częstotliwości 4,7 MHz. Na badany obiekt pada ultradźwiękowa fala quasi-płaska. Przy ustalonym kącie obrotu każdy element rozpraszający w strukturze obiektu odbija falę ciągłą, co powoduje zmianę częstotliwości fali odbitej o częstotliwość dopplerowską wprost proporcjonalną do prędkości ruchu głowicy względem tego elementu. Dla każdego kąta obrotu w geometrii okrężnej, amplitudę odebranego sygnału dla każdej ustalonej częstotliwości można traktować jako całkę liniową wszystkich fal odbitych od rozpraszaczy położonych wzdłuż odpowiedniej linii zgodnej z kierunkiem propagacji. Widmo sygnału odbiorczego jest rozważane jako rzut (sumowanie) współczynników odbicia wzdłuż tych linii. W odniesieniu do klasycznej tomografii komputerowej, w metodzie tomografii dopplerowskiej widma sygnałów zbieranych dla poszczególnych kątów obrotu są rzutami, a wartości amplitud każdego sygnału odbiorczego dla poszczególnych częstotliwości stanowią promienie pomiarowe. Rekonstrukcja obrazu w metodzie tomografii dopplerowskiej realizowana jest za pomocą algorytmów rekonstrukcyjnych wykorzystywanych w klasycznej rentgenowskiej tomografii komputerowej.

W pracy przeprowadzono szereg doświadczeń mających na celu uzyskanie i przeanalizowanie sygnałów dopplerowskich pochodzących od rozpraszaczy drutowych umieszczonych w naczyniu z wodą i obracających się ze stałą prędkością kątową względem dwu-przetwornikowej głowicy ultradźwiękowej.

### 3. Wyniki

Na **Ryc. 1** przedstawiono ideę pomiaru sygnału dopplerowskiego metodą DT wraz z przykładowym wynikiem rejestracji tego sygnału (tomograficzny rzut pomiarowy) w dziedzinie czasu i częstotliwości dla pręta o średnicy 3 mm, oddalonego od środka obrotu o 1 cm, dla częstości obrotu platformy z drutem 1,5 na sekundę, przy kącie obrotu  $\theta = 220^\circ$ .



**Ryc. 1.** Idea pomiaru częstotliwości dopplerowskiej: a) układ pomiarowy służący do pomiaru częstotliwości dopplerowskiej, b) przykładowe wyniki pomiaru sygnału dopplerowskiego w dziedzinie czasu i częstotliwości

### 4. Dyskusja

Dla pomiarów przedstawionych w przykładzie na **Ryc. 1** wyznaczono częstotliwość dopplerowską równą 382,5 Hz, zaś wielkość ta obliczona ze wzoru wynosi 384,2 Hz. Sygnał ultradźwiękowy uzyskany w wyniku odbicia fali od cienkiego pręta pozwala na pomiar częstotliwości dopplerowskiej z dokładnością około 2 Hz, podczas gdy cały zakres zmian tej wielkości dla pełnego obrotu wynosi w tym przypadku 1200 Hz. Na podstawie badań przeprowadzonych w niniejszej pracy przewiduje się, że tomografia dopplerowska może być skutecznie wykorzystana w diagnostyce medycznej. Potencjalnym zastosowaniem tej metody jest obrazowanie struktury tkanki miękkiej w celu wykrywania zmian nowotworowych (np. kobiecych piersi) lub badanie kości kończyn.

### Piśmiennictwo

- [1] TADEUSIEWICZ R., ŚMIETAŃSKI J. *Pozyskiwanie obrazów medycznych*. Wydawnictwo Studenckiego Towarzystwa Naukowego, Kraków, 2011.
- [2] NAJARIAN K., SPLINTER R. *Biomedical signal and image processing*. CRC Press Taylor & Francis Group, USA, 2012.
- [3] OPIELIŃSKI K. J. *Ultradźwiękowe obrazowanie tomograficzne tkanki miękkiej*. Rozdział w książce: *Postępy akustyki*, red. L. Leniowska, A. Brański, Polskie Towarzystwo Akustyczne, Oddział w Rzeszowie, Rzeszów, 2013.
- [4] LIANG H-D., TSUI CH. S. L., HALLIWELL M., WELLS P. N. T. *Continuous wave ultrasonic Doppler tomography*. *Interface Focus*, 2011, 1:665-672.

## **Modulacja aktywności kanałów potasowych typu Kv1.3 przez prenylowe pochodne biologicznie aktywnych związków polifenolowych - badania techniką *patch-clamp***

ANDRZEJ TEISSEYRE, JUSTYNA GĄSIOROWSKA, ANNA URYGA, KRYSZYNA MICHALAK

<sup>1</sup>Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, Katedra i Zakład Biofizyki, ul. Chalubińskiego 10, 50-368 Wrocław, e-mail: andrzej.teisseyre@umed.wroc.pl; justynabronowicka@wp.pl; anna.uryga@umed.wroc.pl; krystyna.michalak@umed.wroc.pl

**Słowa kluczowe:** kanały Kv1.3, technika „*patch-clamp*”, związki polifenolowe, proliferacja, apoptoza

### **1. Wstęp**

Napięciowo-zależne kanały potasowe typu Kanały Kv1.3 występują w wielu typach komórek zarówno normalnych, jak i nowotworowych i współuczestniczą m.in. w procesach proliferacji oraz apoptozy [1-4]. Inhibicja kanałów Kv1.3 potencjalnie mogłaby w przyszłości znaleźć zastosowanie kliniczne przy wspomaganiu chemioterapii niektórych typów nowotworów charakteryzujących się zwiększonym występowaniem kanałów Kv1.3, np. raka piersi, czerniaka czy przewlekłej białaczki limfatycznej B komórkowej [2-4]. Największą szansę na zastosowanie kliniczne mogą mieć niektóre drobnocząsteczkowe związki organiczne, które łączą znaczną inhibitorową efektywność z niską cytotoksycznością ogólnoustrojową. Do związków takich zaliczyć można m.in. niektóre biologicznie aktywne związki wielopierścieniowe pochodzenia roślinnego, a także niektóre ich naturalne oraz syntetyczne pochodne [4].

Badania nad wpływem naturalnie występujących prenylowych pochodnych flawonoidów i chalkonów na aktywność kanałów Kv1.3 prowadzone są w Pracowni Bioelektryczności Katedry i Zakładu Biofizyki Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu od roku 2010. Badania te są prowadzone przy użyciu techniki *patch-clamp*. Jest to nowoczesna technika elektrofizjologiczna umożliwiająca rejestrację prądów płynących przez błony komórkowe w warunkach ustalonego i kontrolowanego potencjału błonowego. Technika ta umożliwia rejestrację prądów płynących przez pojedyncze kanały w skrawku błony nietkniętej komórki (konfiguracja *cell-attached*) lub w skrawku błony oderwanym od reszty komórki i zwróconym na zewnątrz swoją wewnętrzną (konfiguracja *inside-out*) lub zewnętrzną powierzchnią (konfiguracja *outside-out*), a także prądów płynących przez błonę całej badanej komórki, pod warunkiem, że jest to komórka niewielka (o średnicy mniejszej niż 30  $\mu\text{M}$  - konfiguracja *whole-cell*) [5].

### **2. Materiały i metody**

Badania prowadzone są zarówno na układzie modelowym, którym są kanały Kv1.3 w limfocytach T izolowanych z krwi obwodowej zdrowych dawców, jak i na komórkach nowotworowych – limfoblastycznych komórkach białaczki Jurkat T. Jak wykazały badania, w ludzkich limfocytach T oraz w komórkach Jurkat T występują endogennie w dużej ilości kanały Kv1.3 [1]. Badania prowadzone są przy użyciu techniki *patch-clamp* w konfiguracji *whole-cell* [5].

### **3. Wyniki i wnioski**

Pierwszym prenylowanym związkiem polifenolowym badanym w naszym laboratorium pod kątem wpływu na kanały Kv1.3 była jedna z prenylowych pochodnych izoflawonu naringeniny, 8-prenylnonaringenina. Związek ten okazał się efektywnym inhibitorem kanałów Kv1.3, zarówno w układzie modelowym, jak i w komórkach nowotworowych [6]. Efekt inhibicji był odwracalny i zależny od stężenia związku, przy czym całkowitą inhibicję obserwowano przy stężeniach

większych niż 10  $\mu\text{M}$  [6]. Kolejne trzy testowane związki roślinne z w/w grupy: ksantohumol, izoksantohumol oraz izobawachalkon również okazały się efektywnymi inhibitorami kanałów Kv1.3 w komórkach nowotworowych [7]. Jednakże w odróżnieniu od 8-prenylnaringeniny, zastosowanie tych związków w stężeniach powyżej 10  $\mu\text{M}$  nie powodowało całkowitej inhibicji kanałów Kv1.3. Mechanizm hamowania aktywności kanałów Kv1.3 przez ksantohumol, izoksantohumol oraz izobawachalkon jest prawdopodobnie odmienny niż w przypadku 8-prenylnaringeniny [7]. Prowadzone obecnie badania nad wpływem kolejnej prenylowej pochodnej naringeniny, 6-prenylnaringeniny wykazały, że również ten związek jest inhibitorem kanałów Kv1.3 w komórkach nowotworowych, przy czym efektywność inhibicji jest porównywalna do obserwowanej w przypadku 8-prenylnaringeniny.

Wszystkie przebadane do tej pory prenylowe pochodne chalconów i flawonoidów okazały się znacznie silniejszymi inhibitorami kanałów Kv1.3 od wcześniej testowanych związków wielopierścieniowych pozbawionych grupy prenylowej, takich jak izoflawon genisteina, związek z grupy stilbenów – rezweratrol, czy też metoksyłowe pochodne flawonoidu naringeniny oraz pochodnej rezweratrolu - piceatanolu [4,8]. Ponadto, naringenina, w odróżnieniu od swych prenylowych pochodnych nie jest inhibitorem kanałów Kv1.3 w limfocytach T ani w komórkach nowotworowych [8]. Wyniki te wskazują, że obecność grupy prenylowej jest czynnikiem sprzyjającym inhibicji kanałów Kv1.3 przez związki z grupy flawonoidów i chalconów. Inhibicja kanałów Kv1.3 przez prenylowe pochodne flawonoidów i chalconów może wiązać się z hamowaniem proliferacji oraz indukowaniem apoptozy komórek nowotworowych linii komórkowych raka piersi (MCF-7) oraz raka prostaty (PC-3) przez te związki [9,10].

**Źródła finansowania:** Badania finansowane ze środków na działalność statutową Katedry Biofizyki UM we Wrocławiu.

### Piśmiennictwo

- [1] GUTMAN G., CHANDY K.G., GRISSMER S., LAZDUNSKI M., MCKINNON D., PARDO L., ROBERTSON G., RUDY B., SANGUINETTI M., STÜHMER W., WANG X. *International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and Molecular Relationships of Voltage-gated Potassium channels*. Pharmacol. Rev. 2005,67:473-508.
- [2] FELIPE A., BIELANSKA J., COMES N., VALLEJO A., ROIG S., RAMON Y CAJAL S., CONDOM E., HERMANDEZ-LOSA J., FERRERES J. *Targeting the voltage-gated K<sup>+</sup> channels Kv1.3 and Kv1.5 as tumor biomarkers for cancer detection and prevention*. Curr. Med. Chem. 2012,19:661-674.
- [3] COMES N., BIELANSKA J., VALLEJO-GARCIA A., SERRANO-ALBARRAS A., MARRUECOS L., GOMEZ D., SOLER C., CONDOM E., RAMON Y CAJAL S., HERNANDEZ-LOSA J., FERRERES J., FELIPE A. *The voltage-dependent K<sup>+</sup> channels Kv1.3 and Kv1.5 in human cancer*. Frontiers in Physiology, October 2013,4(Article 283):1-12.
- [4] TEISSEYRE A., GAŚSIOROWSKA J., MICHALAK K. *Voltage-gated potassium channels Kv1.3- a potentially new molecular target in cancer diagnostics and therapy*. Adv. Clin. Exp. Med, 2015 (praca w druku).
- [5] HAMILL O.P., MARTY A., NEHER E., SAKMANN B., SIGWORTH F.J. *Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches*. Pfluegers Arch, 1981,39:85-100.
- [6] GAŚSIOROWSKA J., TEISSEYRE A., URYGA A., MICHALAK K. *Study on the influence of 8-prenylnaringenin on the activity of voltage-gated potassium channels Kv1.3 in human Jurkat T-cells*. Cell. Mol. Biol. Lett, 2012, 17: 559-570.
- [7] GAŚSIOROWSKA J., TEISSEYRE A., URYGA A., MICHALAK K. *Inhibition of Kv1.3 channels in human Jurkat T cells by xanthohumol and isoxanthohumol*. J. Membrane Biol, DOI10.1007/s00232-015-9782-0, praca opublikowana online 17 lutego 2015.
- [8] TEISSEYRE A., DUARTE N., FERREIRA M-J., MICHALAK K. *Influence of the multidrug transporter inhibitors on the activity of Kv1.3 voltage-gated potassium channels*. J. Physiol. Pharmacol, 2009, 60:69-76.
- [9] MIRANDA C., STEVENS J., HELMRICH A., HENDERSON M., RODRIGUEZ R., YANG Y., DEINZER M., BARNES D., BUHLER D. *Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (Humulus lupulus) in human cancer cell lines* Food Chem. Toxicol, 1999, 37:271-285.
- [10] DELMULLE L., VAN DEN BERGHE T, DE KEUKELEIRE D, VANDENABEELE P, *Treatment of PC-3 and DU145 prostate cancer cells by prenylflavonoids from hop (Humulus lupulus) induces a caspase-independent form of cell death*. Phytoter. Res, 2008, 22:197-203.

## Monitoring of human body temperature at the conditions of hot climate

BOGDAN VYNOGRADSKYI<sup>1</sup>, ALI ABDULKARIM DZHASIM AL-UBAYIDI

<sup>1</sup>Lviv State University of Physical Culture, Ukraine, Lviv, st. Kostyushka 11, bvynohrad@ukr.net

*The key words: pupils, temperature, environment, physical activity, reaction*

**Foreword.** Climatic and temperature conditions, under which a man carries out his physical activity, are not studied enough yet. There are some scientific researches which tried to describe quantitatively how energetic processes pass in biomechanical systems [1,2]. Practically, there are no works concerning instrumental control and monitoring of the human body's main functions during its physical activity at the conditions of high temperatures in the environment [3].

**The aim of investigation:** to identify how the human body of senior pupils responds to standard physical activity taking into account temperature conditions of the environment.

**Methods and objects of investigation.** The dynamic of heart rate frequency (HRF) was determined on the bases of indexes of heart rate monitoring Polar RS 300X. Together with HRF indexes, using GPS-sensor the position of a pupil was fixed and also the distance and speed of his movement during the dosage of running activity. The body temperature was identified with the help of electronic and computer device for continuous monitoring of indexes of skin temperature in five set points.

Pedagogical experiment was to set admeasurements of skin and body temperature changing under the influence of high temperature of environment at different physical activity. 15 mail senior pupils at the age of 16-17 years took part in the experiment. They studied in schools of Bagdad (Iraq Republic). The pupils belonged to the main medical group, were practically healthy and had high level of physical preparedness.

During the experiment pupils overcame the distance of 200 meters 8 times under comfortable temperature conditions of the environment 19-21°C in the zone of moderate power. HRF of the students reached 130 heartbeats per minute after they finished running 200 meters for the second time. At the next races HRF stayed within the pale 130-140 heartbeats per minute and increased slightly at the moment of finishing three last races. The intervals lasted 2 minutes during which pupils took the distance of 50-60 meters in slow motion. The same tests took place at the adverse environmental conditions, in particular when air temperature reached +30° C and even +40°C.

**The results of investigation.** Races of moderate power at the conditions of comfortable temperature (nearly 20°C) caused some changes in the indexes. They showed that the average weighted skin temperature increased by 0,8°C, and the body temperature – on the average by 0,7°C. But these results turned out to be corrupt at  $p > 0,05$ . At the same time the average temperature of skin surface increased on all the zones of measuring, except forehead, where the temperature even decreased (by 0,4°C). The dynamics of HRF indexes was within the pale from 134 to 175, and on the average after finishing 8 races HRF indexes were  $159 \pm 3$  heartbeats per minute.

Therefore, the absolute increasing from the first to the last race is 41 heartbeats per minute. It is twice as much in comparison with comfortable conditions – at the air temperature nearly 20°C. The pulse rate increased at the end of intervals from 104 ictuses per minute after the first race to 142 ictuses per minute after the last race.

The reaction of the human body of a pupil, who carries out the same races but at the air temperature +30°C, indicates additional influence of thermal load. So, the body temperature increased by 1,1°C ( $p < 0,05$ ) and the average weighted skin temperature has not changed, even decreased (by 0,02°C). At the same time the temperature of some skin zones decreased, for example, on the

forehead and on the hip, on some other zones it has not changed – as on the wrist and on the shin, but it increased on the chest by 0,8°C.

Physiological indexes of the pupils before and after the same races at 40°C show that the body temperature increased by 0,9°C and differs essentially in comparison with the rest stage ( $p < 0,05$ ). The average weighted skin surface temperature, as it was forecasted and statistically increased by 2,6°C ( $p < 0,05$ ), on the chest skin it increased by 3,2°C, and on the shin – by 2,2°C.

The average pulse rate during physical activities was  $165,1 \pm 4$  ictuses per minute. It is 24 ictuses more in comparison with the indexes in comfort conditions. But in the same time it is only 5,4 ictuses more, than at the air temperature 30°C.

It is also important to note that the pulse rate during rest intervals between the races didn't differ so much, but statistically it had the difference at  $p < 0,05$ . The difference of HRF, which was fixed with pupils in comfortable conditions and at the environmental temperatures 30°C and 40°C was on the average 5 and 4 heartbeats per minute. However, after the first race at 40°C the pulse rate was higher in comparison with other, more comfortable conditions. It indicates the essential impact of the environmental temperature on the human body directly after the beginning of the physical activity, during carrying it out and until the finish.

The difference of HRF while the cardiovascular system is renewing during the intervals at 20°C and 30°C was not that significant. Practically, there wasn't any difference in the first part of the test activity, and in the second part the HRF curve was only 2 -3 heartbeats below at 30°C than at air temperature 40°C.

**The discussion.** Accordingly, even during physical activities of moderate power, the significance of heat factor is obvious and easily differentiated. It is possible to follow the first symptoms of body overheating during the first race at the environmental temperature +40°C and in the second part of the physical activity, when students overcome the distance of 200 meters 8 times. The perspectives of the further research will be in carrying out investigations with running tests. It is important to use physical activity of high and maximal power at different thermal environmental conditions. Receiving additional data will give the opportunity to supplement or to refute the patterns concerning additional heat load on the body of the pupils, while they carry out standard physical activity in the form of running.

**The conclusions.** It is determined, that the same running load of moderate power, which is carried out by the pupils at different thermal environmental conditions - 20°C, 30°C i 40°C, represent statistically different admeasurements of changes in skin temperature and body temperature, and also reaction of cardiovascular system.

The heart rate frequency after carrying out the eighth distance of 200 meters at moderate thermal conditions differed from the same indexes at the environmental temperature 30°C i 40°C on the average by 25 and 28 beats per minute accordingly.

Statistically the body temperature increased essentially during the running at the air temperature 20°C, 30°C i 40°C by 0,7°C, 1,1°C and 1,3°C accordingly ( $p < 0,05$ ). The temperature changes of separate zones of skin are of different types – essential increasing was fixed on the skin of chest and hip, and also the average weighted skin temperature (increasing by 3,2°C, 3,2°C and 2,5°C accordingly at +40°C and at  $p < 0,05$ ). Other changes are not essential. A slight temperature decreasing was fixed during the running, in particular at the air temperature 30°C.

## References

- [1] AL-LEHEEBY M., AL-OUN I. *Evaluating physical education curriculum for the intermediate stage as perceived by teachers in Anbar governorate*. European Scientific Journal, 2014, Vol.10 (31), 258-267.
- [2] WILMORE J., COSTILL D., KENNEY W. L. *Physiology of Sport and Exercise*. Human Kinetics, 2008, 592.
- [3] WHIPKEY K. L., WHIPKEY M. N. *The power of calculus*. – New York: John Willy & Sons., 2007, 378.

## Modulatory oporności wielolekowej komórek nowotworowych wśród związków pochodzenia roślinnego

OLGA WESOŁOWSKA<sup>1</sup>, KAMILA ŚRODA-POMIANEK<sup>1</sup>, JERZY WIŚNIEWSKI<sup>1,2</sup>, ALEKSANDRA BIELAWSKA-POHL<sup>3</sup>, MARIA PAPROCKA<sup>3</sup>, DANUTA DUŚ<sup>3</sup>, NOÉLIA DUARTE<sup>4</sup>, MARIA-JOSÉ U. FERREIRA<sup>4</sup>, KRYSZYNA MICHALAK<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Biofizyki, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, ul. Chałubińskiego 10, 50-368 Wrocław, e-mail autora: olga.wesolowska@umed.wroc.pl

<sup>2</sup>Katedra i Zakład Biochemii, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, ul. Chałubińskiego 10, 50-368 Wrocław

<sup>3</sup>Laboratorium Glikobiologii i Oddziaływań Międzykomórkowych, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, ul. Weigla 12, 53-114 Wrocław

<sup>4</sup>Research Institute for Medicines and Pharmaceutical Sciences (iMed.UL), Faculty of Pharmacy, University of Lisbon, Avenue Prof. Gama Pinto, 1649.003, Lisbon, Portugal

**Słowa kluczowe:** oporność wielolekowa (MDR), P-glikoproteina (ABCB1), MRP1 (ABCC1), flawonoidy, diterpeny

### 1. Wstęp

Oporność wielolekowa (ang. multidrug resistance, MDR) to pojawiająca się spontanicznie, bądź na skutek chemioterapii, jednoczesna oporność komórek nowotworowych na wiele, strukturalnie różnych, chemioterapeutyków. Związana jest ona z nadekspresją w komórkach opornych białek transportowych o szerokiej specyficzności substratowej, takich jak P-glikoproteina (P-gp) lub białko MRP1. Poszukiwanie związków, tzw. modulatorów, które stosowane łącznie z lekami przeciwnowotworowymi mogłyby zredukować MDR prowadzone jest od wielu lat. Obiecującym źródłem nowych związków o potencjalnej aktywności hamującej MDR są rośliny spożywcze i lecznicze, z powodu na spodziewaną niższą toksyczność izolowanych z nich związków w porównaniu ze związkami syntezowanymi chemicznie. W niniejszej pracy pokazano przykłady nowych, obiecujących modulatorów MDR izolowanych z szyszek chmielu, cytrusów oraz z wilczomlecza. Związki te należą do prenylowanych, a także polimetoksyloowanych flawonoidów oraz diterpenoidów.

### 2. Materiał i metody

#### 2.1. Materiały

Badane związki: 8-prenylonaringenina (obecna w szyszkach chmielu) oraz tangeretyna (obecna w skórkach owoców cytrusowych) zostały zakupione ze źródeł komercyjnych, jedynie latilagascen B izolowany był z wilczomlecza *Euphorbia lagascae* [1].

#### 2.2. Metody

Wpływ badanych związków na aktywność transportową białka MRP1 sprawdzany był w teście funkcjonalnym przy wykorzystaniu ludzkich erytrocytów jako układu modelowego. Aktywność białka P-gp badana była w linii komórkowej ludzkiego gruczołakoraka jelita grubego, LoVo i w jej lekoopornej sublinii LoVo/Dx metodą cytometrii przepływowej. Sprawdzono również cytotoksyczność badanych związków wobec komórek nowotworowych, a także ich wpływ na cytotoksyczność doxorubicyny. Wewnątrzkomórkowa lokalizacja doxorubicyny w komórkach nowotworowych analizowana była metodą mikroskopii fluorescencyjnej.

### 3. Wyniki

Wykazano, że 8-prenylonaringenina jest silnym inhibitorem dwóch transporterów związanych ze zjawiskiem MDR – białek MRP1 oraz P-gp. Flawonoid ten istotnie zmieniał również rozkład dokсорubicyny w komórkach linii odpornej na ten lek, doprowadzając do zwiększenia ilości dokсорubicyny akumulowanej wewnątrz komórek. W badanych stężeniach 8-prenylonaringenina nie zwiększała jednak cytotoxyczności dokсорubicyny względem opornych komórek LoVo/Dx, tak więc nie odwracała w pełni oporności typu MDR w tym układzie modelowym.

Polimetoksyflawon, tangeretyna okazała się efektywnym modulatorem MDR w linii komórek LoVo/Dx. Związek ten hamował aktywność transportową P-glikoproteiny, podwyższał akumulację dokсорubicyny wewnątrz komórek opornych, a także zwiększał cytotoxyczność tego leku wobec komórek linii LoVo/Dx. Dodatkowo wykazano, że tangeretyna indukuje apoptozę w komórkach ludzkiego gruczołakoraka jelita grubego, przy czym aktywność jej jest większa w komórkach opornych niż wrażliwych na chemioterapię.

Latilagascen B, diterpenoid izolowany z wilczomlecza, wykazywał słabą aktywność hamującą aktywność transportową białka MRP1 w ludzkich erytrocytach, z kolei okazał się efektywnym inhibitorem P-glikoproteiny. Zwiększał akumulację dokсорubicyny w komórkach odpornej linii LoVo/Dx. W badanych stężeniach nie wykazywał jednak zdolności do odwracania MDR w tej linii komórkowej. Niestety zakres badanych stężeń był znacznie ograniczony przez stosunkowo wysoką cytotoxyczność samego latilagascenu B wobec badanych komórek nowotworowych.

### 4. Dyskusja

Przedstawione przykłady działania związków pochodzenia naturalnego wskazują, że rośliny pospolicie użytkowane spożywczo (chmiel, cytrusy), czy też leczniczo (wilczomlecz) stanowią bogate źródło związków o obiecujących właściwościach związanych ze zdolnością do redukcji zjawiska oporności wielolekowej w komórkach nowotworowych. Związki te należą do różnorodnych klas chemicznych. Zidentyfikowanie związków pochodzenia naturalnego posiadających potencjalne właściwości przeciwnowotworowe może stanowić podstawę do prób optymalizacji ich struktury drogą syntezy chemicznej lub biotransformacji w celu uzyskania związków o pożądanym, silnym właściwościach modulatorowych wobec oporności wielolekowej lub właściwościach cytotoxycznych wobec komórek nowotworowych.

### Piśmiennictwo

- [1] WESOŁOWSKA O., WIŚNIEWSKI J., DUARTE N., FERREIRA M.J.U., MICHALAK K. *Inhibition of MRP1 transport activity by phenolic and terpenic compounds isolated from Euphorbia species*. *Anticancer Res*, 2007,27,4127-4134.
- [2] WESOŁOWSKA O., WIŚNIEWSKI J., ŚRODA K., KRAWCZENKO A., BIELAWSKA-POHL A., PAPROCKA M., DUŚ D., MICHALAK K. *8-Prenylonaringenin is an inhibitor of multidrug resistance-associated transporters, P-glycoprotein and MRP1*. *Eur. J. Pharmacol*, 2010,644,32-40.
- [3] WESOŁOWSKA O., WIŚNIEWSKI J., ŚRODA-POMIANEK K., BIELAWSKA-POHL A., PAPROCKA M., DUŚ D., DUARTE N., FERREIRA M.J.U., MICHALAK K. *Multidrug resistance reversal and apoptosis induction in human colon cancer cells by some flavonoids present in Citrus plants*. *J. Nat. Prod*, 2012,75,1896-1902.

## Przewidywanie kinematyki ruchu człowieka przy zastosowaniu analizy regresji liniowej

SLAWOMIR WINIARSKI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Biomechaniki, Akademia Wychowania Fizycznego we Wrocławiu, Al. Ignacego J. Paderewskiego 35, 51-612 Wrocław, slawomir.winiarski@awf.wroc.pl

**Słowa kluczowe:** analiza chodu, prognozowanie, współczynniki regresji

### 1. Wstęp

Prędkość lokomocji wpływa znacząco na kinematyczne i czasowo-przestrzenne parametry chodu [1]. Aby jednoznacznie scharakteryzować ten wpływ stosowano metody przewidywania oparte na równaniach regresji [1-3]. Wykazano przy tym, że pomiary na tej samej populacji i w podobnych warunkach zewnętrznych zapewniają lepsze przewidywanie kinematyki i kinetyki chodu [1]. Statystyczny związek pomiędzy każdym zmierzonym parametrem ( $y$ ) a prędkością ( $v$ ) chodu może być wyrażony w kategoriach relacji liniowej:  $y(v)=A \cdot v+B$ , gdzie  $A$  (współczynnik kierunkowy, nachylenie) i  $B$  (wyraz wolny) są współczynnikami regresji. Dlatego rzetelna standaryzacja prędkości na danych chodu może być wykonana za pomocą metody prognozowania z wykorzystaniem regresji liniowej.

Celem aktualnych badań było opracowanie zestawu równań regresji pod względem prędkości dla parametrów kinematycznych powszechnie stosowanych w analizie chodu człowieka dedykowanych naszemu laboratorium analiz biomechanicznych.

### 2. Materiał i metody

**Materiał.** W badaniu wzięło udział siedemnastu (17) zdrowych mężczyzn (22,0±1,0 lat, 77,85±9,03 kg 1,79±0,13 m). Przeprowadzono także szczegółowe pomiary antropometryczne kończyn dolnych, które są niezbędne do zastosowania model chodu.

**Stanowisko pomiarowe.** Badania zostały wykonane w certyfikowanej pracowni analiz biomechanicznych. Do badań wykorzystano system analizy ruchu BTS Smart-E, który był wyposażony w 6 kamer cyfrowych na podczerwień (1,1  $\mu$ m) przy częstotliwości próbkowania 120 Hz, do rejestracji zmiennych kinematycznych i dynamicznych chodu prawidłowego. Na ciele uczestników rozmieszczono 22 fotorefleksyjne znaczniki filmowania zgodnie z procedurą Helen Hayes-Davis'a. Chód osób rejestrowany był jednorazowo przy wykonaniu dla każdej z prędkości (wolnej, preferowanej i szybkiej) serii ośmiu powtórzeń, na które składało się ok. 5 cykli chodu. W każdej z serii pomiarowej musiały wystąpić minimum trzy przejścia, w których wystąpił pełny kontakt stopy z platformą dynamograficzną. Osoby badane wyraziły pisemną zgodę na dobrowolny udział w badaniu. Badanie zdobyły pozytywną opinię Senackiej Komisji ds. Etyki Badań Naukowych AWF Wrocław.

**Obliczenia.** Dla każdego parametru z zestawu zmiennych: (A) przestrzennych, (B), czasowych oraz (C) kinematycznych kątowych, przeprowadzono analizę regresji pod względem prędkości, aby ocenić potencjalne relacje pomiędzy zarejestrowaną zmienną a prędkością chodu. Zakres ruchu w stawach badany był we wszystkich trzech płaszczyznach i podany w stopniach kątowych. Dla każdego zarejestrowanego parametru wyznaczono współczynniki regresji oraz współczynnik determinacji ( $R^2$ ).

### 3. Wyniki

Średnia prędkość dla chodu szybkiego wyniosła:  $1,87 \pm 0,27$  m/s, z prędkością preferowaną:  $1,36 \pm 0,17$  m/s a dla chodu wolnego:  $1,16 \pm 0,17$  m/s. W tabeli 1 zaprezentowano współczynniki regresji liniowej dla przykładowych parametrów kątowych chodu oraz współczynnik dopasowania (determinacji)  $R^2$ .

**Tab. 1.** Współczynniki regresji liniowej dla przykładowych, kątowych parametrów chodu dla  $n = 17$  mężczyzn.

Zmienna	A [ $^{\circ}$ s $m^{-1}$ ]	B [ $^{\circ}$ ]	$R^2$	Zmienna	A [ $^{\circ}$ s $m^{-1}$ ]	B [ $^{\circ}$ ]	$R^2$
Peak Pelvic Tilt	3,409	3,611	0,89	Peak Hip Flexion	15,678	24,092	0,71
Range of Pelvic Tilt	0,644	0,712	0,83	Range of Hip Flex/Ext	9,920	21,750	0,78
Peak Pelvic Obliquity	3,145	2,598	0,79	Peak Hip Abduction	0,568	1,355	0,78
Range of Pelvic Obliquity	1,743	1,316	0,87	Range of Hip Ab/Adduction	5,304	4,937	0,68
Peak Pelvic Rotation	4,508	1,171	0,98	Peak Hip Rotation	1,018	1,410	0,51
Range of Pelvic Rotation	9,845	0,459	0,92	Range of Hip Rotation	1,818	12,606	0,72
Peak Knee Flexion	4,654	54,723	0,64	Peak Ankle Dorsiflexion	-2,767	16,615	0,83
Range of Knee Flexion	6,323	48,947	0,79	Range of Ankle D/P-flexion	0,982	25,829	0,72

### 4. Dyskusja i wnioski

W wyniku przeprowadzonych obliczeń uzyskano wyniki zbliżone do wyników Lelas i wsp. [3]. Różnice mogą wynikać z odmiennej populacji badawczej oraz warunków laboratoryjnych. Spośród wszystkich zmierzonych parametrów, szczytowe wartości parametrów kątowych (peak values) mają najsilniejszą zależność od prędkości chodu (większe nachylenie). Również wartość szczytowa (peak) i zakres (range) rotacji miednicy są silnie uzależnione od prędkości.

Przedstawione w tabeli prognozowane związki parametrów chodu z prędkością mogą być użyte jako odniesienie dla lepszego doboru parametrów referencyjnych w analizie chodu patologicznego.

### Piśmiennictwo

- [1] SCHWARTZ M.H., ROZUMALSKI A., TROST J.P. *The effect of walking speed on the gait of typically developing children* J Biomech 2008, 41: 1639-50.
- [2] STANSFIELD B.W., HILLMAN S.J., HAZLEWOOD M.E., ROBB J.E. *Regression analysis of gait parameters with speed in normal children walking at self-selected speeds*. Gait Posture 2006, 23: 288-94.
- [3] LELAS J.L., MERRIMAN G.J., RILEY P.O., KERRIGAN D.C. *Predicting peak kinematic and kinetic parameters from gait speed*. Gait Posture 2003, 17(2): 106-12.

## Analiza strukturalna płytki granicznej w modelu zwierzęcym

MAGDALENA WOJTKÓW<sup>1</sup>, MALGORZATA ŻAK, CELINA PEZOWICZ

<sup>1</sup>Katedra Inżynierii Biomedycznej, Mechatroniki i Teorii Mechanizmów, Wydział Mechaniczny, Politechnika Wrocławska, ul. Łukasiewicza 7/9, 50-371 Wrocław, e-mail: magdalena.wojtkow@pwr.edu.pl

**Słowa kluczowe:** płytki granicznej, płytki wzrostowej, badania strukturalne, słowo kluczowe,

### 1. Wstęp

Płytki granicznej jest kompozytową strukturą stanowiącą integralną część trzonu kręgu, jednak ze względu na występowanie warstwy podchrzęstnej stanowi także część krążka międzykręgowego. Pomimo licznych prac badających właściwości strukturalne i mechaniczne elementów budujących kręgosłup, płytki granicznej jest najmniej poznaną strukturą [1].

Celem niniejszych badań jest poznanie oraz analiza strukturalnej budowy płytki granicznej oraz jej połączenia z pierścieniem włóknistym. W badaniach wykorzystano model zwierzęcy, który często jest stosowany w badaniach kręgosłupa ze względu na łatwiejszą dostępność oraz mniejsze zróżnicowanie preparatów pod względem geometrycznym oraz właściwości mechanicznych [2].

### 2. Materiał i metody

Badania przeprowadzono na segmencie ruchowym Th11-Th12 odcinka piersiowego kręgosłupa świni domowej. Z wyizolowanego segmentu wycięto cztery bloki odpowiadające obszarom zlokalizowanym w przednim oraz tylnym rejonie płytki granicznej kręgu górnego oraz kręgu dolnego. Każdy w bloków zawierał połączenia pomiędzy pierścieniem włóknistym, a płytką graniczną oraz trzonem kręgu. Przed przystąpieniem do badań bloczki utrwalono w 10% aldehydzie glutarowym, a następnie poddano procesowi odwapnienia (Thermo Scientific Shandon TBD-1 Decalcifier). Utrwalony materiał pocięto na plastry o grubości 40  $\mu\text{m}$ , a następnie poddano analizie mikroskopowej.

Badania strukturalne przeprowadzono na mikroskopie stereoskopowym (Stereo Discovery V20, Zeiss). W czasie badań analizowano grubość poszczególnych warstw płytki granicznej: cała płytki granicznej (EH), płytki wzrostowej (GH) oraz głębokość zakotwiczenia włókien kolagenowych w podchrzęstnej warstwie płytki granicznej (CFH). Badane parametry przedstawiono na Ryc. 1a.

### 3. Wyniki

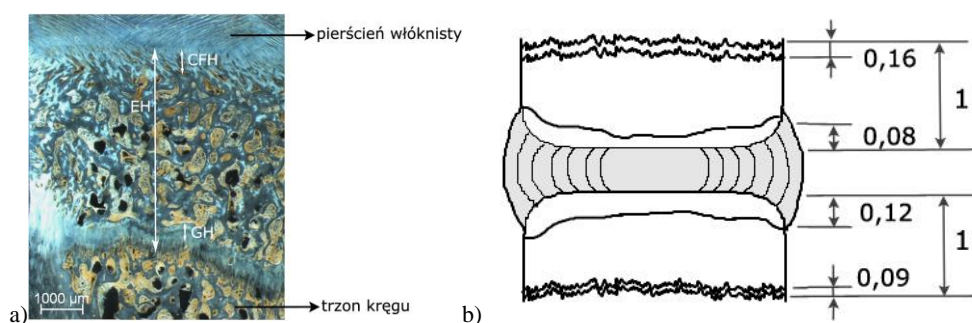
#### Płytki granicznej kręgu górnego

Największą wysokość płytki granicznej górnej równą  $4,00 \pm 0,32$  mm zaobserwowano w obszarze przednim kręgu. Dla porównania w obszarze tylnym kręgu płytki ta była cieńsza o 46%, a jej średnia wysokość wyniosła  $2,12 \pm 0,07$  mm. Płytki wzrostowej wchodząca w skład płytki granicznej górnej charakteryzuje się masywniejszą budową w przednim rejonie kręgu, gdzie osiąga średnią grubość  $0,70 \pm 0,20$  mm, w porównaniu do  $0,30 \pm 0,10$  mm w rejonie tylnym. Taką tendencję zaobserwowano także podczas analizy głębokości zakotwiczenia włókien kolagenowych w warstwie podchrzęstnej płytki granicznej. W obszarze przednim płytki granicznej włókna zakotwiczą się na głębokość średnio wynoszącą  $0,41 \pm 0,19$  mm, natomiast w obszarze tylnym głębokość jest mniejsza średnio o 62% i wynosi  $0,13 \pm 0,03$  mm.

#### Płytki granicznej kręgu dolnego

Analizując badane parametry płytki granicznej dolnej zaobserwowano, iż średnia wysokość całej płytki (EH) w rejonie przednim wynosi  $4,53 \pm 0,58$  mm, natomiast w rejonie tylnym  $2,29 \pm 0,13$  mm.

Procentowy spadek wysokości EH w tylnym rejonie jest taki sam jak w płytce granicznej górnej i wynosi 46%. Płytkę wzrostową w obszarze przednim charakteryzowała się średnią grubością wynoszącą  $0,47 \pm 0,21$  mm, natomiast w obszarze tylnym była cieńsza o 57%, jej średnia grubość wyniosła  $1,18 \pm 0,06$  mm. Głębokość zakotwiczenia włókien kolagenowych w warstwie podchrzęstnej płytki granicznej dolnej jest bardziej równomierna niż w przypadku płytki granicznej górnej. W obszarze przednim średnia głębokość wyniosła  $0,53 \pm 0,15$  mm, natomiast w obszarze tylnym  $0,30 \pm 0,06$  mm.



**Ryc. 1.** Segment ruchowy: a) oznaczenie badanych warstw: płytki granicznej (EH), płytki wzrostowej (GH) oraz zakotwiczenia włókien kolagenowych w podchrzęstnej warstwie płytki granicznej (CFH); b) schematyczne przedstawienie znormalizowanej wysokości poszczególnych warstw płytki granicznej

#### 4. Dyskusja

Płytkę graniczną obu kręgów w obszarze przednim posiada masywniejszą budowę niż w obszarze tylnym. Mierzone parametry osiągnęły w tym rejonie wartości średnio dwa razy większe niż w przypadku obszaru tylnego. Zaobserwowano, iż płytka wzrostowa stanowi około 16% wysokości całej płytki granicznej górnej oraz 9% płytki granicznej dolnej. Natomiast głębokość zakotwiczenia włókien kolagenowych w podchrzęstną warstwę płytki granicznej górnej stanowi około 8% jej całej wysokości. W przypadku płytki granicznej dolnej wartość ta wynosi około 12%. Pozostałą część płytki granicznej zajmuje warstwa porowata (Ryc.1b).

#### Piśmiennictwo

- [1] MOORE R.J. *The vertebral end-plate: what do we know?*. Eur. Spine J., 2000,9:92-96.  
 [2] SZOTEK S., SZUST A., PEZOWICZ C., MAJCHER P., BĘDZIŃSKI R. *Animal models in Biomechanical Spine Investigation*. Bull Vet Inst Pulawy, 2004, 48:163-168

## Weryfikacja algorytmu procesu adaptacji funkcjonalnej tkanki gąbczastej techniką symulacji Monte Carlo

ARTUR WRONA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Politechnika Wrocławska, Wyb. Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław, e-mail: artur.wrona@pwr.edu.pl

**Słowa kluczowe:** metoda Monte Carlo, adaptacja funkcjonalna kości, tkanka kostna gąbczasta

### 1. Wstęp

Technika symulacji Monte Carlo (MC) jest jedną z metod pozwalających modelować zjawiska złożone. Istotą tej metody jest utworzenie odpowiednio licznego zbioru losowo wybranych konfiguracji badanego układu będącego w stanie równowagi termodynamicznej. W oparciu o taki zbiór można wyznaczyć wartości szukanych parametrów, charakteryzujących badany układ, reprezentowane za pomocą wartości średnich po całym zespole konfiguracji.

Jednym z takich złożonych zagadnień jest zjawisko adaptacji funkcjonalnej tkanki kostnej, w której głównym czynnikiem kontrolującym przebieg zmian jest bodziec mechaniczny. Ważną rolę odgrywają również czynniki biologiczne, wśród których należy wymienić szlak OPG-RANKL-RANK, hormony (parathormon, estrogeny u kobiet), wiek, płeć, warstwa komórek osteogennych tkanki kostnej, mikrouszkodzenia powierzchni kości czy procesy zachodzące wewnątrz macierzy kostnej [1-3]. Sparametryzowanie czynników biologicznych pozwala badać ich znaczenie w procesie adaptacji funkcjonalnej między innymi metodą MC.

### 2. Materiał i metody

#### 2.1. Materiał

Badania symulacyjne oparte zostały na modelu matematycznym kości gąbczastej stworzonym na bazie wiedzy literaturowej. Podstawę modelu stanowił zbiór punktów węzłowych, odpowiadających przecięciu beleczek kostnych, zamkniętych w ograniczonej przestrzeni – symulującej tkankę kostną zbitą. Każdej beleczce kostnej przypisywane były atrybuty: średnicy, modułu Younga oraz warstwy powierzchniowej. Długość beleczek dobierano tak, aby dla zbioru niewielkiej liczby węzłów (50 punktów) uzyskać uproszczony model matematyczny kości gąbczastej.

#### 2.2. Metoda badawcza

W prowadzonych badaniach numerycznych stworzono algorytm wykorzystujący metodę MC i pozwalający śledzić zmiany rozkładu przestrzennego struktury kości gąbczastej uwzględniając wybrane czynniki biologiczne i mechaniczne. Do czynników tych zaliczono działanie siły obciążającej model tkanki kostnej, rolę wirtualnej sieci osteocytów oraz wpływ warstwy powierzchniowej [5,6]. W kolejnych krokach symulacji analizowano wpływ losowych zmian punktów węzłowych na energię potencjalną badanego układu. Zmiana prowadząca do obniżenia wartości energii skutkowała akceptacją zmienionej konfiguracji. Konfiguracje, których energia rosła były akceptowane z prawdopodobieństwem określonym za pomocą algorytmu Metropolis'a.

### 3. Wyniki

Rezultatem symulacji komputerowej był zbiór prawdopodobnych rozwiązań ułożenia przestrzennego beleczek kostnych poddanych działaniu różnych czynników biologicznych i mechanicznych, pozwalający wyznaczyć średnie wartości współrzędnych punktów węzłowych oraz parametrów opisujących beleczki: ich średnice, moduły Younga, obecność warstwy ochronnej.

#### 4. Dyskusja

Uzyskane w symulacji matematycznej wyniki pozwalają przewidzieć zachowanie badanego układu oraz mogą być wykorzystane jako narzędzie diagnostyczne do oceny podjętego sposobu leczenia, np. po zabiegach związanych z implantacją elementów metalowych takich jak śruba kostna.

#### Podziękowania

Obliczenia wykonano przy użyciu zasobów udostępnionych przez Wrocławskie Centrum Sieciowo-Superkomputerowe, grant obliczeniowy nr 342.

#### Piśmiennictwo

- [1] COX L., LAGEMAAT M.W., VAN DONNKELAAR C.C., VAN RIETBERGEN B., REILINGH M.L., BLANKEVOORT L., VAN DIJK C.N., ITO K. *The role of pressurized fluid in subchondral bone cyst growth*, Bone, 2011, 49(4): 762-8.
- [2] DEL FATTORE A., TETI A., RUCCI N. *Bone cells and the mechanisms of bone remodeling*, Frontiers in Bioscience E4, 2012: 2302-2321.
- [3] STANISŁAWOWSKI M., KMIEĆ Z. *Udział RANK, RANKL i OPG w osteolizie towarzyszącej nowotworom*, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 2009, 63: 234-241.
- [4] BĘDZIŃSKI R. *Biomechanika Inżynierska. Zagadnienia wybrane*, Oficyna wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 1997.
- [5] WRONA A. *Komputerowy Algorytm badania procesu przebudowy tkanki kostnej gąbczastej*. Acta Bio-Optica et Informatica Medica Inżynieria Biomedyczna, 2014, 20(1): 1-10.
- [6] WRONA A. *Wpływ czynników biologicznych na proces przebudowy tkanki kostnej gąbczastej*. Dokonania Naukowe doktorantów. T.1, Nauki przyrodnicze/pod.red.: Marcin Kuczera. Creativetime, 2013: 50-57.

## Parametry kinematyczne w ocenie obciążeń układu ruchu w step aerobiku

KATARZYNA WYSOCKA<sup>1</sup>, ALICJA RUTKOWSKA-KUCHARSKA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Akademia Wychowania Fizycznego we Wrocławiu, Katedra Lekkoatletyki i Gimnastyki, al. Ignacego Jana Paderewskiego 35, 51-612 Wrocław, kjwysocka@gmail.com

<sup>2</sup>Akademia Wychowania Fizycznego we Wrocławiu, Katedra Biomechaniki, al. I.J. Paderewskiego 35, 51-612 Wrocław, alicja.rutkowska-kucharska@awf.wroc.pl

**Słowa kluczowe:** *chód, staw kolanowy, zginanie grzbietowe stopy*

### 1. Wstęp

Kontuzje stawu kolanowego dotyczą od około 25%, a kontuzje stawu skokowego około 33% instruktorów step aerobiku [1,3]. Badanie prowadzone w sporcie wyczynowym wskazuje, że jedną z przyczyn przeciążeń układu ruchu jest niewłaściwa technika ruchu [2]. Na technikę ruchu w ćwiczeniach na stepie składa się sposób postawienia stopy na stepie, zakres zginania stawu kolanowego, kąt pochylecia tułowia. Ponieważ obciążenia w step aerobiku mieszczą się w przedziale małych wartości (podczas wejścia na step) i średnich (podczas zejścia ze stepu), to przyczyn urazów układu ruchu można doszukiwać się w technice ruchu, podczas której niewłaściwie tłumiona jest siła reakcji podłoża.

Celem pracy było poszukiwanie parametrów kinematycznych ruchu, które mogą decydować o obciążeniach działających na układ ruchu osób ćwiczących step aerobik.

### 2. Materiał i metody

#### 2.1. Materiał

W badaniach brały udział studentki Akademii Wychowania Fizycznego we Wrocławiu podzielone na dwie grupy: instruktorek prowadzących step aerobiku i amateerek, które po raz pierwszy chodziły po stepie podczas badań.

#### 2.2. Metoda

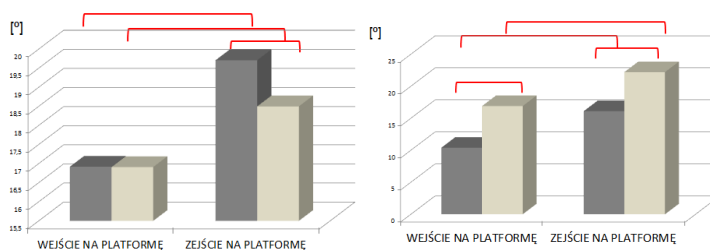
Eksperyment przeprowadzono w Pracowni Analiz Biomechanicznych, Akademii Wychowania Fizycznego we Wrocławiu. Do zbierania danych kinematycznych wykorzystano system BTS Smart oraz dwie platformy dynamometryczne Kistler. Zadanie ruchowe polegało na wykonaniu 11 kroków podstawowych na stopień o wysokości 15cm. Analizowano: kąt zginania stopy w stawie skokowym, czyli ruch zgięcia grzbietowego i podeszwowego stopy, kąt przywodzenia i odwodzenia stopy w osi pionowej stawu skokowego, kąt zginania w stawie kolanowym oraz kąt zginania tułowia.

### 3. Wyniki

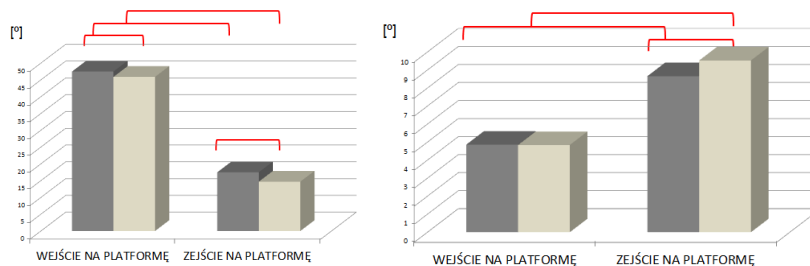
Podczas zejścia na platformę w grupie instruktorek występowało większe zgięcie grzbietowe stopy niż w grupie amateerek.

Zarówno podczas wejścia jak i zejścia na platformę grupa amateerek charakteryzowała się stawianiem stopy w większym odwiedzeniu niż grupa instruktorek. Kąt w stawie kolanowym podczas wejścia na platformę był większy w grupie instruktorek, natomiast podczas zejścia na platformę kąt ten był większy w grupie instruktorek.

Porównując wartość kąta zginania tułowia podczas wejścia na platformę, nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic między grupami. Podczas zejścia na platformę kąt zginania tułowia w grupie amateerek był istotnie większy niż w grupie instruktorek.



**Ryc. 1.** Wartości średnie kąta zginania i odwodzenia stopy podczas wejścia i zejścia na platformę dla badanych grup: instruktorki (ciemny szary) i amatorki (jasny szary). Poziom istotności: p<0,05



**Ryc. 2.** Wartości średnie kąta zginania w stawie kolanowym oraz zginania tułowia podczas wejścia i zejścia na platformę dla badanych grup: instruktorki (ciemny szary) i amatorki (jasny szary). Poziom istotności: p<0,05

#### 4. Wnioski

Schodzenie na platformę przy wyprostowanym stawie kolanowym może być przyczyną kontuzji, co oznacza, że mniejszy kąt w tym stawie w grupie amateerek, może wskazywać na możliwość przeciążeń tego stawu w grupie amateerek. Małe wartości kąta zginania tułowia zarówno podczas wejścia, jak i zejścia ze stepu wskazują na brak zaangażowania mięśni grzbietu podczas tłumienia siły reakcji podłoża, co może być przyczyną przeciążeń kręgosłupa zarówno w grupie amateerek jak i instruktorek.

#### Piśmiennictwo

- [1] DU TOIT V., SMITH R. *Survey of aerobic dance injuries to the lower extremity in aerobics instructors*. Journal of American Podiatric Medicine Association, 2001, 91(10):528-532.
- [2] HAMILL J., CALDWELL G.E. *Mechanical load on the body*. ACSM's Resources Manual for Guidelines for Exercise Testing and Prescription (4th Edition), 2001
- [3] MALLIOU P., ROKKA S., TSIGGANOS G., MAVROMOUSTAKOS S., GODOLIAS G. *Profile of dance aerobic instructors' injuries, part I*. Journal of Human Sport & Exercise, 2013, 8,(3):806-812.

## Wpływ neuronów na ekspresję aldolazy fruktozo-1,6-bisfosforanu (ALDOA) w astrocytach

ALINA ZAWIŚLAK<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Fizjologii Molekularnej Zwierząt, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Uniwersytet Wrocławski, ul. Cybulskiego 30, 50-205 Wrocław, e-mail autora: alina.zawislak@uni.wroc.pl

**Słowa kluczowe:** ALDOA, astrocyty, cross-talk, glikoliza, neurony

### 1. Wstęp

Glukoza jest głównym źródłem energii dla mózgu ssaków. Komórkami mózgu wchłaniającymi glukozę z krwi są astrocyty. Astrocyty nie przekazują jednak glukozy neuronom, lecz przede wszystkim przekształcają ją do mleczanu, który po wydzieleniu do przestrzeni międzykomórkowej jest właściwym substratem energetycznym neuronów. [1].

Astrocytarny katabolizm glukozy i glikogenu wspiera neurony nie tylko poprzez mleczan, ale także przez glutaminę, która służy jako prekursor do syntezy neurotransmiterów: glutaminianu i kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego (GABA) [2]. Tak silny związek między neuronalną transmisją, a astrocytarnym metabolizmem energetycznym sugeruje, że te dwa typy komórek mogą funkcjonować jako syncytium poprzez regulację krzyżową (ang. cross-talk) ekspresji białek zaangażowanych w metabolizm energetyczny i syntezę neurotransmiterów. Najnowsze badania przeprowadzone w naszym Zakładzie potwierdzają te przypuszczenia [3]. Wykazano bowiem, że neurony i astrocyty regulują wzajemnie syntezę szeregu białek zaangażowanych w procesy metaboliczne oraz związanych z syntezą neurotransmiterów (w tym glutaminianu) i neurosekrecją.

Do tej pory nie odkryliśmy jednak sygnałów molekularnych, które wiążą się z takimi zmianami metabolicznymi. Projekt ten jest w założeniu pierwszym i kluczowym etapem badań do pracy doktorskiej pod roboczym tytułem „Mechanizmy regulujące 'cross-talk' astrocytarno-neuronalny”. Ma on na celu identyfikację czynnika (lub czynników) sekrecyjnych wydzielanych przez neurony, które wpływają na metabolizm energetyczny astrocytów (konkretnie na ekspresję mięśniowej izoforma aldolazy fruktozo-1,6-bisfosforanu, ALDOA).

### 2. Materiały i metody

#### 2.1. Hodowle komórkowe i przygotowanie kondycjonowanego medium

Badania prowadzone były na hodowlach pierwotnych astrocytów. Komórki pozyskiwano i hodowano zgodnie z wcześniej opisanym protokołem [3]. Eksperymenty prowadzono na hodowlach astrocytów nie młodszych niż 14 dni po preparacji, po 2-5 pasażach.

Celem otrzymania kondycjonowanego medium neuronów (ang. *neuronalconditioned medium*, NCM) neurony hodowano przez 14-16 dni w zagęszczeniu 30 tys. kom/cm<sup>2</sup> w medium neuronów (NM: Neurobasal-A,B-27 Supplement (2%), penicylina (100 U/ml), streptomycyna (0,1 mg/ml), glutamina (0.5 mM), glutaminian (12,5  $\mu$ M),  $\beta$ -merkaptotanol (25  $\mu$ M) i Ara-C (25  $\mu$ M)). Następnie zbierano z nich medium, filtrowano je przez filtry 0,22  $\mu$ m i mrożono w -80 °C aż do użycia.

#### 2.2. Preparacja kondycjonowanego medium, indukcja astrocytów i fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH)

Celem denaturacji termicznej NCM podgrzewano przez 5 min w odpowiedniej temperaturze, po czym chłodzono na lodzie, a następnie wirowano przez 10 min w 4 °C przy 10000xg. Ultrafiltrację prowadzono z wykorzystaniem kolumniek filtracyjnych o MWCO 10 kDa (VIVASPIN 500),

poprzez wirowanie 20 min w 4 °C przy 15 tys g. Powstały przesącz sterylizowano przepuszczając go przez filtr 0,22 µm. Komórki wysiewano w zagęszczeniu 10 tys. kom/cm<sup>2</sup> na szkiełka pokryte matrygelem i hodowano 24 h w medium astrocytów. Po tym czasie medium zmieniano na odpowiednio spreparowane NCM. Po 24 h komórki utrwalano (4% PFA/PBS, 15 min, RT) i poddawano fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*. Sondy znakowane Cy-3 komplementarne wobec mRNA ALDOA zakupiono od Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Hybrydyzację prowadzono zgodnie z wcześniej opisanym protokołem [3].

### 2.3. Mikroskopia konfokalna, analiza fluorescencyjna i statystyczna

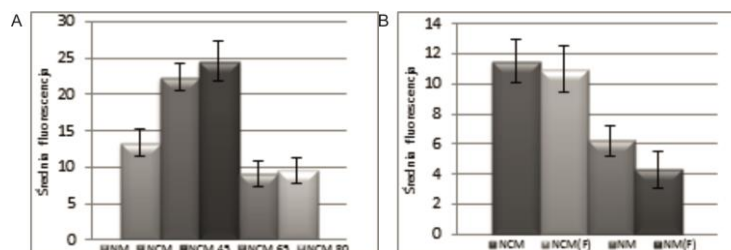
Utrwalone komórki badano pod mikroskopem konfokalnym Olympus FV1000 z użyciem filtrów dla Cy3 i DAPI i obiektywu olejowego Plan Apo 603/1.4NA. Dla DAPI używano lasera 405 nm, natomiast dla Cy3-559 nm. Moc lasera (25% dla obu fluoroforów) była stała podczas wszystkich eksperymentów. By uniknąć wyświetlenia się sygnałów fluorescencyjnych, komórki zamknięto w medium Fluoroshield™(Sigma). Zdjęcia robiono jedynie centrum preparatu na 10 przypadkowo wybranych obszarach. Wszystkie komórki na zdjęciach (średnio 10 na zdjęcie) były brane pod uwagę przy liczeniu średniej fluorescencji. Analizę fluorescencyjną i statystyczną przeprowadzono zgodnie z wcześniej opisanym protokołem [3].

### 3. Wyniki i wnioski

Badania wykazały, że czynnik sekrecyjny (lub czynniki) wydzielany przez neurony, znacząco zwiększa ekspresję mRNA ALDOA w astrocytach w stosunku do komórek traktowanych medium niekondycjonowanym (**Ryc. 1 A**).

Wykazano także, że w wyniku podgrzania NCM do temperatury powyżej 65°C, spada ekspresja mRNA ALDOA, natomiast gdy temperatura wynosiła jedynie 45°C podobny spadek nie jest obserwowany (**Ryc.1 A**). Wskazuje to, że wydzielany przez neurony regulator jest wrażliwy na działanie wysokiej temperatury (>65°C), lecz nie ulega denaturacji w temperaturze 45°C.

Pokazano również, że w wyniku filtracji NCM z użyciem filtra o MWCO=10 kDa nie dochodzi do spadku ekspresji mRNA ALDOA (**Ryc.1 B**). Oznacza to, masa molowa tegoż czynnika nie przekracza 10 kDa, zatem jest to niewielkie białko, lub peptyd.



**Ryc. 1.** A) Wpływ denaturacji termicznej NCM na ekspresję mRNA ALDOA w astrocytach. NM – niekondycjonowane medium neuronów, NCM – kondycjonowane medium neuronów, NCM 45/65/80 – NCM denaturowane w temperaturze 45/65/80°C. B) Wpływ filtracji (MWCO = 10kD) NCM na ekspresję mRNA ALDOA w astrocytach. NCM(F) – NCM filtrowane, NM(F) – NM filtrowane

### Piśmiennictwo

- [1] MAGISTRETTI P. J., *Neuron-glia metabolic coupling and plasticity*. J. Exp. Biol., vol. 209, no. Pt 12, pp. 2304-11, Jun. 2006.
- [2] GIBBS M. E., HUTCHINSON D., HERTZ L., *Astrocytic involvement in learning and memory consolidation*. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, vol. 32, no. 5, pp. 927-944, 2008.
- [3] MAMCZUR P., BORSUK B., PASZKO J., SAS Z., MOZRZYMAS J., WIŚNIEWSZKI J. R., GIZAK A., RAKUS D., *Astrocyte-neuron crosstalk regulates the expression and subcellular localization of carbohydrate metabolism enzymes*. Glia, vol. 63, no. 2, pp. 328-40, Feb. 2015.

## Zmienność rytmu serca u świń żywionych dietą typu western

DOROTA ZYŚKO<sup>1</sup>, ROBERT PASLAWSKI<sup>2,3</sup>, ADRIAN JANISZEWSKI<sup>2,4</sup>, URSZULA PASLAWSKA<sup>2,4</sup>,  
ANDRZEJ SZUBA<sup>2,5</sup>

<sup>1</sup>Zakład Ratownictwa Medycznego UM we Wrocławiu ul. Bartła 5, 51-618 Wrocław, e-mail autora: dzysko@wp.pl

<sup>2</sup>Zintegrowane Centrum Medycyny Sercowo-Naczyniowej ul. Kamińskiego 73a, 51-124 Wrocław

<sup>3</sup>Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych Zawodowych i Nadciśnienia Tętniczego UM we Wrocławiu, ul. Borowska 213, 50-556 Wrocław

<sup>4</sup>Katedra Chorób Wewnętrznych z Kliniką Koni Psów i Kotów Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UPWr, pl. Grunwaldzki 47 50-366 Wrocław

<sup>5</sup>Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych Zawodowych i Nadciśnienia Tętniczego UM we Wrocławiu, ul. Borowska 213, 50-556 Wrocław

**Słowa kluczowe:** serce, świnia, zmienność rytmu dobowego

### 1. Wstęp

Zmienność rytmu serca jest wyrazem zmian napięcia układu autonomicznego. Spadek zmienności rytmu serca spowodowany wzrostem napięcia układu współczulnego towarzyszy niewydolności serca o różnej etiologii i jest uznanym czynnikiem ryzyka śmierci sercowej [1]. Celem badania było stwierdzenie, czy wczesnej miażdżycy spowodowanej długotrwałym spożywaniem diety bogato tłuszczowej i bogato węglowodanowej (diety typu western) zakłócają fizjologiczną zmienność rytmu serca.

### 2. Materiał i metody

Badano 2 grupy zwierząt: kontrolną (grupa kontrolna GK) złożoną z 41 świń żywionych przez 12 miesięcy standardową karmą dla świń. Drugą grupę (grupa badana – GB) stanowiło 12 świń żywionych dietą typu „western” wzbogaconą o 4% dodatek dwucukrów i zawierającą 5 razy więcej tłuszczów nasyconych niż dieta komercyjna. Świnie premedykowano mieszaniną anestetyczną midazolam + medetomidyna + ketamina i.m. Znieczulenie kontynuowano poprzez dożylny wlew propofolu w formie bolusów według efektu działania. Po 20-30 min od znieczulenia, po wyrównaniu się czynności serca dokonywano około 60 min rejestracji EKG przy użyciu sytemu holterowskiego Aspel. Przeprowadzono analizę zapisów 2 min fragmentów wykonanych po 30 min od początku znieczulenia.

Analiza statystyczna wykonywana była przy pomocy oprogramowania STATISTICA 9.1 PL. Badane zmienne przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  SD i porównywano w zależności od rozkładu testem t Studenta dla zmiennych o rozkładzie normalnym lub jeśli odrzucona została hipoteza o normalności rozkładu testem U Manna-Whitney’a. Poziom istotności statystycznej przyjęto dla  $p \leq 0,05$ .

### 3. Wyniki

Wyniki analizy statystycznej przedstawiono w tabeli 1. Nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy grupami zwierząt w zakresie badanych parametrów zmienności rytmu serca. Grupy różniły się istotnie statystycznie jedynie masą ciała.

**Tab. 1** Analiza parametrów elektrokardiograficznych świń żywionych dietą standardową (GK) i świń żywionych dietą typu western (GB)

Zmienne	Grupa badana (GB)	Grupa kontrolna (GK)	p
mR-R (ms)	819,4 ± 108,4	821,0 ± 196,7	NS
SDNN	26,0 ± 23,6	27,4 ± 35,9	NS
rMSSD	28,8 ± 31,5	32,9 ± 47,5	NS
pNN50	4,4 ± 8,4	9,7 ± 21,5	NS
TP	16,6 ± 9,0	20,9 ± 6,9	NS
LF	5,4 ± 3,8	7,0 ± 8,4	NS
HF	9,2 ± 6,2	12,5 ± 19,8	NS
B	0,69 ± 0,3	0,75 ± 0,4	NS

Badane zmienne – średnia, p – poziom istotności p, mR-R – średni czas trwania odstępu R-R, SDNN – odchylenie standardowe, rMSSD – pierwiastek kwadratowy ze średniej sumy kwadratów różnic między kolejnymi odstępami, pNN50 – odsetek różnic pomiędzy kolejnymi NN przekraczających 50 ms względem liczby wszystkich odstępów NN w badanym okresie, TP – całkowita amplituda widma w zakresie częstotliwości 0-0,4 Hz, LF – amplituda widma w zakresie niskiej częstotliwości; (0,04-0,15 Hz), amplituda widma w zakresie wysokiej częstotliwości (0,15-0,40 Hz), B – iloraz LF/HF.

#### 4. Dyskusja

Arterioskleroza powoduje wzrost oporu naczyniowego i w ten sposób zwiększa obciążenie serca. Jednym z najszybciej uruchamianych mechanizmów kompensacyjnych jest aktywacja układu adrenergicznego – co powoduje zmiany zmienności rytmu serca. Eksperyment wykonano na świniami, ponieważ są jedynym gatunkiem zwierząt rozwijającym spontaniczną arteriosklerozę pod wpływem diety bogatej w tłuszcze nasycone [2]. Wykonane badanie wskazuje, że we wczesnych etapach rozwoju miażdżycy nie obserwuje się istotnych zmian zmienności rytmu serca, co pozwala sądzić iż na tym etapie choroby nie dochodzi do istotnych zmian napięcia w zakresie układu autonomicznego.

#### Piśmiennictwo

- [1] BARTHEL P, SCHNEIDER R., BAUER A., ULM K., SCHMITT C., SCHOMIG A., SCHMIDT G. *Heart rhythm turbulence – new marker of SCD after infarct*. Circulation 2003, 108, 1221-6.
- [2] PASŁAWSKI R, PASŁAWSKA U, NICPOŃ J, SZUBA A. *Swine as a model of experimental atherosclerosis*. Adv Clin Exp Med. 2011, 20 (2), 211-215.

## System nawigacji komputerowej w świetle widzialnym do zastosowań w biomechanice

MATYLDA ŻMUDZIŃSKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Politechnika Wroclawska, ul. Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław, e-mail: zmudzinska.matyllda@gmail.com

**Słowa kluczowe:** system nawigacji, opencv, analiza kinematyczna

### 1. Wstęp

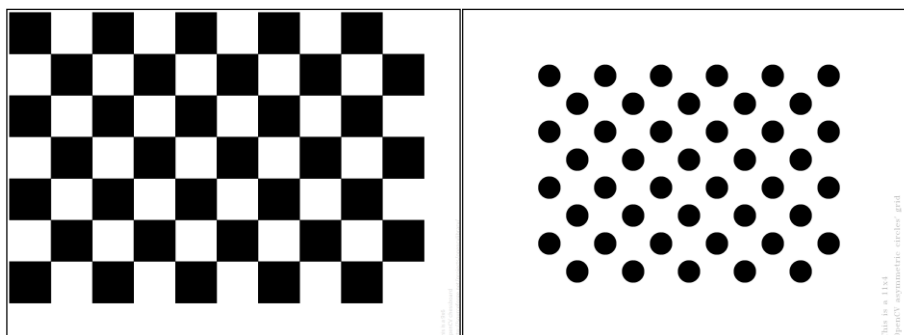
Analiza kinematyczna przy użyciu systemów nawigacji komputerowej jest szeroko stosowaną metodą monitorowania postępów w rehabilitacji ruchowej, oraz badania ruchu zawodników różnych dyscyplin sportowych. [1] Ze względu na znaczne koszty specjalistycznych systemów *motion capture*, takich jak np. Optotrak Certus, coraz większą popularność zdobywają proste układy oparte m.in. o kamery internetowe, czy czujnik Kinect, dostępne również dla indywidualnych użytkowników.

Poniższe opracowanie ma na celu przedstawić proces projektowania oraz testowania komputerowego systemu nawigacji opartego o kamery internetowe oraz bezpłatne biblioteki języka C++.

### 2. Materiał i metody [2] [3]

Zaprojektowany układ składa się z trzech liniowo względem siebie ustawionych kamer internetowych, podłączonych do komputera poprzez złącze USB oraz z zestawu markerów. Kluczowe dla działania systemu jest oprogramowanie, które zostało opracowane w języku C++ przy wykorzystaniu biblioteki *OpenCV*. Biblioteka ta pozwala na rejestrację i przetwarzanie obrazu z kilku kamer jednocześnie.

W programie zastosowano funkcje *calibrateCamera*, *findChessboardCorners* oraz *findCirclesGrid* służące kalibracji kamer, wykorzystujące przedstawione na ryc.1 wzorce.



Ryc. 1. Wzorce do kalibracji kamer przy pomocy biblioteki OpenCV, z lewej: *Chessboard*, z prawej *Circles Grid*, źródło: [2]

Następnie z wykorzystaniem odpowiednich funkcji (m.in. *computeCorrespondEpilines*, *correctMatches*, *findFundamentalMat*) stworzono macierze, umożliwiające wzajemne powiązanie ze sobą obrazów z kamer i usunięcie dystorsji. Kolejną operacją było odtworzenie trójwymiarowego obrazu z zastosowaniem zasady triangulacji (funkcja *triangulatePoints*). Aby możliwe było śledzenie i zapisywanie położenia zastosowanych pasywnych markerów, zaimplementowano funkcję

*matchTemplate*, która poprzez porównanie znanego wzorca z obrazem kamery odnajduje na nim w czasie rzeczywistym pożądane elementy. Przykład zastosowanego markera przedstawiono na ryc. 2. W przeprowadzonym doświadczeniu wykorzystano 16 różnych markerów.



**Ryc.2.** Marker umożliwiający śledzenie obiektów na obrazie z kamery, źródło: [3]

Podczas testów sprawdzających poprawność działania i dokładność zaprojektowanego systemu, dokonano analizy kinematycznej ruchu trzech osób podczas treningu na ergometrze wiosłarskim Concept 2. Do przeprowadzenia każdej próby, na ciele badanych umieszczono po 14 markerów, w taki sposób, aby na podstawie ich położenia możliwe było odtworzenie trajektorii ruchu ćwiczącego. Dwa pozostałe markery umieszczono na ergometrze. Następnie każdy z badanych wykonał trzy dziesięciosekundowe próby wiosłowania, co zostało zarejestrowane przez zaprojektowany system.

Po przeprowadzeniu powyższych prób, dokonano analogicznego doświadczenia z wykorzystaniem systemu Optotrak Certus, co pozwoliło uzyskać wyniki do oceny i porównania dokładności.

### 3. Wyniki

W wyniku przeprowadzonych na autorskim systemie prób otrzymano wyniki pozwalające oceniać kinematykę ruchu wioslarza z dokładnością do około 10 mm. Niektóre z markerów były niewidoczne przez część trwania testu. Próby z Optotrakiem według danych producenta dają natomiast dokładność sięgającą 0,1 mm [4].

### 4. Dyskusja

Na dokładność odwzorowania ruchu wpływ ma nie tylko sam system służący jego śledzeniu, ale też sposób mocowania markerów do ciała. W opisywanym przypadku, gdzie osoba badana porusza się w sposób dynamiczny oraz jest ubrana w strój niecałkowicie przylegający do ciała, uzyskana dokładność jest zadowalająca. Mimo o dwa rzędy wyższego niż w systemie Optotrak błędu, możliwe jest odtworzenie ruchu podczas treningu. Dokładność systemu można by poprawić poprzez zastosowanie większej liczby kamer o lepszej rozdzielczości. W ten sposób skonstruowany układ zastąpić może kosztowne systemy *motion capture*, co umożliwi analizę kinematyczną, pozwalającą m.in. na doskonalenie techniki wykonywanych ćwiczeń, wśród indywidualnych użytkowników, czy małych klubów sportowych.

### Piśmiennictwo

- [1] PAWŁOWSKI R., PIĘCIAK T. *Wizualizacja ruchu człowieka (Motion Capture)*. Inżynierowie dla Biologii i Medycyny, 2009,5:20:27
- [2] Dokumentacja biblioteki OpenCV: <http://docs.opencv.org/>
- [3] Dokumentacja biblioteki ArUco: [http://docs.ros.org/electric/api/aruco\\_pose/html/index.html](http://docs.ros.org/electric/api/aruco_pose/html/index.html)
- [4] Strona internetowa NDI Digital: <http://www.ndigital.com/msci/products/optotrak-certus/>

## Matematyczny model enterohepatycznego krążenia żółci

MAGDALENA ŻULPO<sup>1</sup>; JOANNA BALBUS<sup>2</sup>; ARTUR WRONA<sup>1</sup>; KRYSZTOF KUBICA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Politechnika Wroclawska, Katedra Inżynierii Biomedycznej, Plac Grunwaldzki 13, 50-377 Wrocław

<sup>2</sup> Politechnika Wroclawska, Katedra Matematyki, Janiszewskiego 14a, 50-372 Wrocław, magdalena.zulpo@pwr.edu.pl

**Słowa kluczowe:** model homeostazy cholesterolu, krążenie enterohepatyczne

### 1. Wstęp

Utrzymanie homeostazy cholesterolu, kluczowe w wielu procesach biochemicznych, wymaga przede wszystkim prawidłowej jego dystrybucji podczas krążenia enterohepatycznego [1]. Zachwianie tego cyklu jest niejednokrotnie przyczyną wielu zaburzeń, co w efekcie może prowadzić do poważnych schorzeń. Otyłość i kamienica żółciowa mają ogromny wpływ na motorykę pęcherzyka żółciowego. Należy również zwrócić uwagę na fakt istnienia różnych, indywidualnych odpowiedzi na cholesterol przyjmowany wraz z pożywieniem. Większość osób wykazuje podwyższony poziom cholesterolu we krwi po posiłku zawierającym cholesterol (hiper-responders), jednak u około 20% obserwowano zależność odwrotną (hypo-responders) [2]. Na proces homeostazy cholesterolu ma więc wpływ nie tylko jego prawidłowa cyrkulacja i dystrybucja, lecz również jest on silnie determinowany poprzez cechy osobnicze. Niewątpliwie, w procesach tych niezwykle ważną rolę pełni pęcherzyk żółciowy, którego funkcjonowanie determinuje przebieg cyklu enterohepatycznego.

### 2. Materiał i metody

Bazując na naszym wcześniejszym modelu dwu-przedziałowym [3] stworzyliśmy model trój-przedziałowy poprzez dodanie przedziału reprezentującego pęcherzyk żółciowy (przedział III). Przedział I reprezentuje krew przepływającą przez wątrobę, natomiast przedział II krew obwodową. Przedziały modelu oraz relacje pomiędzy nimi są opisane trzema równaniami różniczkowymi:

$$\frac{dm_1}{dt} = \frac{k}{m_1} + k_{21}m_2 - k_{12}m_1 - (m_{3total} - m_3)a_1 - k_b \frac{m_1}{m_3} + m_{in} + M_{in}^* \quad (1)$$

$$\frac{dm_2}{dt} = -k_{21}m_2 + k_{21}m_1 - m_{tis} + M_{diet}^* \quad (2)$$

$$\frac{dm_3}{dt} = -M_{be}^* - s_g m_3 + (m_{3total} - m_3)k_g + k_b \frac{m_1}{m_3} \quad (3)$$

Pierwsze równanie opisuje szybkość zmian cholesterolu w przedziale I, na które składają się: 1) cholesterol syntetyzowany w wątrobie; 2) kinetyka wymiany cholesterolu między przedziałami I i II; 3) szybkość dostarczania i strat cholesterolu wraz z żółcią; 4) utrata cholesterolu związana z syntezą kwasu cholowego. Ilość cholesterolu w drugim przedziale (równ. 2) zależy od: 1) kinetyki wymiany cholesterolu pomiędzy przedziałem II i I; 2) zapotrzebowania cholesterolu przez tkanki; 3) cholesterolu zawartego w diecie. Trzeci przedział reprezentuje równanie opisujące napełnianie i opróżnianie pęcherzyka żółciowego (równ. 3) kwasem cholowym (ChA), który jest głównym składnikiem żółci oraz ko-transporterem cholesterolu. Ilość ChA w III przedziale zależy od: 1) szybkości napełniania woreczka żółciowego; 2) szybkości opróżniania pęcherzyka żółciowego; 3) stanu pęcherzyka żółciowego. Procesy zależne od czasu (takie jak spożycie cholesterolu w ciągu cyklu dnia, wchłanianie ChA w jelicie krętim oraz napływ cholesterolu wraz z żółcią do pęcherzyka) są względem siebie przesunięte czasowo. Poszczególne procesy były kontrolowane za pomocą funkcji Heaviside'a.

### 3. Wyniki

Analiza modelu trój-przedziałowego pozwoliła na badania wpływu parametrów modelowych określających: ilość cholesterolu w diecie ( $M_{\text{diet}}$ ), zmiany szybkości syntezy ChA ( $k_b$ ), zmiany objętości pęcherzyka ( $m_{3\text{total}}$ ), ilość usuwanego z organizmu ChA ( $w$ ) oraz krążenie cholesterolu z i do wątroby wraz z żółcią ( $a_1$ ,  $a_2$ ), na: stężenie cholesterolu w II przedziale ( $c_2$ ), masę ChA w III przedziale ( $m_3$ ), szybkość syntezy ChA ( $v_{\text{ChA}}$ ) oraz szybkość syntezy cholesterolu ( $v_{\text{Chol}}$ ). Podczas symulacji modelowano dwa charakterystyczne przypadki stanu pęcherzyka: pęcherzyk całkowicie zdrowy (normalny) oraz całkowicie wypełniony kamieniami żółciowymi (patologiczny).

**Tab. 1.** Wartości parametrów wyjściowych modelu w odpowiedzi na zmianę parametrów podstawowych (↑ wzrost, ↓ spadek, = brak zmian; w odniesieniu do wartości podstawowych)

Parametry i wartości modyfikowane	Stan normalny				Stan patologiczny			
	$c_2$ [mg/ml]	$m_3^*$ [mg]	$v_{\text{Chol}}$ [mg/min]	$v_{\text{ChA}}$ [mg/min]	$c_2$ [mg/ml]	$m_3^*$ [mg]	$v_{\text{Chol}}$ [mg/min]	$v_{\text{ChA}}$ [mg/min]
parametry podstawowe	179	3007	0,695	0,143	179	267	0,656	1,615
$M_{\text{diet}}$ [mg]	↑	↑	=	↓	↑	=	↑	↑
$k_b$ [mg/min]	↓	↑	↓	↓	↓↓	↑↑	↓	↑
	↑	=	↑	↑	↑↑	↓	↑	↑↑
$m_{3\text{total}}$ [mg]	↓	↑	↓↓	↓	↑	↓↓	↑↑	↑↑
	↑	=	↑	↑	↓↓	↑↑	↑	↓
$w$ [-]	↑	↓	=	↑↑	↓	↓↓	↓	↑↑
$a_1$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	↓	↑	=	↓	↑	↑↑	=	↑
	↑	↓	=	↑↑	↓	↓	=	↑↑
$a_2$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	↓	↓	=	↑↑	↓	↓	=	↑↑
	↑	↑	=	↓	↑	↑↑	=	↑

### 4. Dyskusja

Zgodnie z oczekiwaniem, pęcherzyk żółciowy wypełniony kamieniami żółciowymi wykazuje znacząco zmniejszającą zdolność magazynowania żółci ( $m_3^*$ ). W takiej sytuacji żółć wydzielana przez wątrobę dostaje się bezpośrednio do jelit, z pominięciem pęcherzyka żółciowego. Badania symulacyjne pozwoliły także zaobserwować wzrost szybkości syntezy kwasu cholowego w wątrobie w odpowiedzi na zmniejszenie zdolności pęcherzyka do magazynowania żółci. Wynik ten można interpretować w kategoriach reguły przekory: wzrost ilości kwasu cholowego jest czynnikiem przeciwdziałającym tworzeniu kamieni żółciowych. Warto również podkreślić, że stan pęcherzyka żółciowego nie ma wpływu na stężenie cholesterolu we krwi pod warunkiem, że jego pogarszający się stan jest kompensowany odpowiednio zwiększonym napływem żółci wątrobowej. W modelu trój-przedziałowym udało nam się również zaobserwować odwrotne reakcje na cholesterol w diecie (hyper i hypo responders), determinowane wartościami parametrów  $a_1$ ,  $a_2$ . Hipotezy te wymagają weryfikacji w badaniach klinicznych.

### Piśmiennictwo

- [1] GUYTON A.C., HALL J.E. *Textbook of Medicinal Physiology*, ELSEVIER, 2006.
- [2] SHAFFER E.A., MCORMOND P., DUGGAN H. *Quantitative cholelescintigraphy: assessment of gallbladder filling and emptying and duodenogastric reflux*, *Gastroenterology*, 1980, 79(5 Pt 1):899-906.
- [3] HRYDZIUSZKO O., WRONA A., BALBUS J., KUBICA K. *Mathematical Two-compartment Model of Human Cholesterol Transport in Application to High Blood Cholesterol Diagnosis and Treatment*, *Electronic Notes In Theoretical Computer Science*, 2014, 306:19-30.



## ORGANIZATOR I WSPÓŁORGANIZATORZY



ISBN 978-83-934204-8-3