

EWA W O J T A L

UWALNIANIE DO KRĄŻENIA DEZAGREGUJĄCYCH  
PROSTANOIDÓW POD WPŁYWEM STYMULACJI  
ELEKTRYCZNEJ KOŃCZYN W MATERIALE  
DOŚWIADCZALNYM I KLINICZNYM

Pracownia Chirurgii Doświadczalnej  
Instytutu Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej  
Polskiej Akademii Nauk

Praca wykonana pod kierunkiem  
Doc. dr hab. med.

Macieja BORKOWSKIEGO

Praca na stopień doktora nauk przyrodniczych

=====

<http://rcin.org.pl>

W A R S Z A W A , 1987



Składam serdeczne podziękowania

Mojemu Promotorowi, doc.dr hab.med. Maciejowi Borkowskiemu za wszechstronną opiekę i pomoc okazywaną mi w trakcie wykonywania niniejszej pracy.

Pani doc.dr hab.med. Krystynie Cedro-Ceremużyńskiej za udostępnienie mi aparatury i odczynników oraz cenne uwagi i dyskusje podczas wykonywania części eksperymentalnej pracy.

Paniom Dorocie Laszuk, Irenie Sawicz i Stefanii Słyk za pomoc w przygotowywaniu i prowadzeniu doświadczeń.

Koleżankom i kolegom z III Oddziału Chirurgicznego Szpitala Praskiego w Warszawie za pomoc w realizacji badań klinicznych, oraz tym wszystkim, z których pomocą i życzliwością spotykałam się podczas przygotowywania tej pracy.



<u>S P I S T R E Ś C I</u>	Str.
W S T Ę P	4
MATERIAŁ I METODY	20
I. Badania eksperymentalne	20
II. Badania kliniczne	31
W Y N I K I	35
I. Badania eksperymentalne	35
1. Wpływ elektrycznej stymulacji pnia sympatycznego na agregację płytek krwi.	35
2. Wpływ elektrostymulacji powierzchniowej na agregację płytek krwi.	36
3. Określenie własności chemicznych substancji wydzielanej do krążenia pod wpływem elektrostymulacji powierzchniowej.	40
4. Wpływ elektrostymulacji powierzchniowej na zmiany przepływu całkowitego krwi w kończynie.	53
Podsumowanie wyników I	61
II. Badania kliniczne	62
1. Wpływ elektrostymulacji powierzchniowej na zmiany agregacji płytek krwi oraz czasu krwawienia:	
a/ u chorych z chorobą Raynauda	62
b/ u chorych z chorobą Bùrgera	63
c/ u zdrowych ochotników	70



d/ próba ślepa	70
2. Wpływ długotrwałego stosowania elektrostymulacji powierzchniowej na zmiany agregacji płytek krwi i czas krwawienia u chorych z zaburzeniami krążenia obwodowego.	73
Podsumowanie wyników II	78
DYSKUSJA	80
WNIOSKI	94
STRESZCZENIE	96
PIŚMIENNICTWO	101



## WSTĘP

Infuzja prostanoidów o właściwościach naczyniorozkurczowych i hamujących agregację płytek krwi oraz bezpośrednia lub przezskórna elektrostymulacja nerwów zaopatrujących naczynia są niekonwencjonalnymi i stosunkowo młodymi metodami leczenia chorób krążenia obwodowego. Stosowanie każdej z obu metod prowadzi do złagodzenia skutków zaburzenia homeostazy wewnątrznaczyniowej i poprawy krążenia w kończynach objętych zmianami patologicznymi. Znajomość zasad i efektów działania metody farmakologicznej /infuzja naczynioaktywnych prostanoidów/ może pomóc w próbie wyjaśnienia mechanizmu poprawy krążenia pod wpływem elektrostymulacji, który do tej pory nie został w pełni poznany.

W przebiegu większości chorób, którym towarzyszą zmiany w krążeniu obwodowym dochodzi do powstawania zakrzepów śródnaczyniowych. Tętnice doprowadzające ulegają częściowemu lub całkowitemu zamknięciu, co w konsekwencji prowadzi do zmian troficznych w tkankach przez nie zaopatrywanych i martwicy.

Takie zmiany patologiczne obserwuje się między innymi w przebiegu choroby lub zespołu Raynauda, choroby B<sup>u</sup>rgera, której często towarzyszy objaw Raynauda, miażdżycy oraz cukrzycy /angiopatie cukrzycowe/. Pomimo różnej etiologii tych chorób ważnym czynnikiem patogennym formowania wewnątrznaczyniowych zakrzepów jest zachwianie równowagi między powstawaniem substancji anty - i proagregacyjnych w układzie naczyniowym /88/. Najważniejszą sub -



stancją hamującą agregację płytek krwi w układzie naczyniowym jest prostacyklina, a związkami silnie zlepiającymi krwinki płytkowe - tromboksan  $A_2$ .

Prostacyklina / $PGI_2$ / jest najsilniejszym z odkrytych do tej pory endogennych inhibitorów agregacji płytek krwi /40,88/. Powoduje wzrost poziomu wysokoenergetycznego związku chemicznego c - AMP /cyklicznego 3', 5' adenozynomonofosforanu/ w płytkach i erytrocytach.

Wzrost poziomu c - AMP w tych komórkach wpływa na hamowanie agregacji płytek krwi oraz podnosi zdolność erytrocytów do odkształceń. Poza tym prostacyklina rozprasza powstałe już zbitki płytkowe i rozszerza naczynia krwionośne. Działa lokalnie lub uwolniona do krążenia wykazuje działanie systemowe poprzez zmniejszenie obwodowego oporu naczyniowego /23,47,100/. Prostaglandyny  $E_1$ / $PGE_1$ / i  $D_2$ / $PGD_2$ / wykazują podobne do prostacykliny działanie na płytki. Jednakże efekty przez nie wywołane są o wiele słabsze. Poza tym działają krócej, ponieważ w odróżnieniu do prostacykliny ulegają inaktywacji w krążeniu płucnym /47/.

Związkami chemicznymi o przeciwstawnym działaniu do prostacykliny jest powstający w płytkach krwi - tromboksan  $A_2$ / $TXA_2$ /. Hormon ten powoduje zlepianie się płytek krwi i kurczenie miocytów tętnic. Uważa się, że tromboksan  $A_2$  jest odpowiedzialny za napady skurczów naczyń wieńcowych serca i powstawanie zakrzepów wewnątrznaczyniowych /87/.

Przeciwstawne działanie  $PGI_2$  i  $TXA_2$  wskazuje na ogromne znaczenie dla homeostazy wewnątrznaczyniowej utrzymywania równowagi w wytwarzaniu tych dwóch potężnych hormonów.



Na podstawie badań przeprowadzonych w ostatnich latach stwierdzono naruszenie równowagi  $\text{PGI}_2/\text{TXA}_2$  w chorobach, którym towarzyszą zmiany naczyniowe.

Zauważono np., że w początkowej fazie rozwoju cukrzycy synteza prostacykliny przez naczynia znamienne się obniża, co może początkować postępowanie zmian miażdżycowych /87/.

Obniżoną produkcję prostacykliny, zmniejszenie podatności płytek krwi na dezagregujące działanie  $\text{PGI}_2$ , wzrost ilości krążących agregatów płytkowych, oraz podwyższoną produkcję  $\text{TXA}_2$  przez płytki obserwowano u chorych na cukrzycę /70, 87, 95, 105, 111/, miażdżycę /87, 88, 129/, u chorych z zakrzepicą tętniczą, głęboką żylną zakrzepicą czy nawracającym zapaleniem żył /86/ jak również w chorobie Raynauda /51, 86, 107, 138/. Wzrost produkcji  $\text{TXA}_2$  związany jest ze skróceniem czasu przeżycia płytek /112/, a obniżenie wrażliwości płytek na  $\text{PGI}_2$  doprowadza do wzrostu ich podatności na endogenne czynniki agregujące i powstawanie zakrzepów wewnątrznaczyniowych. Prostacyklina prawdopodobnie odgrywa rolę w regulacji wzrostu komórek w ścianie naczynia i w związku z tym proliferacja mięśni gładkich w blaszce miażdżycowej może być konsekwencją obniżonej produkcji tego hormonu /113/.

Krew pacjentów z zespołem Raynauda wykazuje nieprawidłowości reologiczne, które wpływają na upośledzenie przepływu krwi przez mikrokrążenie. Należą do nich: wzrost lepkości krwi /20, 38, 66, 106, 130/, obniżenie odkształcalności erytrocytów /27, 29/, podniesienie poziomu fibrynogenu w osoczu /10, 20, 66/. Obniżenie wrażliwości



na działanie dezagregujących prostaglandyn przy niższej temperaturze /51,86,138/, zmniejszony przepływ całkowity i odżywczy u pacjentów z objawem Raynauda /78,81/ może mieć związek z patogenezą objawu Raynauda i przyczyniać się do zakrzepowych powikłań.

Obserwowana w chorobie Raynauda wzmożona agregacja płytek krwi i podniesienie poziomu  $\beta$ -tromboglobulin mogą być wtórne do zniszczenia śródbłonna. Natomiast zniszczenie śródbłonna powoduje obniżoną produkcję prostacykliny /6,8,138/.

W chorobie Bùrgera również obserwuje się wzrost lepkości krwi /28/. Wzrasta poziom fibrynogenu /105,120/ i agregacja płytek krwi /szczególnie w fazie zakrzepowej rozwoju choroby/ co prowadzi do zaciopowania naczyń. Uważa się, że jednym z czynników etiopatologicznych w chorobie Bùrgera jest nikotyna. Badania wykazały, że nikotyna obniża produkcję prostacykliny przez śródbłonek naczyń. Natomiast nie ma wpływu na powstawanie płytkowego tromboksanu  $A_2$ . Poza tym nikotyna hamuje wzrost poziomu  $PGI_2$  w odpowiedzi na podwyższony poziom noradrenaliny. Tego typu działanie nikotyny może odgrywać ważną rolę w rozwoju chorób naczyniowych, nie tylko choroby Bùrgera /23,89,115/. U ludzi zdrowych pod wpływem wysiłku i niedokrwienia wzrasta poziom prostacykliny i tromboksanu  $A_2$ . U osób z chorobami naczyniowymi produkcja  $TXA_2$  w wyniku wysiłku jest niewspółmiernie wyższa od wzrostu poziomu  $PGI_2$  /82,133/.

Aktywacja płytek w połączeniu z obniżoną syntezą prostacykliny przez śródbłonek naczyń może naruszać równowagę prostacyklina/tromboksan  $A_2$  preferując naczynioskurczowe i proagregacyjne



własności tromboksanu  $A_2$  prowadząc do powstawania wewnątrznaczyniowych zakrzepów /51, 56, 57, 132/.

Farmakologiczne, zachowawcze leczenie chorób krążenia obwodowego polega na stosowaniu leków rozszerzających naczynia, pobudzających fibrynolizę, środków przeciwzakrzepowych i przeciwbólowych. Leczenie przeciwzakrzepowe i trombolityczne ma zasadnicze znaczenie szczególnie w okresach, w których dochodzi do nasilenia wewnątrznaczyniowego wykrzepiania /110/.

Od połowy lat 70-tych w literaturze medycznej ukazują się doniesienia na temat stosowania w leczeniu chorób krążenia obwodowego prostaglandyn o własnościach antyagregacyjnych i naczyniorozszerzających. Należą do nich głównie: prostacyklina i prostaglandyny z serii E.

Infuzja prostacykliny zdrowym ochotnikom /2-16 ng/kg/min/ powoduje rozszerzenie naczyń krwionośnych, hamowanie agregacji krwinek płytkowych i redukcję krążących agregatów we krwi /47, 131/. U chorych z miażdżycą prowadzi do wzrostu mięśniowego przepływu krwi, u 45 % badanych wywołuje gojenie owrzodzeń niedokrwiennych i zmniejszenie bólów spoczynkowych, co pozwala tym pacjentom na odstawienie narkotyków /23, 93, 97/. Złagodzenie bólów i spontaniczne gojenie owrzodzeń kończyn dolnych pod wpływem infuzji prostacykliny / 15 ng/kg/min/ obserwowano również u chorych na cukrzycę /69, 94/. U chorych z chorobą lub objawem Raynauda powoduje hamowanie agregacji płytek krwi, powrót zdolności erytrocytów do odkształceń /23, 29/, zwiększenie przepływu krwi i związany z nim wzrost temperatury kończyn. Częstotliwość i czas trwania ataków



bólu niedokrwiennego ulega znacznej redukcji. U wszystkich pacjentów z chorobą Raynauda, u których wystąpiły uszkodzenia skóry w wyniku niedokrwienia obserwowano gojenie owrzodzeń /30, 45, 76, 108/.

Stwierdzono, że infuzja PGI<sub>2</sub> u pacjentów z miażdżycą, chorobą B<sup>u</sup>rgera czy Raynauda lub infuzja 6-keto PGE<sub>1</sub>/stabilny, aktywny produkt biotransformacji PGI<sub>2</sub>/ w przypadku miażdżycy dodatkowo aktywuje fibrynolizę /25, 68, 120/.

Korzystne klinicznie efekty działania prostacykliny polegające na zmniejszeniu bólów niedokrwiennych i gojeniu owrzodzeń utrzymują się od 3 - 6 /45/ do 9,5 /29/ tygodni po zakończeniu infuzji. Natomiast sam efekt hamowania agregacji płytek krwi obserwuje się tylko przez 2 godziny. Naczyniorozkurczowe działanie PGI<sub>2</sub> jest jeszcze krótsze niż na płytki i znika po 15 minutach od zakończenia infuzji /30, 37, 131/. Dotychczas nie wyjaśniono długotrwałego utrzymywania się efektów infuzji PGI<sub>2</sub> /69/.

Niżankowski /93/ wysunął następującą hipotezę tłumaczącą to zjawisko. Kurcz naczyń opornościowych występujący w następstwie uszkodzenia tkanek pogłębia niedokrwienie, prowadząc do procesu samopodtrzymywania. Prostacyklina mogłaby znosić kurcz, poprawiając ukrwienie tkanek na tyle, że bodziec powodujący spazm mógłby zaniknąć.

Stosowanie infuzji prostaglandyny E<sub>1</sub> w chorobach krążenia obwodowego /choroba Raynauda, B<sup>u</sup>rgera, zarostowe stwardnienie tętnic/ prowadzi do otrzymania efektów klinicznych podobnych do działania prostacykliny. Infuzja PGE<sub>1</sub> /10 ng/kg/min/ powoduje wzrost obwodowego przepływu krwi u zwierząt /79, 99/ i ludzi /20, 29, 34, 94/.



Badania wykazują istotną rolę  $\text{PGE}_1$  w gojeniu owrzodzeń niedokrwien-nych /20, 49, 96, 87, 98, 112/. Jedynie pacjenci z daleko posuniętymi zmianami zgorzelinowymi kończyn nie wykazują żadnej odpowiedzi na infuzję prostaglandyny  $\text{E}_1$  czy prostacykliny /8, 118/. Lucas i wsp. uważają, że  $\text{PGE}_1$  nie poprawia filtracji erytrocytów /77/. Natomiast Dowd i wsp. twierdzą, że w wyniku infuzji  $\text{PGE}_1$  znamienne wzrasta zdolność erytrocytów do odkształceń u chorych z zespołem Raynauda i sklerodermią /29/.

Podobnie jak w przypadku infuzji  $\text{PGI}_2$  autorzy podają różny czas utrzymywania się efektów  $\text{PGE}_1$ . Wzrost przepływu krwi utrzymuje się średnio od 20 min do 2 tygodni po zakończeniu infuzji /20, 79, 98/. Natomiast ogólną poprawę polegającą na zmniejszeniu bólów niedokrwienych, gojeniu owrzodzeń, zmniejszeniu częstotliwości ataków skurczu naczyń obserwowano przez 11 tygodni po infuzji /20, 98/.

Podsumowując dotychczas przedstawione dane można stwierdzić, że korzystny efekt działania wyżej wymienionych prostanoidów /prostacykliny i prostaglandyny  $\text{E}_1$ / w leczeniu chorób krążenia obwodowego polega na kombinacji ich działania naczyniorozszerzającego, redukcji tworzenia agregatów płytkowych, zwiększenia plastyczności erytrocytów i stymulacji fibrynolizy.

Jako pierwsi na świecie, korzystny efekt infuzji prostacykliny w chorobach niedokrwienych kończyn dolnych zademonstrowali A. Szczeklik i R. Gryglewski wraz ze swoimi współpracownikami z Akademii Medycznej w Krakowie /118/.



Podczas stosowania prostanoidów o własnościach dezagregujących w badaniach laboratoryjnych i klinicznych zwrócono uwagę na następujące zjawisko. Długotrwałe infuzje wysokich dawek PGI<sub>2</sub> powodują tzw. efekt odbicia - wzrost aktywności płytek /9, 24, 137/. Maksymalne hamowanie agregacji występuje po 12 godzinach infuzji PGI<sub>2</sub>. Po 48 - 72 godzinach zostaje osiągnięty poziom wyjściowy. Po 7 dniach ciągłej infuzji płytki są zaktywowane do wartości około 170 % wartości wyjściowych. Pomimo to nigdy nie obserwowano żadnych komplikacji długotrwałego podawania PGI<sub>2</sub> /114/. Mimo znacznej aktywacji płytek czas ich przeżycia się wydłużał. U osób z chorobami krążenia obwodowego płytkowy półokres życia wzrósł z  $63 \pm 4$  do  $82 \pm 5$  godzin /u ludzi zdrowych wynosi on 100 - 115 godzin/. Efekt odbicia obserwuje się również w przypadku stymulacji fibrylizy. Postuluje się, że krótsze, ale za to częstsze aplikacje PGI<sub>2</sub> powinny dać lepsze rezultaty terapii.

Inną równie młodą, ale stosunkowo mało poznaną metodą wspomagającą leczenie chorób krążenia obwodowego jest elektrostymulacja. Z klinicznymi efektami działania elektrostymulacji można zapoznać się w pracach dotyczących bezpośredniej czy przezskórnej stymulacji rdzenia kręgowego lub przezskórnej elektrostymulacji konkretnego regionu ciała objętego zmianami patologicznymi.

#### Elektrostymulacja rdzenia kręgowego

Zjawisko rozszerzenia naczyń krwionośnych w kończynach zwierząt pod wpływem elektrostymulacji korzonków grzbietowych rdzenia kręgowego opisywano już na początku XX wieku. Późniejsze



badania Hiltona i Marshalla /48/ na zwierzętach oraz obserwacje Foerster'a prowadzone podczas operacji neurologicznych u ludzi /35/ potwierdziły istnienie związku między elektrostymulacją rdzenia a stanem czynnościowym naczyń krwionośnych. Podjęto próby wdrożenia elektrostymulacji jako jednej z metod terapeutycznych w klinice. Początkowo stosowano ją w chorobach, którym towarzyszyło uszkodzenie układu autonomicznego prowadzące do zmian w skórnym przepływie krwi i zaburzeń termoregulacji np. w neuropatii cukrzycowej czy stwardnieniu rozsianym. Pod wpływem bezpośredniej elektrostymulacji rdzenia kręgowego obserwowano wzrost skórno i mięśniowego przepływu krwi w kończynach objętych patologią /37,127/. Autorzy podają różny czas utrzymywania się efektów stymulacji. Wzrost temperatury skóry i zmniejszenie bólów niedokrwienych w wyniku stymulacji rdzenia u chorych z miażdżycą ograniczone były tylko do czasu działania bodźca elektrycznego. Po wyłączeniu stymulacji ponownie występowały objawy niedokrwienia /22/. Natomiast u chorych ze stwardnieniem rozsianym wzrost temperatury skóry utrzymywał się przez kilka dni po zakończeniu stymulacji. Prosty mechanizm pobudzenia nerwowego nie wyjaśnia w pełni tak długotrwałego efektu.

Tallis i wsp. wysunęli następujące hipotezy odnośnie mechanizmu wzrostu przepływu krwi pod wpływem elektrostymulacji rdzenia kręgowego /128/:

1. Elektrostymulacja powoduje hamowanie naczyńskurczowych włókien  $\alpha$  - adrenergicznych i pobudzenie naczyń rozkurczowych



włókien cholinergiczných, co w konsekwencji prowadzi do wzrostu przepływu krwi w skórze i w mięśniach.

2. Stymulacja blokuje odruch naczynioskurczowy wywołujący ból, zgodnie z teorią "bramkowania" lub inaczej teorią kontroli wejścia bólu, wysuniętą przez Melzacka i Walla /83/.
3. Stymulacja rdzenia pobudza centralne gałęzki pierwszych neuronów czuciowych. Impulsy biegną bezpośrednio antydromowo w dół kolumnami grzbietowymi aktywując odruch aksonowy.

Hilton i Marshall /48/ stwierdzili, że efekt rozszerzenia naczyń pod wpływem bezpośredniej elektrostymulacji rdzenia kręgowego, który przypisywali antydromowej stymulacji włókien o małej średnicy może być zahamowany przez blokery syntezy prostaglandyn, a nie przez blokery układu sympatycznego. Uważają, że wzrost przepływu pod wpływem stymulacji jest wynikiem uwalniania naczynioaktywnych prostaglandyn w mięśniach. Podobny mechanizm łącznie z syntezą prostacykliny może wpływać na rozszerzenie naczyń w skórze obserwowane podczas elektrostymulacji.

Analogiczny wpływ na stan czynnościowy naczyń obwodowych wywołuje przezskórna elektrostymulacja rdzenia kręgowego. Metodę tę stosowano u chorych na miażdżycę, chorobę B<sup>u</sup>rgera i z angiopatią cukrzycową. Obserwowano zmniejszenie intensywności bólów niedokrwiennych, zwiększenie tolerancji na wysiłek, wzrost skórno i mięśniowego przepływu krwi, gojenie owrzodzeń. Wzrost przepływu krwi obserwowano jednak tylko w czasie działania bodźca. W przypadkach wystąpienia martwicy elektrostymulacja była bezskuteczna.



U żadnej z badanych osób nie stwierdzono klinicznej odpowiedzi na stymulację placebo /16,17,128/. Broseta i wsp. postulują, że przezskórna stymulacja rdzenia kręgowego może być alternatywną, nieinwazyjną metodą leczenia chorób krążenia obwodowego w przypadkach, gdzie bezpośrednia interwencja chirurgiczna jest niemożliwa /16,17/.

W ciągu ostatnich lat w literaturze tematu pojawiły się nieliczne doniesienia na temat elektrostymulacji powierzchniowej bezpośrednio regionu ciała objętego patologią naczyniową.

W literaturze anglojęzycznej dla elektrostymulacji powierzchniowej stosuje się określenie przezskórnej stymulacji nerwów /transcutaneous nerve stimulation - TNS/ lub przezskórnej elektrycznej stymulacji /transcutaneous electric stimulation - TES/. Ponieważ dotychczas polscy autorzy używali terminu - elektrostymulacja powierzchniowa - ESP /53, 54, 71, 72, 73, 121, 122, 123, 124, 125, 126/ zastosowano go również w tej pracy.

#### Elektrostymulacja powierzchniowa kończyn

Stosowanie niskoczęstotliwościowej /2-5 Hz/ elektrostymulacji powierzchniowej kończyn u chorych na chorobę Raynauda czy z polineuropatią cukrzycową wywołuje wzrost temperatury skóry badanego obszaru ciała. Stwierdzono, że maksymalny wzrost wynosi 7-10<sup>o</sup>C i utrzymuje się przez kilka godzin po zakończeniu stymulacji. Obwodowe rozszerzenie naczyń krwionośnych wiąże się ze złagodzeniem bólów niedokrwiennych /62/. Wzrost temperatury skóry i ustąpienie bólów niedokrwiennych wskazywały na uwalnianie do krwi pod wpływem



stymulacji endogennych substancji mających wpływ na stan czynnościowy naczyń. Kaada i wsp. stwierdzili, że u chorych na chorobę Raynauda pod wpływem ESP wzrasta stężenie naczynioaktywnego peptydu jelitowego /VIP/ w osoczu /60, 61, 63/. Niższy poziom VIP w osoczu chorych na chorobę Raynauda może być wtórny do obniżonej u tych pacjentów temperatury skóry /25, 5<sup>o</sup>C/ w porównaniu do osób zdrowych /27, 5<sup>o</sup>C/. Mechanizm uwalniania VIP do krążenia pod wpływem ESP jest nieznanym /63/.

Długotrwały efekt rozszerzenia naczyń i gojenie owrzodzeń pod wpływem elektrostymulacji powierzchniowej o niskiej częstotliwości obserwowano w przypadkach chronicznych owrzodzeń o różnej etiologii takich jak: miażdżyca, odleżyny, neuropatie w wyniku urazów /59/. U pacjentów ze sklerodermią, której towarzyszy objaw Raynauda, owrzodzenie i bóle kończyn, podawanie leków naczyniorozkurczowych nie wywołuje żadnych efektów. Natomiast stosowanie ESP prowadzi do złagodzenia bólów.

W wyżej wymienionych jednostkach chorobowych elektrostymulacja kończyny badanej powodowała wystąpienie reakcji rozszerzenia naczyń również w kończynie symetrycznej, niestymulowanej /65/. Metoda elektrostymulacji jest łatwa do zastosowania przez samego chorego i nie powoduje skutków ubocznych, poza niewielkim obniżeniem ciśnienia krwi /62/.

Carley i Wainapel oraz Nikołajew i wsp. postulują stosowanie ESP w leczeniu trudno gojących się ran skóry towarzyszących chorobom krążenia obwodowego. Na podstawie badań stwierdzili, że elektrostymulacja poprawia przepływ krwi przez skórę, działa bakteriobójczo,



przyspiesza gojenie, pobudza podział i różnicowanie fibroblastów oraz stymuluje wymianę międzykomórkową. Pobudzenie mechanizmów homeostatycznych może prowadzić do rekonstrukcji zniszczonych tkanek /19, 92/.

Nigdy nie obserwowano efektu placebo przy stosowaniu metody elektrostymulacji powierzchniowej /62/.

Wiele jest doniesień na temat wpływu elektrostymulacji na autonomiczny układ nerwowy polegający na hamowaniu układu sympatycznego /1, 58, 61, 63, 64, 75, 128/. Dodatkowo sugeruje się, że ESP powoduje uwalnianie do krążenia aktywnej substancji, rozszerzającej naczynia krwionośne /63, 64, 65/.

Badania Kaady i wsp. nad mechanizmem działania elektrostymulacji powierzchniowej wykazały, że odpowiedź naczyniowa na niskoczęstotliwościową stymulację nie jest hamowana przez  $\beta$ -adrenergicznych, histaminergicznych i purinergicznych antagonistów jak również przez inhibitory syntezy prostaglandyn czy osoczowych kinin /59, 60/.

Ważnym czynnikiem, na który należy zwracać uwagę w badaniach nad ESP, jest częstotliwość stosowanych impulsów stymulujących. Spotykane w literaturze, niekiedy sprzeczne ze sobą dane na temat mechanizmów działania tej metody prawdopodobnie wynikają ze stosowania przez autorów różnych parametrów stymulacji. Antagonista opioidów - naloxon nie znosi np. przeciwbólowego efektu stymulacji wysokoczęstotliwościowej. Natomiast analgetyczne działanie stymulacji niskoczęstotliwościowej jest przez niego blokowane /60/. Zjawisko to sugeruje, że każdy rodzaj działania ESP jest wynikiem różnych



mechanizmów nerwowych /1, 32, 50, 84, 135/.

Badania prowadzone przez Pracownię Chirurgii Doświadczalnej Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN potwierdzają możliwość kontrolowanej ingerencji w mikrokrażenie skórne za pośrednictwem indywidualnie dobranego bodźca elektrycznego. W jednostkach chorobowych, w których zmiany czynnościowego stanu połączeń tętniczo-żylnych są przyczyną choroby względnie odgrywają rolę w jej powstawaniu /13, 14, 91, 134/ stosowanie elektrostymulacji wysokoczęstotliwościowej /100 Hz/ umożliwia sterowanie rozdziałem krwi między krażenie odżywcze przez kapilary i krażenie nieodżywcze przez połączenia tętniczo-żylne /121/.

Badania eksperymentalne na zwierzętach wykazały, że wysokoczęstotliwościowa elektrostymulacja powierzchniowa powoduje zwiększony przepływ krwi w stymulowanym obszarze skóry /122, 123/. Przyspiesza również proces regeneracji ran /31, 53, 72/. Stwierdzono, że efekt jednorazowej stymulacji polegający na wzroście kapilarnego przepływu krwi utrzymuje się średnio od 3 do 6 godzin po zakończeniu ekspozycji na bodziec elektryczny /54, 71/.

Wyniki prac eksperymentalnych naszej Pracowni były zachętą do podjęcia prób wdrożenia elektrostymulacji powierzchniowej do terapii chorób krażenia obwodowego jako metody wspomagającej dotychczas stosowane konwencjonalne metody leczenia. Badania kliniczne prowadzone są od roku 1982 w III Oddziale Chirurgii Szpitala Praskiego w Warszawie. Zabiegom elektrostymulacji powierzchniowej poddawano chorych na chorobę Raynauda, z zespołem Raynauda oraz



chorych na chorobę Bürgera. Wykazano, że zastosowanie elektrostymulacji poprawia ukrwienie, czego odbiciem jest znamieny wzrost temperatury badanego obszaru ciała. Poza tym stwierdzono, że zastosowanie elektrostymulacji powierzchniowej np. w przypadku choroby Raynauda może zapobiegać wystąpieniu ataków skurczu tętnic w warunkach, które je wywołują /obniżona temperatura, stress//73,124,125/.

Na podstawie przedstawionego przeglądu literatury można zauważyć, że stosowanie dwóch różnych metod terapeutycznych /1. infuzji naczynioaktywnych prostanoidów; 2. elektrostymulacji/ w leczeniu chorób krążenia obwodowego wywołuje analogiczne efekty kliniczne. Prowadzi do wzrostu temperatury kończyn związanego z poprawą krążenia, zmniejszenia bólów niedokrwiennych, gojenia owrzodzeń kończyn objętych patologią. Mechanizm działania naczynioaktywnych prostanoidów został w dużej mierze poznany. Natomiast wyniki prac dotyczących stosowania elektrostymulacji powierzchniowej nie pozwalają jednoznacznie odpowiedzieć na pytanie, jaki jest mechanizm jej działania. W dalszym ciągu pozostaje on w sferze hipotez.

Analogiczne efekty kliniczne obserwowane w następstwie stosowania prostanoidów i elektrostymulacji nasuwają przypuszczenie, że pod wpływem elektrostymulacji powierzchniowej wydzielane są do krążenia naczynioaktywne substancje mające korzystne działanie terapeutyczne w chorobach krążenia obwodowego.

Celem mojej pracy jest wyjaśnienie mechanizmu korzystnego klinicznie działania elektrostymulacji powierzchniowej.



Praca składa się z dwóch części: eksperymentalnej i klinicznej.

W rozdziale Wyniki dotyczącym części eksperymentalnej umieszczono elementy dyskusji, ponieważ kolejne etapy badań przeprowadzono na zasadzie wynikania. Wprowadzenie nowych, następujących po sobie rodzajów badań było logiczną konsekwencją wyników otrzymywanych na etapie wcześniejszym.



## MATERIAŁ I METODY

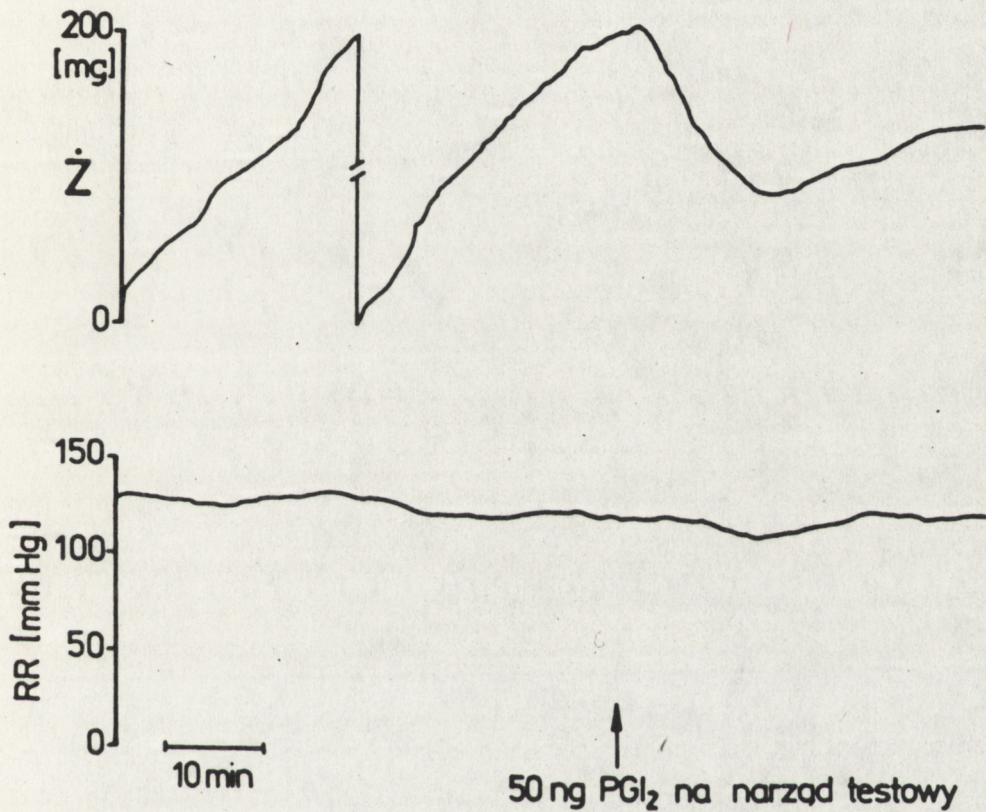
### 1. Badania eksperymentalne

Badania prowadzono przy zastosowaniu metody biologicznej, stosowanej do wykrywania w krążącej krwi substancji biologicznie aktywnych *in vivo* oraz metody Borna *in vitro*.

Metoda biologiczna wykrywania we krwi substancji wpływających na zmiany agregacji płytek krwi.

Zasadą tej metody jest zastosowanie narządu kolagenowego /w tym przypadku ścięgna skokowego królika/, który w sposób ciągły omywany jest krwią zwierzęcia. Płytki krwi osadzając się na narządzie kolagenowym powodują wzrost jego ciężaru, co rejestrowane jest jako stopniowe podwyższanie się linii zapisu agregacji. Podanie każdej egzogennej substancji dezagregującej: dożylnie lub bezpośrednio na narząd, czy też spowodowanie badaną procedurą doświadczalną uwolnienia endogennych substancji dezagregujących do krążenia, powoduje spłukanie płytek. Zmniejszenie ciężaru narządu kolagenowego obserwuje się jako stopniowe obniżanie zapisu agregacji na rejestratorze /39/ ryc. 1.





Ryc. 1 . Zapis, jaki otrzymuje się przy zastosowaniu metody biologicznej. Na wykresie pierwszym od góry przedstawione są zmiany agregacji płytek krwi na narządzie testowym omywanym krwią żylną /Z/ pod wpływem egzogennej prostacykliny. /wychylenie krzywych do góry - agregacja, obniżanie się linii zapisu - dezagregacja/. Poniżej - systemowe ciśnienie krwi /RR/. Opis metody w tekście.

Metoda ta nie pozwala na precyzyjne rozróżnienie między uwalnianymi substancjami aktywnymi biologicznie, ale stwarza możliwość ciągłego monitorowania pojawiania się ich we krwi in vivo.

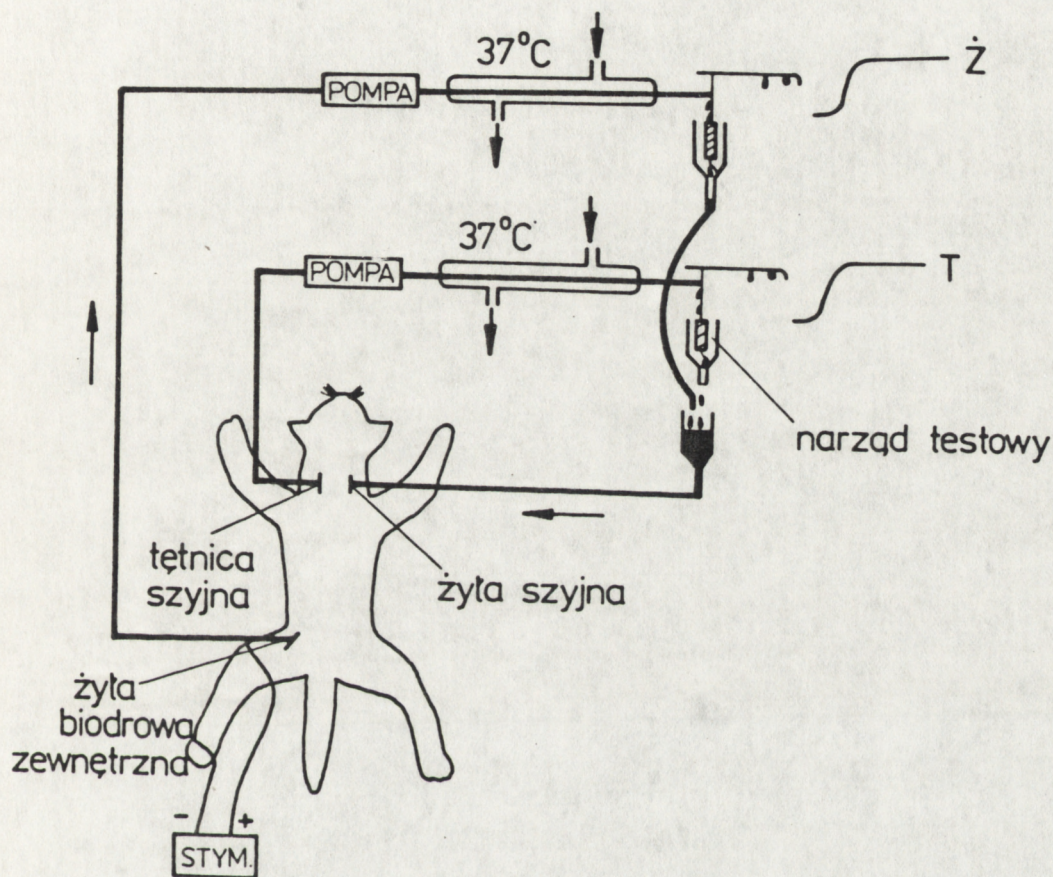


Badania przeprowadzono na kotach obydwu płci o wadze 3,3 - 5,7 kg. Ilość użytych zwierząt podano w rozdziale Wyniki przy przedstawianiu wartości liczbowych otrzymanych w wyniku stosowania określonej techniki doświadczalnej.

Zwierzęta poddawano znieczuleniu ogólnemu Vetbutalem/Biovet, 30 mg/kg i. p./, a następnie po wykonaniu tracheostomii podawano środek zwiotczający - Tricuran/Germed, 3 mg/kg i. v./ i wentylowano sztucznie przy pomocy klasycznej pompy oddechowej /Medipan/. Kaniulowano obie tętnice i żyły szyjne, tętnicę udową oraz żyłę biodrową zewnętrzną. Średnie ciśnienie tętnicze rejestrowano z prawej tętnicy udowej, połączonej z elektromagnetycznym miernikiem ciśnienia krwi /Statham P<sub>23</sub>Db/. Izolowane ścięgno skokowe królika zawieszano na dźwigni połączonej z przetwornikiem elektromagnetycznym /Harvard typ 386 A/, przekazującym zmiany obciążenia monitorowane w sposób ciągły przy pomocy rejestratora /Watanabe/. Zapisy zmian tętniczego ciśnienia krwi i ciężaru narządu kolagenowego rejestrowano jednocześnie. Po podaniu heparyny /Heparinum - Polfa, 2 tys. j. m./kg i. v./ rozpoczynano omywanie narządów testowych krwią z szybkością 2,5 ml/min. Dreny doprowadzające krew do narządów kolagenowych umieszczone były w płaszczu wodnym o temp. 37°C. Krew żylną /z żyły biodrowej zewnętrznej/ lub tętniczą /z tętnicy szyjnej/ doprowadzano do narządów testowych przy pomocy pompy infuzyjnej /Medipan/.

W większości doświadczeń stosowano jednocześnie dwa obiegi krwi: żylny i tętniczy. Schemat układu doświadczalnego przedstawia rys. 2 a.





Ryc. 2a. Schemat układu doświadczalnego. Krew żylną z żyły biodrowej zewnętrznej, stymulowanej kończyny oraz krew tętniczą z tętnicy szyjnej przetaczano przy pomocy pompy infuzyjnej przez ogrzewany przewód / $37^{\circ}\text{C}$ /. Krew omywała narządy kolagenowe, a następnie z powrotem grawitacyjnie powracała do układu żylnego przez żyłę szyjną. Zmiany ciężaru narządów testowych /omywanego krwią żylną / $\dot{Z}$ / i tętniczą / $T$ / rejestrowano jednocześnie w sposób ciągły.

Dla porównania wielkości zmian ciężaru narządów testowych, wywołanych aktywnością substancji uwalnianej do krążenia w wyniku elektrostymulacji, oceniano zmiany ciężaru wywołane egzogenną substancją dezagregującą płytki krwi. Do kalibracji używano  $\text{PGI}_2$  /Upjohn/



w dawce 50 ng., bezpośrednio do krwi omywającej narządy kolagenowe. Ponieważ obserwowano duże różnice indywidualne we wrażliwości na egzogenną PGI<sub>2</sub>, wielkość reakcji wywołanej pojawieniem się badanej substancji we krwi podawano jako średnią różnicę między poszczególnymi wartościami ciężaru ścięgna /odpowiadającymi zmianom agregacji płytek krwi/ po i przed elektrostymulacją, wyrażoną w procentach /  $\Delta$  %/. Dla określenia zmian ciężaru ścięgna w trakcie omywania narządów kolagenowych krwią, kalibrowano wychylenie pisaka rejestratora /6 cm na zapisie odpowiada ciężarowi 200 mg/.

W celu określenia właściwości substancji biologicznie aktywnych wydzielanych do krążenia pod wpływem elektrostymulacji zastosowano następujące procedury doświadczalne:

- Zbadano wpływ inhibitorów syntetazy prostaglandynowej /indometacyny i aspiryny/ na zmiany agregacji płytek krwi na narządach kolagenowych wywołane elektrostymulacją.

Indometacynę /Indomethacin-Merck, Sharp and Dohme, 10 mg/kg i. v./ rozpuszczano w niewielkiej ilości alkoholu etylowego, a następnie w 0,01 M buforze fosforanowym o pH = 7,4. Aspirynę podawano w postaci Aspisolu/Bayer, 20 - 50 mg/kg i. v./.

Obydwa leki podawano 20 - 30 min. przed rozpoczęciem elektrostymulacji. Jeżeli pojawienie się w krążeniu substancji wpływającej na zmiany agregacji płytek krwi pod wpływem elektrostymulacji było hamowane przez indometacynę lub aspirynę w powyżej podanych stężeniach, uznawano tę substancję za prostanoid /40/.



- W celu oceny stabilności substancji uwalnianej do krążenia pod wpływem elektrostymulacji powierzchniowej zastosowano model doświadczalny z tzw. pętlą opóźniającą /40/.

Schemat układu doświadczalnego przedstawia ryc. 2b.

Przyjęto, że jeżeli dezagregacja płytek krwi pod wpływem działania elektrostymulacji wystąpi tylko na ścięgnie przed pętlą opóźniającą, oznaczać to będzie, że trwałość uwalnianej do krążenia substancji dezagregującej jest porównywalna z trwałością syntetycznej PGI<sub>2</sub>. Natomiast jeżeli dezagregacja wystąpi również na narządzie kolagenowym, do którego krew ze stymulowanej kończyny kota dopływa z 10 minutowym opóźnieniem oznacza to, że uwolniona substancja dezagregująca jest trwalsza od syntetycznej PGI<sub>2</sub>.

- Dodatkowo wykonano doświadczenia z elektrostymulacją pnia sympatycznego i elektrostymulacją powierzchniową po uprzednim podaniu  $\alpha$ -bloкера, fentolaminy/Regitin, Ciba-Geigy, 4 mg/kg i. v. /.

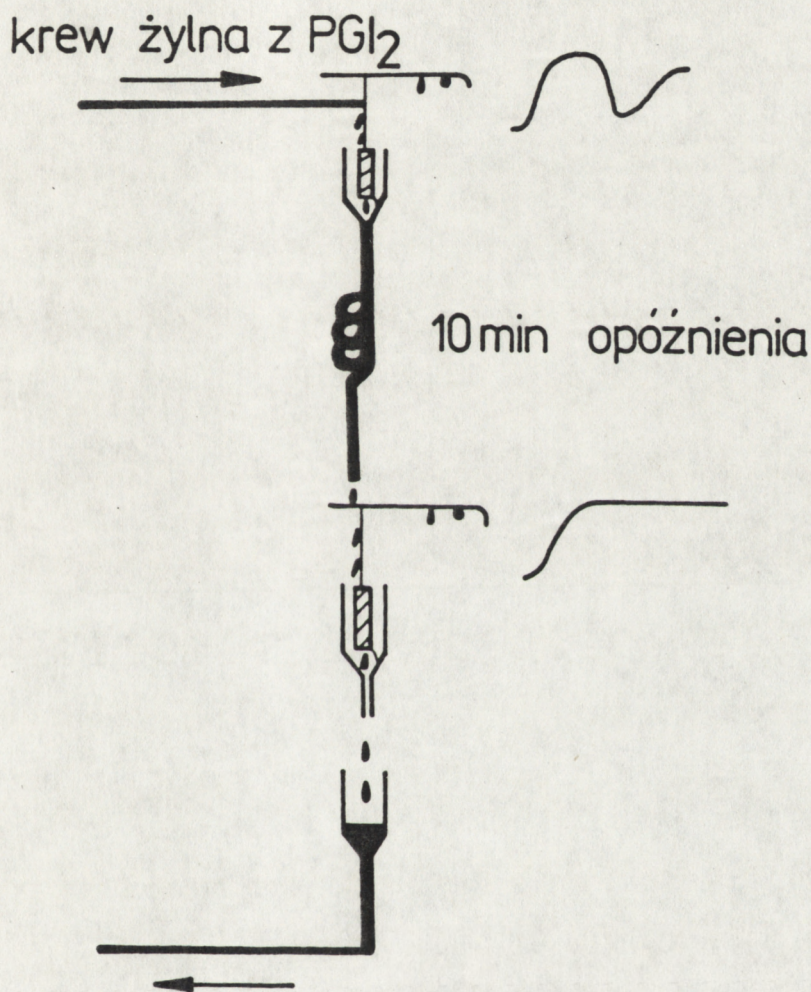
Przed przystąpieniem do określania wpływu elektrostymulacji powierzchniowej na zmiany agregacji płytek krwi, wykonano doświadczenia mające na celu określenie wpływu bezpośredniej elektrostymulacji nerwów wegetatywnych na wyżej wymienione zjawiska.

- Elektrostymulacja pnia sympatycznego.

W celu odsłonięcia pnia sympatycznego otwierano jamę brzuszną zwierzęcia w linii pośrodkowej ciała. Przycinano blaszkę ścienną tylnej ściany brzucha wzdłuż aorty. Odsłaniano lewy łańcuch sympatyczny. U większości zwierząt podwiązywano lewe nadnercze, aby



zapobiec wydzielaniu katecholamin.



Ryc. 2b. Schemat układu doświadczalnego z zastosowaniem pętli opóźniającej. Krew żylna osiągała narząd kolagenowy po 1 minucie od wypłynięcia z żyły biodrowej zewnętrznej /po stronie stymulowanej/, spływała do naczynka umieszczonego pod ścięgnem, a następnie przez 10 minut płynęła pętlą opóźniającą zanim dotarła na drugi narząd kolagenowy. Po opłynięciu obydwu ścięgien krew powracała grawitacyjnie do żyły szyjnej. Z prawej strony ryciny przedstawione są zapisy zmian agregacji płytek na naczyniach testowych pod wpływem PGI<sub>2</sub> przed i po jej przejściu przez pętlę opóźniającą.



Odsłonięty łańcuch sympatyczny przecinano kolejno pomiędzy zwojami i stymulowano poniżej poziomu przecięcia. Stymulację łańcucha sympatycznego wykonywano przy pomocy dwubiegunowej elektrody srebrnej. Pień sympatyczny w odcinku lędźwiowym oraz elektrodę podnoszono powyżej otaczających struktur i pokrywano ciepłym olejem mineralnym. Impulsy prostokątne o czasie trwania 2 msec podawano z kardiostymulatora wielofunkcyjnego /Ormed, typ 7A/. Przy doborze parametrów stymulacji pnia sympatycznego opierano się na technice opisanej przez Sonnescheina i Weissmana, stosowanej do badań naczynioruchowego zaopatrzenia tylnej kończyny kota przez neurony układu wegetatywnego /116/. Częstość impulsów stymulujących wynosiła 8 - 16 imp/s.

Napięcie prądu dobierano tak, aby jego wartość była tuż powyżej minimum wymaganego do wywołania największej reakcji. Zawierało się ono między 2 do 3 V przy natężeniu 0,2 - 0,4 mA.

- Elektrostymulacja powierzchniowa /ESP/.

Elektrostymulację powierzchniową u kotów prowadzono przy pomocy prototypowego stymulatora napięciowego. Elektrody z elastycznej taśmy metalowej, po owinięciu gazą, nawilżoną solą fizjologiczną przykładano do kończyny tylnej zwierzęcia po stronie podeszwowej /tuż poniżej palców i w połowie uda/. Zwierzęta stymulowano przez 15 - 40 minut prądem o impulsach prostokątnych z częstością 75-100 imp/s. W większości doświadczeń stosowano maksymalny bodziec



elektryczny nie wywołujący drżenia włókienkowego mięśni. W doświadczeniach wykonywanych na zwierzętach oddychających spontanicznie intensywność stymulacji wynosiła 0,8 - 1,4 mA, a u zwierząt porażonych i wentylowanych sztucznie od 2 do 4 mA. Stosowanie bodźca o intensywności wyższej niż 4 mA wywoływało drżenie włókienkowe mięśni.

W celu określenia wpływu częstości impulsów stymulacyjnych na badane efekty w 3 doświadczeniach zastosowano również częstość 20 imp/s. W 3 innych, w których oceniano ewentualny wpływ pracy mięśniowej na badane zmienne intensywność bodźca stymulującego przekraczała 4 mA.

W celu określenia, czy uwalniane do krążenia substancje wpływają na przepływ krwi, badano zmiany przepływu całkowitego w kończynie tylnej kota pod wpływem stosowania elektrostymulacji powierzchniowej. Całkowity przepływ krwi oznaczano przy pomocy przepływomierza elektromagnetycznego /Statham/ połączonego z głowicą /Statham P 23 Db/ umieszczoną na tętnicy udowej zwierzęcia. Dodatkowo wykonywano kalibrację z egzogenną  $\text{PGI}_2$ . Pierwszą, dystalną w stosunku do czujnika elektromagnetycznego gałąź tętnicy udowej kaniulowano w celu dotętniczego podawania prostacykliny. Gałęzie tętnicy udowej poniżej czujnika podwiązywano w celu wyeliminowania krążenia obocznego. Taki sposób podawania gwarantuje ograniczenie efektów krążeniowych  $\text{PGI}_2$  tylko do badanych łożysk /100/.

Pomiary zmian przepływu całkowitego pod wpływem elektrostymulacji wykonywano u zwierząt spontanicznie oddychających oraz w celu wy-



eliminowania ewentualnego wpływu pracy mięśniowej na badane zmienne, u zwierząt porażonych, wentylowanych sztucznie.

- Badania zmian agregacji płytek krwi pod wpływem elektrostymulacji powierzchniowej metoda fotometryczna według Borna /in vitro/.

Zasadą tej metody jest ciągły pomiar zmian transmisji światła przechodzącego przez stale mieszane osocze bogatopłytkowe. Po dodaniu czynnika agregującego krwinki płytkowe łączą się ze sobą, tworząc większe zlepy. Zmniejsza się w tym czasie gęstość optyczna osocza, a tym samym zwiększa transmisja światła. Wzrost przepuszczalności światła jest proporcjonalny do stopnia agregacji /15/, ryc.3. Jako czynnik agregujący stosowano ADP /Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo/ w postaci jednosodowej soli dwuwodnej /ciężar cząsteczkowy 485/.

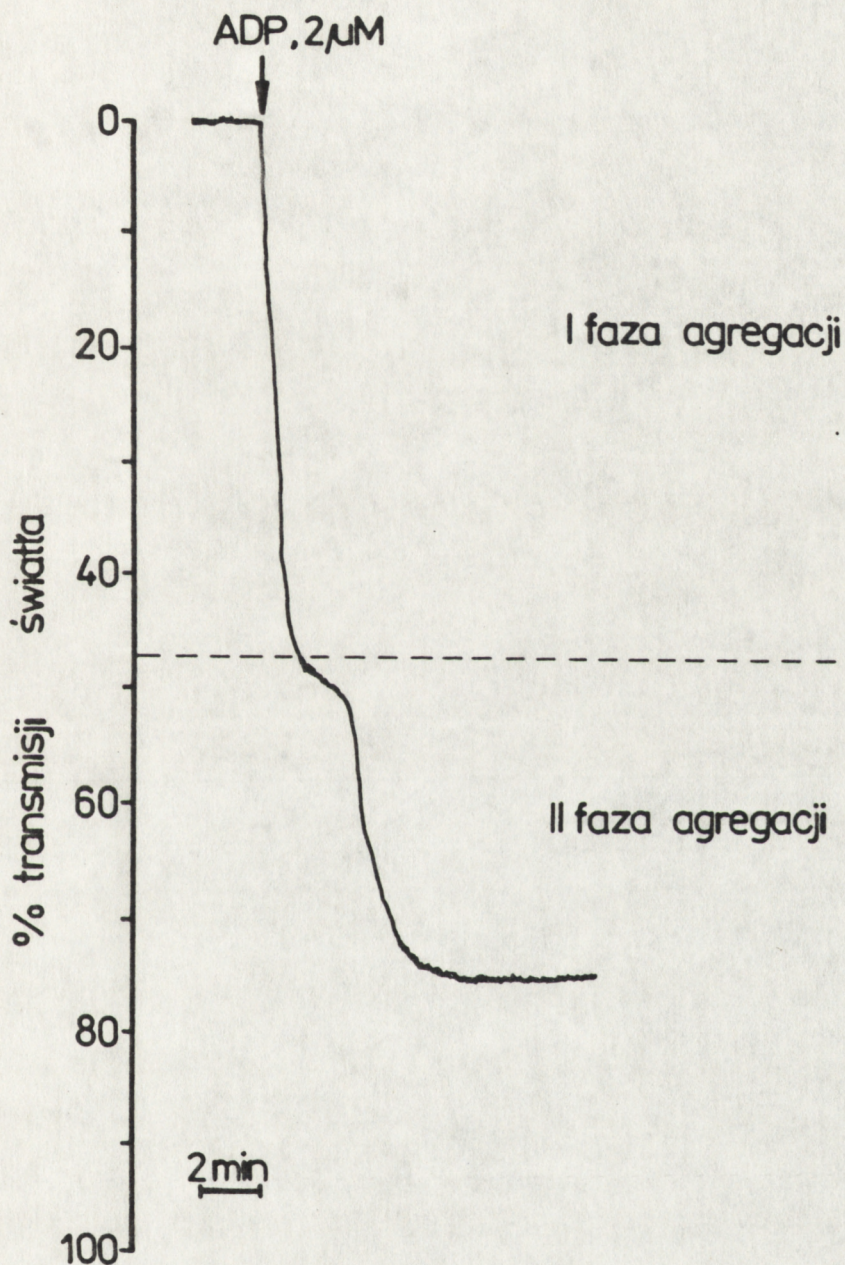
- Badania agregacji płytek krwi u kotów.

Doświadczenia przeprowadzono na kotach o wadze od 3,2 do 4,3 kg znajdujących się w narkozie vetbutalowej /Biovet, 30 mg/kg i.p./.

W celu wyeliminowania wpływu pracy mięśniowej wywołanej elektrostymulacją na agregację płytek krwi badania przeprowadzono w dwóch grupach: u kotów spontanicznie oddychających oraz u kotów porażonych Tricuraniem /Germed, 3 mg/kgi.v./ i wentylowanych sztucznie.

Krew pobierano z następujących, uprzednio kaniulowanych naczyń: tętnicy szyjnej, żyły udowej po stymulowanej stronie oraz żyły udowej kończyny kontrolnej. Próbki krwi pobierano przed, w trakcie i po zakończeniu elektrostymulacji powierzchniowej kończyny. Uzyskaną krew mieszano w plastikowych strzykawkach z 3,8 % cytrynianem





Ryc. 3. Wykres agregacji płytek krwi. Zapis ma przebieg dwufazowy. I fazę agregacji /zlepianie się płytek krwi/ wywołuje dodanie do surowicy egzogenego ADP.

II faza agregacji jest wynikiem działania endogennych substancji agregujących, uwalnianych z płytek.



sodu /Polfa/ w stosunku 9:1. Osocze bogatopłytkowe otrzymywano przez sedimentację krwi 1 - 2 godziny /80/. Następnie umieszczano je w silikonowych probówkach i wirowano w temperaturze pokojowej przez 20 minut przy 2 tysiącach obrotów w celu otrzymania osocza pozbawionego płytek. Osocze ubogopłytkowe stosowano do zerowania agregometru. Wstępnie wykonywano próby agregacji krwinek płytkowych w celu ustalenia najmniejszego stężenia ADP wywołującego nieodwracalną agregację.

W dalszych badaniach używano tak oznaczonego progowego stężenia ADP. Stężenie końcowe ADP w osoczu bogatopłytkowym wynosiło 0,5 - 6  $\mu$ M. Zapisy agregacji płytek krwi u kotów wykonywano na rejestratorze Watanabe.

## II. Badania kliniczne

- Badania agregacji płytek krwi u ludzi.

Badania przeprowadzono u 16 chorych /14 kobiet, 2 mężczyzn; w wieku 18-55 lat/ z rozpoznaną przed 3 - 9 laty chorobą lub zespołem Raynauda oraz u 9 chorych /8 mężczyzn i 1 kobieta; w wieku 29-44 lata/ z rozpoznaną przed 4 - 12 laty chorobą Bürgera. Rozpoznanie ustalono w czasie badań w Przychodni Naczyniowej Szpitala Praskiego /Warszawa/ na podstawie całokształtu obrazu klinicznego oraz badań dodatkowych.

W celu sprawdzenia wpływu długotrwałego stosowania elektrostymulacji powierzchniowej na zmiany agregacji płytek krwi wykonano



badania u 11 chorych /10 z chorobą lub zespołem Raynauda : 8 kobiet i 2 mężczyzn w wieku 29-53 lata i 1 chorego z chorobą Bùrgera w wieku 29 lat/, którzy stosowali tę metodę jako wspomagającą w leczeniu przez okres od jednego do dwóch lat.

Wykonano również badania u 10 zdrowych ochotników, u których nie stwierdzono dotychczas zaburzeń krążenia obwodowego /6 mężczyzn i 4 kobiety; w wieku 25 - 36 lat/. Wyniki uzyskane na podstawie tych badań traktowano jako kontrolę.

Do stymulacji używano prototypowych stymulatorów napięciowych.

Stosowano elektrody ołowiowo-cynkowe, będące na fabrycznym wyposażeniu stymulatorów TUR-RS 12 /NRD/. Elektrody po zwilżeniu solą fizjologiczną umieszczano pod opuszkami palców ręki oraz w połowie przedramienia lub w przypadku choroby Bùrgera, również pod opuszkami palców nogi i w połowie podudzia. Stosowano maksymalny, bezbólowy bodziec prostokątny. Częstość impulsów stymulujących wynosiła 100 imp/s, intensywność bodźca średnio 20 mA, a czas trwania pojedynczego impulsu 1 msek. Podane powyżej parametry prądu stosowanego w metodzie elektrostymulacji powierzchniowej zostały opracowane na podstawie kilkuletnich badań: kapilaroskopowych, termograficznych i izotopowych /54, 71, 73, 121, 122, 123, 125/.

Osoby badane przebywały w pomieszczeniu o średniej temperaturze 20°C w pozycji siedzącej. Stymulowana kończyna górna oparta była na elektrodzie leżącej na stole tak, że dłoń i przedramię były na tej samej wysokości. W przypadku choroby Bùrgera stymulowana kończyna dolna oparta była o elektrodę leżącą na podłodze.



Wszystkie osoby biorące udział w eksperymencie przez dwa tygodnie przed badaniem nie przyjmowały żadnych leków. W dniu badania, przez dwie godziny poprzedzające eksperyment nie spożywały żadnych pokarmów ani płynów oraz nie paliły papierosów. U wszystkich osób badania wykonano w tym samym przedziale czasowym /godz. 9,30-11,30/ opierając się na wynikach Petralito i wsp. /103/, wskazujących na istnienie u ludzi dobowych wahań w intensywności agregacji płytek krwi.

W celu wyeliminowania wpływu czynnika subiektywnego na wyniki, wykonano próbę ślepą. Polegała ona na tym, że u 10 chorych /5 chorych z chorobą Raynauda w wieku 35 - 58 lat i 5 zdrowych ochotników w wieku 29 - 36 lat/ wykonano pozorowaną elektrostymulację powierzchniową. Osoby uczestniczące w eksperymencie były informowane o jego przebiegu, polegającym na elektrostymulacji powierzchniowej kończyny badanej. Do elektrod nie doprowadzano jednak impulsów elektrycznych. Pozostałe warunki doświadczenia były takie same jak w poprzednich grupach, opisanych powyżej. Krew pobierano z żył łokciowych lub w przypadku chorych z chorobą Bürgera, również z żył powierzchniowych kończyn dolnych. Każdorazowo krew pobierano z kończyny stymulowanej i z kończyny symetrycznej, traktowanej jako kontrola; przed, bezpośrednio po i 60 minut po zakończeniu stymulacji.

Próbki krwi mieszano z 3,8 % cytrynianem sodu /Polfa/ w stosunku 9:1, przenoszono do silikonowych probówek wirowniczych i odwirowywano w temp. pokojowej przez 10 minut przy 750 obrotach w celu otrzymania osocza bogatopłytkowego. Następnie osocze to wirowano



przez 20 minut przy 2 tys. obrotów, aby otrzymać osocze pozbawione płytek.

Testy agregacji płytek krwi u ludzi i kotów wykonywano w prototypowym agregometrze, w którym użyto promieniowanie elektromagnetyczne w zakresie światła widzialnego. Agregometr połączono z rejestratorem /Radeliks/, przy pomocy którego otrzymywano zapisy agregacji płytek krwi. Czynniki agregujący /ADP/ dodawano po 2 minutach inkubacji osocza bogopłytkowego w temp. 37°C.

Wielkość agregacji określano jako procent transmisji światła, otrzymany na skali 0 - 100 % kalibrowanej przez różnicę osocza bogopłytkowego /0 % transmisji/ i osocza ubogopłytkowego /100 % transmisji/. Procent agregacji obliczano z otrzymanej krzywej agregacji na podstawie wzoru:

$$\frac{D_p - D_k}{D_p} \times 100 \% = \% \text{ agregacji płytek krwi}$$

- $D_p$  - gęstość optyczna początkowa;
- $D_k$  - gęstość optyczna końcowa.

Wpływ elektrostymulacji powierzchniowej na czynności zlepne płytek krwi oznaczano mierząc u ludzi w poszczególnych grupach czas krwawienia metodą Duke'a /67/.

Badania wykonywano bezpośrednio po pobraniu krwi do badań agregacji, tzn. przed, bezpośrednio po i 60 minut po zakończeniu stymulacji.

Otrzymane wyniki we wszystkich wyżej wymienionych typach badań poddane zostały analizie statystycznej testem istotności t Studenta dla różnicy średnich zmiennych połączonych.



## W Y N I K I

### I Badania eksperymentalne

#### 1. Wpływ elektrycznej stymulacji pnia sympatycznego na agregację płytek krwi.

Elektrostymulację pnia sympatycznego wykonano u 11 kotów. Przy jednoczesnym zastosowaniu dwóch obiegów krwi: żylnego i tętniczego - dezagregacja płytek wystąpiła we wszystkich badanych przypadkach na narządzie testowym omywanym krwią żylną oraz w 10 przypadkach na narządzie omywanym krwią tętniczą. Agregacja na narządzie kolagenowym omywanym krwią żylną po stymulacji wynosiła  $73,9 \pm 18,9\%$  wartości kontrolnej sprzed stymulacji. Średnia różnica między wartością agregacji przed stymulacją, a jej wartością po stymulacji wynosiła  $-26,1 \pm 9,0\%$  / $p < 0,01$ , test istotności t dla różnicy średnich dwóch zmiennych połączonych/. Na narządzie testowym omywanym krwią tętniczą poziom agregacji po stymulacji wynosił  $81,8 \pm 34,1\%$  wartości kontrolnej, a średnia różnica poziomu agregacji /po - przed stymulacją wynosiła  $-18,2 \pm 12,0\%$  / $p < 0,02$ /, /ryc. 4, 5/. Po wyłączeniu stymulacji w czasie dłuższym niż 1 godzina nie obserwowano wznowienia agregacji płytek krwi.

Dla porównania wpływu elektrostymulacji pnia sympatycznego na agregację płytek krwi, przy blokadzie  $\alpha$  - receptorów /patrz Dyskusja/, wykonano 4 doświadczenia z fentolaminą /4 mg/kg i. v./. Dezagregacja płytek krwi wystąpiła we wszystkich badanych przypadkach na obydwu narządach testowych. Agregacja po stymulacji na narządzie kolagenowym



omywanym krwią żylną wynosiła  $18,1 \pm 5,2$  % wartości kontrolnej sprzed stymulacji. Średnia różnica między wartością agregacji przed stymulacją, a jej wartością po stymulacji wynosiła  $-81,9 \pm 6,0$  % / $p < 0,01$ /. Na narządzie testowym omywanym krwią tętniczną poziom agregacji po stymulacji wynosił  $29,3 \pm 15,8$  % wartości kontrolnej, a średnia różnica poziomu agregacji /po - przed stymulacją/ wynosiła  $-70,7 \pm 3,5$  % / $p < 0,01$ /.

/Ryc. 6./

Wyniki zmian agregacji uzyskane w doświadczeniach z fentolaminą wskazują, że zastosowanie  $\alpha$  - blokady wzmacnia efekt dezagregacji płytek krwi wywołany elektrostymulacją /patrz dalej ryc. 5A i ryc. 6/.

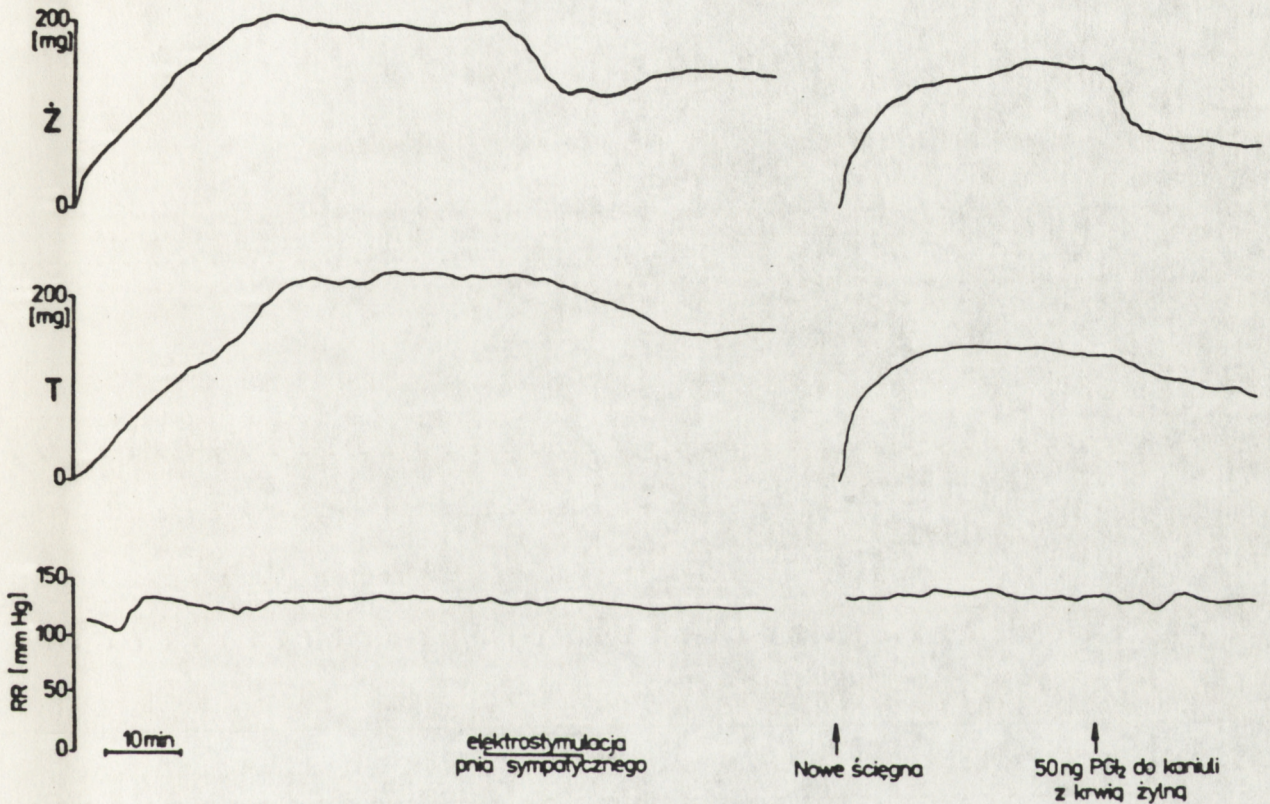
Z przedstawionej serii doświadczeń wynika, że pod wpływem stymulacji pnia sympatycznego uwalnia się do krążenia substancja o właściwościach dezagregujących płytki krwi.

## 2. Wpływ elektrostymulacji powierzchniowej na agregację płytek krwi.

Następnym etapem pracy było sprawdzenie, czy stymulacja powierzchniowa, podczas której stymulowano nerwy wegetatywne, jak i nerwy somatyczne, prowadzi również do uwolnienia substancji aktywnej, dezagregującej płytki krwi.

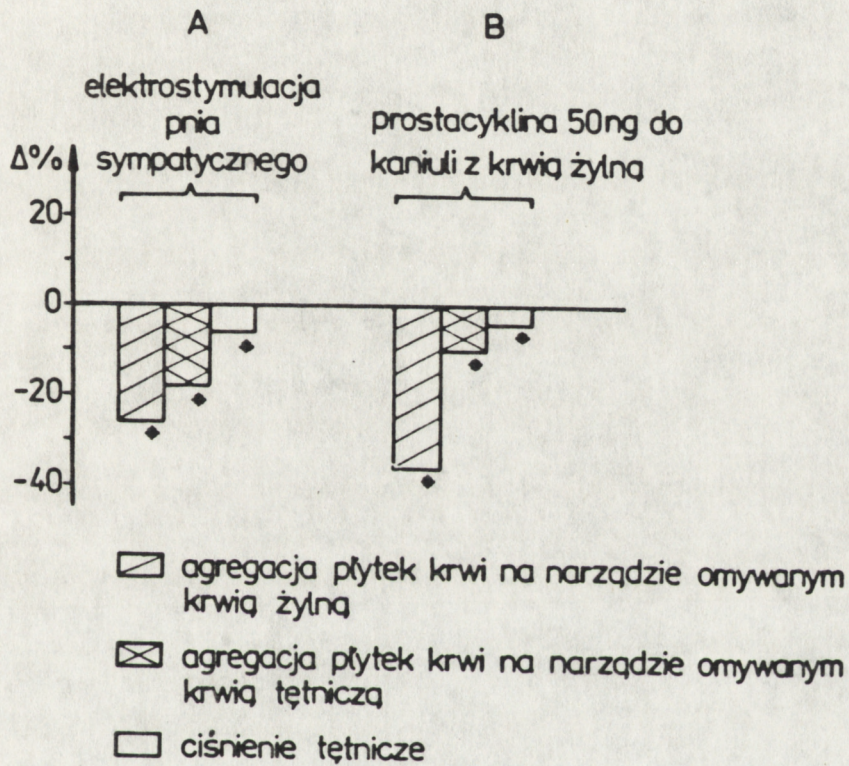
W tej grupie doświadczenia przeprowadzono u 12 kotów. Dezagregacja płytek wystąpiła we wszystkich badanych przypadkach na narządach testowych omywanych zarówno krwią żylną jak i tętniczną. Po stymulacji agregacja na narządzie kolagenowym omywanym krwią tętniczną wynosiła  $55,9 \pm 35,5$  % wartości kontrolnej; średnia różnica





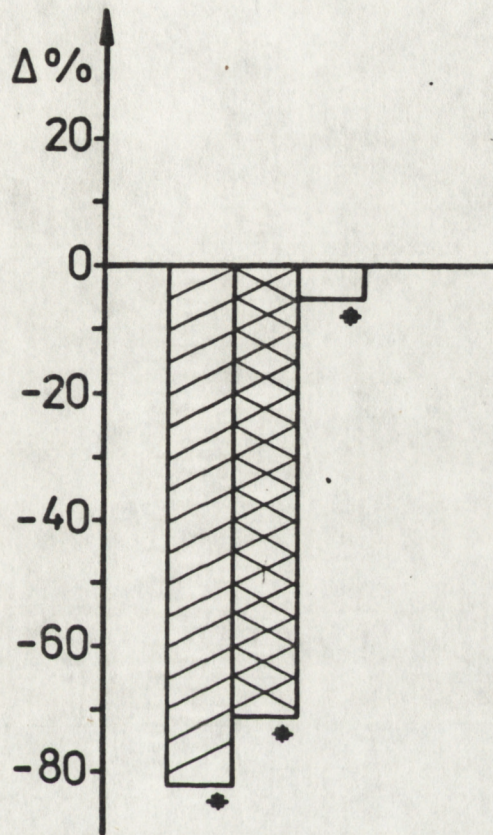
Ryc. 4. Zapis typowej reakcji na elektrostymulację pnia sympatycznego. Zapisy od góry w dół: agregacja płytek na narządzie testowym omywanym krwią żylną /Z/, krwią tętniczną /T/, RR - systemowe ciśnienie krwi. Wychylenie krzywych ku górze oznacza agregację. Po osiągnięciu poziomu stałego rozpoczęto stymulację. Na narządach testowych omywanych krwią żylną /Z/ i tętniczną /T/ widoczna jest postępująca dezagregacja płytek krwi. Jako pierwsza pojawia się dezagregacja na narządzie omywanym krwią żylną, obwodową, a następnie z kilkuminutowym opóźnieniem na narządzie omywanym krwią z tętnicy szyjnej. Dezagregacja na narządzie kolagenowym omywanym krwią żylną jest wyraźniej zaznaczona niż na narządzie omywanym krwią tętniczną. Dla porównania z lewej strony ryciny przedstawiono reakcję dezagregacji płytek krwi pod wpływem egzogennej  $PGI_2$ .








Ryc. 5. A. Reakcja systemowego ciśnienia krwi oraz agregacji płytek na narządach testowych omywanych krwią żylną i tętniczą w odpowiedzi na elektrostymulację pnia sympatycznego /11 kotów/. B. Dla porównania wielkości dezagregacji, przedstawiono zmiany agregacji płytek krwi na narządach testowych omywanych krwią żylną i tętniczą po podaniu znanej dawki prostacykliny bezpośrednio do krwi omywającej / 8 oznaczeń /. Kolumny przedstawiają wartości średnie,  $x$  oznacza znamienność statystyczną różnic w porównaniu z wartościami kontrolnymi /  $\Delta$  %/.





-  agregacja płytek krwi na narzędzie omywanym krwią żylną
-  agregacja płytek krwi na narzędzie omywanym krwią tętniczną
-  ciśnienie tętnicze

Ryc. 6. Reakcje systemowego ciśnienia krwi oraz agregacji płytek na narządach testowych w odpowiedzi na elektrostymulację pnia sympatycznego po uprzednim podaniu fentolaminy /4 mg/kg i. v./.



między poszczególnymi wartościami agregacji po i przed stymulacją wynosiła  $-44,1 \pm 36,9 \%$  / $p < 0,001$ /. Na narządzie kolagenowym omywanym krwią tętniczną agregacja po stymulacji wynosiła  $75,1 \pm 30,4 \%$  wartości kontrolnej; średni spadek w stosunku do wartości kontrolnych / $\Delta \%$ / wynosił  $-24,9 \pm 16,1 \%$  / $p < 0,01$ /.

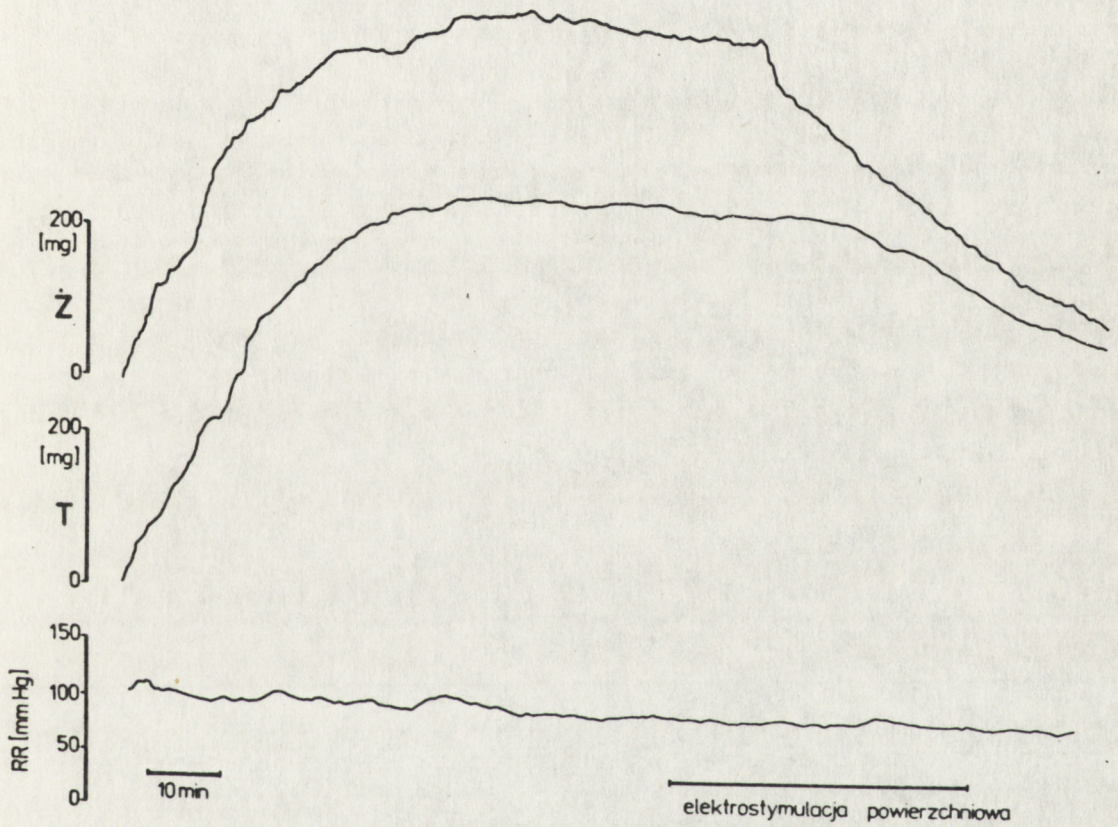
Podobnie jak w przypadku elektrostymulacji pnia sympatycznego dezagregacja pojawiła się początkowo na narządzie testowym omywanym krwią żylną wypływającą ze stymulowanej kończyny kota, a następnie z opóźnieniem występowała na narządzie kolagenowym omywanym krwią tętniczną wypływającą z tętnicy szyjnej. Największy spadek agregacji występował podczas stymulacji. Dezagregacja utrzymywała się podczas jednogodzinnej obserwacji, prowadzonej po zakończeniu stymulacji /ryc. 7 i 8/.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że zarówno stymulacja nerwów wegetatywnych u kotów jak i elektrostymulacja powierzchniowa kończyny zwierzęcia prowadzi do pojawienia się w krążeniu substancji /jednej lub kilku/ powodujących dezagregację płytek krwi. Dezagregacja występuje zarówno na narządzie testowym omywanym krwią żylną wypływającą ze stymulowanej kończyny kota, jak i na narządzie omywanym krwią tętniczną z tętnicy szyjnej. Oznacza to, że uwalniana pod wpływem elektrostymulacji substancja nie ulega inaktywacji w krążeniu płucnym.

3. Określenie własności chemicznych substancji wydzielanej do krążenia pod wpływem elektrostymulacji powierzchniowej.

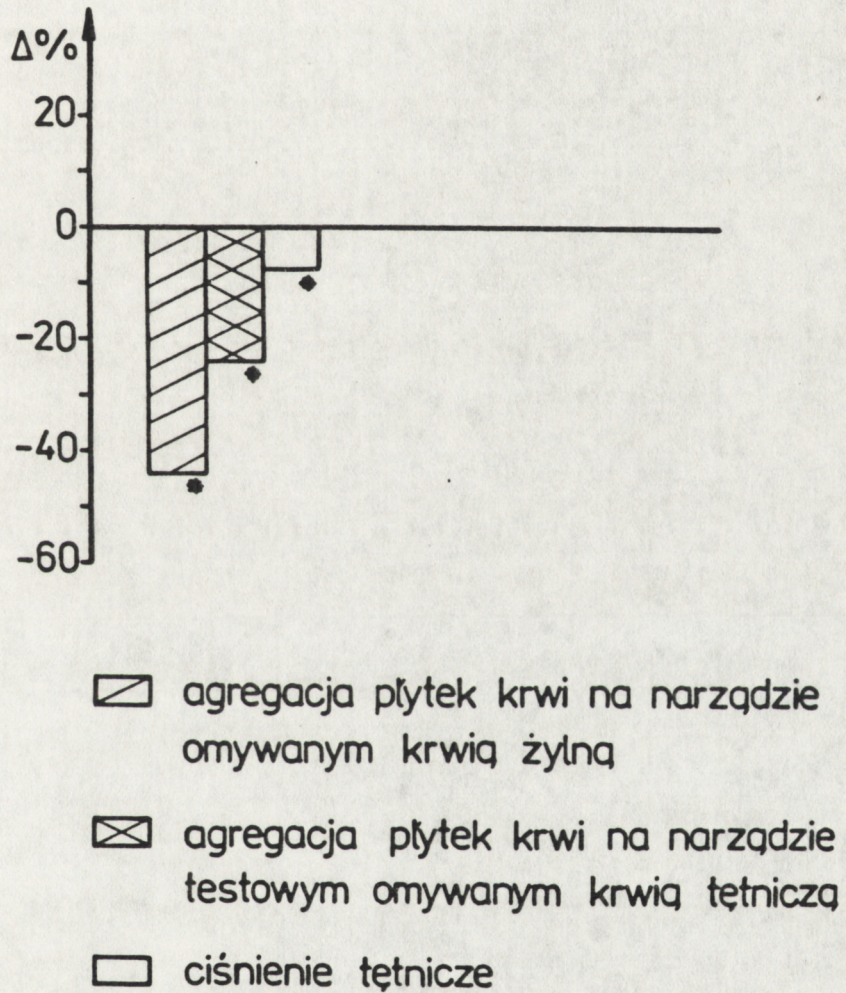
W celu określenia pochodzenia chemicznego substancji uwal-





Ryc. 7 . Zapis zmian agregacji płytek krwi na narządach kolagenowych omywanych krwią tętniczą i żylną pod wpływem elektrostymulacji powierzchniowej. Oznaczenia takie same jak na ryc. 4. Na obu narządach widoczna postępująca dezagregacja płytek krwi.





Ryc. 8. Reakcja systemowego ciśnienia krwi oraz agregacji płytek na narządach testowych omywanych krwią żylną i tętniczną w odpowiedzi na elektrostymulację powierzchniową.



nianej do krążenia pod wpływem elektrostymulacji, wykonano doświadczenia na kotach z zastosowaniem inhibitorów syntezy prostaglandyn /indometacyny i aspiryny/. Badania przeprowadzono w obydwu poprzednio opisanych grupach doświadczeń /Wyniki, Część I pkt 1 i 2/. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że podanie indometacyny /5 doświadczeń z elektrostymulacją pnia sympatycznego, 5 z zastosowaniem elektrostymulacji powierzchniowej/ lub aspiryny /4 doświadczenia z elektrostymulacją powierzchniową/ znosiło dezagregację wywołaną drażnieniem prądem elektrycznym /ryc. 9, 10/.

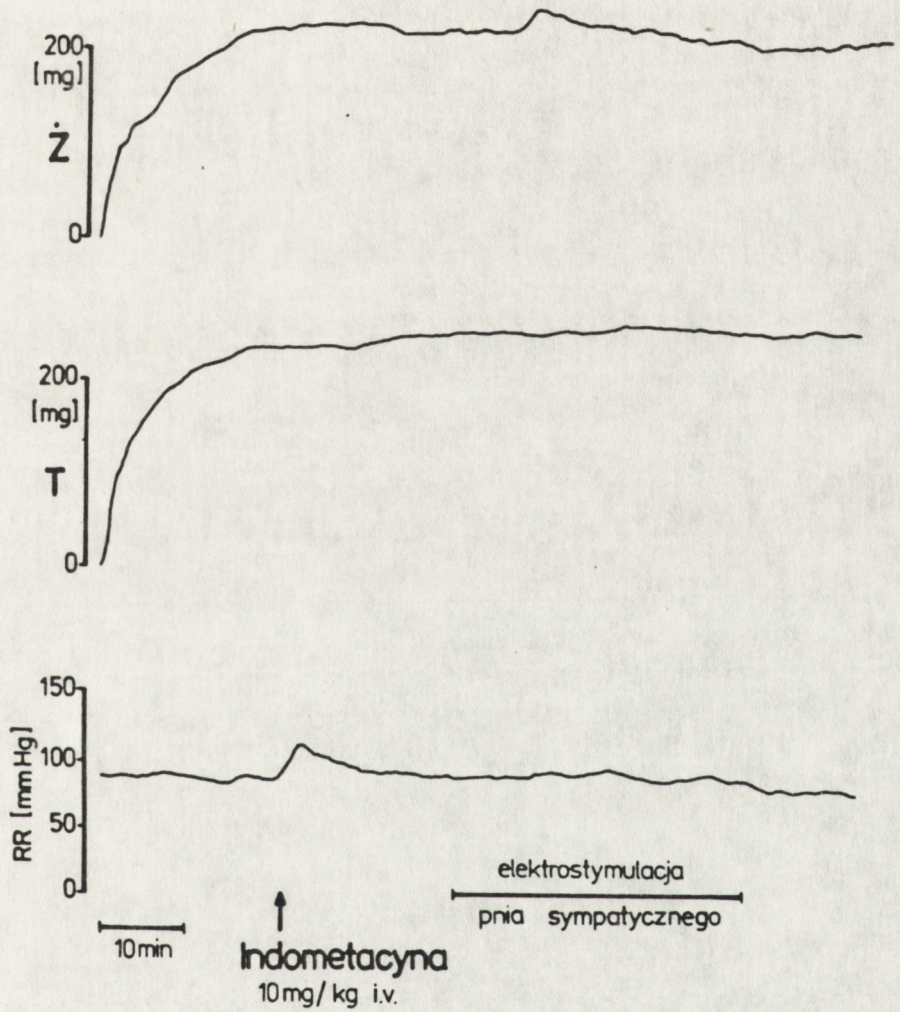
Na podstawie faktu, że podanie aspiryny i indometacyny, związków hamujących syntezę prostaglandyn, znosi reakcję dezagregacji płytek krwi wywołaną elektrostymulacją można wnioskować, że uwalniana pod wpływem stymulacji substancja jest prostanoidem. Aby przekonać się, czy substancja uwalniana pod wpływem elektrostymulacji jest prostacykliną, zastosowano układ doświadczalny z tzw. pętlą opóźniającą, który pozwala określić trwałość badanego związku /7 doświadczeń/ /ryc. 11,12/.

Średni poziom agregacji po stymulacji na narządzie testowym przed pętlą opóźniającą wynosił  $74,1 \pm 12,0$  % wartości kontrolnej.

Średnia różnica pomiędzy poszczególnymi wartościami agregacji po i przed stymulacją wynosiła  $-25,9 \pm 6,3$  % / $p < 0,001$ /.

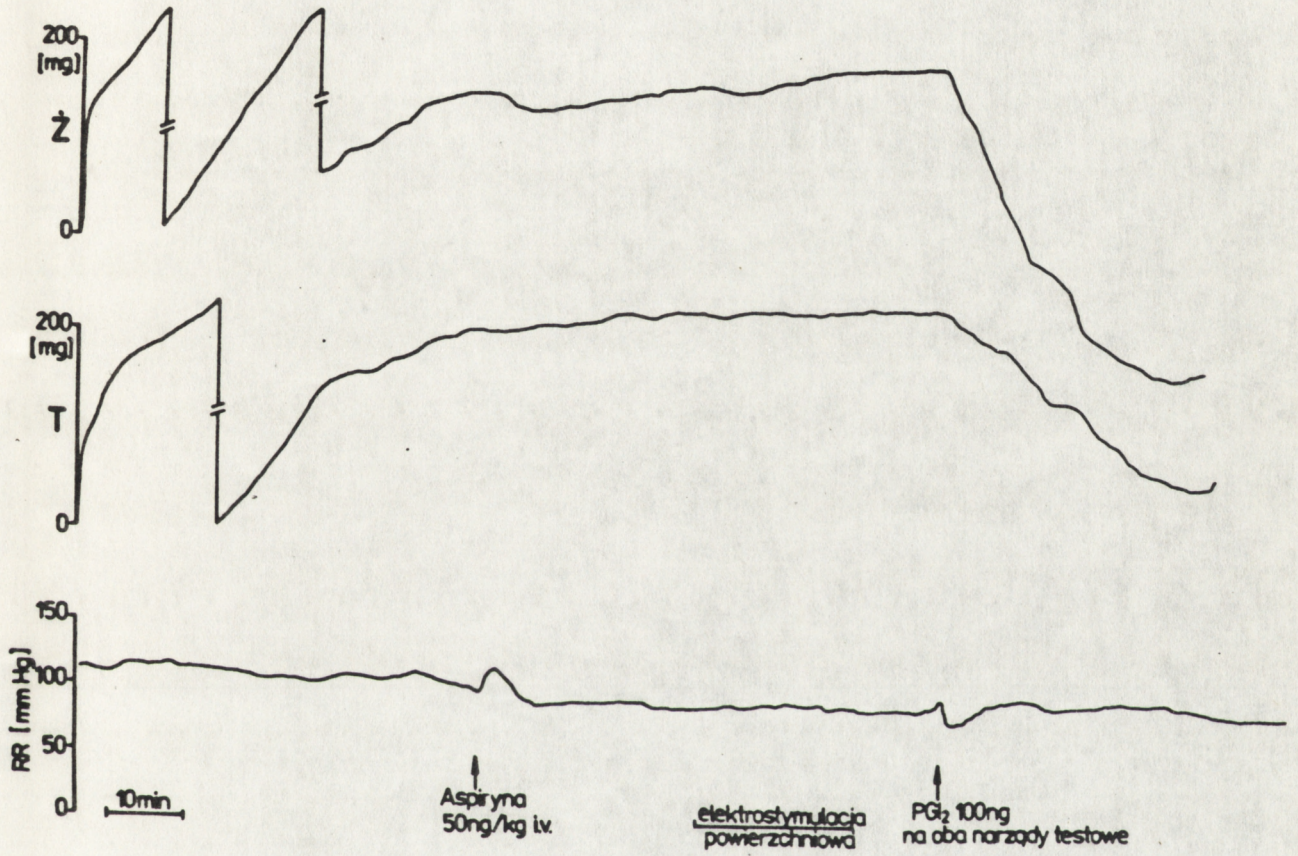
Za pętlą opóźniającą średni poziom agregacji wynosił  $80,5 \pm 25,5$  % wartości kontrolnych, a średnia różnica poziomu agregacji po i przed stymulacją wynosiła  $19,5 \pm 8,3$  % / $p < 0,05$ / /ryc. 13/.





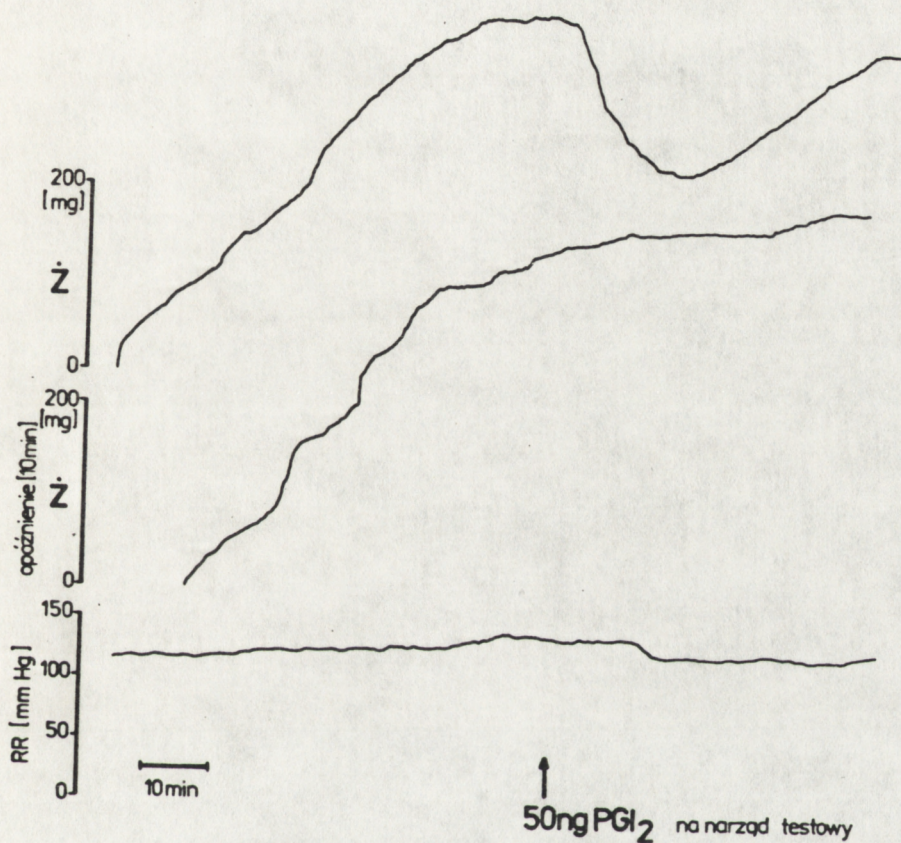
Ryc. 9. Wpływ indometacyny na dezagregację płytek krwi pod wpływem elektrostymulacji pnia sympatycznego. Widoczny brak dezagregacji na obydwu narządach testowych /omywanych krwią żylną i tętniczą/.





Ryc. 10. Aspiryna hamuje pojawienie się dezagregacji pod wpływem elektrostymulacji powierzchniowej. Czułość płytek na egzogenną prostacyklinę została zachowana.

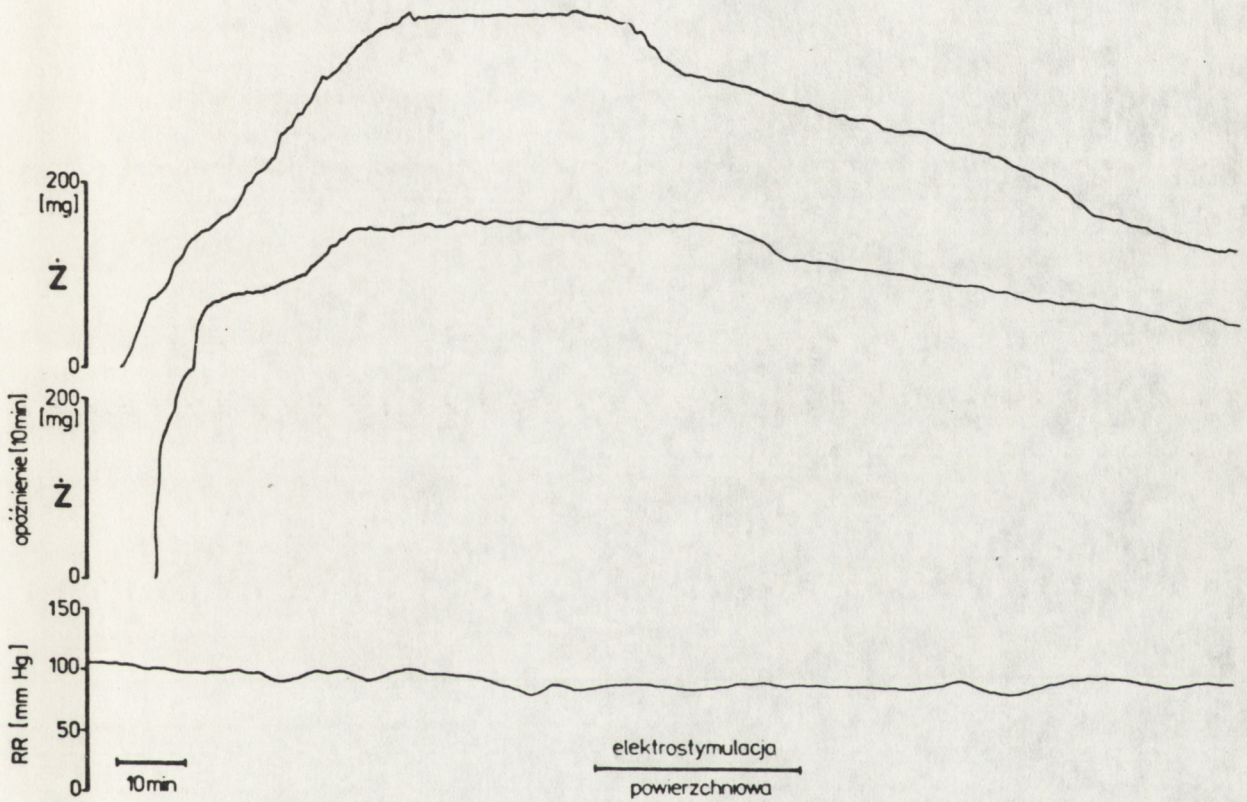




Ryc. 11. Wpływ 10-minutowego opóźnienia na dezagregację płytek krwi po podaniu egzogennej prostacykliny.

Na zapisie pierwszym od góry widoczna jest dezagregacja płytek krwi pod wpływem PGI<sub>2</sub>. Po 10 minutach opóźnienia /patrz ryc. 2/ krew dociera na drugi narząd testowy, na którym nie obserwuje się dezagregacji płytek /drugi zapis od góry/. Oznacza to, że syntetyczna prostacyklina płynąc przez pętlę opóźniającą ulega rozkładowi.

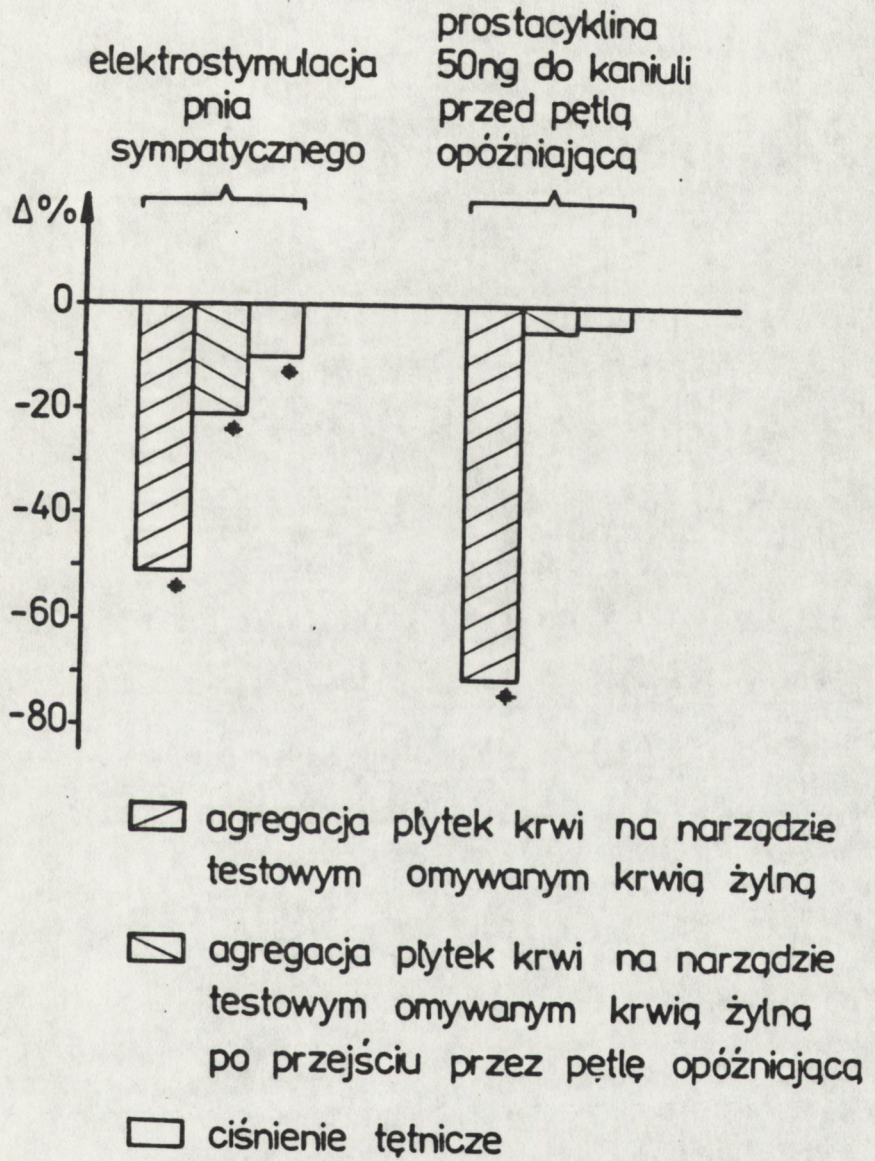




Ryc. 12. Ocena stabilności substancji uwalnianej do krążenia pod wpływem elektrostymulacji powierzchniowej.

Widoczna postępująca dezagregacja pod wpływem stymulacji na ścięgnie omywanym krwią żylną /zapis górny/ oraz dezagregacja na ścięgnie, do którego ta sama krew dopływa z 10-minutowym opóźnieniem /drugi zapis od góry/.





Ryc. 13. Reakcja systemowego ciśnienia tętniczego oraz agregacji płytek krwi na narządach testowych omywanych krwią żylną przed i po przejściu krwi przez pętlę opóźniającą w odpowiedzi na elektrostymulację pnia sympatycznego. Dla porównania z lewej strony rysunku przedstawiono wartości tych zmiennych uzyskane w wyniku podania  $\text{PGI}_2$  bezpośrednio na narząd testowy przed pętlą. Zmiany agregacji pod wpływem syntetycznej  $\text{PGI}_2$ , za pętlą opóźniającą są statystycznie nieistotne.



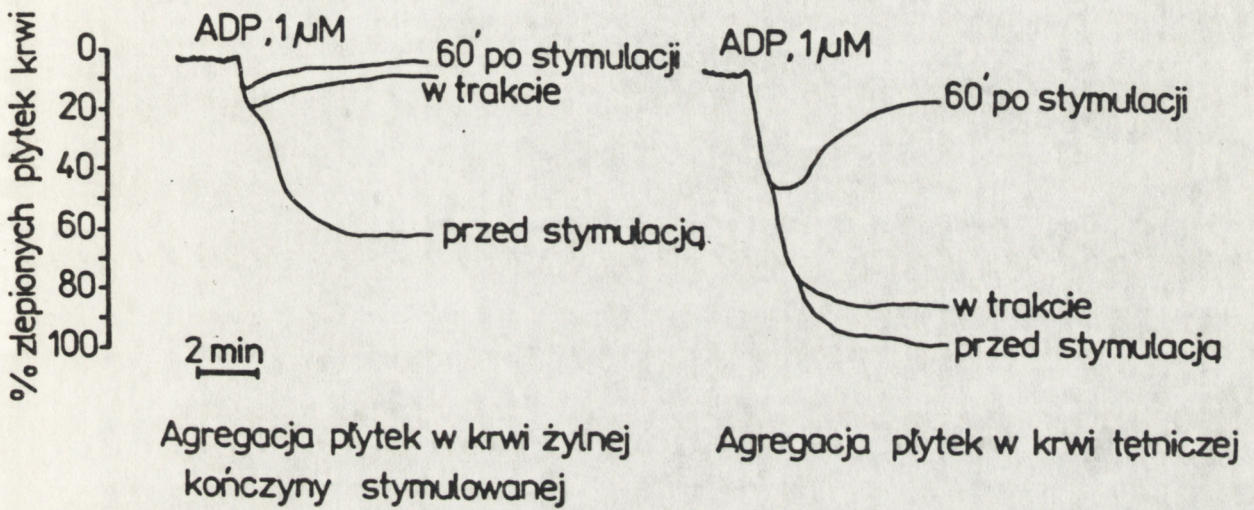
Wyniki badań z wprowadzeniem 10-minutowego opóźnienia między momentem uwolnienia, a bezpośrednim działaniem substancji dezagregujących na płytki krwi wykazują, że prostanoidy uwalniane podczas stymulacji są trwalsze od syntetycznej prostacykliny /PGI<sub>2</sub>/. W związku z tym można było wykonać serię badań krwi in vitro, które mogłyby potwierdzić właściwości substancji uwalnianej do krążenia pod wpływem elektrostymulacji powierzchniowej, określone wcześniej przy zastosowaniu metody biologicznej. Badania in vitro przeprowadzono przy zastosowaniu metody Borna /patrz Metodyka/.

W celu wyeliminowania ewentualnego wpływu minimalnej pracy mięśniowej wywołanej elektrostymulacją na agregację płytek krwi badania przeprowadzono w dwóch grupach: u kotów spontanicznie oddychających i u kotów porażonych, wentylowanych sztucznie.

Wyniki doświadczeń przedstawia Tabela I i ryc. 14 i 15.

Na podstawie otrzymywanych wyników stwierdzono, że pod wpływem elektrostymulacji powierzchniowej wydziela się do krążenia substancja, która powoduje zmniejszenie podatności płytek krwi na czynnik agregujący /ADP/. Hamowanie agregacji występuje zarówno we krwi żyłnej jak i tętniczej. Prostanoid lub prostanoidy wydzielane do krążenia pod wpływem elektrostymulacji są na tyle stabilne, że ich działanie widoczne jest nawet po upływie czasu, jaki jest niezbędny na przygotowanie surowicy do oznaczeń metodą Borna. Wyniki tej serii doświadczeń potwierdzają wyniki otrzymane przy zastosowaniu metody biologicznej.





Ryc. 14. Zapis typowej zmiany agregacji płytek krwi w odpowiedzi na elektrostymulację powierzchniową /wg metody Borna/. Widoczne zmniejszenie podatności na czynnik agregujący /ADP/ zarówno we krwi żyłnej stymulowanej kończyny zwierzęcia jak i krwi tętniczej. Największa reakcja hamowania agregacji występuje godzinę po zakończeniu stymulacji.

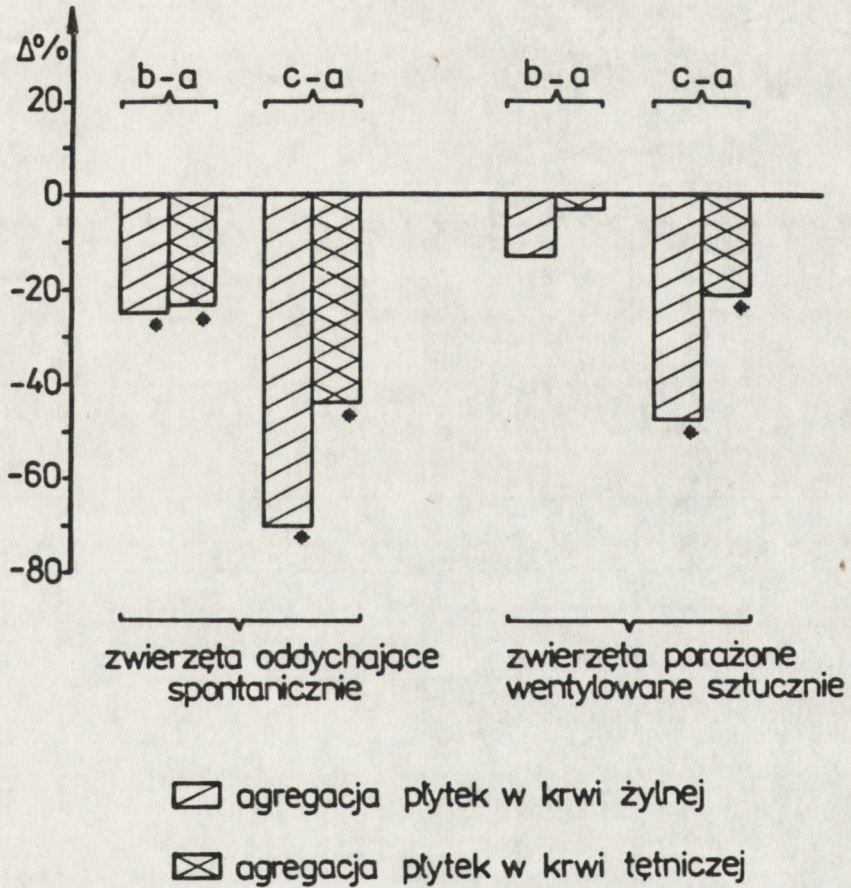


	etapy doświadczenia	Zwierzęta oddychające spontanicznie n=9		
		$\bar{x} \pm SD$ <sup>xx</sup>	% kontroli	wniosek statystyczny
Agregacja krwinek płytkowych we krwi żylniej [%]	przed stymulacją /a/	61,9 <sup>±</sup> 16,5		
	bezpośrednio po stymulacji /b/	50,1 <sup>±</sup> 20,1	81,0 <sup>±</sup> 32,4	
	60' po stymulacji /c/	18,6 <sup>±</sup> 7,6	30,0 <sup>±</sup> 12,3	
	średnia różnica bezpośrednio po przed stymulacją /b-a/	-11,8 <sup>±</sup> 13,2	-19,0 <sup>±</sup> 21,4	p<0,0
	średnia różnica 60' po-przed stymulacją /c-a/	-43,3 <sup>±</sup> 11,5	-70,0 <sup>±</sup> 18,6	p<0,0
	-----			
Agregacja krwinek płytkowych we krwi tętnicznej [%]	przed stymulacją /a/	71,2 <sup>±</sup> 12,0		
	bezpośrednio po stymulacji //b/	55,1 <sup>±</sup> 19,0	77,4 <sup>±</sup> 26,6	
	60' po stymulacji /c/	39,8 <sup>±</sup> 20,9	55,9 <sup>±</sup> 29,3	
	średnia różnica bezpośrednio po przed stymulacją /b-a/	-16,1 <sup>±</sup> 16,8	-22,6 <sup>±</sup> 23,6	p<0,0
	średnia różnica 60' po-przed stymulacją/c-a/	31,4 <sup>±</sup> 22,5	-44,2 <sup>±</sup> 31,5	p<0,0

Tabela I. Zmiany średnich wartości agregacji krwinek płytkowych w wyniku wpływu elektrostymulacji powierzchniowej kończyny tylnej

<sup>xx</sup> Ze względu na charakter przeprowadzonych badań, wartość odchylenia grup wyników nie należy traktować jako miernika istotności różnic. Podanie odchylenia standardowego miało na celu wskazanie istnienia różnic wielkości reakcji na ten sam bodziec. Właściwym testem jest test istotności t dla różnicy średnich zmiennych powiązanych





Ryc. 15. Reakcje agregacji płytek we krwi żylniej i tętniczej w odpowiedzi na elektrostymulację powierzchniową u kotów. Agregacja płytek krwi: przed stymulacją /a/, bezpośrednio po stymulacji /b/, 60 minut po stymulacji /c/.



4. Wpływ elektrostymulacji powierzchniowej na zmiany przepływu całkowitego krwi w kończynie.

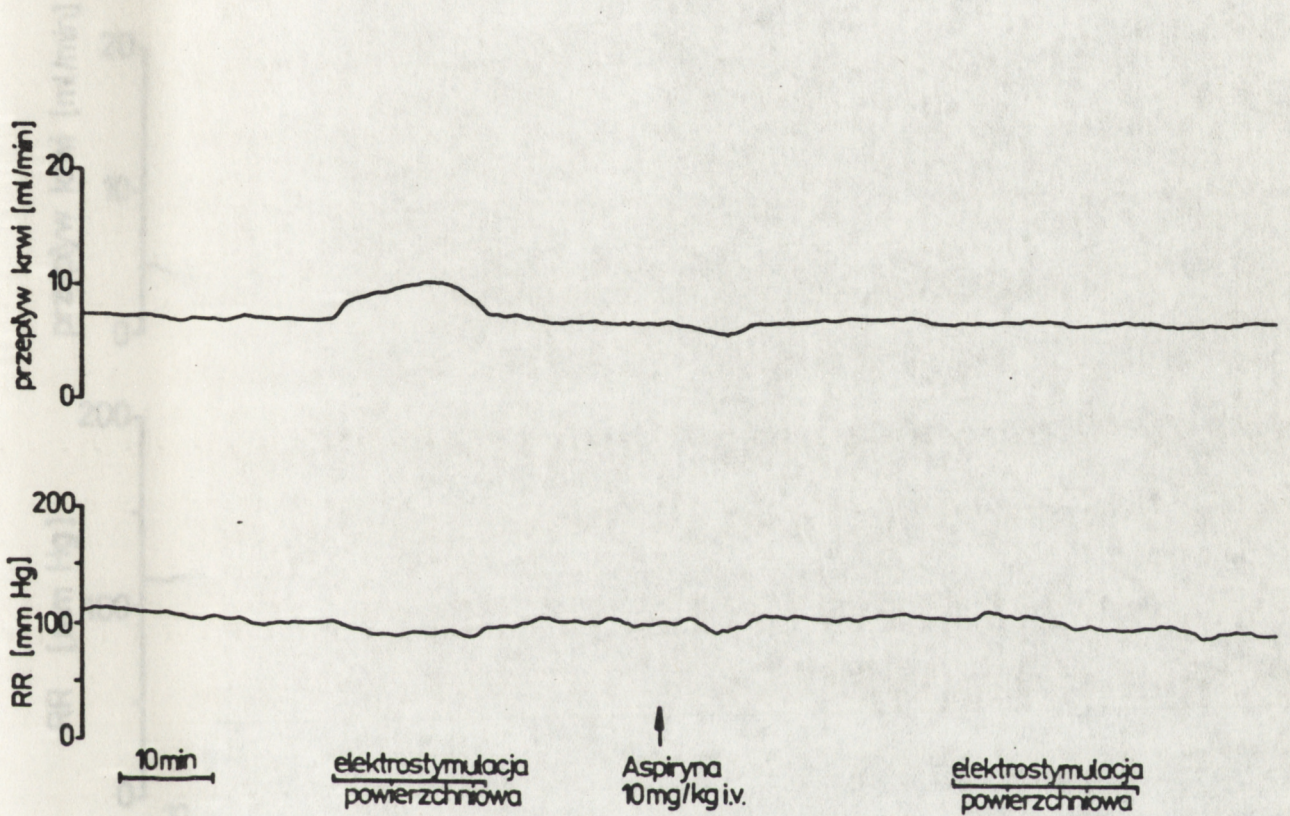
W celu sprawdzenia, czy uwalniany pod wpływem stymulacji dezagregujący prostanoid jest również czynnikiem naczyniorozszerzającym, badano wpływ elektrycznej stymulacji powierzchniowej na zmiany całkowitego przepływu krwi w tylnej kończynie kota.

Przebieg typowego doświadczenia, w którym badano wpływ elektrostymulacji powierzchniowej na zmiany kończynowego przepływu krwi bez i po uprzednim podaniu inhibitora syntezy prostaglandyn /aspiryny/ przedstawia ryc. 16.

Aspiryna hamuje wzrost przepływu tylko w tych przypadkach, gdzie nie dochodzi do drżenia mięśni pod wpływem elektrostymulacji. Przy użyciu dużej intensywności stymulacji praca mięśniowa powoduje wzrost przepływu pomimo uprzedniego podania blokerów syntezy prostaglandyn /aspiryny czy indometacyny/, ryc. 17.

Wzrostowi przepływu krwi pod wpływem elektrostymulacji powierzchniowej towarzyszył niewielki, chociaż statystycznie znamienny spadek ciśnienia krwi w obydwu badanych grupach zwierząt. U kotów spontanicznie oddychających spadek ciśnienia krwi utrzymywał się jeszcze po zakończeniu stymulacji pomimo powrotu wartości przepływu krwi do kontroli. Wpływ przezskórnej elektrostymulacji oraz infuzji znanej dawki prostacykliny na zmiany przepływu i systemowego ciśnienia krwi przedstawia Tabela II A i B, ryc. 18.

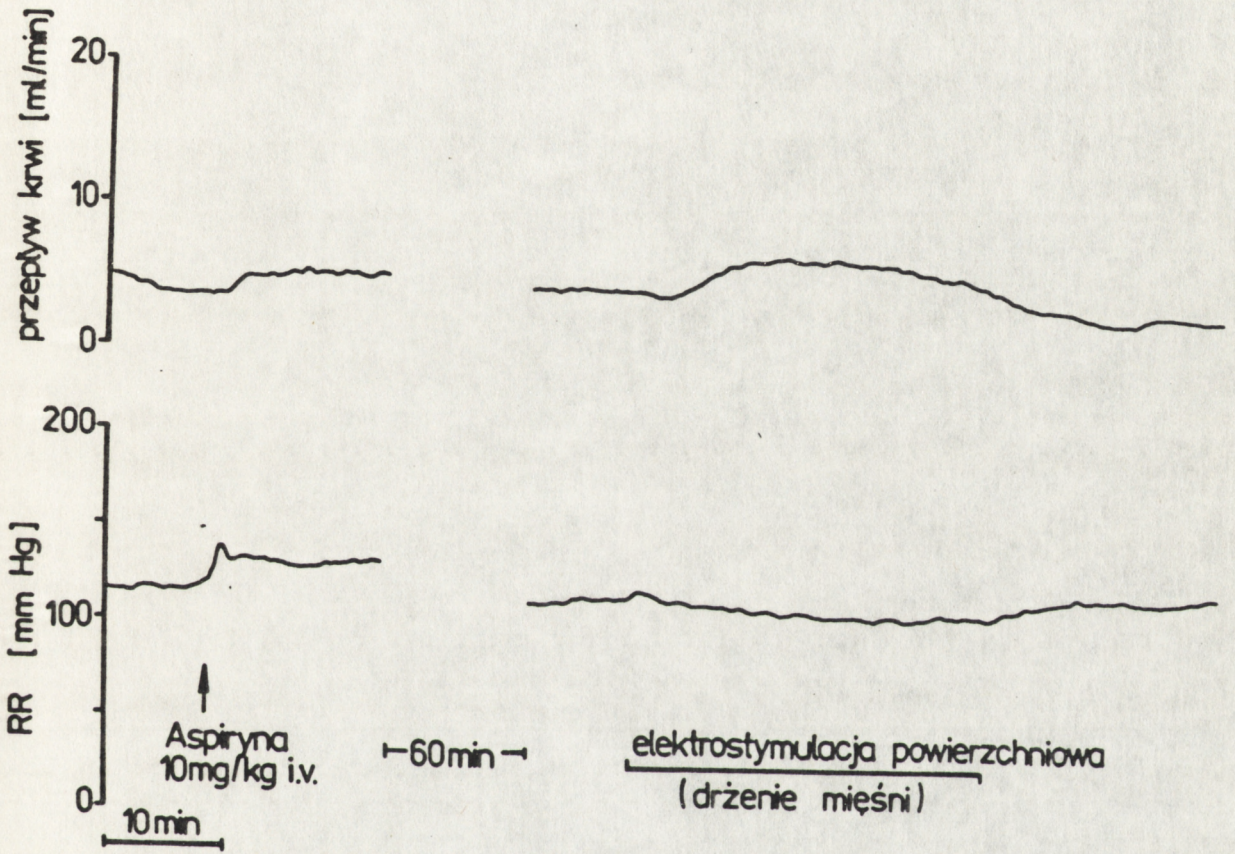




Ryc. 1

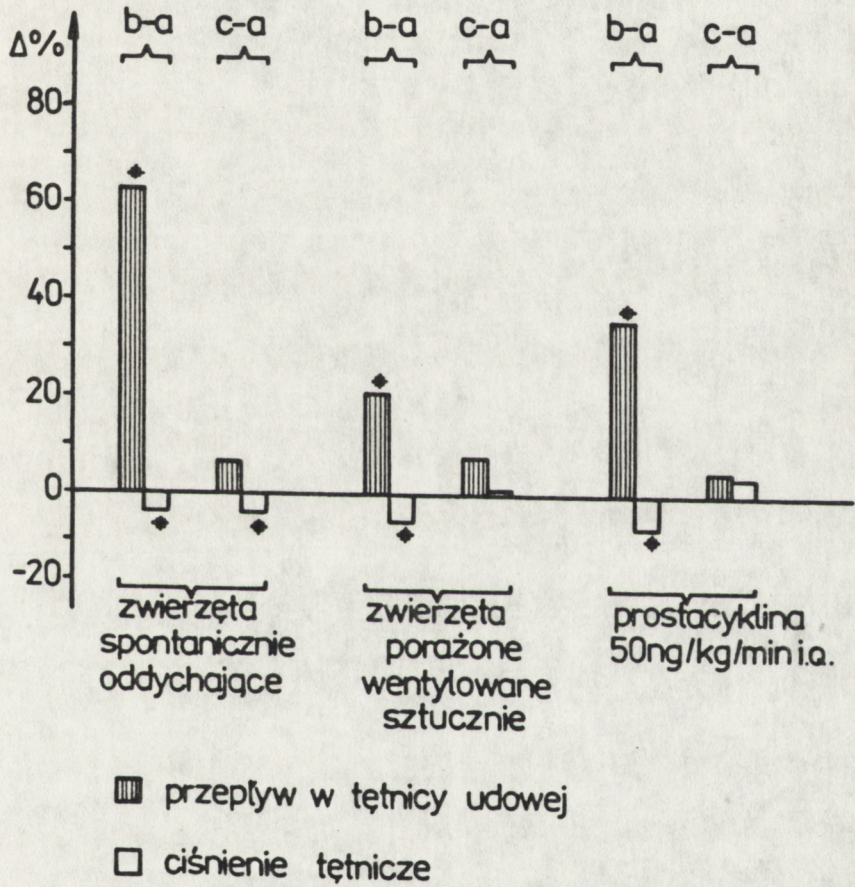
Ryc. 16. Wzrost przepływu całkowitego w tętnicy udowej kota pod wpływem elektrostymulacji powierzchniowej. Aspiryna hamuje wzrost przepływu wywołany elektrostymulacją, co oznacza, że był on wywołany pojawieniem się w krążeniu naczyniorozszerzającego prostanoidu.





Ryc. 17. Wzrost przepływu krwi wywołany drżeniem mięśni nie jest hamowany uprzednim podaniem aspiryny.





Ryc. 18. Zmiany systemowego ciśnienia tętniczego i całkowitego przepływu krwi w tętnicy udowej wywołane elektrostymulacją powierzchniową kończyny tylnej kota oraz dotętnicznym podaniem prostacykliny. Patrz Tabela II.



A.

	Etapy doświadczenia	Zwierzęta oddychające spontanicznie n=11		
		$\bar{x} \pm SD$	% kontroli	Wnio- sta
Przepływ /ml/min/	przed stymulacją /a/	5,9 $\pm$ 1,8		
	w trakcie stymulacji /b/	9,7 $\pm$ 2,7	164,4 $\pm$ 45,8	
	po stymulacji /c/	6,3 $\pm$ 2,4	106,8 $\pm$ 40,7	
	średnia różnica w trakcie-przed /b-a/	3,8 $\pm$ 2,2	64,4 $\pm$ 37,2	p<0
	średnia różnica po-przed /c-a/	0,4 $\pm$ 1,8	6,8 $\pm$ 30,5	
	Ciśnienie krwi /mm Hg/	przed stymulacją/a/	114,7 $\pm$ 12,8	
w trakcie stymulacji /b/		110,5 $\pm$ 14,2	96,3 $\pm$ 12,4	
po stymulacji /c/		110,4 $\pm$ 12,5	96,2 $\pm$ 10,9	
średnia różnica w trakcie-przed /b-a/		-4,2 $\pm$ 5,6	3,7 $\pm$ 4,9	p<0
średnia różnica po-przed /c-a/		-4,3 $\pm$ 8,7	3,7 $\pm$ 7,6	p<0

B.

		Infuzja prostacykliny 50 ng/kg i.a. /zwierzęta		
	Etapy doświadczenia	$\bar{x} \pm SD$		
		Przepływ /ml/min/		
n = 10	przed infuzją /a/	8,4 $\pm$ 1,8		
	w trakcie infuzji /b/	11,6 $\pm$ 2,4		
	po stymulacji /c/	9,0 $\pm$ 2,0		
	średnia różnica w trakcie-przed /b-a/	3,2 $\pm$ 2,2		
	średnia różnica po-przed /c-a/	0,6 $\pm$ 0,8		
	Ciśnienie krwi /mm Hg/	przed infuzją /a/	116,7 $\pm$ 9,6	
w trakcie infuzji /b/		112,1 $\pm$ 12,5		
po infuzji /c/		122,0 $\pm$ 11,0		
średnia różnica w trakcie-przed /b-a/		-4,6 $\pm$ 5,8		
średnia różnica po-przed /c-a/		5,3 $\pm$ 7,7		

Tabela II. Zmiany średnich wartości przepływu całkowitego i system elektrostrymulację powierzchniową /A/ oraz infuzją znane

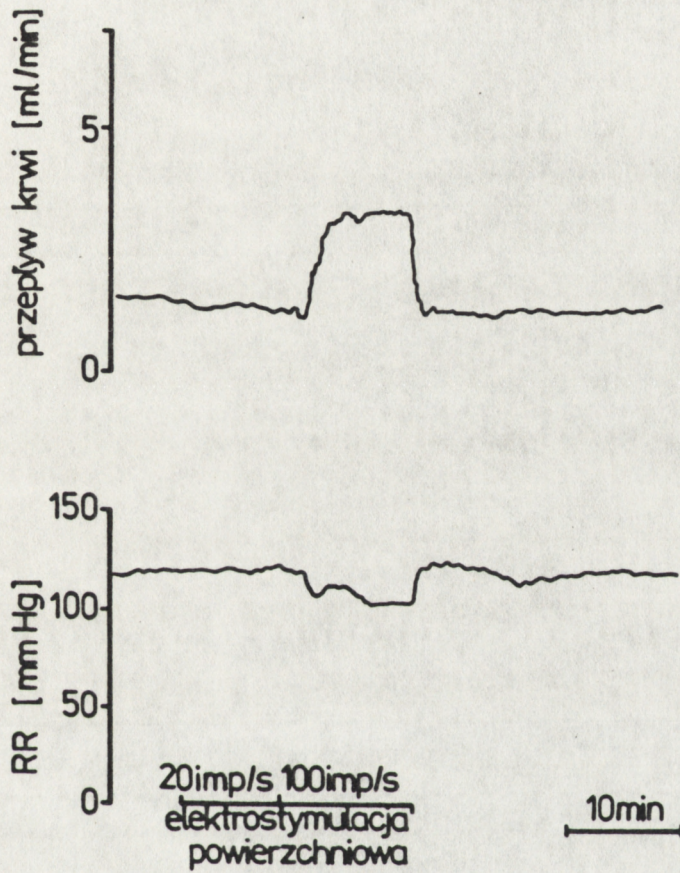


Podczas wykonywania doświadczeń stwierdzono istnienie zależności między częstością impulsów stymulujących a zmianami ciśnienia systemowego i całkowitego przepływu krwi. Tylko w zakresie częstości wysokich /75-100 imp/s / obserwowano statystycznie znamienne spadki ciśnienia krwi i wzrost przepływu. U zwierząt porażonych, wentylowanych sztucznie, elektrostymulacja z zastosowaniem niskiej /20 imp/s / częstości impulsów, bez względu na intensywność bodźca nie wywoływała zmian badanych parametrów /ryc. 19/.

Podsumowując wyniki badań przeprowadzonych w tej serii doświadczeń można stwierdzić, że pod wpływem elektrostymulacji powierzchniowej wzrasta całkowity przepływ krwi w kończynie, przy jednoczesnym nieznacznym spadku ciśnienia systemowego krwi.

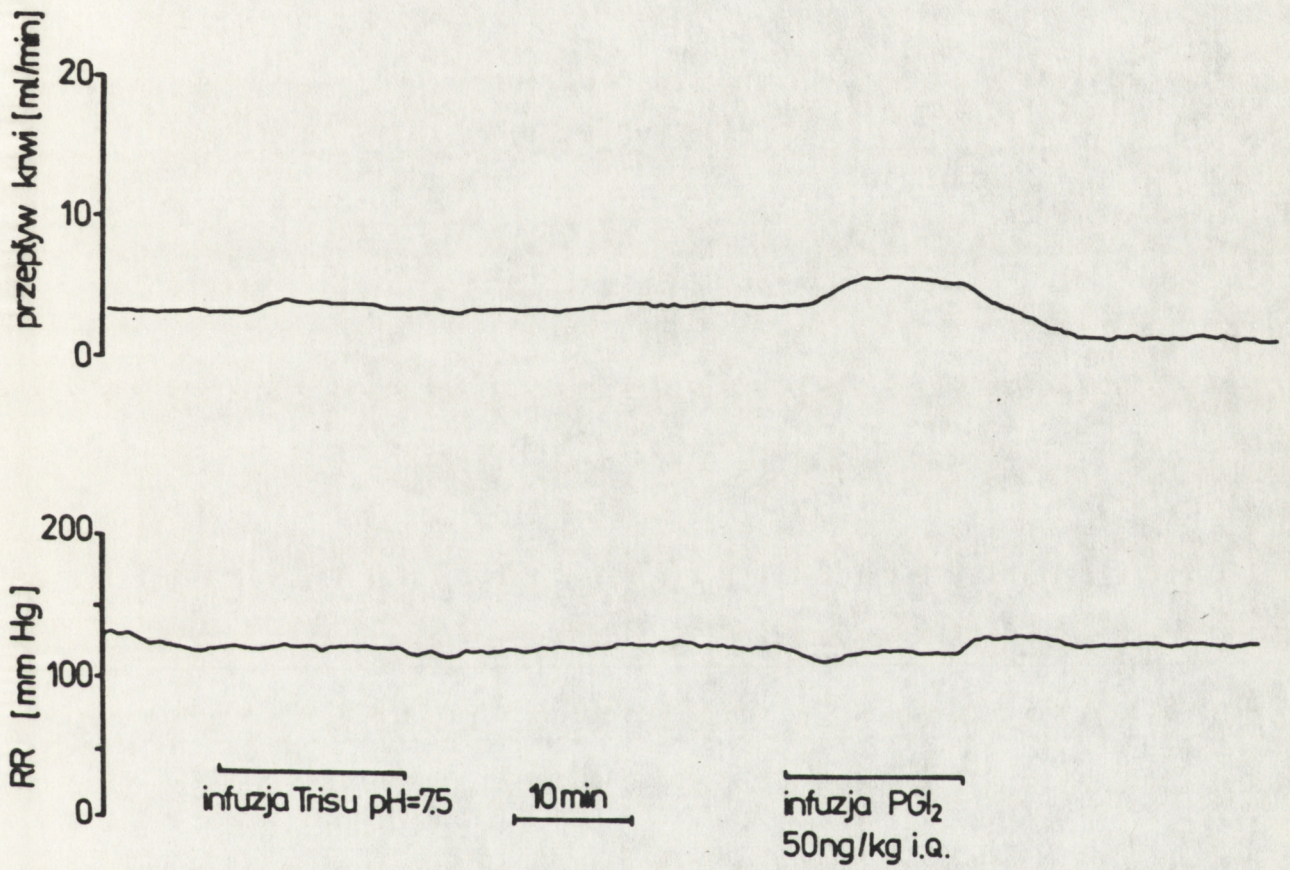
Za wzrost przepływu całkowitego i spadek systemowego ciśnienia krwi u zwierząt porażonych odpowiedzialna jest substancja, której pojawienie się jest blokowane przez inhibitory syntezy prostaglandyn. Wzrost całkowitego przepływu krwi w kończynie i spadek ciśnienia systemowego może być związany z naczynio-rozszerzającym działaniem prostanoidu /prostanoidów/ uwalnianych do krążenia pod wpływem elektrostymulacji powierzchniowej. Znamienne statystycznie zmiany badanych parametrów ograniczają się tylko do czasu trwania elektrostymulacji. Po jej zakończeniu wartości przepływu całkowitego w tętnicy udowej oraz systemowego ciśnienia krwi u zwierząt porażonych wracają do poziomu kontrolnego. Zmiany te mają przebieg porównywalny do tego, jaki obserwujemy w odpowiedzi na podanie egzogennej prostacykliny, kiedy to reakcje ciśnienia i przepływu ograniczają się tylko do czasu trwania infuzji /ryc. 20/.





Ryc. 19. Wpływ częstości impulsów stymulujących na zmiany systemowego ciśnienia krwi oraz przepływu całkowitego w tętnicy udowej kota. Widoczny jest wzrost przepływu i spadek ciśnienia krwi pod wpływem stymulacji o częstości impulsów 100 imp/s oraz brak zmian tych parametrów przy częstości = 20 imp/s.





Ryc. 20. Wzrost przepływu krwi w tętnicy udowej kota pod wpływem infuzji prostacykliny.  
Infuzja samego trisu, w którym rozpuszcza się prostacyklinę nie wywołuje istotnych zmian przepływu.



Podsumowanie wyników / Część I/

1. Zarówno stymulacja nerwów wegetatywnych jak i elektrostymulacja powierzchniowa kończyny kotów prowadzi do pojawienia się w krążeniu substancji wywołującej postępującą dezagregację płytek krwi.
2. Uwolniona pod wpływem elektrostymulacji substancja dezagregująca płytki krwi nie ulega inaktywacji w krążeniu płucnym.
3. Podanie inhibitorów syntezy prostaglandyn znosi reakcję dezagregacji płytek krwi wywołaną elektrostymulacją, co oznacza, że uwalniana pod wpływem elektrostymulacji substancja jest prostanoidem.
4. Aktywność biologiczna dezagregującego prostanoidu uwalnianego do krążenia pod wpływem elektrostymulacji powierzchniowej nie zanika po 10 minutach inkubacji we krwi o temp.  $37^{\circ}\text{C}$ , co oznacza, że jest on trwalszy od syntetycznej prostacykliny.
5. Pod wpływem elektrostymulacji powierzchniowej wzrasta całkowity przepływ krwi w stymulowanej kończynie przy jednoczesnym, niewielkim spadku systemowego ciśnienia krwi. Zmiany tych parametrów u zwierząt porażonych, wentylowanych sztucznie hamowane są przez podanie inhibitorów syntezy prostaglandyn, co wskazuje na to, że substancje odpowiedzialne za wzrost przepływu są prostanoidami.
6. Reakcje przepływu całkowitego w stymulowanej kończynie oraz ciśnienia systemowego krwi u zwierząt porażonych, wentylowanych sztucznie zależą od częstości impulsów stymulujących.



Stosowanie wysokich częstości rzędu 75-100 imp/s doprowadza do uwolnienia prostanoidu wywołującego wzrost przepływu całkowitego i obniżenie systemowego ciśnienia krwi.

Na podstawie wyników doświadczeń przedstawionych w tym rozdziale można stwierdzić, że pod wpływem elektrostymulacji powierzchniowej uwalnia się do krążenia prostanoid lub prostanoidy o właściwościach dezagregujących płytki krwi, trwalsze od syntetycznej prostacykliny.

## II Badania kliniczne

Wyniki doświadczeń przedstawione w Części I wykazały, że aktywność substancji wydzielanych do krążenia pod wpływem elektrostymulacji powierzchniowej nie zanika w czasie niezbędnym na przygotowanie krwi do oznaczeń metodą Borna. Substancja lub substancje te hamowały agregację płytek krwi *in vitro* w wynaczynionej krwi kotów.

Ze względu na dużą stabilność prostanoidów uwalnianych do krążenia pod wpływem stymulacji, można było stosując metodę Borna przeprowadzić następny etap badań. Jego celem było sprawdzenie, czy elektrostymulacja powierzchniowa powoduje hamowanie agregacji płytek krwi również u ludzi.

1. Wpływ elektrostymulacji powierzchniowej na zmiany agregacji płytek krwi oraz czasu krwawienia u ludzi ze schorzeniami krążenia obwodowego /pierwsza stymulacja/

a/ u chorych z chorobą lub zespołem Raynauda;



Elektrostymulacja powierzchniowa stosowana u chorych z chorobą lub zespołem Raynauda powoduje zmniejszenie podatności płytek krwi na czynnik agregujący /ryc. 21/.

Hamowanie agregacji związane było z wydłużeniem czasu krwawienia prawdopodobnie na skutek zaburzenia czynności zlepnej płytek krwi /Tabela III ryc. 22/.

Pomimo, że podatność na czynniki agregujące bezpośrednio po stymulacji w kończynie badanej nie zmieniała się w sposób znamien-ny, to czas krwawienia przedłużał się istotnie średnio o 30 % w sto-sunku do wartości przed stymulacją. Największy wzrost czasu krwa-wienia /średnio o 130 %/, podobnie jak największe hamowanie agre-gacji /średnio o 50 %/ występował godzinę po stymulacji.

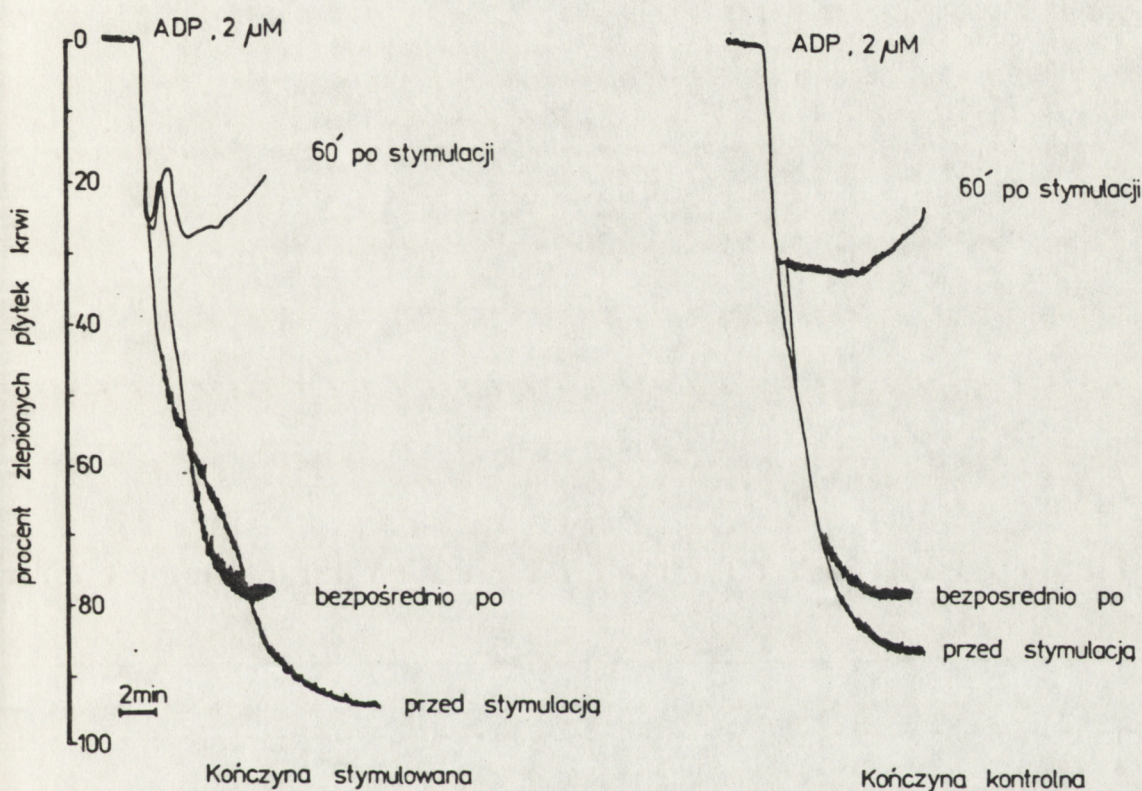
Na podstawie otrzymywanych wyników stwierdzono, że elek-trostymulacja powierzchniowa stosowana u chorych z chorobą lub zespołem Raynauda prowadzi do spadku podatności krwinek płytkowych na czynnik agregujący i wywołuje wydłużenie czasu krwawienia.

Reakcja hamowania agregacji płytek jest systemowa i występuje nie tylko we krwi żyłnej kończyny badanej, ale również we krwi kończy-ny kontrolnej.

b/ u chorych z chorobą Błrgega /pierwsza stymulacja/;

Badania przeprowadzone u chorych z chorobą Błrgera wyka-zały brak wpływu elektrostymulacji powierzchniowej na agregację pły-tek krwi, zarówno we krwi kończyny badanej jak i kontrolnej. Natomiast czas krwawienia w kończynie badanej w wyniku stymulacji wydłużył się





Ryc. 21. Wpływ elektrostymulacji powierzchniowej na zmiany agregacji krwinek płytkowych we krwi żyłnej kończyny stymulowanej oraz we krwi żyłnej kończyny symetrycznej, traktowanej jako kontrola. Na wykresach widać zmniejszoną podatność na czynnik agregujący /ADP/.

Największe hamowanie agregacji występuje godzinę po zakończeniu stymulacji.

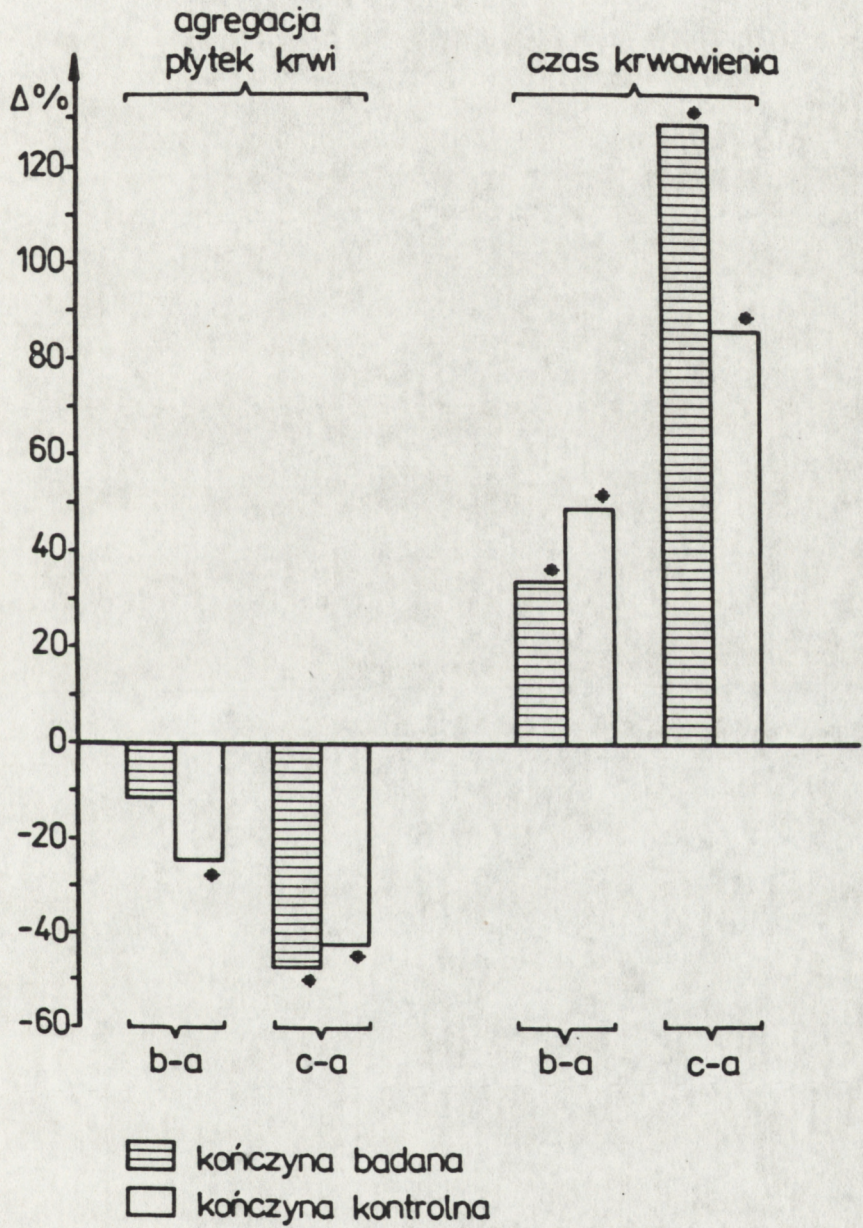
/p. S. Z., lat 53/.



	Etapy doświadczenia	Kończyna stymulowana		
		$\bar{x} \pm SD$	% kontrol	Wnios staty
Agregacja płytek krwi [%] n = 16	przed stymulacją /a/	65,3 <sup>±</sup> 17,8		
	bezpośrednio po stymulacji /b/	57,7 <sup>±</sup> 19,1	88,4 <sup>±</sup> 27,2	
	60' po stymulacji /c/	34,6 <sup>±</sup> 10,0	52,9 <sup>±</sup> 15,4	
	średnia różnica bezpośrednio po-przed /b-a/	-7,6 <sup>±</sup> 14,2	-11,6 <sup>±</sup> 21,8	
	średnia różnica 60' po-przed /c-a/	-30,7 <sup>±</sup> 17,8	-47,1 <sup>±</sup> 27,3	p<0,00
	=====			
Czas krwawienia /sek/ n = 16	przed stymulacją /a/	179,0 <sup>±</sup> 86,7		
	bezpośrednio po stymulacji /b/	239,7 <sup>±</sup> 120,5	133,9 <sup>±</sup> 67,3	
	60' po stymulacji /c/	410,3 <sup>±</sup> 140,6	229,2 <sup>±</sup> 78,5	
	średnia różnica bezpośrednio po-przed /b-a/	60,6 <sup>±</sup> 103,4	33,9 <sup>±</sup> 57,8	p<0,05
	średnia różnica 60'po-przed /c-a/	231,3 <sup>±</sup> 150,3	129,2 <sup>±</sup> 84,0	p<0,00

Tabela III. Zmiany średnich wartości agregacji płytek krwi i czasu krwa stymulowanej i kontrolnej pod wpływem elektrostymulacji pow z chorobą lub zespołem Raynauda.





Ryc. 22. Zmiany agregacji płytek we krwi żyłnej kończyny badanej i kontrolnej oraz czasu krwawienia w odpowiedzi na elektrostymulację powierzchniową u chorych z chorobą Raynauda /pierwsza stymulacja/.



znamiennie /Tabela IV, ryc. 23/. Ograniczenie reakcji czasu krwawienia tylko do kończyny badanej wskazuje na lokalny i nie związany ze zmianami agregacji płytek krwi, mechanizm tego zjawiska.

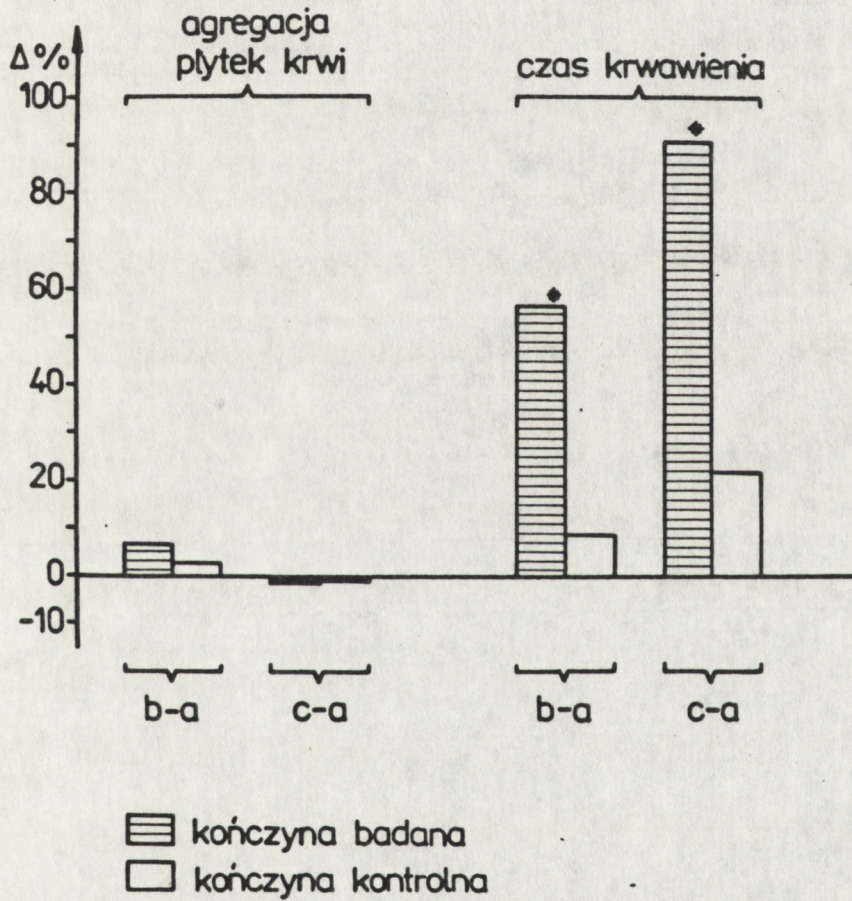
Brak statystycznie znamiennych zmian agregacji płytek krwi u chorych z chorobą Bùrgera nie jest jednoznacznym miernikiem nieprzydatności metody elektrostymulacji powierzchniowej jako metody wspomagającej w leczeniu tej jednostki chorobowej. U dwóch chorych z dziewięciu przebadanych, wystąpiło zmniejszenie agregacji płytek krwi średnio o 65 % pod wpływem stymulacji /pierwsza ekspozycja/ oraz wydłużenie czasu krwawienia o 110% w stosunku do wartości kontrolnych i była to reakcja systemowa. Obserwowano ją zarówno w kończynie stymulowanej jak i kontrolnej. Biorąc pod uwagę niewielką ilość przebadanych osób,  $n = 9$  /choroba Bùrgera - rozpoznawana na podstawie obecnie obowiązujących kryteriów jest schorzeniem rzadko występującym: 2-6:1000 /110/ trudno wnioskować, dlaczego w tych dwóch przypadkach stwierdzono wpływ elektrostymulacji. Cechą różnicującą te przypadki od pozostałych jest czas trwania choroby. Zmniejszenie podatności płytek na czynniki agregujące pod wpływem elektrostymulacji powierzchniowej wystąpiło u chorych, u których chorobę Bùrgera rozpoznano przed czterema - pięcioma laty. Natomiast brak znamiennych zmian w agregacji stwierdzono u chorych ze znacznie wcześniej rozpoznaną chorobą Bùrgera, bo przed ośmioma - czernastoma laty.



		Kończyna stymulowana		Wnio- stat
		$\bar{x} \pm SD$	% kontroli	
Agregacja płytek krwi / % / n = 9	przed stymulacją /a/	51,9 <sup>±</sup> 9,7		
	bezpośrednio po stymulacji /b/	55,3 <sup>±</sup> 15,0	106,6 <sup>±</sup> 28,9	
	60` po stymulacji /c/	51,3 <sup>±</sup> 23,4	98,9 <sup>±</sup> 45,1	
	średnia różnica bezpośrednio po- przed /b-a/	3,4 <sup>±</sup> 16,7	6,6 <sup>±</sup> 32,2	
	średnia różnica 60` po-przed /c-a/	-0,6 <sup>±</sup> 26,9	-1,1 <sup>±</sup> 51,8	
	-----			
Czas krwawienia /sek/ n = 9	przed stymulacją /a/	149,2 <sup>±</sup> 50,8		
	bezpośrednio po stymulacji /b/	234,6 <sup>±</sup> 111,1	157,2 <sup>±</sup> 74,5	
	60` po stymulacji /c/	286,4 <sup>±</sup> 176,6	192,0 <sup>±</sup> 118,4	
	średnia różnica bezpośrednio po- przed /b-a/	85,4 <sup>±</sup> 76,3	57,2 <sup>±</sup> 51,1	p<0
	średnia różnica 60` po-przed /c-a/	137,2 <sup>±</sup> 157,1	92,0 <sup>±</sup> 105,3	p<0

Tabela IV. Zmiany średnich wartości agregacji płytek krwi oraz cza-  
w kończynie stymulowanej i kontrolnej pod wpływem elekt-  
powierzchniowej u chorych z chorobą Bürgera /pierwsza s





Ryc. 23. Reakcje agregacji płytek we krwi żylniej kończyny badanej i kontrolnej oraz czasu krwawienia w odpowiedzi na elektrostymulację powierzchniową u chorych z chorobą Bürge-  
ra /pierwsza stymulacja/.



c/ u zdrowych ochotników;

Elektrostymulacja powierzchniowa zastosowana u zdrowych ochotników, u których nie stwierdzono zaburzeń krążenia obwodowego powodowała spadek podatności płytek krwi na czynnik agregujący i wydłużenie czasu krwawienia zarówno w kończynie badanej jak i kontrolnej. Hamowanie agregacji płytek krwi i wydłużenie czasu krwawienia obserwowano bezpośrednio po stymulacji i w godzinę po jej zakończeniu /Tabela V, ryc. 24/.

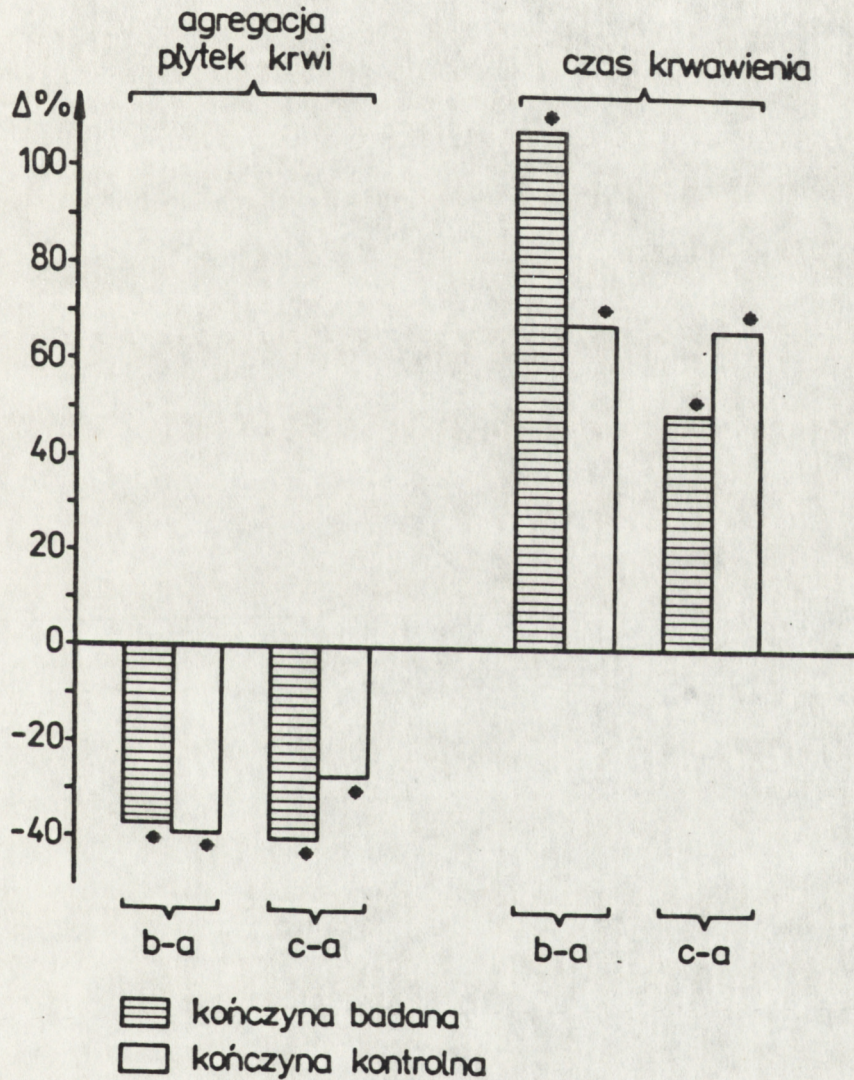
Hamowanie agregacji płytek we krwi kończyny badanej bezpośrednio po zakończeniu stymulacji u zdrowych ochotników jest cechą różnicującą wyniki tej grupy od wyników uzyskanych u chorych z chorobą lub zespołem Raynauda /Część II pkt 1a/.

d/ próba ślepa;

W celu wyeliminowania wpływu czynnika subiektywnego na wyniki, przeprowadzono próbę ślepa polegającą na wykonaniu u osób badanych pozorowanej elektrostymulacji powierzchniowej.

Badania wykonano u 10 osób /5 zdrowych ochotników i 5 chorych z chorobą Raynauda/. Dobór osób do badań wynikał z poprzednich ustaleń, że właśnie u zdrowych ochotników i w chorobie Raynauda dochodzi do hamowania agregacji płytek krwi i wydłużenia czasu krwawienia pod wpływem elektrostymulacji. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że pozorowana elektrostymulacja powierzchniowa /brak bodźca elektrycznego/ nie wywołuje znamienych zmian podatności





Ryc. 24. Hamowanie agregacji i wydłużenie czasu krwawienia w odpowiedzi na elektrostymulację powierzchniową w grupie kontrolnej /zdrowi ochotnicy, n=10/.



	Etapy doświadczenia	Kończyna stymulowana		
		$\bar{x} \pm SD$	% kontrolny	Wni sta
Agregacja płytek krwi / % / n = 10	przed stymulacją /a/	70,9 $\pm$ 13,9		
	bezpośrednio po stymulacji /b/	44,8 $\pm$ 22,7	63,2 $\pm$ 32,1	
	60' po stymulacji /c/	42,2 $\pm$ 20,6	59,5 $\pm$ 29,0	
	średnia różnica bezpośrednio po-przed /b-a/	-26,1 $\pm$ 20,0	-36,8 $\pm$ 28,2	p<0,
	średnia różnica 60' po-przed /c-a/	-28,7 $\pm$ 23,8	-40,5 $\pm$ 33,6	p<0,
	=====			
Czas krwawienia /sek/ n = 10	przed stymulacją /a/	224,8 $\pm$ 72,2		
	bezpośrednio po stymulacji /b/	469,1 $\pm$ 153,7	208,7 $\pm$ 68,4	
	60' po stymulacji /c/	336,0 $\pm$ 142,5	149,5 $\pm$ 63,4	
	średnia różnica bezpośrednio po-przed /b-a/	244,3 $\pm$ 128,4	108,7 $\pm$ 57,1	p<0,
	średnia różnica 60' po-przed /c-a/	111,2 $\pm$ 97,2	49,5 $\pm$ 43,3	p<0,

Tabela V. Zmiany średnich wartości agregacji płytek we krwi żyłnej i kontrolnej oraz czasu krwawienia pod wpływem elektrosymulacji powierzchniowej u zdrowych ochotników.



platek krwi na ADP oraz ~~czas~~ krwawienia. Oznacza to, że pomimo poinformowania chorych o korzystnym wpływie elektrostymulacji na agregację płytek krwi, czynnik psychologiczny w tej metodzie jako wspomagającej w leczeniu, nie wpływa na uwalnianie do krążenia substancji dezagregującej płytki krwi.

2. Wpływ długotrwałego stosowania elektrostymulacji powierzchniowej na agregację płytek krwi i czas krwawienia u chorych z zaburzeniami krążenia obwodowego.

Z danych literaturowych wynika, że przy stosowaniu długotrwałych, ciągłych infuzji egzogennych prostanoidów o właściwościach dezagregujących w konsekwencji podatność płytek krwi na czynniki agregujące wzrasta /9, 24, 137/. W celu sprawdzenia wpływu długotrwałego stosowania stymulacji wykonano testy agregacji u chorych, którzy tę metodę jako wspomagającą w leczeniu, stosowali przez okres od jednego do dwóch lat.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono zmniejszenie wyjściowej, przed stymulacją podatności na czynniki agregujące /średnio 40% agregacji/ w porównaniu z chorymi, którzy dopiero zaczęli stosować stymulację /średnio 65 % agregacji krwinek płytkowych przy tym samym stężeniu ADP/. Zmniejszenie podatności płytek krwi na czynniki agregujące wiąże się z ograniczeniem powstawania zakrzepów śródnaczyniowych, towarzyszących chorobom krążenia obwodowego i dlatego jest zjawiskiem korzystnym klinicznie. Zaobserwowany wzrost podatności płytek na czynnik agregujący godzinę po zakończeniu stymulacji we krwi kończyny badanej dotyczy tylko I fazy agregacji wywołanej



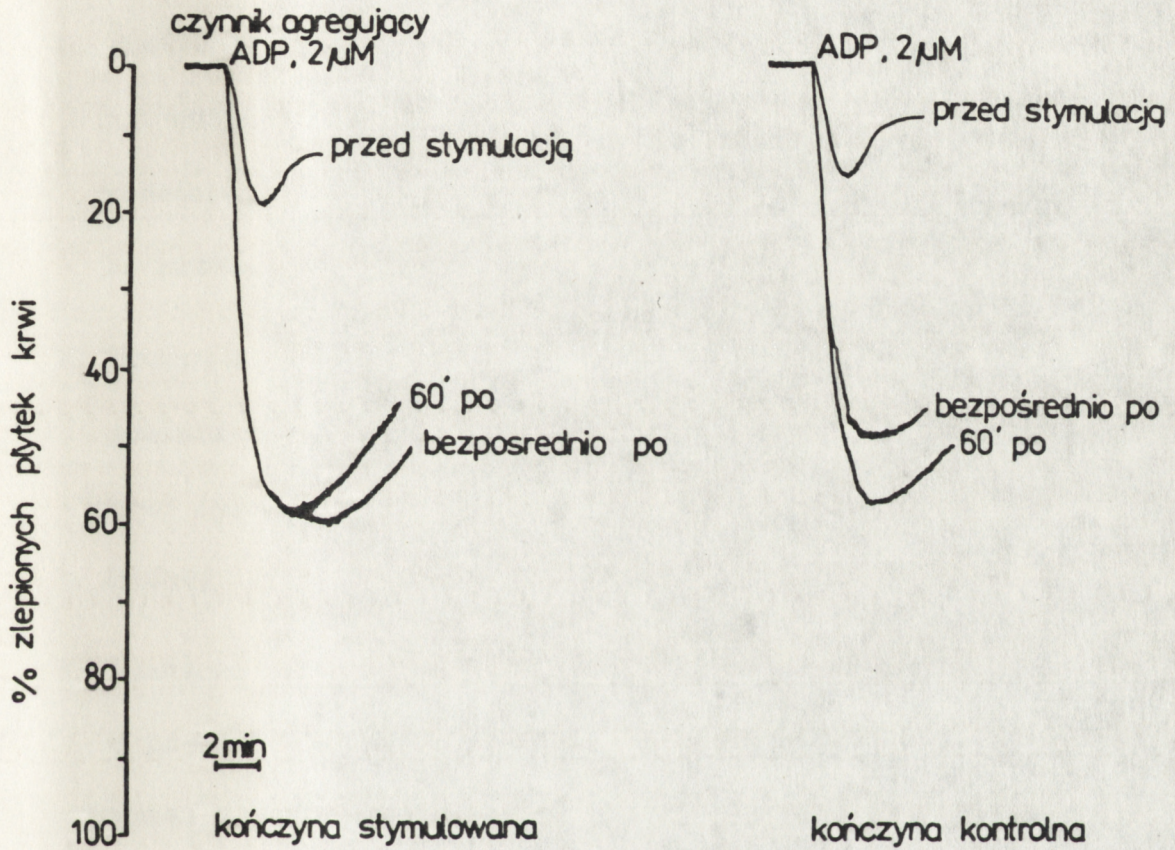
egzogennym ADP. Jednocześnie występuje bardzo silne hamowanie "reakcji uwalniania" endogennych, płytkowych czynników agregujących. Nawet kilkakrotne zwiększenie stężenia ADP nie wywołuje II fazy agregacji. Obserwowane wydłużenie czasu krwawienia prawdopodobnie wiąże się ze zjawiskiem hamowania "reakcji uwalniania". Ryc. 25, Tabela VI, ryc. 26.



	Etapy doświadczenia	Kończyna stymulowana		
		$\bar{x} \pm SD$	%kontroli	Wnio sta
Agregacja płytek krwi / % / n = 11	przed stymulacją /a/	40,5 <sup>±</sup> 19,6		
	bezpośrednio po stymulacji /b/	43,8 <sup>±</sup> 19,7	108,1 <sup>±</sup> 48,6	
	60` po stymulacji /c/	61,5 <sup>±</sup> 21,5	151,9 <sup>±</sup> 53,1	
	średnia różnica bezpośrednio po- przed /b-a/	3,3 <sup>±</sup> 34,3	8,1 <sup>±</sup> 84,6	
	średnia różnica 60` po-przed /c-a/	21,0 <sup>±</sup> 24,2	51,9 <sup>±</sup> 59,7	p<0
	-----			
Czas krwawienia /sek/ n = 11	przed stymulacją /a/	272,0 <sup>±</sup> 109,9		
	bezpośrednio po stymulacji /b/	337,6 <sup>±</sup> 117,1	124,1 <sup>±</sup> 43,1	
	60` po stymulacji /c/	424,0 <sup>±</sup> 203,7	155,9 <sup>±</sup> 74,9	
	średnia różnica bezpośrednio po- przed /b-a/	65,6 <sup>±</sup> 68,6	24,1 <sup>±</sup> 25,2	p<0
	średnia różnica 60` po-przed/c-a/	152,0 <sup>±</sup> 188,8	55,9 <sup>±</sup> 69,4	p<0

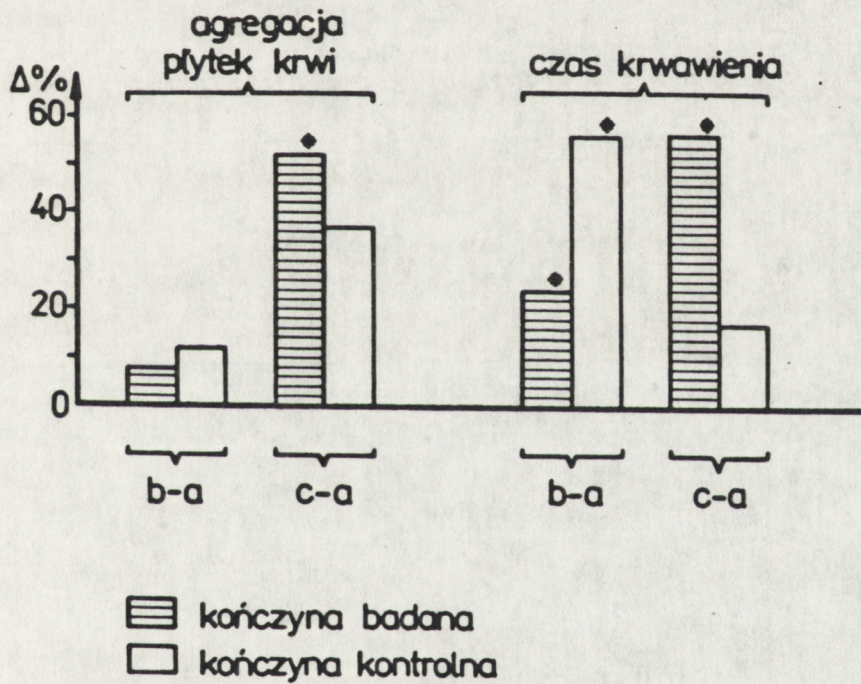
Tabela VI. Zmiany średnich wartości agregacji krwinek płytkowych kończyny badanej i kontrolnej oraz czasu krwawienia stosowali elektrostymulację powierzchniową przez okno do dwóch lat.





Ryc. 25. Wpływ długotrwałego stosowania elektrostymulacji powierzchniowej na zmiany agregacji krwinek płytkowych we krwi żyłnej kończyny stymulowanej i kończyny kontrolnej. Na wykresach widoczny jest wzrost I fazy agregacji wywołanej egzogennym ADP pod wpływem stymulacji przy jednoczesnym braku II fazy /hamowanie "reakcji uwalniania"/. p. Z.Sz., lat 34.





Ryc. 26. Zmiany agregacji płytek we krwi żyłnej kończyny badanej i kontrolnej oraz czasu krwawienia w odpowiedzi na długotrwałe stosowanie elektrostymulacji powierzchniowej u chorych z zaburzeniami krążenia obwodowego.



Podsumowanie wyników / Część II/  
-----

1. Elektrostymulacja powierzchniowa stosowana u chorych z chorobą lub zespołem Raynauda i u zdrowych ochotników powoduje spadek podatności płytek krwi na czynnik agregujący oraz wydłużenie czasu krwawienia.
2. Hamowanie agregacji płytek krwi pod wpływem elektrostymulacji powierzchniowej jest reakcją systemową; występuje nie tylko we krwi żyłnej kończyny badanej, ale również we krwi kończyny kontrolnej.
3. Elektrostymulacja powierzchniowa nie powoduje znamienych zmian w podatności płytek krwi na czynnik agregujący u chorych w zaawansowanej fazie rozwoju choroby Bürgera.
4. Wydłużenie czasu krwawienia w odpowiedzi na elektrostymulację u chorych na chorobę Bürgera ogranicza się tylko do kończyny badanej, co wskazuje na lokalny mechanizm tej reakcji.
5. Długotrwałe stosowanie elektrostymulacji powierzchniowej /jeden - dwa lata/ prowadzi do zmniejszenia wyjściowej /przed stymulacją/ podatności płytek na czynnik agregujący w porównaniu z wartościami uzyskiwanymi u chorych, którzy zaczęli stosować tę metodę.
6. Pod wpływem długotrwałego, systematycznego stosowania stymulacji u chorych z zaburzeniami krążenia obwodowego dochodzi do wzrostu podatności płytek krwi na egzogenny czynnik agregujący przy



jednoczesnym hamowaniu "reakcji uwalniania" endogennych, płytkowych czynników agregujących.

7. Elektrostymulacja placebo nie wpływa na zmiany agregacji płytek krwi i czas krwawienia u ludzi zdrowych i u chorych z chorobą Raynauda.



## D Y S K U S J A

Podsumowując wyniki uzyskane z badań eksperymentalnych na zwierzętach /Wyniki - Część I/ można stwierdzić, że pod wpływem bezpośredniej elektrostymulacji nerwów wegetatywnych jak i elektrostymulacji powierzchniowej kończyn wydzielane są do krążenia prostanoidy o właściwościach dezagregujących płytki krwi, trwalsze od syntetycznej prostacykliny. Poza hamowaniem agregacji krwinek płytkowych powodują wzrost całkowitego przepływu krwi przez stymulowaną kończynę i niewielki spadek ciśnienia systemowego. Reakcje zmian przepływu i ciśnienia zależą od częstości stosowanych impulsów stymulujących.

Stosowanie elektrostymulacji powierzchniowej u ludzi również prowadzi do zmian agregacji płytek krwi. Wyniki otrzymane z badań klinicznych /Część II/ wykazały, że elektrostymulacja powierzchniowa stosowana u chorych z chorobą lub zespołem Raynauda i u zdrowych ochotników powoduje spadek podatności płytek krwi na czynnik agregujący oraz wydłużenie czasu krwawienia.

Obserwowany bezpośrednio po stymulacji brak statystycznie znamiennych zmian w agregacji płytek krwi w kończynie badanej u chorych na chorobę Raynauda może być następstwem jednoczesnego działania dwóch mechanizmów:

- 1/ elektrostymulacja powierzchniowa wywołuje hamowanie agregacji płytek krwi;



2/ obniżona temperatura /utrata ciepła spowodowana utrzymaniem dłoni w jednej pozycji na zwilżonej solą fizjologiczną elektrodzie przez 40 minut stymulacji/ jako bodziec naczynioskurczowy w chorobie Raynauda przyczynia się bezpośrednio do tworzenia agregatów płytkowych.

Prawdopodobnie dlatego efekt hamowania agregacji płytek bezpośrednio po stymulacji u osób chorych jest widoczny tylko w kończynie kontrolnej. Natomiast wyraźnie zaznaczony w obydwu kończynach  $p < 0,001$  godzinę po zakończeniu stymulacji.

U zdrowych ochotników przeciwnie niż w chorobie Raynauda, niewielka utrata ciepła dłoni podczas stymulacji nie wpływa na reakcję hamowania agregacji wywołaną elektrostymulacją. Systemowy, a nie lokalny charakter reakcji hamowania agregacji wskazuje na to, że mechanizm wydzielania substancji dezagregującej płytki krwi pod wpływem elektrostymulacji nie jest związany z pracą mięśniową kończyny stymulowanej.

Niejednorodność wyników zmian agregacji i czasu krwawienia otrzymanych w grupie chorych na chorobę Błrgera wskazuje na konieczność przeprowadzania badań wstępnych, w celu indywidualnego doboru pacjentów do elektrostymulacji powierzchniowej jako metody wspomagającej w leczeniu. Prawdopodobnie stymulacja stosowana we wczesnej fazie rozwoju choroby Błrgera wywołuje hamowanie agregacji płytek krwi. W większości przypadków jednak choroba Błrgera ma charakter postępujący, doprowadzając do zamknięcia



tętnicy i powstania martwicy /110/. Brak reakcji hamowania agregacji płytek krwi oznacza, że mechanizm wydzielania dezagregujących prostanoidów pod wpływem elektrostymulacji, w późnej fazie rozwoju choroby Bùrgera ulega zniszczeniu. W związku z tym metoda elektrostymulacji powierzchniowej może być stosowana tylko w tych przypadkach, w których prowadzi do hamowania agregacji płytek.

U chorych z chorobą lub zespołem Raynauda podobnie jak u osób zdrowych, mechanizm uwalniania substancji dezagregujących jest zachowany. Zmniejszenie podatności płytek krwi na czynniki agregujące pod wpływem elektrostymulacji w chorobie Raynauda jest zjawiskiem korzystnym. Ogranicza powstawanie zakrzepów śródnaczyniowych, które towarzyszą często powtarzającym się i długotrwałym napadom zaburzeń naczynioruchowych. Wydzielona lub wydzielone do krążenia pod wpływem elektrostymulacji substancje dezagregujące płytki krwi mogą przyczyniać się do rozpuszczania już powstałych zakrzepów płytkowych, blokujących drobne naczynia obwodowe. Natomiast u ludzi zdrowych, gdzie nie stwierdza się zmian w naczyniach obwodowych i nadmiernej agregacji krwinek płytkowych, stosowanie elektrostymulacji powierzchniowej może prowadzić do zbyt dużego, fizjologicznie nieuzasadnionego wydzielania substancji dezagregujących płytki.

Kliniczne uzasadnienie stosowania elektrostymulacji powierzchniowej we wczesnej fazie rozwoju choroby Bùrgera wymaga dalszych badań. Dwa przypadki pozytywnej reakcji na elektrostymulację u chorych, u których chorobę rozpoznano zaledwie 4-5 lat temu, nie stanowią grupy reprezentatywnej.



Warto zastanowić się nad mechanizmem wydzielania dezagregujących prostanoidów pod wpływem elektrostymulacji powierzchniowej. Wielu autorów wskazuje na istnienie zależności między prostaglandynami typu E i przewodnictwem w nerwach sympatycznych.

Stwierdzono, że stymulacja nerwów sympatycznych prowadzi do wzrostu syntezy i uwalniania do krwi PGE. Prostaglandyny typu E hamują uwalnianie noradrenaliny w odpowiedzi na stymulację /33,90,104/.

Stjörne i Greenberg sugerują, że prostaglandyny uwalniane są z zakończeń nerwowych. Natomiast Gilmore i wsp. oraz Hedqvist uważają, że uwalniane są z kurczących się pod wpływem elektrostymulacji mięśni. Fakt, że elektrostymulacja nerwów sympatycznych wywołuje uwalnianie PG również wtedy, kiedy możliwość skurczu mięśni jest zahamowana np.: przez podanie  $\alpha$ -bloкера wskazuje, że miejscem uwalniania prostaglandyn pod wpływem stymulacji są zakończenia nerwowe /26,85,102/.

Prostaglandyny typu E działają głównie presynaptycznie prowadząc na zasadzie sprzężenia zwrotnego do redukcji uwalniania transmittera adrenergicznego. Natomiast prostacyklina działa postsynaptycznie hamując skurcz naczyniowy wywołany noradrenaliną /70,136/.

Stymulacja nerwów adrenergicznych poza wzrostem uwalniania  $\text{PGI}_2$  i  $\text{PGE}_2$  prowadzi do znamiennej redukcji uwalniania  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , która wywołuje skurcz naczyń.  $\text{PGF}_{2\alpha}$  powoduje również zmniejszenie uwalniania acetylocholinoz z zakończeń cholinergiczych. Obniżony wyrzut  $\text{PGF}_{2\alpha}$  podczas stymulacji może przyczyniać się do redukcji skurczu naczyń /104/.



Wyniki badań wykazują, że sympatyczny układ nerwowy może kontrolować uwalnianie  $\text{PGI}_2$  i innych prostaglandyn z naczyń krwionośnych /104/.

Güllner uważa, że prostaglandyny hamują uwalnianie i transmisję adrenergiczną tylko *in vitro*. W badaniach *in vivo*, u zdrowych ochotników działają jako agoniści układu sympatycznego. W nienaruszonym organizmie indometacyna obniża, a nie podnosi poziom katecholamin w osoczu. Wg. Güllnera fizjologiczne znaczenie prostaglandyn *in vitro* polega na ograniczaniu uwalniania transmittera tylko w stanach podwyższonej aktywności nerwów sympatycznych /41, 42, 43, 44/.

Inne badania wykazały, że stymulacja nerwów sympatycznych i krążące katecholaminy mogą pobudzać wyrzut  $\text{PGI}_2$  z naczyń krwionośnych i odgrywać ważną rolę w fizjologicznej kontroli wzajemnego oddziaływania  $\text{PGI}_2$  - płytki krwi /104/.

Powszechnie uważa się, że biosynteza endogennych prostaglandyn związana jest ze stymulacją receptorów  $\alpha$ -adrenergicznych.

Levine i Moskowitz udokumentowali, że uwalnianie prostaglandyn pod wpływem noradrenaliny jest hamowane przez wiele  $\alpha$ -blokerów /12/.

Czy wydzielanie dezagregujących prostanoidów pod wpływem elektrostymulacji powierzchniowej również odbywa się na drodze pobudzenia receptorów  $\alpha$ ?. Wyniki doświadczeń z fentolaminą /bloker pre- i postsynaptycznych receptorów  $\alpha$ -adrenergicznych/ przeczą takiej



koncepcji. Podanie  $\omega$ -bloкера nie tylko, że nie zahamowało reakcji dezagregacji płytek krwi pod wpływem stymulacji, ale jeszcze ją wzmocniło /rozdział Wyniki, Część I/. Stosowana w tej pracy elektrostymulacja wysokoczęstotliwościowa pobudza głównie włókna mielinowe z grupy A i B mające krótki okres bezwzględnej niepobudliwości /refrakcji/ oraz dodatkowo włókna bezmielinowe z grupy C /adrenergiczne/ w czasie ich wrażliwości na bodziec.

Mediatorami uwalnianymi na zakończeniach włókien mielinowych jest acetylocholina, na zakończeniach włókien bezmielinowych - noradrenalina. Beetens i wsp. /5/ wykazali istnienie wzajemnego oddziaływania między transmiterem cholinergicznym i komórkami endotelium prowadzące do produkcji naczynioaktywnych substancji np.: prostacykliny. Gryglewski stwierdził, że dożylnie wstrzyknięcie acetylocholiny lub metacholiny powoduje dezagregację zlepow płytkowych we krwi tętniczej porównywalną do dezagregacji spowodowanej dożylnym wstrzyknięciem  $\text{PGI}_2$ . Uprzednie podanie zwierzętom atropiny lub aspiryny znosiło dezagregację wywołaną metacholiną. Prostanoidy uwalniane pod wpływem metacholiny są trwalsze od syntetycznej prostacykliny. Uwalnianie prostanoidów dezagregujących pod wpływem metacholiny było znoszone przez lignokainę co sugeruje, że mogą one pośredniczyć w naczyniorozkurczowym działaniu acetylocholiny /40/. Poza acetylocholiną również histamina, bradykinina i serotonina stymulują syntezę prostacykliny przez izolowane naczynia /3, 11, 36, 74/.



Opierając się o powyżej przedstawione dane można podjąć próbę wy tłumaczenia, dlaczego  $\alpha$ -bloker wzmacnia efekt stymulacji prowadząc do wzrostu wydzielania dezagregujących prostanoidów. Fentolamina zwiększa uwalnianie noradrenaliny w odpowiedzi na impuls, ponieważ zahamowany zostaje mechanizm zwrotnego jej pobierania przez neuron adrenergiczny. Noradrenalina działając na presynaptyczny receptor  $\beta$  w zakończeniach cholinergicznym zwiększa proces uwalniania acetylocholiny /2/, która z kolei może pobudzać syntezę dezagregujących prostanoidów.

Porównując wyniki otrzymane w badaniach *in vivo* i *in vitro* /Wyniki, Część I/ stwierdzono rozbieżność dotyczącą momentu pojawienia się aktywności prostanoidów dezagregujących. W badaniach *in vivo* uwalnianie substancji o właściwościach dezagregujących rejestrowano już w trakcie stosowania stymulacji oraz po jej zakończeniu. Natomiast *in vitro* największe hamowanie agregacji stwierdzono godzinę po zakończeniu stymulacji.

Możliwe, że w trakcie stymulacji wydzielają się do krążenia nietrwałe prostanoidy dezagregujące, których aktywność można zarejestrować tylko w badaniach przeprowadzanych *in vivo*. Natomiast podczas przygotowywania surowicy do oznaczeń agregacji *in vitro* ulegają one rozkładowi, a hamowanie agregacji powodują ich pochodne, powstałe w wyniku biotransformacji do trwałych i biologicznie aktywnych prostanoidów /np.: biotransformacja  $PGI_2$  może prowadzić do trwałej i aktywnej 6-oxo-PGE<sub>1</sub>//40/. Możliwość taką potwierdzają wyniki badań czasu



krwawienia, który wzrasta zarówno po wyłączeniu stymulacji jak i godzinę później. Obserwowane in vitro największe hamowanie agregacji godzinę po zakończeniu stymulacji, a nie w trakcie lub bezpośrednio po jej zakończeniu można wytłumaczyć następująco.

Podczas elektrostymulacji powierzchniowej bodziec elektryczny pobudzać może różne rodzaje nerwów przebiegających w stymulowanej kończynie. W tej sytuacji mechanizm powodujący uwolnienie dezagregujących prostanoidów w trakcie stymulacji może być równoważony przez włączenie innych mechanizmów, będących naturalną przeciwwagą do ich uwalniania.

Wyniki badań Kaady i wsp. /59, 60/ nad mechanizmem działania elektrostymulacji powierzchniowej są niezgodne z wynikami przedstawionymi w tej pracy. Podanie blokera syntezy prostaglandyn nie znosi naczyniorozkurczowego efektu stymulacji niskoczęstotliwościowej /2-5 imp/s /. Oznacza to, że stymulacja stosowana przez Kaadę i wsp. nie powoduje wydzielania naczynioaktywnych prostanoidów.

Niezgodność ta wynika prawdopodobnie z różnic metodologicznych, głównie ze stosowania różnych częstości impulsów stymulujących i w związku z tym uruchamiania innych mechanizmów nerwowych /75/.

Wyniki Hughes'a i wsp. /50/ sugerują, że niskoczęstotliwościowa stymulacja działa przez uwalnianie  $\beta$ -ednorfin, podczas gdy stymulacja wysokoczęstotliwościowa działa przez inne, dotąd nieznanne, mechanizmy.

Leandri i wsp. badając różne rodzaje elektrostymulacji powierzchniowej /różne elektrody, częstotliwość, natężenie/ powodujące



włókien nerwowych.

Utrzymujący się nieznaczny spadek ciśnienia systemowego pod wpływem wysokoczęstotliwościowej stymulacji u zwierząt spontanicznie odychających zgodny jest z wynikami Kaady, który obserwował to zjawisko u chorych z zaburzeniami krążenia obwodowego pod wpływem elektrostymulacji niskoczęstotliwościowej /62/.

W mechanizmie działania stymulacji niskoczęstotliwościowej prostanoidy prawdopodobnie również odgrywają rolę. Kaada zauważył /58/, że stosowanie niskoczęstotliwościowej stymulacji jest z nieznanych przyczyn, przejściowo /przez kilka dni/ nieskuteczne u pacjentów, którzy jednocześnie chorowali na grypę lub byli przeziębieni. Można sugerować następujące wyjaśnienie tego zjawiska. Przy tego typu chorobach podaje się aspirynę, która jak wiadomo blokuje syntezę prostanoidów. W związku z tym przyjmowanie aspiryny mogło być przyczyną nieskuteczności działania elektrostymulacji powierzchniowej u tych chorych. Może stosowane przez Kaadę stężenie antagonisty prostaglandyn było zbyt niskie /indometacyna - 18 mg i, v./, aby całkowicie zahamować ich syntezę.

Na czym polega korzystne klinicznie działanie wysokoczęstotliwościowej elektrostymulacji w chorobie Raynauda?

Wiele jest hipotez na temat fizjopatologii tej choroby. Należą do nich: zwiększone napięcie nerwów sympatycznych, zmiany w tętnicach palców, wzrost stężenia noradrenaliny we krwi żyłnej kończyn, nadwrażliwość postsynaptycznych  $\alpha$ -receptorów, zwiększona lepkość krwi.



włókien nerwowych.

Utrzymujący się nieznaczny spadek ciśnienia systemowego pod wpływem wysokoczęstotliwościowej stymulacji u zwierząt spontanicznie oddychających zgodny jest z wynikami Kaady, który obserwował to zjawisko u chorych z zaburzeniami krążenia obwodowego pod wpływem elektrostymulacji niskoczęstotliwościowej /62/.

W mechanizmie działania stymulacji niskoczęstotliwościowej prostanoidy prawdopodobnie również odgrywają rolę. Kaada zauważył /58/, że stosowanie niskoczęstotliwościowej stymulacji jest z nieznanymi przyczynami, przejściowo /przez kilka dni/ nieskuteczne u pacjentów, którzy jednocześnie chorowali na grypę lub byli przeziębieni. Można sugerować następujące wyjaśnienie tego zjawiska. Przy tego typu chorobach podaje się aspirynę, która jak wiadomo blokuje syntezę prostanoidów. W związku z tym przyjmowanie aspiryny mogło być przyczyną nieskuteczności działania elektrostymulacji powierzchniowej u tych chorych. Może stosowane przez Kaadę stężenie antagonisty prostaglandyn było zbyt niskie /indometacyna - 18 mg i, v./, aby całkowicie zahamować ich syntezę.

Na czym polega korzystne klinicznie działanie wysokoczęstotliwościowej elektrostymulacji w chorobie Raynauda?

Wiele jest hipotez na temat fizjopatologii tej choroby. Należą do nich: zwiększone napięcie nerwów sympatycznych, zmiany w tętnicach palców, wzrost stężenia noradrenaliny we krwi żyłnej kończyn, nadwrażliwość postsynaptycznych  $\alpha$ -receptorów, zwiększona lepkość krwi.



Żadna z nich nie daje satysfakcjonującego wytłumaczenia.

W 1984 r. Brotzu i wsp. /18/ wysunęli nową hipotezę patofizjologii choroby Raynauda, polegającą na nadwrażliwości presynaptycznych  $\beta$ -receptorów. Stwierdzono, że agonista  $\beta$ -receptorów /isoprenalina/ zamiast oczekiwanego efektu naczyniorozkurczowego powoduje skurcz naczyń i redukcję przepływu krwi w kończynach. Stymulacja presynaptycznych  $\beta$ -receptorów wywołuje znamieny wzrost uwalniania noradrenaliny /NA/ u chorych na chorobę Raynauda, co doprowadza do spadku przepływu i wystąpienia ataków skurczu naczyń. U chorych pod wpływem stymulacji  $\beta$ -receptorów przepływ krwi obniżał się o 60 %, podczas gdy u osób zdrowych zmiany były nieistotne statystycznie. Różnica we wrażliwości na agonistę  $\beta$ -receptorów u ludzi chorych i zdrowych wskazuje na to, że objawy choroby Raynauda wywołane są znamienym wzrostem uwalniania NA w wyniku nadwrażliwości presynaptycznych  $\beta$ -receptorów, a nie nadwrażliwością postsynaptycznych  $\alpha$ -receptorów. Hipoteza ta zgodna jest z badaniami Peacocka /101/, który stwierdził wzrost poziomu NA w obwodowej krwi żyłnej u chorych na chorobę Raynauda. Elektrostymulacja niskoczęstotliwościowa i elektroakupunktura powodują obniżenie poziomu noradrenaliny w osoczu chorych /61, 63/. W związku z tym korzystne działanie elektrostymulacji powierzchniowej prawdopodobnie polega na hamowaniu układu sympatycznego. Hipoteza Brotzu i wsp. /18/ o nadwrażliwości presynaptycznych  $\beta$ -receptorów jako czynnika patogenego sugeruje nowe możliwości terapeutyczne w chorobie Raynauda.



Polegałyby one na blokowaniu presynaptycznych  $\beta$  - receptorów, lub stymulacji presynaptycznych  $\alpha_2$ -receptorów, lub receptorów syntezy prostaglandyn.

Wyniki przedstawionej przeze mnie pracy wskazują, że wysokoczęstotliwościowa elektrostymulacja powierzchniowa powoduje uwolnienie do krążenia prostanoidów dezagregujących, trwalszych od syntetycznej prostacykliny.

Na podstawie badań z zastosowaniem dazoxibenu, inhibitora syntezy tromboksanu  $A_2$  /TXA<sub>2</sub>/ stwierdzono, że TXA<sub>2</sub> nie jest odpowiedzialny za wywołanie ataków skurczu naczyń występujących w przebiegu choroby Raynauda /7, 21, 55, 78/. Brak wpływu dazoxibenu na wystąpienie objawu Raynauda pod wpływem zimna nie podważa roli TXA<sub>2</sub> w tworzeniu zakrzepów śródnaczyniowych. Podniesiony poziom noradrenaliny, wzrost podatności płytek krwi na agregację pod wpływem adrenaliny, wzmożona produkcja tromboksanu  $A_2$  przez płytki, zaburzenia przepływu i wzrost lepkości krwi stwierdzone w chorobie Raynauda przyczyniają się do powstawania zakrzepowych powikłań. Poza tym prekursorzy tromboksanu  $A_2$ , prostaglandyny PGG<sub>2</sub> i PGH<sub>2</sub> mogą również wywoływać agregację płytek krwi bez przechodzenia do TXA<sub>2</sub> /78/.

W związku z tym zdolność prostanoidu uwalnianego pod wpływem wysokoczęstotliwościowej stymulacji do hamowania agregacji płytek i rozpuszczania już powstałych zakrzepów płytkowych wskazuje na przydatność elektrostymulacji powierzchniowej jako metody wspomagającej w leczeniu choroby Raynauda.



Mechanizmem regulującym wytwarzanie i uwalnianie prostanoidów dezagregujących w przypadku stosowania wysokoczęstotliwościowej ESP jest prawdopodobnie stymulacja cholinergiczna. Możliwe, że uwalniane pod wpływem ESP prostanoidy działają na zakończenia adrenergiczne i hamują uwalnianie noradrenaliny. Hipoteza ta zgodna jest z wynikami Stjörne'a i Brundina, że wydzielanie NA pod wpływem pobudzenia  $\beta$ -receptorów może być antagonizowane przez endogenne prostaglandyny /117/.

Wpływ elektrostymulacji wysokoczęstotliwościowej na hamowanie układu sympatycznego mogące przejawiać się między innymi w obniżeniu poziomu noradrenaliny we krwi żyłnej powracającej z kończyn u osób z chorobą Raynauda wymaga dalszych badań. Interesujące jest również, jak i czy w ogóle ESP wpływa na zaburzoną w tej jednostce chorobowej zdolność erytrocytów do odkształceń. Czy wydzielona pod wpływem elektrostymulacji substancja dezagregująca płytki krwi działa podobnie do prostacykliny i poprawia ich plastyczność przyczyniając się w ten sposób do lepszego zaopatrzenia tkanek?

Na obecnym etapie badań można stwierdzić, że mechanizm działania elektrostymulacji powierzchniowej odpowiedzialny za obserwowane korzystne efekty kliniczne stosowania tej metody w schorzeniach krążenia obwodowego, polega na uwalnianiu do krążenia prostanoidów o właściwościach dezagregujących płytki krwi, trwalszych od syntetycznej prostacykliny. Fizjologiczne działanie tych substancji poz-



wala na modyfikację zachwianej w przebiegu chorób krążenia obwodowego równowagi między formowaniem substancji anty- i proagregacyjnych. Tym samym może ograniczać powstawanie nowych i "rozpuszczać" już powstałe zakrzepy śródnaczyniowe.

W przeciwieństwie do metody farmakologicznej, polegającej na infuzji naczynioaktywnych i dezagregujących krwinki płytkowe prostanoidów, elektrostymulacja powierzchniowa jest metodą nieinwazyjną, łatwą do zastosowania przez samego chorego i nie wywołuje skutków ubocznych. Poza tym uruchamia naturalne, endogenne mechanizmy regulujące wewnątrznaczyniową homeostazę.



## W N I O S K I

1. Bezpośrednia elektrostymulacja nerwów wegetatywnych u kotów oraz elektrostymulacja powierzchniowa u ludzi i kotów powoduje uwolnienie do krążenia prostanoidu /prostanoidów/ o właściwościach dezagregujących płytki krwi, trwalszego od syntetycznej prostacykliny.
2. Pod wpływem elektrostymulacji powierzchniowej wzrasta całkowity przepływ krwi w kończynie stymulowanej u kotów przy jednoczesnym, niewielkim spadku systemowego ciśnienia krwi. Za zmiany tych parametrów odpowiedzialny jest prostanoid /prostanoidy/, którego aktywność ogranicza się tylko do czasu trwania stymulacji.
3. Zmiany przepływu całkowitego w kończynie badanej oraz systemowego ciśnienia krwi u kotów porażonych, wentylowanych sztucznie występują tylko podczas stosowania wysokich częstości impulsów stymulujących /75-100 Hz/.
4. Elektrostymulacja powierzchniowa powoduje spadek podatności płytek krwi na czynnik agregujący oraz wydłużenie czasu krwawienia u ludzi zdrowych i u chorych z chorobą lub objawem Raynauda. Reakcje te mają charakter systemowy.
5. Elektrostymulacja powierzchniowa nie powoduje znamienych zmian w podatności płytek krwi na czynnik agregujący u chorych z chorobą Bùrgera.
6. Długotrwałe stosowanie elektrostymulacji powierzchniowej /jeden - - dwa lata/ prowadzi do zmniejszenia podatności płytek krwi na



czynnik agregujący w porównaniu z wartościami uzyskanymi u  
chorych, którzy dopiero zaczęli stosować tę metodę.



## STRESZCZENIE

Infuzja naczynioaktywnych prostanoidów oraz bezpośrednia lub przezskórna elektrostymulacja nerwów zaopatrujących naczynia są nowymi metodami leczenia chorób krążenia obwodowego. Stosowanie każdej z nich powoduje wzrost temperatury badanego obszaru ciała, związany z poprawą ukrwienia, gojenie owrzodzeń niedokrwiennych oraz zmniejszenie częstotliwości występowania stanów kurczowych tętniczek.

Działanie naczynioaktywnych prostanoidów zostało w dużej mierze poznane. Natomiast mechanizm poprawy krążenia pod wpływem elektrostymulacji jest w dalszym ciągu nieznany. Podobne efekty kliniczne obserwowane w następstwie stosowania infuzji naczynioaktywnych prostanoidów i metody elektrostymulacji powierzchniowej nasunęły przypuszczenie, że pod wpływem stymulacji wydzielane są do krążenia substancje, mogące mieć działanie terapeutyczne w chorobach krążenia obwodowego.

Celem pracy było wyjaśnienie mechanizmu działania elektrostymulacji powierzchniowej, odpowiedzialnego za obserwowane efekty kliniczne.

Badania prowadzono przy zastosowaniu:

- metody biologicznej, służącej do wykrywania w krążącej krwi substancji biologicznie czynnych *in vivo*;
- metody Borna do badań zmian agregacji płytek krwi *in vitro*.

Przed przystąpieniem do określenia wpływu elektrostymulacji powierzchniowej na zmiany agregacji płytek krwi u zwierząt doświadczalnych wykonano badania mające na celu określenie wpływu



elektrostymulacji nerwów wegetatywnych na wyżej wymienione zjawiska.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że zarówno bezpośrednia elektrostymulacja nerwów wegetatywnych jak i elektrostymulacja powierzchniowa tylnej kończyny kota powodują uwolnienie do krążenia substancji o właściwościach dezagregujących płytki krwi.

Substancja /substancje/ ta nie ulega inaktywacji w krążeniu płucnym.

Na podstawie faktu, że podanie inhibitorów syntezy prostaglandyn hamuje reakcję dezagregacji płytek krwi wywnioskowano, że uwolniona pod wpływem elektrostymulacji substancja /substancje/ jest prostanoidem.

Wyniki badań z zastosowaniem opóźnienia między momentem uwolnienia a bezpośrednim zadziałaniem substancji dezagregującej na płytki wykazały, że prostanoidy uwalniane pod wpływem stymulacji są trwalsze od syntetycznej prostacykliny.

Wyniki doświadczeń przy użyciu metody Borna przeprowadzone u kotów oddychających spontanicznie i u kotów porażonych, wentylowanych sztucznie potwierdziły wyniki otrzymane przy zastosowaniu metody biologicznej. Pod wpływem elektrostymulacji powierzchniowej wydzielana jest do krążenia substancja /substancje/ hamująca agregację płytek krwi. Zmniejszenie podatności płytek na czynnik agregujący występowało zarówno we krwi żyłnej jak i tętniczej.

W celu sprawdzenia, czy uwalniany pod wpływem elektrostymulacji powierzchniowej dezagregujący prostanoid jest również czynnikiem naczyniorozszerzającym badano wpływ stymulacji na zmiany przepływu całkowitego w tylnej kończynie u kotów. Przepływ krwi mierzono przy pomocy przepływomierza elektromagnetycznego, połą-



czonego z głowicą umieszczoną na tętnicy udowej stymulowanej kończyny. Pomiaru wykonano u zwierząt oddychających spontanicznie oraz w celu wyeliminowania wpływu pracy mięśniowej u zwierząt porażonych, wentylowanych sztucznie.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że pod wpływem działania elektrostymulacji powierzchniowej wzrasta całkowity przepływ krwi w kończynie zwierzęcia przy jednoczesnym, niewielkim spadku systemowego ciśnienia krwi. Stwierdzono, że za wzrost przepływu całkowitego w kończynie i spadek systemowego ciśnienia krwi u kotów porażonych, wentylowanych sztucznie odpowiedzialna jest substancja, której pojawienie jest blokowane przez inhibitory syntezy prostaglandyn.

U zwierząt spontanicznie oddychających podczas stosowania dużej intensywności stymulacji /powodującej skurcze mięśni/ wzrost całkowitego przepływu krwi w kończynie był efektem nałożenia się dwóch mechanizmów prowadzących do rozszerzenia naczyń, działania naczynioaktywnych prostanoidów /co stwierdzono u zwierząt porażonych/ oraz aktywności metabolitów pracy mięśniowej.

Reakcje przepływu całkowitego w stymulowanej kończynie oraz ciśnienia systemowego krwi u zwierząt porażonych, wentylowanych sztucznie zależały od częstości impulsów stymulujących. Obserwowano je tylko podczas stosowania wysokich częstości impulsów stymulujących rzędu 75-100 imp/sek.

Następnym etapem badań było sprawdzenie, czy elektrostymulacja powierzchniowa hamuje agregację płytek krwi również u ludzi. Badania przeprowadzono w następujących grupach:



a/ u chorych z chorobą Raynauda /16 osób/;

Elektrostymulacja powierzchniowa u chorych z chorobą Raynauda prowadziła do spadku podatności krwinek płytkowych na czynnik agregujący i wydłużenia czasu krwawienia. Reakcja hamowania agregacji była systemowa i występowała zarówno we krwi kończyny stymulowanej jak i we krwi kończyny kontrolnej.

b/ u chorych z chorobą Bùrgera /9 osób/;

Badania przeprowadzone u chorych z chorobą Bùrgera wykazały brak wpływu elektrostymulacji powierzchniowej na agregację płytek krwi.

c/ u zdrowych ochotników /grupa kontrolna - 10 osób/;

Elektrostymulacja powierzchniowa zastosowana u zdrowych ochotników, u których nie stwierdzono zaburzeń krążenia obwodowego powodowała spadek podatności płytek krwi na czynnik agregujący i wydłużenie czasu krwawienia.

d/ próba ślepa /10 osób/;

Próba ślepa polegająca na wykonaniu u osób badanych pozorowanej elektrostymulacji /do kończyny badanej nie dochodził bodziec elektryczny/ wykazała brak wpływu czynnika subiektywnego na zmiany agregacji płytek krwi.

W celu sprawdzenia wpływu długotrwałego stosowania elektrostymulacji powierzchniowej wykonano testy agregacji u chorych, którzy stosowali tę metodę systematycznie przez okres od jednego do dwóch lat /11 osób/.



Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono w tej grupie mniejszą, wyjściową /przed stymulacją/ podatność płytek krwi na czynnik agregujący w porównaniu z wynikami uzyskanymi u chorych, którzy zaczęli stosować tę metodę jako wspomagającą w leczeniu. Pod wpływem stymulacji dochodziło do wzrostu podatności płytek krwi na egzogenny czynnik agregujący przy jednoczesnym hamowaniu "reakcji uwalniania" endogennych, płytkowych czynników agregujących.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że mechanizm działania elektrostymulacji powierzchniowej odpowiedzialny za obserwowane korzystne efekty kliniczne polega na uwalnianiu do krążenia prostanoidu, lub prostanoidów o właściwościach dezagregujących płytki krwi, trwalszych od syntetycznej prostacykliny.



PIŚMIENNICTWO

1. Abram, S. E. Asiddaro, C. B. Reynolds, A.: Increased skin temperature during transcutaneous electrical stimulation. *Anesth. Analg.* 1980, 59, 22.
2. Alberts, P.: Mechanisms of facilitation and muscarinic or  $\alpha$ -adrenergic inhibition of acetylcholine and noradrenaline secretion from peripheral nerves. *Acta Physiol. Scand.* 1982, Suppl. 506, 7.
3. Barrow, S. E. Dollery, T., Heavey, D. J., Hickling, N. E., Ritter, J. M., Vial, J.: Effect of vasoactive peptides on prostacyclin synthesis in man. *Br. J. Pharm.* 1986, 87, 243.
4. Basyliiss, W.: On the origin from the spinal cord of the vasodilator fibres of the hind limb. *J. Physiol.* 1901, '26, 173.
5. Beetens, J. R., von Hove, C., Rampart, M., Herman, A. G., : Acetylcholine stimulates the release of prostacyclin by rabbit aorta endothelium. *J. Pharm., Pharmacol.* 1983, 35, 251.
6. Belch, J. J. F., Cormie, J., Neuman, P., McLoren, M., Barbenel, J., Capell, H., Leiberman, P., Forbes, C. D., Prentice, C. R. M.: Dazoxiben, a thromboxane synthetase inhibitor in the treatment of Raynaud's syndrome: A double blind trial. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1983, 15, 113 S.
7. Belch, J. J. F., Neuman, P., Drury, J. K., Capell, H., Leiberman, P., James, W. B., Forbes, C. D., Prentice, C. R. M.: Successful treatment of Raynaud's syndrome with prostacyclin. *Thrombos. Haemostas.* 1981, 45, 255.
8. Belch, J. J. F., McKoy, A., McArdle, B., Leiberman, P., Pollock, J. E., Lowe, G. D. O., Forbes, C. D., Prentice, C. R. M.: Epoprostenol /PGI<sub>2</sub>/ and severe arterial disease. *Lancet* 1983, 1, 315.



9. Blatter, W., Furrer, K., Schriber, K., Kofmehl, R., Masini, C.: Platelet proteins during and after prostacyclin therapy for lower limb ischemia. Suggestion for a rebound platelet activation. *Vasa* 1981, 10, 261.
10. Blunt, R. J., George, A. J. Hurkow, R. A., Strachan, C. J. A., Stuart, J.: Hiperviscosity and thrombotic changes in idiopathic and secondary Raynaud's syndrome. *Br. J. Haematol* 1980, 45, 651.
11. Boeynaems, J. M., Galand, N.: Cholinergic stimulation of vascular prostacyclin synthesis. *Prostaglandins* 1983, 23, 531.
12. Borda, E. S., Peredo, H., Gimeno, M. F.: Alpha adrenergic stimulation modified prostaglandins release in vas deferens. *Prostaglandins* 1983, 26, 701.
13. Borkowski, M.: An experimental study on the role of arteriovenous anastomoses in the pathogenesis of trophic ulcer. *Arch. Immun. Therap., Exp.*, 1973, 21, 363.
14. Borkowski, M.: Badania doświadczalne nad udziałem połączeń tętniczo-żylnych w powstawaniu owrzodzeń troficznych u królików. Rozprawa habilitacyjna PAN, Warszawa 1974.
15. Born, G. V. R.: Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 1962, 194, 927.
16. Broseta, J., Garcia-March, G., Ingelmo, A., Gomez Alonso, A., Barbera, J., Gonzalez-Dorder, J., Garrido, H., Barcia-Solario, J. L., Joanes, V., Carbonell Canti, C.: Chronic spinal cord stimulation in peripheral arterial insufficiency. *Angilogie* 1985, 37, 70.
17. Broseta, J., Barbera, J., Barcia-Solario, J. L., Garica-March, G., Gonzalez-Darder, J., Rovaina, F., Joanes, V.: Spinal cord stimulation in peripheral arterial disease. *J. Neurosurg* 1986, 64, 71.



18. Brotzu, G., Carboni, M. G., Falchi, S., Montisci, R.: Altered regulator mechanisms of presynaptic adrenergic nerve: A new physiopathological hypothesis in Raynaud's disease. *Microvasc. Res.* 1984, 27, 110.
19. Carley, P. J., Wainapel, S. F.: Electrotherapy of acceleration of wound healing: low intensity direct current. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 1985, 66, 443.
20. Clifford, P. C., Martin, M. F. R., Sheddon, E. J., Kirby, J. D., Baird, R. N., Dieppe, P. A.: Treatment of vasospastic disease with prostaglandin E<sub>1</sub>. *Br. Med. J.* 1980, 281, 1031.
21. Coffman, J. D., Rasmussen, H. M.: Effect of thromboxane synthetase inhibition in Raynaud's phenomenon. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1984, 36, 369.
22. Cook, A. N., Oygar, A., Baggenstons, P.: Vascular disease of extremities. Electric stimulation of spinal cord and posterior roots. *NY State J. Med.* 1976, 76, 366.
23. Davies, S. C., Machin, S. J.: Prostacyclin /PGI<sub>2</sub>/. *Intensive Care Med.* 1983, 9, 49.
24. Dembińska-Kieć, A., Żmuda, A., Grodzińska, L., Bieroń, K., Basista, M., Kędzior, A., Kostka-Trąbka, E., Telesz, E., Żelazny, T.: Increased platelet activity after termination of prostacyclin infusion into man. *Prostaglandins* 1981, 21, 827.
25. Dembińska-Kieć, A., Kostka-Trąbka, E., Gryglewski, R. J.: Effect of prostacyclin on fibrinolytic activity in patients with arteriosclerosis obliterans. *Thromb. Haemostas.* 1982, 47, 190.
26. Dhumal, V. R., Girdhar, A., Gulati, O. D., Hemavathi, K. G., Shah, D. S.: Mutual interaction of prostaglandin-like material and noradrenaline during periarterial nerve stimulation of rabbit intestine. *J. Pharm. Pharmacol* 1983, 35, 674.



27. Dodds, A. J., O'Reilly, M. J. G., Yates, C. J. P., Cotton, L. T., Flute, P. T., Dormandy, J. A.: Haemorrhological response to plasma exchange in Raynaud's syndrome, *Br. Med. J.* 1979, ii, 1186.
28. Dormandy, J. A.: Practical impact of haemorheology on the treatment of chronic peripheral ischemia. *Angiology*, 1981, 32, 710.
29. Dowd, P. M., Kovacs, I. B., Bland, C. J. H., Kirby, J. D. T.: Effect of prostaglandins I<sub>2</sub> and E<sub>1</sub> on red cell deformability in patients with Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis. *Br. Med. J.* 1981, 283.
30. Dowd, P. M., Martin, M. F. R., Cooke, E. D., Bowcock, S. A., Jones, R., Dieppe, P. A., Kirby, J. D. T.: Treatment of Raynaud's phenomenon by intravenous infusion of prostacyclin /PGI<sub>2</sub>/. *Br. J. Dermatol* 1982, 106, 81.
31. Eberhardt, A., Szczypiorski, P., Korytowski, G.: Effect of transcutaneous electrostimulation on the cell composition of skin exudate. *Acta Physiol. Pol.* 1986, 37, 41.
32. Ebershold, M. J., Lows, E. R., Albers, J. W.: Measurement of autonomic function before, during, and after transcutaneous stimulation in patients with chronic pain and control subjects. *Mayo Clin. Proc.* 1977, 52, 228.
33. Ellsworth, M. L., Gregory, T. J., Newell, J. C.: Pulmonary prostacyclin production with increased flow and sympathetic stimulation. *Appl. J. Physiol.* 1983, 55, 1225.
34. Fagrell, B., Lundberg, G., Olsson, A., Östergren, J.: PGE<sub>1</sub> treatment of severe skin ischemia in patients with peripheral arterial insufficiency - the effect on skin microcirculation. *Vasa* 1986, 15, 56.
35. Foerster, O.: The dermatomes in man. *Brain*, 1933, 56, 1.



36. Förstermann, U., Hertting, G., Neufang, B. : The role of endothelial and non-endothelial prostaglandins in the relaxation of isolated blood vessels of the rabbit induced by acetylcholine and bradykinin. *Br. J. Pharmac.* 1986, 87, 521.
37. Friedman, H., Nashold, B. S., Somjen, G. : Physiological effects of dorsal column stimulation. *Adv. Neurol.* 1974, 4, 769.
38. Gayle, K. B., Dormandy, J. A. : Abnormal blood viscosity in Raynaud's phenomenon. *Lancet*, 1976, i, 1317.
39. Gryglewski, R. J., Korbut, R., Ocetkiewicz, A. : Reversal of platelet aggregation by prostacyclin. *Pharmacol. Res. Commun.* 1978, 10, 185.
40. Gryglewski, R. J. : Mechanizmy regulacyjne uwalniania dezagregujących prostanoidów. *Kard. Pol.* 1982, T. XXV, 802.
41. Güllner, H. G. : Prostaglandin actions on the adrenergic nervous system. *Klin. Wochenschr.* 1983, 61, 533.
42. Güllner, H. G. : The interactions of prostaglandins with the sympathetic nervous system - a review. *J. Auton. Nerv. Syst.* 1983, 8, 1.
43. Güllner, H. G. : Endogenously synthesized prostaglandins stimulate sympathetic nervous system. *Prostaglandins Leuk. and Med.* 1983, 10, 345.
44. Güllner, H. G. : Prostaglandins and blood pressure. *Ann. Intern. Med.* 1984, 100, 163.
45. Herbaczyńska-Cedro, K., Staszewska-Barczak, J., Janczewska, H. : Muscular work and the release of prostaglandin-like substances. *Cardiovasc. Res.* 1976, 10, 413.
46. Herman, A. G. : Clinical use of prostaglandins in perspective. *Acta Clin. Belg.* 1983, 38, 75.



47. Higgs, E. A., Moncada, S.: Prostacyclin-physiology and clinical uses. *Review. Gen. Pharmac.* 1983, 14, 7.
48. Hilton, S. M., Marshall, J. M.: Dorsal root stimulation cause vasodilation in cat skieletal muscle. *J. Physiol.* 1980, 299, 277.
49. Hirai, M., Nakayama, R.: Haemodynamic effects of intra-arterial and intravenous administration of prostaglandin E<sub>1</sub> in patients with peripheral arterial disease. *Br. J. Surg.* 1986, 73, 20.
50. Hughes, G. S., Lichstein, P. R., Whitlock, D., Harker, C.: Response of plasma beta-endorphins to transcutaneous electrical nerve stimulation in healthy subjects. *Phys. Ther.* 1984, 64, 1062.
51. Hutton, R. A., Mikhailidis, D. P., Bernstein, R. M., Jeremy, J. Y., Hughes, G. R. V., Dandona, P.: Assessment of platelet function in patients with Raynaud's syndrome. *J. Clin. Pathol.* 1984, 37, 182.
52. Jaśkowski, J., Szczypiorski, P.: The evaluation of TNS in selected disease. *International Congress of Angiology. Ateny* 1985, 469.
53. Jaśkowski, J., Kruk, M., Szczypiorski, P., Strupińska, E.: Nowa metoda przyspieszania gojenia się ran skórnych.  
L II Zjazd Towarzystwa Chirurgów Polskich, Gdańsk 1985, 241.
54. Jaśkowski, J., Szczypiorski, P., Strupińska, E., Kruk, M.:  
Czas utrzymywania się efektów działania elektrostymulacji powierzchniowej w ocenie izotopowej i impedancyjnej.  
VII Konferencja Naukowo-Szkoleniowa Biocybernetyka, Inżynieria Biomedyczna. Streszczenia referatów. Gdańsk 1985, 236.
55. Jones, E. W., Honkey, C. J.: A thromboxane synthetase inhibition in Raynaud's phenomenon. *Prostaglandins Leukotrienes Med.* 1983, 12, 67.
56. Jouve, R., Rolland, P. H., Pellegrin, E., Mercier, C., Delboy, C., Serradimigni, A.: Plasma thromboxane B<sub>2</sub> and capacity of the aorta to produce prostacyclin in arteriopathies of the lower extremities. *J. Mal. Vasc.* 1983, 8, 221.



57. Jouve, R., Rolland, P. H., Delboy, C., Mercier, C.: Thromboxane B<sub>2</sub>, 6-keto - PGF<sub>1</sub> alpha, and PGA<sub>1</sub> plasma levels in arteriosclerosis obliterans: relationship to clinical manifestations, risk factors, and arterial pathoanatomy. *Am. Heart J.*, 1984, 107, 45.
58. Kaada, B.: Neurophysiological mechanisms of pain suppression and cutaneous vasodilatation induced by transcutaneous nerve stimulation /TNS/ and acupuncture - a review. 64-69 w "Legevitenskap og livsvisdom" 1982, University Press, Bergen, Norway 1982.
59. Kaada, B.: Peripheral vasodilatation and healing of chronic ulceration by transcutaneous nerve stimulation. *Tidsskr Nor Loegeforen* 1982, 30, 1591.
60. Kaada, B., Eielsen, O.: In search of mediators of skin vasodilation induced by transcutaneous nerve stimulation: I. Failure to block the response by antagonists of endogenous vasodilators. *Gen. Pharmacol.* 1983, 14, 623.
61. Kaada, B., Eielsen, O.: In search of mediators of skin vasodilation induced by transcutaneous nerve stimulation: II. Serotonin implicated. *Gen. Pharmacol* 1983, 14 635.
62. Kaada, B.: Vasodilation induced by transcutaneous nerve stimulation in peripheral ischemia/Raynaud's phenomenon and diabetic polyneuropathy/. *Europ. Heart. J.* 1983, 3, 303.
63. Kaada, B., Olsen, E., Eielsen, O.: In search of mediators of skin vasodilation induced by transcutaneous nerve stimulation: III. Increase in plasma VIP in normal subjects and in Raynaud's disease. *Gen. Pharmacol.* 1984, 15, 107.
64. Kaada, B. Helle, K.: In search of mediators of skin vasodilation by transcutaneous nerve stimulation: IV. In vitro bioassay of the vaso-inhibitory activity of sera from patients suffering from peripheral ischemia. *Gen. Pharmacol.* 1984, 15, 115.



65. Kaada, B. : Systemic sclerosis: successful treatment of ulcerations pain, Raynaud's phenomenon, calcinosis, and dysphagia by transcutaneous nerve stimulation. *Acupuncture and Electro-Therapeutics Res., Int. J.* 1984, 9, 31.
66. Kimby, K., Fagrell, B., Björkholm, M., Holm, G., Mellstedt, H., Norberg, R. : Skin capillary abnormalities in patients with Raynaud's phenomenon. *Acta Med. Scand.* 1984, 215, 127.
67. Kokot, F. : Metody badań laboratoryjnych stosowanych w klinice. PZWL, Warszawa, 1969, 162.
68. Korbut, R., Byrska-Danek, A., Gryglewski, R. J. : Fibrinolytic activity of 6-keto prostaglandin E<sub>1</sub>. *Thromb. Haemost.* 1983, 50, 893.
69. Koy, S., Nancarrow, J. D. : Spontaneous healing and relief of pain in a patient with intractable vasculitic ulceration of the lower limb following an intravenous infusion of prostacyclin: a case report. *Br. J. Plast. Surg.* 1984, 37, 175.
70. Kristensen, S. D., Knudsen, F., Nielsen, A. H., Ring, T. : Decreased platelet sensitivity to prostacyclin /epoprostenol/ during hemodialysis. *Clin. Nephrol.* 1984, 21, 230.
71. Kruk, M., Jaśkowski, J., Szczypiorski, P. : Impedancyjna ocena wpływu elektrostymulacji powierzchniowej na przepływ krwi. L II Zjazd Towarzystwa Chirurgów Polskich, Gdańsk 1985, Streszczenia referatów. 219.
72. Kruk, M., Szczypiorski, P., Jaśkowski, J., Strupińska, E. : Wpływ powierzchniowej elektrostymulacji na szybkość gojenia się ran. VII Konferencja Naukowo-Szkoleniowa Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna. Gdańsk 1985. Streszczenia referatów, 237.
73. Kruk, M., Szczypiorski, P., Borkowski, M., Szamowska, R. : Termograficzna ocena skuteczności działania elektrostymulacji powierzchniowej na mikrokrążenie skórne w niektórych chorobach naczyń obwodowych. *Pol. Tyg. Lek.* 1985, 40, 485.



74. Lafferty, K., de Trofford, J. C., Roberts, V. C., Cotton, L. T. : Raynaud's phenomenon, prostacyclin or histamine deficit?  
Lancet, 1983, 1, 536.
75. Leandri, M., Brunetti, O., Parodi, C. I. : Telethermographic findings after transcutaneous electrical nerve stimulation.  
Phys. Ther. 1986. 66, 210.
76. Lipsmeyer, E. A. : Raynaud's syndrome. J. Arkansas Med. Soc.  
1982, 79, 63.
77. Lucas, G. S., Simms, M. H., Caldwell, N. M., Alexander, S. J. C., Stuart, J. : Haemorrhheological effects of prostaglandin E<sub>1</sub> infusion in Raynaud's syndrome. J. Clin. Pathol. 1984, 37, 870.
78. Luderer, J. R., Nicholas, G. G., Neunyer, M., Riley, D. L., Vary, J. E., Garcia, G., Schweck, D. W. : Dazoxiben, a thromboxane synthetase inhibitor in Raynaud's phenomenon. Clin. Pharmacol. Ther.  
1984, 36, 105.
79. Lynch, T. G., Hobson, R. W., Barbolinardo, J. P. : Effects of intravenous and intraarterial infusions of PGE<sub>1</sub> on canine hind-limb blood flow distribution. Surgery 1984, 96, 35.
80. Marcinkiewicz, E., Grodzińska, L., Gryglewski, R. J. : Platelet aggregation and thromboxane A<sub>2</sub> formation in cat platelet rich plasma. Pharmacol. Res. Commun. 1978, 10, 1.
81. McGrath, M. A., Peek, R., Penny, R. : Raynaud's disease: Reduced hand blood flows with normal blood viscosity. Aust. N. Z. J. Med. 1978, 8, 126.
82. Mehta, J., Mehta, P., Horalek, Ch. : The significance of platelet-vessel wall prostaglandin equilibrium during exercise-induced stress. Am. Heart J. 1983, 105, 895.
83. Melzack, R., Wall, P. D. : Pain mechanisms: a new theory, Science, 1965, 150, 971.



84. Melzack, R., Wall, P.D. : Acupuncture and TNS, *Postgrad, Med. J.* 1984, 60, 893.
85. Michibayashi, T. : Inhibitory action of prostaglandin E on angiotensin II induced enhancement of vasoconstrictor response to sympathetic stimulation. *Jpn Circ. J.* 1983, 47, 1065.
86. Mikhaldis, D. P., Hutton, R. A., Dandona, P. : Effect of cooling on prostaglandin mediated inhibition of platelet aggregation. *Clin. Sci.* 1981, 61, 28.
87. Moncada, S. : The role of prostacyclin and thromboxane A<sub>2</sub> in the regulation of platelet behaviour. *Mater. Med. Pol.* 1980, 12, 207.
88. Moncada, S. : Biology and therapeutic potential of prostacyclin. *Stroke* 1983, 14, 157.
89. Nadler, J. L., Velasco, J. S., Horton, R. : Cigarette smoking inhibits prostacyclin formation. *Lancet*, 1983, 1248.
90. Nadler, J., Zipser, R. D., Horton, R. : The effect of adrenergic stimulation on urinary prostaglandin E<sub>2</sub> and 6-keto PGF<sub>1</sub> in man. *Prostaglandins* 1983, 26, 519.
91. Nielubowicz, J., Borkowski, M. : Opening of arteriovenous anastomoses after experimental sciatic nerve transection. *Cariovas. Surg.* 1973, 14, 422.
92. Nikołajew, W., Szehter, A. B., Mamebow, Ł. A., Nabikow, A. P., Manuczarow, N. K. : Application of optimal-frequency sinusoidal current to stimulation of healing of skin wounds. *Biull. Eksp. Biol. Med.* 1984, 97, 731.



93. Niżankowski, R. : Leczenie prostacykliną chorób tętnic obwodowych. *Kard. Pol.* 1986, 29, 209.
94. Olsson, A. G. , Jogerstrand, T. : Effects of prostaglandin E in peripheral artery disease. W: Carlson, L. A. : International Conference on Atherosclerosis. Raven Press, New York, 1978, 403.
95. Onodera, H. , Hirata, T. , Sugawara, H. , Sugai, K. , Yoda, B. , Toyota, T. , Goto, Y. : Platelet sensitivity to adenosine diphosphate and to prostacyclin in diabetic patients. *Tohoku J. Exp. Med.* 1982, 137, 423.
96. Pardy, B. J. , Lewis, J. D. , Eastcott, H. H. G. : Preliminary experience with prostaglandin E<sub>1</sub> and I<sub>2</sub> in peripheral vascular disease. *Surgery* 1980, 88, 826.
97. Pardy, B. J. , Eastcott, H. H. G. : Prostaglandin therapy in severe limb ischemia. *World J. Surg.* 1983, 7, 353.
98. Pardy, B. J. , Hoare, M. C. , Eastcott, H. H. G. , Miles, C. C. , Needham, T. N. , Harbourne, T. , Ellis, B. W. : Prostaglandin E<sub>1</sub> in severe Raynaud's phenomenon. *Curr. Sing.* 1983, 40, 331.
99. Pasch, A. P. , Ricotta, J. J. , Burke, A. R. , O'Mara, R. E. , De Wesse, J. A. , Wilson, G. : Effect of prostaglandin E<sub>1</sub> on blood flow in normal and ischemic canine hind limb. *Surgery* 1984, 95, 724.
100. Pawlik, W. W. , Gustaw, P. P. , Konturek, S. J. : Mikrokrążeniowe efekty prostacykliny w krążeniu krezkowym i kończynowym. *Kard. Pol.* 1982, T XXV, 447.
101. Peacock, J. H. ; Peripheral venous blood concentrations of epinephrine and norepinephrine in primary Raynaud's disease. *Circ. Res.* 1959, 7, 821.



102. Petkov, V., Radomirow, R.: Adrenergic transmission and prostaglandins. *Acta Physiol. Pharmacol. Bulg.* 1982, 8, 115.
103. Petralito, A., Mangiofico, R. A., Gibino, S., Cuffari, M. A., Miano, M. F., Fiore, C. E.; Daily modifications of plasma fibrinogen: platelets aggregation, Howell's time. PTT, TT, and antithrombin III in normal subjects and in patients with vascular disease. *Chronobiologie* 1982, 9, 195.
104. Pipili, E., Poyser, N.L.: Effects of nerve stimulation and of administration of noradrenaline or potassium chloride upon the release of prostaglandins  $I_2$ ,  $E_2$  and  $F_{2\alpha}$  from the perfused mesenteric arterial bed of the rabbit. *Br. J. Pharmac.* 1981, 72, 89.
105. Popadić, M., Horacić, M., Reraković, Dz. jr., Pirnat, L.: Circulating platelet aggregates in patients with coronary heart diseases and lower limb ischemia. *Vasa* 1985, 14, 35.
106. Pringle, R., Walder, D.N., Weaver, J.P.A.: Blood viscosity in Raynaud's phenomenon. *Lancet*, 1966, i, 1086.
107. Reilly, I. A. G., Roy, L., Fitzgerald, G. A.: Biosynthesis of thromboxane in patients with systemic sclerosis and Raynaud's phenomenon. *Br. Med. J.* 1986, 292, 1037.
108. Rhodes, R. S., Heard, S. E.: Detrimental effect of high - dose prostaglandin  $E_1$  in the treatment of ischemic ulcers. *Surgery* 1983, 93, 839.
109. Roath, S.: Managing Raynaud's phenomenon. *Br. Med. J.* 1986, 293, 88.
110. Rykowski, H., Adamski, S.: Choroby naczyń. PZWL, Warszawa, 1981, 299.



111. Scarabin, P. Y., Samama, M. : Effect of age on ADP - induced platelet aggregation in diabetic and non-diabetic subjects. *Thrombosis Research* 1981, 22, 687.
112. Shionoya, S. : Surgical treatment of Buerger's disease, *Serono Symposium 44, Peripheral arterial disease: medical and surgical problems.* Stipo, S. Cavallaro, A., Academic Press, London and New York 1981, 341.
113. Sinzinger, H., Silberbauer, K., Winter, M., Auerswald, W. : Is human arterial smooth muscle cell proliferation regulated by prostacyclin? *Exp. Path.* 1979, 17, 354.
114. Sinzinger, H., Harsch, A. K., Silberbauer, K. : The behaviour of various platelet function tests during long-term prostacyclin infusion in patients with peripheral vascular disease. *Thromb. Haemostas.* 1983, 50, 885.
115. Sinzinger, H., Fitscho, P., Peskar, B. A. : Endothelial - cells in peripheral vascular disease. *Angiology* 1986, 37, 112.
116. Sonneschein, R. R., Weisman, M. L. : Sympathetic vasomotor outflows to hind-limb muscles of the cat. *Am. J. Physiol.* 1978, 235, H482.
117. Stjärne, L., Brundin, J. : Frequency-dependence of <sup>3</sup>H-noradrenaline secretion from human vasoconstrictor nerves. Modification by factors interfering with  $\alpha$  -or  $\beta$  -adrenoceptor or prostaglandin E<sub>2</sub> mediated control. *Acta Physiol. Scand.* 1977, 101, 199.
118. Szczeklik, A., Skawiński, S., Głuszko, P., Niżankowski, R., Szczeklik, J., Gryglewski, R. J. : Successful therapy of advanced arteriosclerosis obliterans with prostacyclin. *Lancet* 1979, 1, 1111.
119. Szczeklik, A., Gryglewski, R. J., Niżankowski, R., Skawiński, S., Głuszko, P., Korbut, R. : Prostacyclin therapy in peripheral arterial disease. *Thromb. Res.* 1980, 19, 191.



120. Szczeklik, A., Kopeć, M., Śladek, K., Musiał, J., Chmielewska, J., Teisseyre, E., Dudek-Wojciechowska, G., Palester-Chlebowczyk, M.: Prostacyclin and the fibrinolytic system in ischemic vascular disease. *Thromb. Res.* 1983, 29, 655.
121. Szczypiorski, P.: Badania doświadczalne nad wpływem elektrostymulacji powierzchniowej na przepływ krwi w połączeniach tętno-żylnych w skórze ucha królika oraz naczyniach włosowatych wału paznokciowego człowieka. Rozprawa doktorska, Warszawa, 1981.
122. Szczypiorski, P., Jaśkowski, J., Strupińska, E., Kruk, M.: Ocena wpływu elektrostymulacji powierzchniowej na przepływ krwi w modelu doświadczalnym. L II Zjazd Towarzystwa Chirurgów Polskich. Gdańsk, 1985. Streszczenia referatów, 240.
123. Szczypiorski, P., Jaśkowski, J., Kruk, M., Strupińska, E.: Izotopowa ocena skuteczności działania elektrostymulacji powierzchniowej. VII Konferencja Naukowo-Szkoleniowa. Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna, Gdańsk 1985, Streszczenia referatów, cz.I, 238.
124. Szczypiorski, P., Borkowski, M., Jeziorski, K.: Fizjologiczne podstawy działania elektrostymulacji powierzchniowej w terapii niektórych chorób naczyniowych. *Pol. Tyg. Lek.* 1985, 40, 313.
125. Szczypiorski, P., Kruk, M., Borkowski, M., Szamowska, R.: Próba zastosowania elektrostymulacji powierzchniowej, jako czynnika zapobiegającego znacznemu obniżaniu się temperatury skóry podczas oziębiania w niektórych chorobach naczyń obwodowych. *Pol. Tyg. Lek.* 1985, 40, 896.
126. Szczypiorski, P., Jaśkowski, J., Strupińska, E., Kruk, M.: The effect of superficial electrostimulation. *Med. Biol. Eng. Comput.* 1985, Suppl. I, 223.



127. Tallis, R. C. , Illis, L. S. , Sedgwick, E. M. , Hardwige, C. , Garfield, J. S. :  
Spinal cord stimulation in peripheral vascular disease.  
J. Neurol, Neurosurg. and Psychiatry 1983, 46, 478.
128. Tallis, R. C. , Illis, L. S. , Sedgwick, E. M. , Hardwige, C. , Kenedy, K. :  
The effect of spinal cord stimulation upon peripheral blood flow in  
patients with chronic neurological disease.  
Int. Rehabil. Med. 1983, 5, 4.
129. Tremoli, E. , Socini, A. , Petroni, A. , Galli, A. : Increased platelet aggre-  
gability is associated with increased prostacyclin production by ves-  
sel walls in hypercholesterolemic rabbits. Prostaglandins 1982,  
24, 397.
130. Turczyński, B. , Sroczyński, J. : Wskaźnik agregacji krwinek czerwo-  
nych, hematokryt i lepkość osocza krwi u chorych na naczyniową  
postać choroby wibracyjnej.  
Med. Pr. 1985, 36, 161.
131. Vane, J. R. : Prostacyclin, a hormone with a therapeutic potential.  
J. Endocrinol. 1982, 95, 3P.
132. Vane, J. R. : Prostacyclin. J. Royal Soc. Med. 1983, 76, 245.
133. Viinikka, L. , Kärkölä, P. , Pokela, R. , Ylikorkola, O. :Lack of effect  
of ischemia and dipyridamole on prostacyclin production in arterio-  
sclerosis obliterans.  
Prostaglandins, 1981, 21.821.
134. Wojtal, E. , Górewicz, R. , Borkowski, M. : Studies on arteriovenous  
anastomoses in rabbits. Acta Physiol. Pol. 1984, 35, 1.
135. Wong, R. A. , Jette, D. U. : Changes in sympathetic tone associated  
with different forms of transcutaneous electrical nerve stimulation  
in healthy subjects. Phys. Ther. 1984, 64.478.



136. Yabek, S. M., Avner, B. P.: Effects of prostacyclin /PGI<sub>2</sub>/ and indomethacin on neonatal lamb mesenteric and renal artery responses to electrical stimulation and norepinephrine. *Prostaglandins*, 1980, 19, 23.
137. Yardumian, D. A., Machin, S. F.: Altered platelet function in patients on continuous infusions of epoprostenol. *Lancet*, 1984, 1357.
138. Zehovi, J., Hamilton, W. A. P., O'Reily, M. J. G., Leyton, J., Cotton, L. T., Kakkor, V. V.: Plasma exchange and platelet function in Raynaud's phenomenon. *Thromb. Res.* 1980, 19, 86.