



UNIwersytet
PRZYRODNICZY
WE WROCLAWIU



**Ocena parametrów związanych z gospodarką żelazem w nerce, wątrobie i śledzionie świń,
które przeżyły ostry incydent niedokrwienia mięśnia sercowego**

**Evaluation of parameters related to iron metabolism in the kidney, liver and spleen of pigs
that underwent an acute incident of myocardial ischemia**

Rozprawa doktorska

lek. wet. Kacper Czesław Nowak
Katedra Chorób Wewnętrznych z Kliniką Koni, Psów i Kotów
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Promotorki:

Prof. dr hab. Urszula Paślawska
Katedra Chorób Wewnętrznych z Kliniką Koni, Psów i Kotów
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Prof. dr hab. Marzenna Podhorska Okołów
Zakład Badań Ultrastrukturalnych
Wydział Lekarski
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Wrocław 2023

ProHum - Interdyscyplinarna Szkoła Doktorska- planowanie badań eksperymentalnych,
tworzenie i optymalizacja zwierzęcych modeli doświadczalnych z umiejętnościami
transferowania ich do badań klinicznych w medycynie człowieka

Umowa nr POWR.03.02.00-00-I008/17

Streszczenie pracy w języku polskim

Niewydolność serca jest jednym z najpowszechniejszych problemów zdrowotnych z jakimi zmagają się ludzie. Jedną z najczęstszych jej form jest choroba wieńcowa, która jest główną przyczyną zawału serca (MI), powodujących ostrą niewydolność serca. W ostatnich latach badaniom poddano związki pomiędzy przewlekłą niewydolnością serca a zaburzeniami gospodarki żelazowej. Przedmiotem niniejszej pracy było zbadanie czy MI może wywołać długotrwałe zaburzenia homeostazy żelaza. Badano systemowy zasób żelaza oraz stężenie żelaza i kluczowych białek zaangażowanych w gospodarkę żelazową w nerce, wątrobie oraz śledzionie. Dodatkowy aspekt pracy stanowiła ocena czy intramiokardialna terapia MI komórkami macierzystymi istotnie wpływa na homeostazę żelaza.

Badania przeprowadzono na modelu świni domowej. Zwierzęta podzielono na cztery grupy: kontrolną (KON), grupę u której wywołano MI i podano intramiokardialnie płyn fizjologiczny, oraz dwie grupy świń u których intramiokardialnie podano dwie testowane zawiesiny komórek macierzystych (MI+L1 i MI+L2). Dwie ostatnie grupy otrzymywały dodatkowo takrolimus. Wszystkie grupy otrzymywały terapię przeciwplatekającą polegającą na podaniu kwasu acetylosalicylowego (aspiryny). MI wywołano poprzez zamknięcie przepływu w gałęzi zstępującej lewej tętnicy wieńcowej balonem angioplastycznym. Komórki macierzyste podawano przy użyciu systemu NOGA. Jest to system mapowania elektrofizjologicznego serca, który tworzy trójwymiarową wizualizację elektromechaniczną komory. Tak utworzona mapa umożliwiała zlokalizowanie miejsca zawałowego oraz nawigację w celu najdokładniejszego podania preparatu komórek. Świnie badano trzykrotnie, przed wykonaniem procedury, w 28 dniu i po 3 miesiącach od MI. Badanie kontrolne obejmowało badanie kliniczne, elektrokardiograficzne, echokardiograficzne, badania morfologiczne i biochemiczne krwi. Po wykonaniu trzeciego badania kontrolnego świnię poddano eutanazji, wykonano badanie sekcyjne i pobrano próbki narządów do badań histopatologicznych (barwienie preparatów histologicznych z narządów błękitem pruskim w celu wykrywania i lokalizowania żelaza w tkankach) i proteomicznych. Badania przeprowadzono na ekstraktach homogenatów tkankowych rozdzielonych elektroforetycznie w żelach poliakrylamidowych. Metodą western blotting oznaczano łańcuch lekki i ciężki ferrytyny w nerce, wątrobie oraz śledzionie oraz białko hepacydynę w wątrobie. Oznaczono też wybrane parametry gospodarki żelazowej w surowicy

krwi. Wykonano reakcje immunohistochemiczne przeciwko łańcuchowi lekkiemu i ciężkiemu ferrytyny w preparatach histologicznych.

Według uzyskanych wyników u zwierząt z grup MI zaobserwowano wzrost zasobów żelaza w wątrobie i śledzionie. Odnotowano wyższe poziomy łańcucha lekkiego ferrytyny w wątrobie, oraz łańcucha ciężkiego w wątrobie oraz korze nerki. Potwierdzono także, że MI nie towarzyszyły długotrwałe zaburzenia w systemowym statusie żelaza. W grupach leczonych komórkami macierzystymi stwierdzono istotnie niższy poziom hepcydyny w tkance wątroby.

Summary

Heart failure is one of the most common health problems facing humanity. One of the most common forms of it is coronary artery disease, which is the main cause of heart attack (MI) causing acute heart failure. In recent years, the links between chronic heart failure and iron disorders have been studied. The subject of this study was to investigate whether MI can cause long-term disorders of iron homeostasis. The systemic iron supply and the amount of iron and key proteins involved in iron metabolism in the kidney, liver, and spleen were studied. An additional aspect of the work was the assessment of whether intramyocardial MI stem cell therapy significantly affects iron homeostasis.

The research was conducted on a domestic pig model. The animals were divided into four groups: control group (KON), a group in which MI was induced and 0,9% NaCl normal saline was injected intramyocardially and two groups of pigs in which two tested stem cell suspensions (MI+L1 and MI+L2) were intramyocardially administered. The last two groups received additional takrolimus. All groups received antiplatelet treatment – aspirin. MI was induced by closing the flow in the left anterior descending coronary artery with an angioplastic balloon. Stem cells were administered using the NOGA system. The pigs were examined three times, prior to the procedure, on day 28 and 3 months after MI. The follow-up examination included clinical, electrocardiography, echocardiography, morphological and biochemical blood tests. After the third check-up, the pigs were euthanized, a post-mortem examination was performed and organ samples were taken for histopathological examination (staining of histological slides from organs with Prussian blue to detect and localize iron in tissues) and

proteomic examinations. The research was conducted on extracts of tissue homogenates electrophoretically separated in polyacrylamide gels. Western blotting was used to determine the light and heavy ferritin chain in the kidney, liver and spleen and hepcidin protein in the liver. Selected parameters of iron management in blood serum were also determined. Immunohistochemical reactions for the ferritin light and heavy chain detection were performed in histological slides.

According to the results obtained, an increase in iron resources in the liver and spleen was observed in animals from the MI groups. Higher levels of the ferritin light chain in the liver and the heavy chain in the liver and renal cortex were reported. It was also confirmed that MI was not accompanied by long-term disturbances in the systemic status of iron. In the stem cell groups, significantly lower levels of hepcidin in liver tissue were found.