

**Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
Wydział Medycyny Weterynaryjnej**

PRACA DOKTORSKA

Doctoral thesis

Ocena kardioprotekcyjnego działania dowieńcowo podawanego kwasu acetylosalicylowego na świńskim modelu niedokrwienia/reperfuzji – badania in vivo.

Assessment of the cardioprotective effect of intracoronary acetylsalicylic acid in a porcine model of ischemia/reperfusion - in vivo study.

lek. wet. Piotr Frydrychowski

Praca wykonana pod kierunkiem:
prof. dr hab. Agnieszki Noszczyk-Nowak
Katedra Chorób Wewnętrznych z Kliniką Koni, Psów i Kotów
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

oraz

dr hab. Iwony Bil-Luli, prof. uczelni
Zakład Chemii Klinicznej i Hematologii Laboratoryjnej
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

WROCLAW 2022

WYKAZ UŻYTYCH SKRÓTÓW

ABTS	sól diamonowa 2,2'-azobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonianu)
ASA	kwasy acetylosalicylowy, aspiryna
ATP	adenozyno-5'-trifosforan
COX	cyklooksygenaza
DNA	kwasy deoksyrybonukleinowy
EKG	badanie elektrokardiograficzne
GPx	peroksydaza glutationowa (ang. <i>glutathione peroxidase</i>)
GR	reduktaza glutationowa (ang. <i>glutathione reductase</i>)
GSH	forma zredukowana glutationu
GSSG	forma utleniona glutationu
GST	S-transferaza glutationowa (ang. <i>glutathione S-transferase</i>)
LAD	gałąź przednia zstępująca lewej tętnicy wieńcowej
LCX	gałąź okalająca lewej tętnicy wieńcowej
LDL	lipoproteiny o małej gęstości (ang. <i>low-density lipoprotein</i>)
LF	lipofuscyna (ang. <i>lipofuscin</i>)
MDA	dialdehyd malonowy (ang. <i>malondialdehyde</i>)
MI	zawał mięśnia sercowego (ang. <i>myocardial infarction</i>)
NADPH	zredukowana forma fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
OSI	wskaźnik stresu oksydacyjnego (ang. <i>oxidative stress index</i>)
PCI	przezskórne interwencje wieńcowe (ang. <i>percutaneous coronary interventions</i>)
ROS	reaktywne formy tlenu (ang. <i>reactive oxygen species</i>)
TAC	całkowita zdolność antyoksydacyjna (ang. <i>total antioxidant capacity</i>)
TOS	całkowity status oksydacyjny (ang. <i>total oxidative status</i>)
VF	migotanie komór (ang. <i>ventricular fibrillation</i>)
VT	tachykardia komorowa (ang. <i>ventricular tachycardia</i>)

STRESZCZENIE

Niedokrwienie i zawał mięśnia sercowego oraz inne choroby układu krążenia są wymieniane wśród głównych przyczyn zgonów ludzi w krajach uprzemysłowionych. Zawał mięśnia sercowego, wraz z chorobą niedokrwinną serca, stanowią najczęstszą przyczynę niewydolności serca, czyli stanu, w którym serce nie jest w stanie dostarczyć odpowiedniej ilości krwi do narządów organizmu. Wśród najistotniejszych powikłań niedokrwienia i zawału mięśnia sercowego wskazuje się rozwój zaburzeń rytmu serca, zwłaszcza zagrażających życiu arytmii komorowych: częstoskurczu komorowego i migotania komór.

Patofizjologia niedokrwienia mięśnia sercowego jest złożona, a w medycynie człowieka jako jego główną przyczynę wskazuje się miażdżycę i powstające w jej przebiegu blaszki miażdżycowe, które po oderwaniu mogą doprowadzić do zamknięcia światła naczyń wieńcowych, skutkującego niedokrwieniem mięśnia sercowego. Najczęstszym miejscem okluzji naczyń zaopatrujących serce jest gałąź przednia zstępująca lewej tętnicy wieńcowej. Przywrócenie krążenia w niedokrwionym obszarze mięśnia sercowego może jednak skutkować dalszym uszkodzeniem mięśnia sercowego określanym jako uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne. Jego patogeneza jest złożona, a wśród potencjalnych procesów zaangażowanych w rozwój uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjnego wymienia się aktywację i agregację płytek krwi razem z następstwami tych zjawisk oraz zwiększoną produkcją reaktywnych form tlenu, która dodatkowo prowadzi do nasilenia zjawiska zwanego stresem oksydacyjnym.

Mianem stresu oksydacyjnego określamy zaburzenie równowagi pomiędzy produkcją reaktywnych form tlenu a działaniem mechanizmów antyoksydacyjnych organizmu. Reaktywne formy tlenu mogą powstawać zarówno ze źródeł endogennych, jak i egzogennych, a ich nadmierna produkcja i nagromadzenie prowadzi do uszkodzenia komórek, tkanek, białek, lipidów i DNA. Do najczęstszych reaktywnych form tlenu zaliczane są anionorodnik ponadtlenkowy, nadtlenek wodoru, rodnik hydroksylowy oraz tlen singletowy. Do ochrony ustroju przed reaktywnymi formami tlenu służą nieenzymatyczne i enzymatyczne mechanizmy antyoksydacyjne. Stres oksydacyjny stanowi jedną z przyczyn chorób sercowo-naczyniowych, a jego rola została potwierdzona w patogenezie i progresji m.in. miażdżycy, niedokrwienia i niewydolności serca. Do oceny nasilenia stresu oksydacyjnego wykorzystywane są enzymatyczne i nieenzymatyczne markery stresu oksydacyjnego.

Jednym z leków o działaniu przeciwplatekowym wykorzystywanych w prewencji i leczeniu niedokrwienia i zawału mięśnia sercowego jest kwas acetylosalicylowy, potocznie zwany aspiryną. Oprócz hamowania aktywacji płytek krwi wykazuje on działanie przeciwzapalne, przeciwbólowe i przeciwgorączkowe. Jako główny mechanizm działania kardioprotekcyjnego kwasu acetylosalicylowego wskazuje się jego działanie antyagregacyjne w stosunku do płytek krwi, jednak sugerowany jest również antyoksydacyjny potencjał aspiryny. Kwas acetylosalicylowy u ludzi z niedokrwieniem i zawałem mięśnia sercowego podawany jest doustnie lub dożylnie, a nową koncepcją jest jego dowieńcowe podanie podczas epizodu ostrego niedokrwienia mięśnia sercowego w celu zmniejszenia uszkodzenia poreperfuzyjnego mięśnia sercowego. Możliwość wykorzystania dowieńcowej drogi podania w celu efektywniejszego działania kwasu acetylosalicylowego w niedokrwieniu mięśnia sercowego znajduje swoje potwierdzenie w literaturze, gdzie wskazuje się na większą skuteczność dowieńcowego niż dożylnego podania innych substancji o działaniu przeciwplatekowym.

W badaniach naukowych dotyczących patofizjologii, diagnostyki czy leczenia niedokrwienia i zawału mięśnia sercowego wykorzystuje się zwierzęce modele chorób serca, zwłaszcza świński model niedokrwienia i zawału mięśnia sercowego. Świnia, ze względu na podobne do ludzkich anatomie serca, krążenia wieńcowego czy mechanizmów arytmogennych stanowi dobry model niedokrwienia mięśnia sercowego u ludzi. Zazwyczaj model ten jest osiąganym poprzez przeznaczyńową okluzję naczyń wieńcowych, m.in. z wykorzystaniem balonów angioplastycznych. Najczęściej zamykanym naczyniem jest gałąź przednia zstępująca lewej tętnicy wieńcowej, jednak rzadko przeprowadza się okluzję jej proksymalnego odcinka, co związane jest z wysoką śmiertelnością zwierząt podczas takiej procedury. Również u ludzi niedokrwienie mięśnia sercowego na skutek zamknięcia proksymalnego odcinka gałęzi przedniej zstępującej lewej tętnicy wieńcowej skutkuje większym obszarem martwicy i większą śmiertelnością w porównaniu z innymi miejscami okluzji.

Przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej badania miały na celu określenie, na podstawie analizy markerów stresu oksydacyjnego, kardioprotekcyjnego działania kwasu acetylosalicylowego podanego dowieńcowo podczas ostrego niedokrwienia mięśnia sercowego, uzyskanego poprzez okluzję proksymalnego odcinka gałęzi przedniej zstępującej lewej tętnicy wieńcowej u świń. Ponadto, poprzez modyfikację procedury znieczulenia

zastosowanej podczas wywołania niedokrwienia, dążono do uzyskanie stabilnego modelu niedokrwienia i zawału mięśnia sercowego o wysokiej przeżywalności zwierząt. Zamysłem badań była również charakterystyka komorowych zaburzeń rytmu serca podczas niedokrwienia mięśnia sercowego wywołanego przez okluzję proksymalnego odcinka gałęzi przedniej zstępującej lewej tętnicy wieńcowej u świń.

Zrealizowane badania wykazały istotne statystycznie różnice dotyczące stężeń i aktywności markerów stresu oksydacyjnego u świń, którym podawano dowieńcowo kwas acetylosalicylowy, w porównaniu z grupą kontrolną zwierząt. Wykazano, że wartości całkowitej zdolności antyoksydacyjnej w tkankach pobranych z mięśnia sercowego i surowicy świń poddanych procedurze niedokrwienia mięśnia sercowego są wyższa w grupie świń otrzymujących kwas acetylosalicylowy w porównaniu z grupą kontrolną. Dowiedziono również, że wartości całkowitego statusu oksydacyjnego, wskaźniku stresu oksydacyjnego i stężenia lipofuscyny w surowicy są wyższe u zwierząt z grupy kontrolnej w porównaniu ze świniami, którym podawano kwas acetylosalicylowy. Badania wykazały ponadto, że wartości całkowitego statusu oksydacyjnego, wskaźniku stresu oksydacyjnego, stężenia dialdehydu malonowego oraz aktywności peroksydazy glutationowej, reduktazy glutationowej i S-transferazy glutationowej w tkankach pobranych z mięśnia sercowego świń są wyższe w grupie kontrolnej w porównaniu z grupą świń otrzymujących kwas acetylosalicylowy. Wykazano również, że okluzja proksymalnego odcinka gałęzi przedniej zstępującej lewej tętnicy wieńcowej skutkuje wysoką wywoływalnością komorowych zaburzeń rytmu serca, zwłaszcza częstoskurczu komorowego i migotania komór. Udowodniono także, że modyfikacja schematu znieczulenia świń prowadzi do 100 % przeżywalności zwierząt poddanych procedurze wywołania niedokrwienia i zawału mięśnia sercowego.

Uzyskane wyniki udowodniły kardioprotekcyjne działanie kwasu acetylosalicylowego podawanego dowieńcowo w trakcie niedokrwienia i zawału mięśnia sercowego, związane ze zmniejszeniem nasilenia stresu oksydacyjnego w surowicy i tkankach mięśnia sercowego badanych świń. Przeprowadzone badania umożliwiły opracowanie stabilnego świńskiego modelu niedokrwienia i uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjnego mięśnia sercowego, który cechuje się wysoką wywoływalnością arytmii komorowych i 100% przeżywalnością. Uzyskane wyniki mogą stanowić podstawę dalszych badań dotyczących dowieńcowego podawania kwasu acetylosalicylowego, zwłaszcza podczas epizodów ostrego niedokrwienia mięśnia sercowego.

Słowa kluczowe: niedokrwienie mięśnia sercowego, zawał mięśnia sercowego, uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne, kwas acetylosalicylowy, arytmie komorowe, stres oksydacyjny, świnia

ABSTRACT

Myocardial ischemia and myocardial infarction as well as other cardiovascular diseases are listed among the leading causes of human death in industrialized countries. Myocardial infarction, along with ischemic heart disease, is the most common cause of heart failure, a condition in which the heart is unable to supply an adequate amount of blood to the body's organs. Among the most significant complications of ischemia and myocardial infarction is the development of cardiac arrhythmias, especially the life-threatening ventricular arrhythmias: ventricular tachycardia and ventricular fibrillation.

The pathophysiology of myocardial ischemia is complex, and human medicine points to atherosclerosis and the atherosclerotic plaques that form in its course, which, when detached, can lead to occlusion of the lumen of the coronary vessels, resulting in myocardial ischemia, as its main cause. The most common site of occlusion of the vessels supplying the heart is the anterior descending branch of the left coronary artery. However, restoring circulation to the ischemic area of the myocardium can result in further myocardial damage known as ischemia-reperfusion injury. Its pathogenesis is complex, and among the potential processes involved in the development of ischemia-reperfusion injury are the activation and aggregation of platelets along with the sequelae of these phenomena, as well as increased production of reactive oxygen species, which additionally leads to an oxidative damage.

Oxidative stress is defined as an imbalance between the production of reactive oxygen species and the action of the body's antioxidant mechanisms. Reactive oxygen species can be formed from both endogenous and exogenous sources, and their excessive production and accumulation leads to damage to cells, tissues, proteins, lipids and DNA. The most common reactive oxygen species include superoxide anion radical, hydrogen peroxide, hydroxyl radical and singlet oxygen. Non-enzymatic and enzymatic antioxidant mechanisms are used to protect the body from reactive oxygen species. Oxidative stress is one of the causes of cardiovascular disease, and its role has been confirmed in the pathogenesis and progression of

atherosclerosis, ischemia and heart failure, among others. Enzymatic and non-enzymatic markers are used to assess the severity of oxidative stress.

One of the antiplatelet drugs used in the prevention and treatment of myocardial ischemia and infarction is acetylsalicylic acid, commonly known as aspirin. In addition to inhibiting platelet activation, it exhibits anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects. As the main mechanism of acetylsalicylic acid's cardioprotective effect is its anti-aggregative action against platelets but the antioxidant potential of aspirin is also suggested. Acetylsalicylic acid in humans with myocardial ischemia and infarction is administered orally or intravenously, and a new concept is its intracoronary administration during an episode of acute myocardial ischemia to reduce post-reperfusion myocardial damage. The possibility of using the intracoronary route of administration to make acetylsalicylic acid more effective in myocardial ischemia is supported by the literature, where it is indicated that intracoronary than intravenous administration of other antiplatelet agents is more effective.

Research on the pathophysiology, diagnosis or treatment of myocardial ischemia and infarction uses animal models of heart disease, especially the porcine model of myocardial ischemia and infarction. The pig, due to its human-like cardiac anatomy, coronary circulation or arrhythmogenic mechanisms, is a good model of myocardial ischemia in humans. Typically, this model is achieved by transcatheter coronary vessel occlusion, including the use of angioplasty balloons. The most commonly occluded vessel is the left anterior descending branch of the left coronary artery, but occlusion of its proximal segment is rarely performed, which is associated with high animal mortality during such a procedure. Also in humans, myocardial ischemia due to occlusion of the proximal segment of the anterior descending branch of the left coronary artery results in a larger area of necrosis and higher mortality compared to other sites of occlusion.

The research was aimed at determining the cardioprotective effect of intracoronary acetylsalicylic acid administration during acute myocardial ischemia, achieved by occluding the proximal segment of the anterior descending branch of the left coronary artery in pigs. In addition, by modifying the anaesthetic protocol used during induction of ischemia, a stable model of myocardial ischemia and infarction with high animal survival was sought. The intention of the study was also to characterize ventricular arrhythmias during myocardial ischemia induced by occlusion of the proximal segment of the anterior descending branch of the left coronary artery in pigs.

The performed studies showed statistically significant differences regarding the concentrations and activities of oxidative stress markers in pigs that received intracoronary administration of acetylsalicylic acid, compared to the control group of animals. The values of total antioxidant capacity in tissues collected from the myocardium and serum of pigs undergoing myocardial ischemia procedure were shown to be higher in the group of pigs receiving acetylsalicylic acid compared to the control group. It also proved that the values of total oxidative status, oxidative stress index and serum lipofuscin concentration are higher in the control group animals compared to the pigs receiving acetylsalicylic acid. The study also showed that the values of total oxidative status, oxidative stress index, malondialdehyde concentration, and glutathione peroxidase, glutathione reductase and glutathione S-transferase activities in samples collected from porcine heart muscle are higher in the control group compared to the group of pigs receiving acetylsalicylic acid. It has also been demonstrated that occlusion of the proximal segment of the anterior descending branch of the left coronary artery results in a high inducibility of ventricular arrhythmias, especially ventricular tachycardia and ventricular fibrillation. It has also been proven that modification of the porcine anesthesia scheme leads to a 100% survival rate of animals undergoing the procedure to induce ischemia and myocardial infarction.

The results proved the cardioprotective effect of acetylsalicylic acid administered intracoronary during myocardial ischemia and infarction, associated with a reduction in the severity of oxidative stress in the serum and myocardial tissues of the studied pigs. The conducted studies enabled the development of a stable porcine model of myocardial ischemia and ischemia-reperfusion injury, which has a high inducibility of ventricular arrhythmias and 100% survival rate. The results may provide a basis for further studies on intracoronary administration of acetylsalicylic acid, especially during episodes of acute myocardial ischemia.

Keywords: myocardial ischemia, myocardial infarction, ischemia-reperfusion injury, acetylsalicylic acid, ventricular arrhythmias, oxidative stress, swine