

lek. Adrian Barzyc

*Wpływ dowieńcowego podania diphenyliodonium oraz L-argininy
w buforze o kwasowym odczynie na wielkość blizny pozawałowej
i występowanie zaburzeń rytmu serca u szczurów z niedokrwieniem
i reperfuzją mięśnia sercowego*

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w
dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: prof. dr hab. n. med. Agnieszka Cudnoch-Jędrzejewska

Promotor pomocniczy: dr n. med. Małgorzata Wojciechowska

Katedra i Zakład Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej

Warszawski Uniwersytet Medyczny



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2023 r.

Streszczenie w języku polskim

Wstęp

Przyczyną ostrych zespołów wieńcowych są najczęściej istotne zmiany miażdżycowe zawężające, a czasem wręcz zamykające naczynie wieńcowe, stąd w ich leczeniu stosuje się zabieg angioplastyki wieńcowej polegający na przywróceniu drożności takiego naczynia. Nagłe przywrócenie przepływu krwi do obszaru niedokrwionego jest przyczyną uszkodzenia poreperfuzyjnego, które odpowiada za zwiększenie ostatecznych rozmiarów zawału serca oraz wzrost ryzyka zagrażających życiu zaburzeń rytmu serca.

Założenia pracy

Podstawowymi mechanizmami patofizjologicznymi uszkodzenia poreperfuzyjnego są: przykurcz reperfuzyjny, przetrwałe otwarcie megakanalów mitochondrialnych, stres oksydacyjny, stan zapalny oraz zjawisko no-reflow. Nie można dokładnie określić, który z nich dominuje, najprawdopodobniej współwystępują one ze sobą. Hipoteza zakłada, że tylko interwencja, która jednocześnie ingeruje w różne szlaki uszkodzenia poreperfuzyjnego może okazać się skuteczna w zmniejszaniu końcowego obszaru zawału serca oraz ograniczeniu częstości występowania epizodów migotania komór serca.

Cel pracy

Głównym celem rozprawy doktorskiej jest zbadanie czy dowieńcowe podanie diphenyliodonium, L-argininy, buforu o kwasowym odczynie oraz ich kombinacji zmniejsza prawdopodobieństwo migotania komór serca oraz wpływa korzystnie na rozległość obszaru martwicy serca u szczurów.

Metodyka

Doświadczenia przeprowadzono na sercach szczurzych w warunkach *in vitro*.

Sześćdziesiąt siedem 12-tygodniowych samców szczurów Sprague-Dawley (SPRD/Clzd) podzielono na osiem grup. Po podłączeniu serca do systemu Langendorffa we wszystkich grupach pierwsze 10 minut doświadczenia stanowiło okres stabilizacji (przygotowania). Następnie przepływ buforu w systemie był wyłączany na czas 15 minut co skutkowało całkowitym niedokrwieniem mięśnia sercowego. W czasie pierwszych trzech minut reperfuzji bufor był podawany za pośrednictwem oddzielnego dojścia, a na kolejne 42 minuty powracano do pierwotnego źródła buforu.

W grupie pierwszej podczas reperfuzji podano bufor Krebsa-Henseleita niepoddany żadnym modyfikacjom (grupa kontrolna). Skład buforu w grupach 2, 6, 7, 8 został zmodyfikowany poprzez dodanie diphenyliodonium ($20 \mu\text{mol/l}$), w grupach 3, 5, 7, 8 użyta została L-arginina (3mmol/l), a w grupach 4, 5, 6, 8 podczas reperfuzji wykorzystano bufor o kwasowym odczynie – pH 6,8.

Ocenie podlegały następujące parametry:

- średnia wartość ciśnienia rozkurczowego w lewej komorze serca podczas stabilizacji;
- czas od początku reperfuzji do przywrócenia fizjologicznego rytmu serca;
- średnia wartość ciśnienia rozkurczowego w lewej komorze serca w czasie reperfuzji odpowiednio w 15., 30. oraz 45. minucie jej trwania;
- liczba epizodów migotania komór;
- wyrażony w procentach stosunek powierzchni objętej zawałem do całego obszaru serca;
- zawartość białka - kaspazy-3 w koniuszku serca (Western blot);
- zawartość białka - kinazy 3-fosfatydyloinozytolu w koniuszku serca (Western blot);

Wyniki:

- Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w wartościach ciśnienia rozkurczowego w lewej komorze serca podczas stabilizacji między poszczególnymi grupami;
- Nie wykonano porównawczej analizy statystycznej liczby epizodów migotania komór serca pomiędzy poszczególnymi grupami badawczymi a grupą kontrolną z uwagi na zbyt małą liczbę epizodów migotania komór.
- Średni czas do przywrócenia fizjologicznego rytmu serca w grupach badawczych nie różnił się statystycznie istotnie względem grupy kontrolnej. Nie zaobserwowano również statystycznie istotnych różnic dla tego parametru pomiędzy poszczególnymi grupami badawczymi;
- Średnie „deltę”, czyli różnice między wartościami ciśnienia rozkurczowego w danym momencie reperfuzji (w 15., 30. oraz w 45. minucie) a wartością ciśnienia rozkurczowego w fazie przygotowania (stabilizacji) grup badawczych D oraz BKO + D + ARG były istotnie niższe niż w grupie kontrolnej. Ponadto średnie delty wartości ciśnienia rozkurczowego w 30. i 45. reperfuzji dla grup badawczych ARG oraz BKO + ARG były istotnie niższe niż w grupie kontrolnej.
- Średni procentowy obszar martwicy serca dla grup badawczych: D, BKO + ARG, ARG + D i BKO + D + ARG był istotnie niższy niż w grupie kontrolnej. Nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w średnim procentowym obszarze martwicy serca między poszczególnymi grupami badawczymi.
- Średni stosunek zawartości białka kaspazy-3 w koniuszku serca względem białka referencyjnego (β -aktyny) dla grup badawczych: BKO i BKO + ARG był istotnie niższy niż w grupie kontrolnej. Ponadto wykazano, że średni stosunek zawartości kaspazy-3 względem białka referencyjnego (β -aktyny) dla niektórych grup badawczych był istotnie niższy niż dla pozostałych: BKO + ARG vs BKO + D, ARG + D vs BKO + D, BKO + ARG vs ARG, D vs BKO + D, BKO vs ARG, BKO vs BKO + D, BKO + ARG vs BKO + D + ARG.

- Średni stosunek zawartości białka kinazy 3-fosfatydyloinozytolu w koniuszku serca względem białka referencyjnego (β -aktyny) dla grupy badawczej BKO + ARG był istotnie niższy niż w grupie kontrolnej. Ponadto wykazano, że średni stosunek zawartości kinazy 3-fosfatydyloinozytolu w koniuszku serca względem białka referencyjnego (β -aktyny) dla niektórych grup badawczych był istotnie niższy niż w pozostałych: BKO + ARG vs ARG, BKO + ARG vs BKO, BKO + ARG vs ARG + D, BKO + D + ARG vs ARG.

Wnioski:

1. Zastosowanie dodatkowych substancji – diphenyliodonium oraz kombinacji buforu o kwasowym odczynie, L-argininy i diphenyliodonium w buforze Krebsa-Henseleita w modelu zawału serca *ex vivo* z wykorzystaniem systemu Langendorffa istotnie zmniejsza parametr „delta” ciśnienia rozkurczowego (świadczący o sile przykurczu reperfuzyjnego) w 15., 30. i 45. minucie reperfuzji. Ponadto zastosowanie dodatku L-argininy oraz kombinacji L-argininy i buforu o kwasowym odczynie w tym modelu istotnie zmniejsza parametr delty ciśnienia rozkurczowego w 30. i 45. minucie reperfuzji.
2. Zastosowanie dodatkowych substancji – diphenyliodonium oraz następujących kombinacji: 3 substancji (buforu o kwasowym odczynie, L-argininy i diphenyliodonium), 2 substancji (L-argininy i diphenyliodonium) oraz innych 2 substancji (buforu o kwasowym odczynie i L-argininy) w buforze Krebsa-Henseleita w modelu zawału serca *ex vivo* z wykorzystaniem systemu Langendorffa istotnie zmniejsza obszar martwicy serca.
3. Zastosowanie dodatkowych substancji (bufor o kwasowym odczynie oraz kombinacji bufor o kwasowym odczynie z L-argininą) w buforze Krebsa-Henseleita w modelu zawału serca *ex vivo* z wykorzystaniem systemu Langendorffa powoduje zmniejszenie zawartości białka kaspazy-3 (markera apoptozy) oraz kinazy 3-fosfatydyloinozytydu p85 (czynnika protekcyjnego) w koniuszku serca.

Podsumowanie

Wyniki badań potwierdzają kardioprotekcyjny wpływ zastosowania w czasie reperfuzji buforu o kwasowym odczynie (pH 6.8), L-argininy oraz diphenyliodonium. Jednoczesne dowieńcowe podanie diphenyliodonium oraz L-argininy w buforze o kwasowym odczynie wiązało się z istotnym statystycznie obniżeniem „delty” ciśnienia rozkurczowego w lewej komorze serca oraz procentowego obszaru zawału serca względem grupy kontrolnej. Dokładne mechanizmy działania wymienionych substancji oraz możliwości ich zastosowania celem ograniczenia uszkodzenia poreperfuzyjnego wymagają dalszych badań.