**Wioleta Kisiel**

**Wpływ propofolu na wybrane parametry hemostazy i proces zakrzepowy u szczurów**

**z nadciśnieniem naczyniowo-nerkowym**

Rozprawa na stopień
doktora nauk medycznych

Promotor:
Prof. dr hab. Ewa Chabielska

Promotor pomocniczy:

Dr hab. n. med. Marzena Wojewódzka-Żelezniakowicz

Praca wykonana w Samodzielnej Pracowni Biofarmacji
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Kierownik Samodzielnej Pracowni Biofarmacji: Prof. dr hab. Ewa Chabielska

**Białystok 2018**

# Streszczenie

Propofol (PRO) to anestetyk dożylny, który obok etomidatu jest najczęściej stosowany we wprowadzeniu do znieczulenia ogólnego. Dane literaturowe nie dają jednoznacznej odpowiedzi o jego wpływie na hemostazę. W hodowlach komórek śródbłonka i badaniach funkcjonalnych wykorzystujących izolowane naczynia i modele zwierzęce wykazano, że PRO zmienia biodostępność tlenku azotu. Działanie to może być przyczyną hipotensji, którą obserwowano zarówno w badaniach eksperymentalnych jak i klinicznych. Z kolei fragmentaryczne i sprzeczne dane donoszą o wpływie PRO na agregację płytek krwi oraz osoczowy układ krzepnięcia. Można założyć zatem, że śródbłonkowe działanie PRO może mieć znaczenie także w regulacji układu hemostazy.

Reasumując, celem przeprowadzonych badań była ocena wpływu infuzji PRO u szczurów z nadciśnieniem naczyniowo-nerkowym (2K-1C) na proces powstawania zakrzepu tętniczego i żylnego, hemostazę pierwotną i osoczową oraz parametry fibrynolizy w osoczu szczurów, a także potwierdzenie udziału mechanizmów śródbłonkowych w efektach działania leku, również w hodowli komórek HUVEC (komórki śródbłonka ludzkiej żyły pępowinowej). Zmierzono także wybrane parametry hemodynamiczne w trakcie infuzji leku.

Badania przeprowadzono na szczurach, samcach szczepu Wistar w modelu zakrzepicy tętniczej i żylnej oraz w modelu *in vitro* - w hodowli komórek HUVEC. PRO podawano w dawce 15 mg/kg/h w godzinnej infuzji do żyły udowej (*i.v.*). Wpływ PRO na proces powstawania zakrzepicy tętniczej i żylnej oceniono przez pomiar szeregu parametrów oceniających zakres i dynamikę formowania zakrzepów. W celu zbadania wpływu infuzji PRO na parametry hemodynamiczne dokonano pomiaru: ciśnienia tętniczego krwi skurczowego (SBP) i rozkurczowego (DBP), przepływu krwi w tętnicy szyjnej (CBF) oraz częstości akcji serca (HR). Oceniono wpływ PRO na parametry hemostazy pierwotnej: czas krwawienia (BT) i adhezję płytek krwi do kolagenu oraz wybrane parametry hemostazy osoczowej: czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (aPTT), czas protrombinowy (PT) i fibrynogen. Dokonano także oceny poziomu hematokrytu (HT) i hemoglobiny (Hb), ilości leukocytów, erytrocytów i płytek krwi. Wpływ PRO na parametry układu fibrynolizy zbadano poprzez określenie czasu lizy skrzepu euglobulin oraz poprzez oznaczenie stężenia antygenów tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA), inhibitora tkankowego aktywatora plazminogenu (PAI-1), inhibitora fibrynolizy aktywowanego trombiną (TAFI). Określono również wpływ PRO na potencjał hemostatyczny, koagulacyjny i fibrynolityczny osocza oraz czas latencji. W modelu HUVEC zmierzono parametry fibrynolizy: stężenie t-PA, PAI-1 i TAFI.

Wykazano, iż godzinna infuzja propofolu działała antyfibrynolitycznie i przeciwpłytkowo, co dokumentowały takie parametry jak: wydłużenie ECLT, wzrost stężenia antygenu PAI-1 i TAFI oraz spadek antygenu t-PA i adhezji płytek krwi do kolagenu. Podobny kierunek zmian parametrów fibrynolizy stwierdzono w hodowli komórek HUVEC, potwierdzając jednocześnie udział śródbłonka naczyniowego w mechanizmie działania propofolu. Lek nie zmieniał natomiast istotnie parametrów krzepnięcia osoczowego mierzonego metodą potencjałów hemostatycznych osocza oraz aPTT, PT i fibrynogenu. Nie modyfikował istotnie procesu powstawania zakrzepu tętniczego i żylnego, choć zauważono tendencję do zwiększenia masy zakrzepów. W przypadku zakrzepicy tętniczej zauważono wzrost incydentów całkowitej okluzji naczynia. Obserwowano także efekt hipotensyjny w trakcie infuzji leku.

Podsumowując, propofol wykazuje działanie plejotropowe w układzie hemostazy zarówno w warunkach patologii układu sercowo-naczyniowego (szczury z nadciśnieniem naczyniowo – nerkowym) jak i w warunkach zdrowia (HUVEC). Jego wpływ na hemostazę jest wielotorowy i wyrażony silnym efektem antyfibrynolitycznym, zależnym od śródbłonka naczyniowego, a także działaniem przeciwpłytkowym. Brak istotnych zmian w procesach formowania zakrzepu żylnego i tętniczego może być wynikiem wielokierunkowego działania propofolu w układzie hemostazy i jego efektu hipotensyjnego. Wyniki prezentowane w niniejszej rozprawie wskazują na konieczność prowadzenia kolejnych badań nad wpływem propofolu na układ hemostazy u pacjentów z zaburzeniami krzepnięcia, leczonych lekami modulującymi procesy krzepnięcia i fibrynolizy oraz badań pokazujących przedłużone w czasie efekty działania leku.

# X. Abstract

Propofol (PRO) is intravenous anaesthetic agent, which next to the etomidate is most commonly used in the introduction to general anesthesia. Literature data do not give a clear-cut answer about its effect on hemostasis. In cultures of endothelial cells and functional studies using isolated vessels and animal models, PRO has been shown to alter the bioavailability of nitric oxide. This effect may be the cause of hypotension, which was observed in both experimental and clinical studies. In turn, fragmentary and conflicting data report on the impact of PRO on platelet aggregation and blood coagulation system. It can be assumed, therefore, that the endothelial action of PRO may be relevant also in the regulation of hemostasis.

To sum up, the aim of the presented research was to assess the effect of PRO infusion in rats with renovascular hypertension (2K-1C) on the process of arterial and venous thrombus formation, primary and plasma haemostasis and fibrinolysis parameters in rat plasma as well as confirmation of the participation of endothelial mechanisms in effects of the drug, also in HUVEC cell culture (endothelial cells of the human umbilical vein). The selected haemodynamic parameters were also measured during the infusion of the drug.

The study was conducted on rats, males of the Wistar strain in the arterial and venous thrombosis model and in the *in vitro* model - in HUVEC cell culture. PRO was administered at a dose of 15 mg /kg /h in hour infusion into the femoral vein (*i.v*.). The impact of PRO on the process of arterial and venous thrombosis was assessed by measuring a number of parameters assessing the scope and dynamics of thrombosis formation. In order to investigate the effect of PRO infusion on hemodynamic parameters, the following parameters were measured: systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP), carotid artery blood flow (CBF) and heart rate (HR). The effect of PRO on the parameters of primary haemostasis was evaluated: bleeding time (BT) and platelet adhesion to collagen and selected parameters of plasma hemostasis: activated partial thromboplastin time (aPTT), prothrombin time (PT) and fibrinogen. Hematocrit (HT) and hemoglobin (Hb) levels, the amount of leucocytes, erythrocytes and platelets were also assessed. The effect of PRO on the parameters of the fibrinolysis system was examined by determining the time of euglobulin clot lysis and by determining the concentration of tissue plasminogen activator (t-PA) antigens, tissue plasminogen activator inhibitor (PAI-1), thrombin-activated fibrinolysis inhibitor (TAFI). The influence of PRO on the haemostatic, plasma coagulation and fibrinolytic potential as well as the latency time were also determined. In the HUVEC model, fibrinolysis parameters were measured: t-PA, PAI-1 and TAFI concentration.

It was shown that the propofol in hourly infusion has antifibrinolytic and antiplatelet effects, which was documented by parameters such as ECLT prolongation, increase in PAI-1 antigen and TAFI, and decrease in t-PA antigen and platelet adhesion to collagen. A similar direction of changes in fibrinolysis parameters was found in the culture of HUVEC cells, while confirming the involvement of vascular endothelium in the mechanism of action of propofol. However, the drug did not significantly alter plasma coagulation parameters as measured by the plasma hemostatic potential as well as aPTT, PT and fibrinogen. He did not significantly modify the process of arterial and venous thrombosis, although there was a tendency to increase the weight of blood clots. In the case of arterial thrombosis, an increase in total vascular occlusion events was noted. A hypotensive effect was also observed during the infusion of the drug.

In conclusion, propofol has a pleiotropic effect in the haemostatic system both in cardiovascular pathology conditions (rats with renovascular hypertension) and in health conditions (HUVEC). Its effect on hemostasis is multidirectional and expressed by a strong antifibrinolytic effect, dependent on the vascular endothelium, as well as antiplatelet effect. Lack of significant changes in the formation of venous and arterial clot may be the result of multidirectional action of propofol in the hemostasis system and its hypotensive effect. The results presented in this dissertation indicate the need to conduct further studies on the effect of propofol on the hemostasis system in patients with coagulation disorders, treated with drugs modulating the coagulation and fibrinolysis processes and studies showing the long-term effects of the drug.