Faculty of Pharmacy, Pharos University in Alexandria
Department of Pharmacology &Toxicology

Potential Cardioprotective Effect of Astaxanthin and/or Aspirin *via* Mitigation of Inflammasome Trails in Isoproterenol-Induced Myocardial Infarction in Rats.

A Thesis

Submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of

Master of Pharmaceutical Sciences

In

Pharmacology and Toxicology

Presented by

Barbara Botros Gamil Eskander

B.Sc. in Pharm. Sci., Faculty of Pharmacy,
Pharos University in Alexandria, 2020

Pharos University in Alexandria

P.U.A. Library
Central Medical Library (B)
Faculty of :
Serial No : 898
Classification : 615.1

2026

ABSTRACT

Myocardial infarction (MI) is a predominant cause of death worldwide. It begins with coronary artery occlusion, followed by myocardial ischemia and irreversible cardiomyocyte death. The comprehensive understanding of MI pathophysiology is essential for investigating novel therapeutics and prophylactic agents. Accordingly, this study examined the potential anti-inflammatory and cardioprotective effects of astaxanthin compared with aspirin and their combination *via* attenuating NLRP3/ASC/caspase-1 signaling pathway. The subcutaneous administration of isoproterenol (ISO) at a dose of (85 mg/kg) for two successive days induced acute MI in rats. Aspirin was administered at a dose of (30 mg/kg), and astaxanthin at two different doses (40 and 60 mg/kg). A combination regimen of aspirin and astaxanthin was also given at a dose of 30 mg/kg and 40 mg/kg, respectively. All treatments were administered orally for 14 days, followed by isoproterenol subcutaneous injection on the 13th and 14th days. The aspirin and astaxanthin combination-pretreated group showed a significant improvement in electrocardiogram (ECG) pattern, cardiac hemodynamics, and histoarchitecture of the myocardial tissue. It decreased the serum biomarkers level, including cardiac troponin I (cTnI), aspartate aminotransferase (AST), creatine kinase MB (CK-MB), and lactate dehydrogenase (LDH). The combination group also showed a significant decline in the cardiac level of toll-like receptor 4 (TLR4), nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB), and interleukin-1 beta (IL-1β). These outcomes are mediated by the significant downregulation of the NLRP3/ASC/caspase-1 signaling pathway. While, isoproterenol significantly decreased miR-495 expression, the combination treatment significantly restored its expression toward the control level. This finding highlighted the protective role of miR-495 in mitigating inflammation in cardiomyocytes, acting as a negative regulator for NLRP3 inflammasome activation. The study demonstrated the dose-dependent cardioprotective effect of astaxanthin. The higher dose of astaxanthin produced effects comparable to those achieved by aspirin, emphasizing the potential protective effects of astaxanthin. The combination regimen exhibited the most pronounced cardioprotective efficacy compared with either monotherapy; effects were comparable to the near-sham levels. Consequently, this combination therapy serves as a promising prophylactic strategy for the prevention of MI.

Keywords: Myocardial infarction, Astaxanthin, Aspirin, NLRP3 inflammasome, miR-495, Dose-dependent, Inflammation.

الملخص العربي

الملخص العربي

تُصنف أمراض القلب والأوعية الدموية السبب الرئيسي للوفاة في جميع أنحاء العالم. و يُعتبر مرض احتشاء عضلة القلب حالةً سريريةً حرجة ومهددة للحياة ؛ تبدأ غالباً بانسداد الشرايين التاجية وما يليه من نقص تروية حاد و انقطاع في إمدادات الأكسجين والدم مما يؤدي إلى تلف نسيجي دائم وقد ينتهي بحدوث الموت القلبي المفاجئ. يتم تشخيص احتشاء عضلة القلب سريرياً من خلال رصد تغيرات ديناميكية في تخطيط كهربائية القلب (ECG) مثل الارتفاع المرضي الملحوظ في القطعة ST عن خط الأساس (ST-segment elevation) و ارتفاع تركيز إنزيمات القلب في الدم مثل ، كرياتين كيناز - الجزء العضلي القلبي (CK-MB) – MB ،إنزيم نزع هيدروجين اللاكتات (LDH) ، إنزيم ناقل أمين الأسبارتات (AST) وارتفاع تركيز البروتينات النوعية مثل تروبونين القلب النوعي I (cTnI).

تُعدُّ مساراتُ الإشارات الالتهابية آليةً أساسيةً في التطور الباثولوجي لاحتشاء عضلة القلب، إذ تعزز تفاقم التلف النسيجي وفشل القلب الوظيفي. إذ يُمثّل NLRP3/ASC/caspase-1 مساراً التهابياً محورياً في حالات احتشاء عضلة القلب، مما يؤدي لاحقاً إلى إعادة تشكيل القلب المرضية. بمجرد تنشيط جسيم NLRP3 الالتهابي ، فإنه يحفز إنزيم كاسباز-1 الذي يؤدي إلى إطلاق السيتوكينات المحفزة للالتهاب و هي مسؤولة عن تفاقم الاستجابة الالتهابية داخل العضلة القلبية مثل الإنترلوكين -١٨ و الإنترلوكين -1 بيتا. تُشكل الأحماض النووية الريبية الصغيرة غير المشفّرة، المعروفة بـ الميكرو آر إن إيه(miRNAs) آلية محورية لـ التنظيم الجيني في مرحلة ما بعد النسخ ، مما يوفر طبقة معقدة من التحكم في المسارات البيولوجية المرتبطة بأمراض القلب. على الرغم من الفعالية السريرية للأدوية التقليدية ، إلا أنها تظل محدودة القدرة على الكبح الكامل للاستجابات الالتهابية المعقدة المرتبطة باحتشاء القلب. وبناءً على ذلك ، أصبح من الضروري البحث عن عوامل وقائية جديدة تتميز بتأثيرات قوية مضادة للأكسدة و اللالتهابات ، لتكون بمثابة استراتيجيات تكميلية للأدوية التقليدية لمواجهة مختلف الآليات المرضية الفسيولوجية التي تشارك في أمراض القلب والأوعية الدموية.

اعتمدت الدراسة على منهجية تقييم متعددة المستويات ، بدءاً من تخطيط القلب الكهربائي وصولاً إلى التعبير الجيني والبروتيني والفحص المجهري للأنسجة ، لتقييم مدى فاعلية التدخل الدوائي ضد الاحتشاء. كما انها قامت بتقديم رؤى حول الآليات الجزيئية التي ساهمت في إحداث احتشاء في عضلة القلب الناجم عن عقارالأيزوبروتيرينول في الجرذان. تشمل أهداف هذه الدراسة تقييم الفعالية الوقائية للقلب للأستازانثين ، مع التركيز على تحديد الاستجابة المعتمدة على الجرعة ، و ذلك مقارنةً بتأثيره مع الأسبرين من خلال تثبيط التأثيرات الضارة لمسار الإشارة الالتهابي NLRP3/ASC/caspase-1 . علاوةً على ذلك، تناولت هذه الدراسة إمكانية تحقيق فوائد تآزرية إضافية في حماية القلب من خلال العلاج المشترك بين الأسبرين والأستازانثين، و ذلك من خلال كبح الاستجابة الالتهابية المفرطة.

أُجريت هذه الدراسة على ذكور الجرذان سبارغ-داويلي و التي يتراوح وزنها بين ١٧٠- ٢٠٠ غرام. قُسِّمت الجرذان عشوائيًا إلى ست مجموعات؛ ستة جرذان في كل مجموعة، وتلقت علاجًا عن طريق الفم لمدة أسبوعين على النحو التالي: المجموعة الأولى (المجموعة الضابطة) تلقت الماء المقطر ، المجموعة الثانية (الأيزوبروتيرينول) تلقت الماء المقطر ثم يليه حقن عقار الإيزوبروتيرينول تحت الجلد في اليومين الأخيرين بجرعة 85 ميليغرام لكل كيلوجرام ، المجموعة الثالثة (الأسبرين) تم علاجها بالأسبرين (30 ميليغرام لكل كيلوجرام يوميًا)، المجموعة الرابعة (الأستازانثين 40) تم علاجها بالأستازانثين (40 ميليغرام لكل كيلوجرام يوميًا)، المجموعة الخامسة (الأستازانثين 60) تم علاجها بالأستازانثين (60 ميليغرام لكل كيلوجرام يوميًا)، والمجموعة السادسة (الأسبرين/ الأستازانثين) تم علاجها (بالأسبرين 30 ميليغرام و بالأستازانثين 40 ميليغرام لكل كيلوجرام يوميًا). تم تحفيز احتشاء عضلة القلب في ذكور الجرذان عن طريق حقن عقارالإيزوبروتيرينول تحت الجلد بجرعة 85 ميليغرام لكل كيلوجرام في اليومين الأخيرين من التجربة.

في نهاية التجربة، بعد 24 ساعة من إعطاء الجرعة الثانية من الإيزوبروتيرينول ، تم تسجيل تخطيط القلب الكهربائي لتقييم حدوث احتشاء عضلة القلب وقياس وظائف القلب الديناميكية الدموية. تم إجراء القتل الرحيم للجرذان وفقاً للبروتوكولات الأخلاقية المعتمدة للتعامل مع حيوانات التجارب. كما تم جمع عينات الأنسجة القلبية لتقييم التأثيرات الوقائية للعلاج الدوائي من خلال تحديد تركيزات مستقبل TLR4 و العامل النووي كابا ب NF-Kb و الإنترلوكين-1 بيتا (IL-1β) باستخدام تقنية ELISA و قياس التعبير البروتيني النسبي NLRP3, Caspase-1, ASC باستخدام تقنية Western blotفي أنسجة القلب ، مع استخدام بروتين بيتا-أكتين (β-actin) كمرجع للمعايرة. كما تم قياس التعبير الجيني لـ miR-495 باستخدام تفاعل البوليميراز المتسلسل الكمي في الوقت الحقيقي (RT-qPCR). و تم تأكيد هذه النتائج من خلال دراسة الهيكل النسيجي للقلب. كما تم تقييم مدى الإصابة القلبية عن طريق قياس تركيز إنزيمات القلب في الدم مثل ، كرياتين كيناز - الجزء العضلي القلبي (CK-MB) – MB ،إنزيم نزع هيدروجين اللاكتات (LDH) ، إنزيم ناقل أمين الأسبارتات (AST) و قياس تركيز البروتينات النوعية مثل تروبونين القلب النوعي I (cTnI) باستخدام تقنية ELISA.

فيما يلي ملخص للنتائج الجديدة واستنتاجات الدراسة الحالية.

كشف مخطط كهربائية القلب (ECG) في الجرذان المحقونة بالإيزوبروتيرينول عن تغيرات جوهرية تمثلت في ارتفاع الجزء ST مما يشير إلى حدوث إصابة حادة في عضلة القلب كما سجلت انخفاضاً جوهرياً في طول فترة RR (interval) مما يشير إلى زيادة معدل ضربات القلب. كما تم ملاحظة نقص في تدفق الدم في الشريان السباتي و كمية الدم التي يضخها القلب في كل نبضة و كمية الدم التي يضخها في الدقيقة (حاصل النتاج القلبي) وقد تعززت هذه النتائج من خلال التحليل النسيجي والقياسات الفيزيائية حيث تم ملاحظة زيادة نسبة وزن القلب إلى وزن الجسم مما يؤكد حدوث تضخم قلبي وخلل وظيفي شامل . وقد أظهرت النتائج زيادة ملحوظة في تركيزات انزيمات القلب في الدم و ارتفاع تركيز مستقبل TLR4 و العامل النووي كابا ب NF-Kb و الإنترلوكين-1 بيتا (IL-1β). بالإضافة إلى ارتفاع التعبير البروتيني النسبي للمكونات الهيكلية الأساسية لجسيم NLRP3 الالتهابي، والتي تشمل: NLRP3, Caspase-1, ASC. وتم أيضا ملاحظة انخفاض كبيرفي التعبير الجيني لـ miR-495 في أنسجة القلب. على المستوى النسيجي المرضي، أدى الإيزوبروتيرينول إلى إحداث آفات نسيجية حادة تمثلت في تنخر واسع النطاق للألياف القلبية وارتشاح التهابي كثيف، مما يؤكد حدوث ضرر هيكلي جسيم في عضلة القلب.

أدى العلاج بالأسبرين، أو الأستازانثين معًا أو كلّ على حدة، إلى تحسن ملحوظ في مؤشرات تخطيط كهربائية القلب تمثل ذلك في تراجع ارتفاع قطعة ST نحو مستواها الطبيعي، متبوعاً بتنظيم معدل ضربات القلب و استعادة الكفاءة الديناميكية الدموية .كما ساهم التدخل الدوائي في الحد من ارتفاع تركيزات انزيمات القلب ، مما يشير إلى قدرته على الحفاظ على سلامة غشاء الخلايا القلبية. علاوة على ذلك، أظهر العلاج انخفاض ملحوظ في المستويات الكمية لمستقبل TLR4 و العامل النووي كابا ب NF-Kb ، مما ساهم في الحد من تفعيل المسارات الالتهابية وهو ما ارتبط بانخفاض موازي في مستويات السيتوكينات الالتهابية مثل الإنترلوكين-1 بيتا (IL-1β). و هذا يعكس قدرة الدواء على الحد من التلف الخلوي والحفاظ على سلامة أنسجة القلب.

وعلى المستوى الجزيئي، أسفر التدخل الدوائي إلى تثبيط ملحوظ في التعبير البروتيني النسبي لـ NLRP3, Caspase-1, ASC في أنسجة القلب كما زاد التعبير الجيني لـ miR-495 بشكل كبير ، مما يشير إلى دوره المحتمل في تثبيط مسارات الالتهاب المستهدفة. أشار تحليل ارتباط بيرسون إلى وجود ارتباط إيجابي قوي بين تركيز cTnI في الدم و التعبير النسبي لـ NLRP3 ، caspase-1 و ASC. يسلط هذا الارتباط الضوء على دور الالتهاب الذي يتوسطه الجسيم الالتهابي NLRP3 مع حجم التلف الخلوي للقلب وبذلك يمكن استخدامه في المستقبل كـ أداة تشخيصية غير جراحية، نظرا لارتباطه الوثيق بمدى تضرر الأنسجة القلبية او كهدف علاجياً استراتيجياً في الحالات السريرية.

وبناءً على هذه المعطيات، فإن العلاج المركب بين الأسبرين والأستازانثين استهدف مسار الإشارة الالتهابي بشكل فعال ، مما يجعله عاملاً وقائياً واعداً في احتشاء عضلة القلب والحد من تداعياته في الممارسة السريرية مستقبلاً. يُظهر هذا النهج العلاجي تأثيرات تآزرية، مما يوفر حماية تفوق ما يحققه كل دواء بمفرده، وذلك باستخدام جرعاتٍ أقل للحد من الآثار الجانبية. وانطلاقًا من هذه النقاط، تهدف التجارب السريرية الجارية إلى ترسيخ العلاج المُركّب كبروتوكول علاجي قياسي يستهدف مساراتٍ مُتعددة في مختلف أمراض القلب والأوعية الدموية. بالإضافة إلى ذلك، يُشير هذا البحث إلى ضرورة استكشاف العلاجات القائمة على miRNA كمنهجية وقائية مبتكرة، والتي سيكون لها دورتنظيمي كبير في في كبح المسارات الالتهابية و الوقاية من الأمراض المرتبطة بالالتهابات، مما يمهد الطريق لثورة جديدة في الطب الجزيئي السريري.