

**Streszczenia rozprawy doktorskiej Macieja Klepuszewskiego w języku polskim i angielskim,
promotor prof. dr hab. n. med. Jacek Gajek**

Tytuł: Humoralne mechanizmy w doświadczalnym modelu tachyarytmicznego wstrząsu kardiogenego

Wstęp: Zwierzęcy model przewlekłej niewydolności serca (chronic heart failure, CHF) indukowany przewlekłą szybką stymulacją serca (rapid ventricular pacing induced CHF, RVP-CHF) rozwija się przy udziale podobnych mechanizmów humoralnych, co CHF u ludzi. Z tego powodu jest on szczególnie często stosowany do badań nad przewlekłymi zmianami w układzie krążenia. Szybka stymulacja komór serca była także używana do wywoływania gwałtownej destabilizacji układu krążenia (rapid ventricular pacing induced acute heart failure, RVP-AHF), lecz doświadczenia te skupiały się głównie na szczegółowo wyselekcjonowanych parametrach. Brakuje opisów zwierzęcych modeli wstrząsu kardiogenego opartych o RVP ukazujących w sposób kompleksowy jak zmieniają się podstawowe parametry hemodynamiczne, echokardiograficzne i biochemiczne w relacji do zachodzących mechanizmów humoralnych.

Cele: 1) wytworzenie i podstawowa charakterystyka hemodynamiczna, echokardiograficzna, biochemiczna modelu tachyarytmicznego wstrząsu kardiogenego świni rasy polskiej białej zwisłouchej, 2) zastosowanie w/w modelu do symulacji częstoskurczu komorowego przebiegającego ze wstrząsem kardiogenym w przypadku serca zdrowego (grupa A) jak i w trakcie rozwoju CHF (grupa B), 3) opis i porównanie zachodzących mechanizmów humoralnych w obu przypadkach na przykładzie endoteliny-1 (ET-1) i czynnika martwicy nowotworów alfa (TNF- α).

Material i metody: Żeńskiemu, 8-miesięcznemu osobnikowi świni rasy polskiej białej o masie 72kg wszczepiono stymulator serca w zmodyfikowanym układzie umożliwiającym stymulację z bardzo wysokimi częstotliwościami. Przeprowadzono 10 sesji doświadczalnych w odstępach 2-tygodniowych, podczas każdej z nich zwiększano stopniowo częstość stymulacji w odstępach 10 minutowych. Przed (Etap 0), w trakcie (etap E) i po (etap Z) zbierano dane hemodynamiczne, echokardiograficzne, biochemiczne i oznaczano stężenia czynników humoralnych. Między sesjami 1-6 rozrusznik wyłączano, dane z tych sesji tworzą grupę A, między sesjami 6-10 stymulowano ciągle z częstością 160/min, dane z tych sesji tworzą grupę B.

Wyniki: Zarówno przed RVP (etap 0), jak i w jego trakcie (etap E) średnie ciśnienie tętnicze (MAP, mmHG) w grupie B było niższe niż w grupie A (B vs. A, etap E: 49 ± 7 vs. 73 ± 11 , $p=0,005$, B vs. A, etap 0: 63 ± 7 vs. 105 ± 14 , $p<0,001$). Uruchomienie RVP: w grupie A powodowało obniżenie MAP (105 ± 14 vs. 73 ± 11 $p<0,001$), w grupie B nie zaobserwowano spadku (63 ± 7 vs. 49 ± 7 $p=0,149$). Ciśnienie tętnicze koreluje ujemnie z częstością stymulacji (pacing rate, PR) ($\rho = -0,537$, $p<0,001$). Grupę B charakteryzowała obniżona frakcja wyrzutowa względem grupy A (etap 0, przed RVP: $27,9 \pm 8,9\%$ vs. $59,9 \pm 4,6\%$ $p=0,003$). Objętość wyrzutowa (wszystkie następujące objętości podano w cm³) ulegała zmniejszeniu pod wpływem RVP w obu grupach (RVP vs. Etap 0; grupa A: $44,1 \pm 34,9$ vs. $86,5 \pm 19$, $p=0,021$; grupa B $29,2 \pm 9,3$ vs. 45 ± 17 , $p=0,044$). Podczas RVP w grupie B względem grupy A obserwowano: niższą frakcję wyrzutową ($19,8 \pm 6,2\%$ vs. $43,2 \pm 21,1\%$, $p<0,001$), większe objętości końcoworozkurczowe (149 ± 23 vs. 89 ± 34 , $p<0,001$) i końcowoskurczowe ($119,8 \pm 21,8$ vs. $44,9 \pm 9,3$ $p<0,001$) przy braku różnicy w objętości wyrzutowej ($29,2 \pm 9,3$ vs. $44,1 \pm 34,9$, $p=0,124$). Stężenie ET-1 [pg/ml] w obu grupach rosło w miarę progresji etapów sesji doświadczalnych 0→E→Z (grupa A: $2,09 \pm 0,24$ → $1,99 \pm 0,59$ → $3,14 \pm 0,92$, $p=0,012$; grupa B: $9,16 \pm 1,38$ → $10,91 \pm 1,06$ → $14,56 \pm 1,98$, $p<0,001$). Średnie stężenie ET-1 w grupie B było wyższe niż w grupie A ($p<0,001$). Analiza interakcji grupy (A czy B) i etapu (0→E→Z) wykazała silniejszy przyrost stężeń ET-1 w grupie B niż w grupie A w trakcie

sesji doświadczalnych (wartość testu $F=8,07$, $p=0,003$). Stężenie ET-1 koreluje w sposób dodatni z częstotliwością stymulacji PR ($\rho=0,759$, $p<0,001$), zaś w sposób ujemny z ciśnieniem tętniczym ($\rho=-0,720$, $p<0,01$ dla MAP). Najwyższe stężenie ET-1 i TNF- α w każdej sesji doświadczalnej występowało zawsze na etapie Z (po RVP), reguła ta nie dotyczy jedynie TNF- α w grupie A. Stężenie TNF- α [pg/ml] w grupie B było wyższe niż w grupie A na każdym etapie z wyjątkiem etapu 0. Dla całości wyników, bez podziału na grupy nie stwierdzono zmian w stężeniach TNF- α w miarę progresji etapów doświadczeń ($0 \rightarrow E \rightarrow Z$), nie występuje interakcja grupa \times etap. W grupie A: stężenia TNF- α korelują negatywnie z liczbą porządkową sesji doświadczalnej - w każdej kolejnej sesji stężenia TNF- α były średnio niższe (korelacja między TNF- α a liczbę porządkową doświadczenia $\rho=-0,689$, $p<0,05$), zaś dla ET-1 korelacja ta ma wartość pozytywną ($\rho=0,642$, $p<0,05$). Korelacje takie nie zachodzą w grupie B. Stężenia ET-1 i TNF- α korelują ze sobą w grupie B, lecz nie A. W grupie B zaobserwowano wzrost parametrów układu czerwonych krwinek w trakcie trwania kolejnych etapów ($0 \rightarrow E \rightarrow Z$) – na przykładzie stężenia hemoglobiny [mmol/l] ($6,68 \pm 0,67$ vs. $7,4 \pm 0,14$ vs. $8,15 \pm 0,19$ $p=0,008$), w grupie B występowały wyższe stężenia potasu, a niższe wapnia względem grupy A ([mmol/litr, na przykładzie etapów E, B vs. A: K^+ : $4,53 \pm 0,26$ vs. $4,01 \pm 0,2$ $p<0,001$; Ca^{2+} : $1,31 \pm 0,08$ vs. $1,43 \pm 0,02$, $p=0,001$). Nie zaobserwowano zmian w układzie krzepnięcia. Po RVP odnotowano niższe pH niż przed (grupa A: $7,35 \pm 0,02$ vs. $7,39 \pm 0,02$ $p=0,017$, grupa B $7,45 \pm 0,02$ vs. $7,49 \pm 0,03$ $p=0,046$), po RVP pH w grupie B było niższe niż w grupie A ($7,45 \pm 0,02$ vs. $7,50 \pm 0,01$, $p<0,001$).

Wnioski:

- Zaproponowany model okazał się być skuteczny w kontekście wywoływania nagłych i silnych zmian w układzie krążenia badanego zwierzęcia,
- Skuteczność ta została potwierdzona wieloma różnymi parametrami – hemodynamicznymi, echokardiograficznymi i metabolicznymi, zarówno w kontekście serca uprzednio zdrowego, jak i w przypadku wcześniej wytworzonej RVP-CHF,
- Zaburzenia homeostazy wywołane przez opisany model indukują silną odpowiedź humoralną ocenianą na przykładzie ET-1 i TNF- α ,
- Zmiany hemodynamiczne, echokardiograficzne jak i metaboliczne w przypadku RVP-CHF są silniej wyrażone niż w przypadku serca uprzednio zdrowego. Postuluje się, że utrwalony częstoskurcz komorowy w kontekście klinicznym przewlekłej niewydolności serca jest gorzej tolerowany,
- nawet w kontekście RVP-CHF obecne, i względnie skuteczne, są mechanizmy adaptacyjne w odpowiedzi na symulowany częstoskurcz komorowy, pozwalają one (przynajmniej do pewnych granic) utrzymać perfuzję narządową na minimalnym poziomie,
- w przypadku RVP-CHF odpowiedź humoralna na wstrząs kardiogeny, mierzona stężeniem ET-1 jest silniejsza niż w przypadku serca uprzednio zdrowego,
- w przypadku stosowania opisanego modelu wstrząsu kardiogenego w RVP-CHF dochodzi do szybkiego wzrostu parametrów czerwonych krwinek, przekraczających zdolności produkcyjne szpiku kostnego, hipotetyczne wyjaśnienie tego zjawiska opiera się na utracie osocza z objętości krążącej i wtórnego zagęszczenia elementów morfotycznych krwi,
- powtarzalne zaburzenia w układzie krążenia wywołane przez symulowany utrwalony częstoskurcz komorowy w sercu uprzednio zdrowym, pomimo a) krótkiego czasu trwania, b) wystarczająco długiego czasu na rekonwalescencję i c) pełnej rekonwalescencji podstawowych parametrów hemodynamicznych, osłabiają odpowiedź humoralną mierzona stężeniem TNF- α , a wzmacniają tę, mierzona stężeniem ET-1, na kolejny utrwalony częstoskurcz komorowy.

Title: Humoral mechanisms in an experimental model of cardiogenic shock due to induced tachyarrhythmia

Introduction: Humoral factors involved in the development of chronic heart failure (CHF) in people and in animal models of chronic heart failure induced by rapid ventricular pacing (RVP-CHF) are similar. For that reason, these models are often used for research on CHF. Rapid ventricular pacing has also been used to induce acute and profound circulatory decompensation, but only in research restricted to highly specific parameters. Complex characteristics of basic hemodynamic, echocardiographic and biochemical parameters in comparison to humoral changes are lacking.

Aims: 1) to create and characterize in terms of basic hemodynamic, echocardiographic and biochemical parameters an swine model of tachycardia-induced cardiogenic shock, 2) to use the model mentioned above, to induce cardiogenic shock due to simulated sustained ventricular tachycardia in an healthy heart (group A), as well as in the development phase of CHF, 3) to characterize and compare humoral mechanisms activated in both groups, by example of endothelin-1 (ET-1) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α).

Materials and methods: The experiment was conducted on a female, 8-month old, 72 kg Polish Large White (Loop-eared) swine. A pacemaker system, specially modified to be able to achieve high pacing rates, was implanted. 10 experimental sessions (ES) in 14-days intervals were conducted. In each, the pacing rate (PR) was gradually increased in 10-minute intervals. Data on basic hemodynamic, echocardiographic, biochemical parameters, as well as the serum concentration of ET-1 and TNF- α were collected at following phases: phase 0 - before initiating RVP, phase E - during RVP, phase Z - after cessation of RVP. Between ES 1-6 the pacemaker system was inactive, between ES 7-10 the heart was paced at a constant rate of 160/min. For analysis, the collected data were divided into following groups: group A consists of data collected from ES 1-6, group B consists of data collected from ES 7-10.

Results: Mean arterial blood pressure (MAP, mmHg) in group B was lower than in group A during phase E (B vs. A 49 ± 7 vs. 73 ± 11 , $p=0,005$) and phase 0 (B vs. A 63 ± 7 vs. 105 ± 14 , $p<0,001$). In group A rapid ventricular pacing lead to a decrease of MAP (105 ± 14 vs. 73 ± 11 $p<0,001$), in group B this drop wasn't significant (63 ± 7 vs. 49 ± 7 $p=0,149$). MAP negatively correlates with PR ($\rho = -0,537$, $p<0,001$). Ejection fraction in group B was lower compared to A (phase 0, $27,9 \pm 8,9\%$ vs. $59,9 \pm 4,6\%$ $p=0,003$). Stroke volume (all following volumes expressed in cm^3) decreased during RVP in both groups (RVP vs. phase 0; A: $44,1 \pm 34,9$ vs. $86,5 \pm 19$, $p=0,021$; B: $29,2 \pm 9,3$ vs. 45 ± 17 , $p=0,044$), but the difference between them wasn't significant (phase E, B vs. A $29,2 \pm 9,3$ vs. $44,1 \pm 34,9$, $p=0,124$). During RVP group B in comparison to group A was characterized by: a lower ejection fraction ($19,8 \pm 6,2\%$ vs. $43,2 \pm 21,1\%$, $p<0,001$), greater end-diastolic (149 ± 23 vs. 89 ± 34 , $p<0,001$) and end-systolic volumes ($119,8 \pm 21,8$ vs. $44,9 \pm 9,3$, $p<0,001$). ET-1 [pg/ml] concentrations constantly increased during progression in phases 0→E→Z (group A: $2,09 \pm 0,24$ → $1,99 \pm 0,59$ → $3,14 \pm 0,92$, $p=0,012$; group B: $9,16 \pm 1,38$ → $10,91 \pm 1,06$ → $14,56 \pm 1,98$, $p<0,001$). Interaction analysis: *group* (A or B) x *phase* (0→E→Z) revealed a stronger increase of ET-1 concentrations during phase progression (0→E→Z) in group B than A (test F-value=8,07, $p=0,003$). ET-1 concentrations correlate positively with PR ($\rho=0,759$, $p < 0,001$), but negatively with MAP ($\rho = -0,720$, $p < 0,01$). ET-1 and TNF- α achieved its peak concentration for every single ES in phase Z, this rule doesn't apply to TNF- α in group A. TNF- α concentrations [pg/ml] in group B were higher than in group A during every phase except phase 0. For the whole data (ES 1-10, without group analysis) TNF- α concentration didn't increase during phase progression (0→E→Z), there is no significant *group x phase* interaction for TNF- α . For group A only: in later conducted ES, TNF- α concentrations were

lower (negative correlation between the ordinal number of ES and TNF- α , $\rho = -0,689$, $p < 0,05$), but ET-1 concentrations were higher (positive correlation $\rho = 0,642$, $p < 0,05$). There is a positive correlation between ET-1 and TNF- α concentrations, but only in group B. Hemoglobin concentration [mmol/l] did constantly rise during phase progression (0→E→Z) only in group B ($6,68 \pm 0,67$ vs. $7,4 \pm 0,14$ vs. $8,15 \pm 0,19$ $p = 0,008$). No changes in basic coagulation parameters were observed. Electrolytes- in group B vs. A the concentration [mmol/l] of: potassium was higher, calcium was lower ($K^+ : 4,53 \pm 0,26$ vs. $4,01 \pm 0,2$, $p < 0,001$; $Ca^{2+} : 1,31 \pm 0,08$ vs. $1,43 \pm 0,02$, $p = 0,001$). After RVP-cessation (phase Z) pH in both groups was lower than before RVP (phase 0) (group A: $7,35 \pm 0,02$ vs. $7,39 \pm 0,02$ $p = 0,017$, group B $7,45 \pm 0,02$ vs. $7,49 \pm 0,03$ $p = 0,046$). At phase Z, pH in group B was lower compared to A ($7,45 \pm 0,02$ vs. $7,50 \pm 0,01$, $p < 0,001$).

Conclusions:

- the developed model has proven as sufficient to deteriorate the animals circulatory system deeply,
- this was proven by a variety of different parameters in both groups – in the healthy heart, as well as in RVP-CHF,
- a significant humoral activation in response, to the induced disturbances has been proven by changes in serum concentration of TNF- α and ET-1,
- the simulation of sustained ventricular tachycardia (sVT) in RVP-CHF, leads to more profound disturbances in basic hemodynamic, echocardiographic and metabolic parameters. sVT tolerance in CHF seems to be impaired, compared to healthy hearts,
- even in settings of RVP-CHF, adaptive reactions to sVT are present and relatively effective, their aim is to maintain tissue perfusion,
- in settings of RVP-CHF the humoral response to cardiogenic shock, measured by the changes in ET-1 concentration, is more prominent, than in a healthy heart,
- in settings of RVP-CHF, there was a constant rise of red blood cell parameters seen, it is much more intensive, than bone marrow capabilities. We suggest loss of circulating serum volume to explain this phenomenon,
- Recurrent disturbances in the circulatory system caused by simulated sustained ventricular tachycardia in a previously healthy heart, despite a) a short duration, b) sufficient recovery time, and c) full recovery of basic hemodynamic parameters, weaken the humoral response measured by TNF- α concentration and enhance the response measured by ET-1 concentration to subsequent sustained ventricular tachycardia.