

**lek. Sonia Borodnicz-Jażdżyk**

**Analiza echokardiograficzna w szczurzym modelu  
uszkodzenia serca indukowanego isoprenalina**

**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. Katarzyna Czarzasta

Katedra i Zakład Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej  
Warszawski Uniwersytet Medyczny



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2021

*Sonia Borodnicz-Jażdżyk*

*Katarzyna Czarzasta*

KIEROWNIK  
Katedry i Zakładu Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej  
Laboratorium Centrum Badań Przedklinicznych CePT

*Agnieszka Cudnoch-Jędrzejewska*  
prof. dr hab. n. med. Agnieszka Cudnoch-Jędrzejewska

## Streszczenie

Uszkodzenie mięśnia sercowego charakteryzuje się zwiększonym stężeniem troponiny sercowej (Tn) we krwi, gdy przynajmniej jedna wartość przekracza górną granicę zakresu wartości referencyjnych na poziomie 99. centyla. Według niniejszej definicji, patomechanizm uszkodzenia mięśnia sercowego obejmuje następujące mechanizmy: 1) ostre niedokrwienie mięśnia sercowego w wyniku uszkodzenia blaszki miażdżycowej z następczą zakrzepicą lub zaburzeniem równowagi pomiędzy zapotrzebowaniem mięśnia sercowego na tlen a jego podażą; 2) bezpośrednie uszkodzenie mięśnia sercowego; 3) zwiększone obciążenie mięśnia sercowego.

Jednym z czynników, które w bezpośredni sposób mogą uszkadzać kardiomiocyty są katecholaminy. Katecholaminy uwalniane z zakończeń nerwowych oraz krążące we krwi aktywują receptory metabotropowe związane z białkiem G, wywołując zmiany w czynności narządów docelowych. Adrenalina i noradrenalina stymulują receptory metabotropowe związane z białkiem G, tzw. adrenoreceptory. Nadmierna ilość krążących katecholamin, jak również nasilone ich uwalnianie z sercowych zakończeń nerwów współczulnych prowadzi do bezpośredniego uszkodzenia kardiomiocytów (m.in. poprzez nasilony stres oksydacyjny oraz zwiększenie cytosolowego i wewnątrzmitochondrialnego stężenia jonów wapnia) i uwalniania Tn do krwi. W codziennej praktyce klinicznej, podawanie katecholamin (noradrenaliny, dopaminy) lub leków sympatykomimetycznych (isoprenaliny; ISO, dobutaminy) jest standardem leczenia ostrych stanów kardiologicznych z obniżoną pojemnością minutową i hipotensją.

ISO jest syntetycznym, nieselektywnym agonistą receptorów  $\beta 1$ - oraz  $\beta 2$ -adrenergicznych i jej dootrzewnowe podawanie u gryzoni jest jednym z najczęściej stosowanych w badaniach eksperymentalnych modelem uszkodzenia serca indukowanego katecholaminami. Zespół Takotsubo (*ang. Takotsubo syndrome*; TTS), inaczej nazywany kardiomiopatią stresową lub kardiomiopatią złamanego serca, jest formą ostrej, odwracalnej niewydolności serca, która zwykle wywołana jest emocjonalnym i/lub fizycznym stresem. Objawy TTS przypominają objawy zawału mięśnia sercowego, jednakże w koronarografii nie stwierdza się istotnych hemodynamicznie zmian w tętnicach wieńcowych, występują natomiast charakterystyczne dla TTS zaburzenia kurczliwości, obejmujące obszar wykraczający poza strefę zaopatrzenia pojedynczej tętnicy wieńcowej.

Liczne badania wykazały, że patofizjologia, charakterystyka kliniczna i odpowiedź na leczenie chorób sercowo-naczyniowych (*ang. cardiovascular diseases*; CVD) zależą od

poziomu żeńskich hormonów płciowych, w szczególności estrogenów, wykazujących działanie kardioprotekcyjne. Owariektomia jest uznanym w literaturze eksperymentalnym modelem menopauzy. Badania przedkliniczne prowadzone na szczurach poddanych owariektomii wciąż zyskują na znaczeniu, jednakże nadal brakuje badań oceniających, w jaki sposób obniżenie poziomu żeńskich hormonów płciowych wpływa na uszkodzenie mięśnia sercowego indukowane przez katecholaminy. Zbadanie tego zagadnienia wydaje się być istotne dla dokładniejszego poznania mechanizmów odpowiedzialnych za patomechanizm CVD, w tym uszkodzenia serca u kobiet i potencjalne kardioprotekcyjne działanie żeńskich hormonów płciowych.

Głównym celem rozprawy doktorskiej była ocena przydatności echokardiografii w diagnostyce, ocenie zaawansowania i przebiegu uszkodzenia mięśnia sercowego indukowanego dootrzewnową iniekcją ISO u samic szczurów Sprague Dawley poddanych owariektomii lub operacji pozorowanej.

Badania przeprowadzono na 147, 9-tygodniowych szczurach Sprague Dawley płci żeńskiej. Zwierzęta zostały poddane następującym czynnościom doświadczalnym: owariektomia lub operacja pozorowana, doświadczalne wywołanie uszkodzenia mięśnia sercowego, przekłatkowe badanie echokardiograficzne (ocena wymiarów, czynności skurczowej i funkcji rozkurczowej lewej komory serca, pomiar parametrów Dopplerowskich przepływu przez zastawkę aortalną oraz innych parametrów hemodynamicznych, parametry funkcji skurczowej prawej komory serca i przepływu przez tętnicę płucną), pobranie krwi i serca, ocena osoczowych stężeń biomarkerów uszkodzenia (troponina I; TnI) i zaawansowania niewydolności mięśnia sercowego (N-końcowy propeptyd natriuretyczny typu B; *ang. N-terminal pro B-type natriuretic peptide*; NT-proBNP), ocena histopatologiczna (ocena struktury i stopnia uszkodzenia mięśnia sercowego), immunohistochemia (ocena ekspresji kinazy typu II zależnej od wapnia i kalmoduliny; *ang. calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II*; CAMKII celem identyfikacji mechanizmu śmierci kardiomiocytów – nekroptozy), weryfikacja skuteczności owariektomii (zbadanie osoczowego stężenia  $17\beta$  – estradiolu).

Zwierzęta zostały podzielone na 4 grupy doświadczalne:

ISOO – samice szczurów Sprague Dawley poddane owariektomii z indukowanym ISO uszkodzeniem mięśnia sercowego;

ISOP – samice szczurów Sprague Dawley poddane operacji pozorowanej z indukowanym ISO uszkodzeniem mięśnia sercowego;

CO – samice szczurów Sprague Dawley poddane owariektomii otrzymujące dootrzewnową iniekcję roztworu soli fizjologicznej (0,9% NaCl);

CP – samice szczurów Sprague Dawley poddane operacji pozorowanej otrzymujące dootrzewnową iniekcję 0,9% NaCl.

W celu scharakteryzowania przebiegu i stopnia zaawansowania uszkodzenia serca w czasie, każda z grup została podzielona na 5 serii, w których wykonywano przezklatkowe badanie echokardiograficzne odpowiednio po 6, 12, 24 i 72 godzinach oraz 10 dniach od podania ISO lub 0,9% NaCl.

Na podstawie charakterystycznych odcinkowych zaburzeń kurczliwości obserwowanych w badaniu echokardiograficznym, u 20 zwierząt z grup ISOO i ISOP zdiagnozowano TTS i zdecydowano o przeprowadzeniu odrębnej analizy statystycznej parametrów echokardiograficznych, biochemicznych i oceny histopatologicznej w seriach szczurów z TTS oraz u osobników otrzymujących iniekcję ISO, które nie rozwinęły odcinkowych zaburzeń kurczliwości lewej komory serca. Ze względu jednak, iż w poszczególnych seriach godzinowych grup ISOO i ISOP TTS rozwinęło  $n < 5$  osobników, analizie statystycznej parametrów echokardiograficznych i biochemicznych z uwzględnieniem wyniku jakościowej analizy echokardiograficznej poddano łączną grupę szczurów z TTS w fazie ostrej (tj. badanie echokardiograficzne, pobranie krwi i serca po 6, 12, 24 oraz 72 godzinach od iniekcji ISO) oraz grupę zwierząt z indukowanym ISO uszkodzeniem mięśnia sercowego bez odcinkowych zaburzeń kurczliwości lewej komory w fazie ostrej (tj. badanie echokardiograficzne, pobranie krwi i serca po 6, 12, 24 oraz 72 godzinach od iniekcji ISO) poddanych owariektomii lub operacji pozorowanej. W związku z tym, zwierzęta z grup ISOO i ISOP zostały podzielone na dodatkowe serie z uwzględnieniem jakościowej oceny echokardiograficznej:

TTSO-o - Samice szczurów Sprague Dawley poddane owariektomii z indukowanym ISO TTS w fazie ostrej (po 6, 12, 24 i 72 godzinach od iniekcji ISO);

TTSP-o - Samice szczurów Sprague Dawley poddane operacji pozorowanej z indukowanym ISO TTS w fazie ostrej (po 6, 12, 24 i 72 godzinach od iniekcji ISO);

bISOO-o - Samice szczurów Sprague Dawley poddane owariektomii z indukowanym ISO uszkodzeniem mięśnia sercowego bez odcinkowych zaburzeń kurczliwości lewej komory w fazie ostrej (po 6, 12, 24 i 72 godzinach od iniekcji ISO);

bISOP-o - Samice szczurów Sprague Dawley poddane operacji pozorowanej z indukowanym ISO uszkodzeniem mięśnia sercowego bez odcinkowych zaburzeń kurczliwości lewej komory w fazie ostrej (po 6, 12, 24 i 72 godzinach od iniekcji ISO);

CO-o - Samice szczurów Sprague Dawley poddane ovariectomii otrzymujące dootrzewnową iniekcję 0,9% NaCl w fazie ostrej (po 6, 12, 24 i 72 godzinach od iniekcji 0,9% NaCl);

CP-o - Samice szczurów Sprague Dawley poddane operacji pozorowanej otrzymujące dootrzewnową iniekcję roztworu 0,9% NaCl w fazie ostrej (po 6, 12, 24 i 72 godzinach od iniekcji 0,9% NaCl).

Badanie echokardiograficzne wykazało, że szczury z grupy ISOO w porównaniu ze zwierzętami z grupy ISOP miały istotnie wyższy końcoworozkurczowy wymiar lewej komory serca (LVEDD), końcoworozkurczowe pole powierzchni lewej komory serca (LVEDA), procentową zmianę pola powierzchni lewej komory serca (FAC), falę E napływu mitralnego, maksymalną i średnią prędkość przepływu przez zastawkę aortalną, maksymalny i średni gradient ciśnień przez zastawkę aortalną, całkowite prędkości przepływu przez zastawkę aortalną w czasie, objętość wyrzutową, maksymalny gradient ciśnień przez zastawkę pnia płucnego, maksymalną prędkość przepływu przez zastawkę pnia płucnego, ponadto zarejestrowano niższe wartości końcowoskurczowego pola powierzchni lewej komory serca (LVESA), średnicy pierścienia zastawki aortalnej oraz czasu akceleracji przepływu przez zastawkę pnia płucnego (AcT). U szczurów w serii TTSO-o FAC był istotnie niższy w porównaniu do serii bISOO-o. Osoczowe stężenie TnI było istotnie wyższe w grupie ISOP w porównaniu do zwierząt z grupy CP, u których krew pobrana została po 24 godzinach od iniekcji 0,9% NaCl. Ponadto, znacząco wyższe osoczowe stężenie TnI zaobserwowano w grupie ISOP w porównaniu do ISOO. Osoczowe stężenie NT-proBNP było istotnie wyższe w grupie ISOP w porównaniu do zwierząt z grupy CP, u których krew pobrana została po 24 godzinach od iniekcji 0,9% NaCl oraz w grupie ISOO w porównaniu do ISOP. Ocena histopatologiczna przeprowadzona po 6, 12, 24 i 72 godzinach od iniekcji ISO w seriach TTSO-o i TTSP-o ujawniła piorunujący przebieg TTS u zwierząt z serii TTSO-o po 24 godzinach od iniekcji ISO. Ocena histopatologiczna po 6, 12, 24 i 72 godzinach od iniekcji ISO w seriach bISOO-o, bISOP-o oraz po 24 godzinach od iniekcji 0,9% NaCl w grupach CO i CP udowodniła histopatologiczne cechy TTS u zwierząt, u których nie obserwowano odcinkowych zaburzeń kurczliwości w badaniu echokardiograficznym, co sugeruje występowanie formy subklinicznego TTS. Ponadto, w seriach TTSO-o, TTSP-o, bISOO-o i bISOP-o stwierdzono obecność wypustek wsierdza o potencjalnym charakterze zatorowym. W immunohistochemii zaobserwowano silną ekspresję CAMKII w grupie ISOO.

## Wnioski

- 1) Szczury z grupy ISOO wykazują większe wymiary lewej komory serca, w tym LVEDA i LVEDD, co wskazuje na zaawansowane przeciążenie objętościowe i rozstrzeń lewej komory.
- 2) Szczury z grupy ISOO mają istotnie wyższe FAC, przy jednoczesnym zwiększeniu LVEDA i zmniejszeniu LVESA, co sugeruje większą siłę skurczu mięśnia sercowego.
- 3) Szczury z grupy ISOO wykazują istotnie niższe wartości AcT, co wskazuje na wyższe ciśnienie i opór w łożysku płucnym.
- 4) FAC jest parametrycznym wskaźnikiem funkcji skurczowej lewej komory serca, wyróżniającym zwierzęta z klinicznie jawnym TTS (TTSO-o) od zwierząt z serii BISOO-o otrzymujących iniekcję ISO, nie rozwijających odcinkowych zaburzeń kurczliwości lewej komory.
- 5) Nekroptoza może brać udział w uszkodzeniu serca indukowanym ISO, w tym TTS.
- 6) Istotnie niższe stężenie TnI u szczurów z grupy ISOO w porównaniu do grupy ISOP może wynikać z zaburzonej dystrybucji Tn w obrębie serca przez masywny obrzęk międzykomórkowy występujący u zwierząt poddanych owariektomii oraz z przewagi programowanych rodzajów śmierci komórkowej, w tym nekroptozy.
- 7) Szczury z grupy ISOO mają istotnie wyższe osoczowe stężenie NT-proBNP, co w połączeniu z większymi wymiarami lewej komory serca sugeruje wzrost przeciążenia i wystąpienie ostrej niewydolności lewej komory.
- 8) Histopatologiczne cechy TTS obserwowane były również u zwierząt, u których nie obserwowano odcinkowych zaburzeń kurczliwości w badaniu echokardiograficznym, co sugeruje, iż zasadne wydaje się wyodrębnienie subklinicznej formy TTS.
- 9) Histopatologiczne cechy TTS występowały u samic szczurów poddanych owariektomii i operacji pozorowanej otrzymujących iniekcję ISO, co sugeruje, iż hipoestrogenemia może nie być czynnikiem odgrywającym główną rolę w patofizjologii TTS.
- 10) TTS wykazuje piorunujący przebieg u samic szczurów poddanych owariektomii, w odróżnieniu od samic szczurów poddanych operacji pozorowanej.

## Podsumowanie

Wyniki niniejszego badania wskazują na obecność potwierdzonej histopatologicznie subklinicznej formy TTS bez odcinkowych zaburzeń kurczliwości lewej komory serca obserwowanych w badaniu echokardiograficznym, co może sugerować ograniczoną

przydatność echokardiografii w modelu eksperymentalnym uszkodzenia serca indukowanego ISO.

Ze względu na różnorodne mechanizmy śmierci komórkowej, których przebieg w czasie ma charakter dynamiczny oraz prawdopodobne zaburzenia dystrybucji biomarkerów martwicy miokardium na poziomie serca, wynikające z nasilonego obrzęku międzykomórkowego wydaje się, że pomiar osoczowego stężenia TnI może mieć niską przydatność w diagnostyce uszkodzenia serca indukowanego ISO w warunkach doświadczalnych. Dlatego też wyniki tego badania sugerują, że diagnostyka uszkodzenia serca indukowanego ISO w modelach eksperymentalnych powinna opierać się przede wszystkim na zaawansowanych badaniach obrazowych w połączeniu z oceną histopatologiczną.

KIEROWNIK  
Katedry i Zakładu Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej  
Laboratorium Centrum Badań Przedklinicznych CePT

*prof. dr hab. n. med. Agnieszka Cudnoch-Jędrzejewska*