

7月11日抄読会 担当:田島



International Journal of
Molecular Sciences



Article

A Rat Model of Clinically Relevant Extracorporeal Circulation Develops Early Organ Dysfunctions

Antoine Persello ^{1,2,*} , Fouzia Souab ¹, Thomas Dupas ¹ , Virginie Aillerie ¹, Edith Bigot ³, Manon Denis ¹, Angélique Erraud ¹ , Thomas Pelé ¹, Angélique Blangy-Letheule ¹, Pierre Miniou ², Philippe Guedat ² , Michel De Waard ¹ , Emmanuelle Abgueguen ², Bertrand Rozec ¹  and Benjamin Lauzier ¹ 

INTRODUCTION

- 体外循環 (Extracorporeal Circulation: ECC) は救命救急領域や心臓・胸部手術において不可欠な処置の1つ
- ECCは、様々な利点を生み出す一方、急性の臓器障害や神経学的異常、多臓器不全といった有害事象の報告もあり、心臓手術後に多い
- 血液と外界の接触や手術ストレス、長時間の人工心肺、組織への不十分な酸素供給による強い炎症反応が惹起される
- 細胞では、微小循環障害や代謝障害、虚血再灌流障害、補体、キニン系、凝固系カスケードの活性化、消化管からのエンドキシンの移行も関与

- 研究デザインモデルとしては、バイオインフォマティクスモデル、動物モデル、ヒト臨床試験モデルが用いられる
- ヒト臨床試験モデルは信頼性が最も高いが限定的
⇒動物モデル(ブタモデル)が用いられるが、高価で飼育コストがかかる
- 齧歯類(ラット)は安価で心血管系の研究に広く用いられている
⇒ヒトの生理学と異なる点も多く、臨床と異なるアプローチでの実験系やデバイスの小型化が必要
- 実験後には安楽死させてしまうため術後までのヒトとの肉眼レベル、分子レベルでの研究の報告はない

AIM

1. 外科的手技、薬理的、モニタリングにおいてヒトに用いるCPBに近いラットモデルで、術後に臓器障害を認めることが再現可能であるラットモデルの作成
2. ECCの影響によるin vivoと血液生化学の値の変化が、臨床上に得られるヒトの値との相互性があるか

MATERIALS AND METHODS

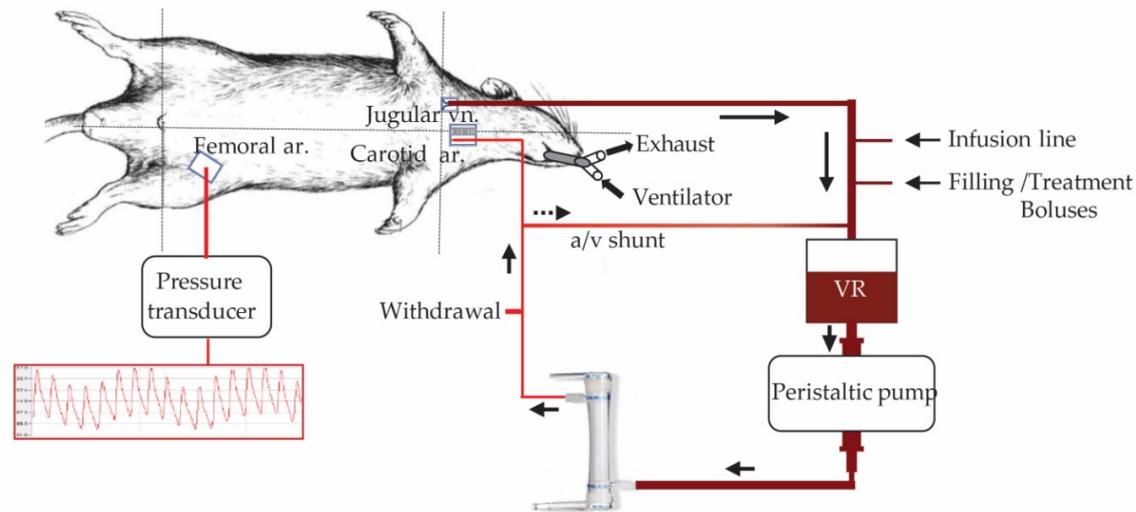
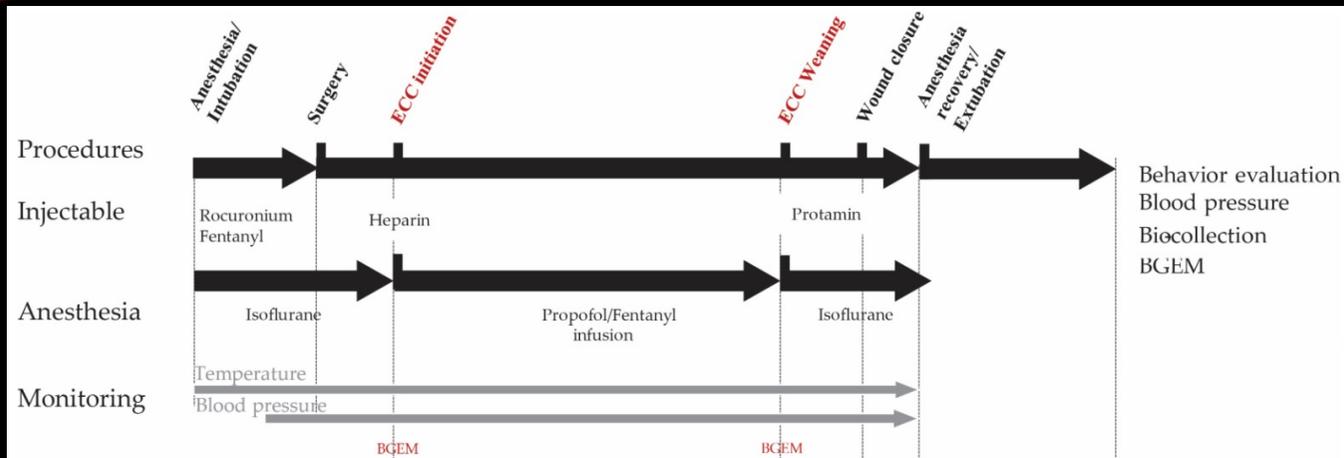
• ヒト

- 2019年12月～2021年3月までに1時間以上のCPBを行う心臓手術を受ける41名
- 麻酔法は全身麻酔
- 術式は少なくとも単弁置換あるいは上行大動脈の手術

• ラット

- 週齢12～14週 雄のWistarラット(400g±50g)
- 15日前に受け取り 2～3匹ずつに分けて管理 温度 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 湿度 $55 \pm 10\%$ 12時間毎の明暗サイクルで管理

実験デザインと血行動態モニタリング

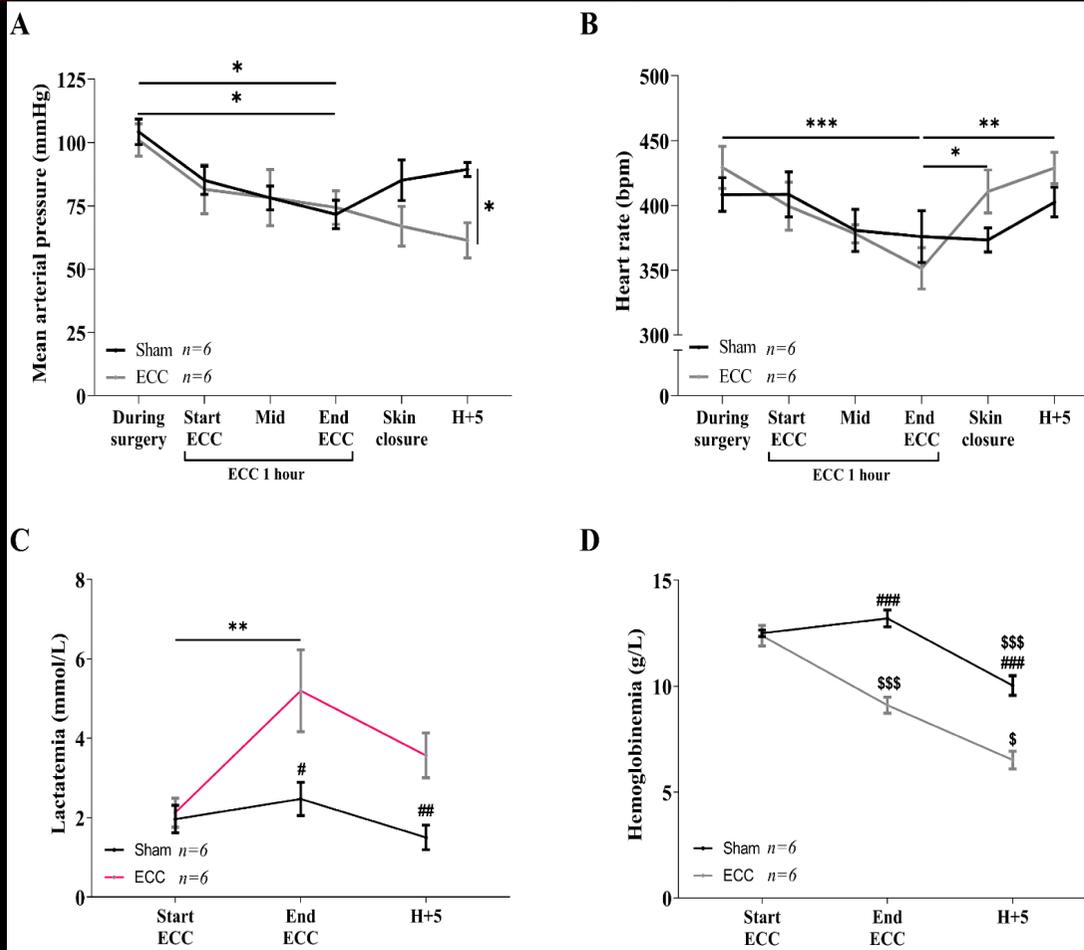


RNAシーケンスを用いた遺伝子解析と比較

- ラットの血行動態と生化学検査はECC施行群 (ECC群) 6匹、ECC未施行群 (シャム群) 6匹で比較
- シャム群はカニューレのみ挿入 ECC回路には接続せず
- 血液サンプルからDGESeqを施行 無作為に両群からサンプルを採取
- ヒトの血液サンプルからも末梢血単核細胞からRNAを逆転写し、DGESeqで遺伝子発現を比較
- 統計: 対応のある二元配置分散分析、Sidakの多重比較検定、フリードマン検定 p 値 < 0.05 を有意差ありと定義



RESULTS ラットの血行動態



- ECC中の平均血圧はプロトコル規定内で推移
- 平均血圧は術後5時間でECC群に有意な低血圧
- 乳酸値は時間ともにECC群で有意な上昇
- ヘモグロビン値もECC群で有意な低下

RESULTS 血ガス

Table 1. Point-of-care measure of blood gases and electrolytes on arterial blood from the rat model.

		Start ECC (Mean ± SEM)	End ECC (Mean ± SEM)	H+5 (Mean ± SEM)
pH	Sham	7.41 ± 0.02	7.37 ± 0.03	7.40 ± 0.02
	ECC	7.42 ± 0.01	7.42 ± 0.04	7.41 ± 0.03
pCO ₂ (mmHg)	Sham	45.47 ± 2.94	46.13 ± 1.88	43.28 ± 3.43
	ECC	42.67 ± 2.52	39.93 ± 4.14	41.15 ± 3.50
pO ₂ (mmHg)	Sham	287.17 ± 35.86	386.68 ± 43.61	329.4 ± 70.54
	ECC	333.12 ± 48.52	436.42 ± 66.41	464.62 ± 43.87
BE (mmol/L)	Sham	4.18 ± 0.59	2.37 ± 1.87	2.15 ± 2.11
	ECC	3.15 ± 0.67	0.80 ± 1.13	1.17 ± 1.14
HCO ₃ ⁻ (mmol/L)	Sham	28.72 ± 0.72	27.98 ± 1.17	27.59 ± 1.77
	ECC	27.47 ± 0.79	25.4 ± 1.24	25.73 ± 1.08
Ca ²⁺ (mmol/L)	Sham	1.32 ± 0.02	1.35 ± 0.03	1.24 ± 0.03
	ECC	1.29 ± 0.02	1.40 ± 0.02	1.10 ± 0.04

Ca ²⁺ (mmol/L)	ECC	1.29 ± 0.02	1.40 ± 0.02	*	1.10 ± 0.04	\$\$\$***
	Sham	101.00 ± 0.73	102.33 ± 1.52		100.67 ± 1.56	
Cl ⁻ (mmol/L)	ECC	101.33 ± 0.84	102.83 ± 1.17		104.17 ± 0.7	
	Sham	4.90 ± 0.11	5.07 ± 0.14		4.17 ± 0.15	
K ⁺ (mmol/L)	ECC	4.62 ± 0.15	4.42 ± 0.11		5.04 ± 0.22	*
	Sham	139.33 ± 0.56	141.33 ± 4.08		139.33 ± 0.95	
Na ⁺ (mmol/L)	ECC	138.73 ± 0.87	139.17 ± 0.79		140.17 ± 0.79	
	Sham	10.17 ± 0.79	10 ± 0.75		12.2 ± 1.45	
AGAP	ECC	10.50 ± 0.92	11.17 ± 1.17		10.77 ± 0.92	
	Sham	14.83 ± 0.7	15.25 ± 0.84		16.2 ± 1.45	
AGAPK	ECC	15.17 ± 0.95	15.5 ± 1.15		15.5 ± 0.99	

BE: Base excess, AGAP, and AGAPK: anion gap, ECC: cardiopulmonary bypass. Statistical differences were calculated with a Kruskal–Wallis test and a Dunn's post-hoc test. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ vs. ECC Start; \$\$\$ $p < 0.01$ vs. sham.

- 血液ガスは両群とも正常範囲内で有意差なし
- 電解質は術後5時間後でECC群に有意な高K血症と低Ca血症

RESULTS ㄷ

Table 2. Description of demographics and clinical data from the cohort.

	Overall (n = 41)
Sex (Male)	36 (87.8%)
Age (year)	
Mean (SD)	66.1 (12.9)
Range	32.0–82.0
Body mass index	
Mean (SD)	26.0 (3.6)
Range	20.0–38.0
Surgery Type	
Mitral valve repair	5 (12.2%)
Mitral valve repair + tricuspid annuloplasty	7 (17.1%)
Mitral valve replacement + tricuspid annuloplasty	3 (7.3%)
Mitral valve replacement + CABG	1 (2.4%)
Aortic valve replacement	2 (4.9%)
Aortic valve replacement + tricuspid annuloplasty	3 (7.3%)
Aortic valve replacement + CABG	4 (9.8%)
CABG x3	5 (12.2%)
CABG > 3	3 (7.3%)
Ascending aorta surgery (Bentall, Tirone David, etc.)	7 (17.1%)
Bentall + CABG	1 (2.4%)
Redux	2 (4.9%)
Dyslipidemia	25 (61.0%)
Hypertension	28 (68.3%)
Tobacco	
Smoker	4 (9.8%)
Diabetes	7 (17.1%)
Obesity	5 (12.2%)
Familial history	3 (7.3%)
Exogenesis	3 (7.3%)

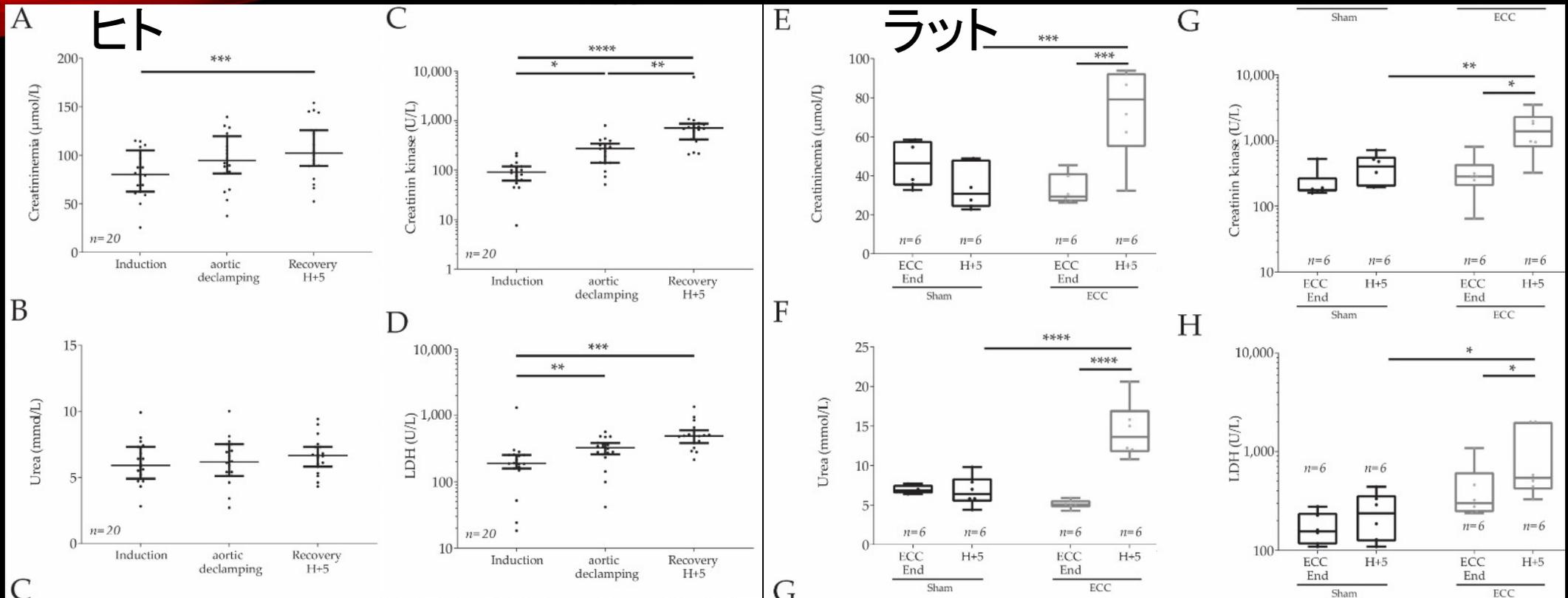
NYHA	
0	4 (9.8%)
I	8 (19.5%)
II	24 (58.5%)
III	5 (12.2%)
Arteriopathy	8 (19.5%)
Myocardial infarction	11 (26.8%)
Cerebral dysfunction	1 (2.4%)
Chronic renal failure	9 (22.0%)
Dialysis	1 (2.4%)
BPCO	2 (4.9%)
Asthma	1 (2.4%)
FeVG	
Mean (SD)	60.8 (7.8)
Range	40.0–70.0
EUROSCORE II	
Mean (SD)	2.5 (2.2)
Range	0.8–11.6
CPB time (min)	
Mean (SD)	126.9 (37.5)
Range	63.0–229.0
Cross-clamping time (min)	
Mean (SD)	98.0 (30.2)
Range	45.0–182.0
Catecholamine	39 (95.1%)
Norepinephrine	37 (90.2%)
Dobutamine	20 (48.8%)
Transfusion peri-op	6 (14.6%)
Cell saver	41 (100.0%)
VIS score 6 h post-op	
Mean (SD)	7.6 (18.1)
Range	0.0–112.0

KDIGO 24 h post-op

0	31 (75.6%)
1	7 (17.1%)
2	2 (4.9%)
3	1 (2.4%)
Left ventricular dysfunction post-op	17 (41.5%)
Hydrocortisone	2 (4.9%)
Ventilation duration (h)	
Mean (SD)	13.0 (48.1)
Range	2.0–312.0
Pulmonary infection	1 (2.4%)
Bleeding volume 6 h post-op (mL)	
Mean (SD)	191.8 (116.5)
Range	70.0–500.0
Transfusion in critical care	4 (9.8%)
Intensive care stay (day)	
Mean (SD)	3.8 (5.9)
Range	1.0–34.0
Hospital stay (day)	
Mean (SD)	13.6 (6.1)
Range	6.0–34.0

Ao: Ascending aorta; CABG: coronary arterial bypass graft; NYHA: New York Heart Association classification; COPD: chronic obstructive pulmonary disease; LVEF: left ventricular ejection fraction; EUROSCORE: European System for Cardiac Operative Risk Evaluation; VIS Score: vasoactive-inotropic Score, KDIGO: kidney disease improving global outcomes.

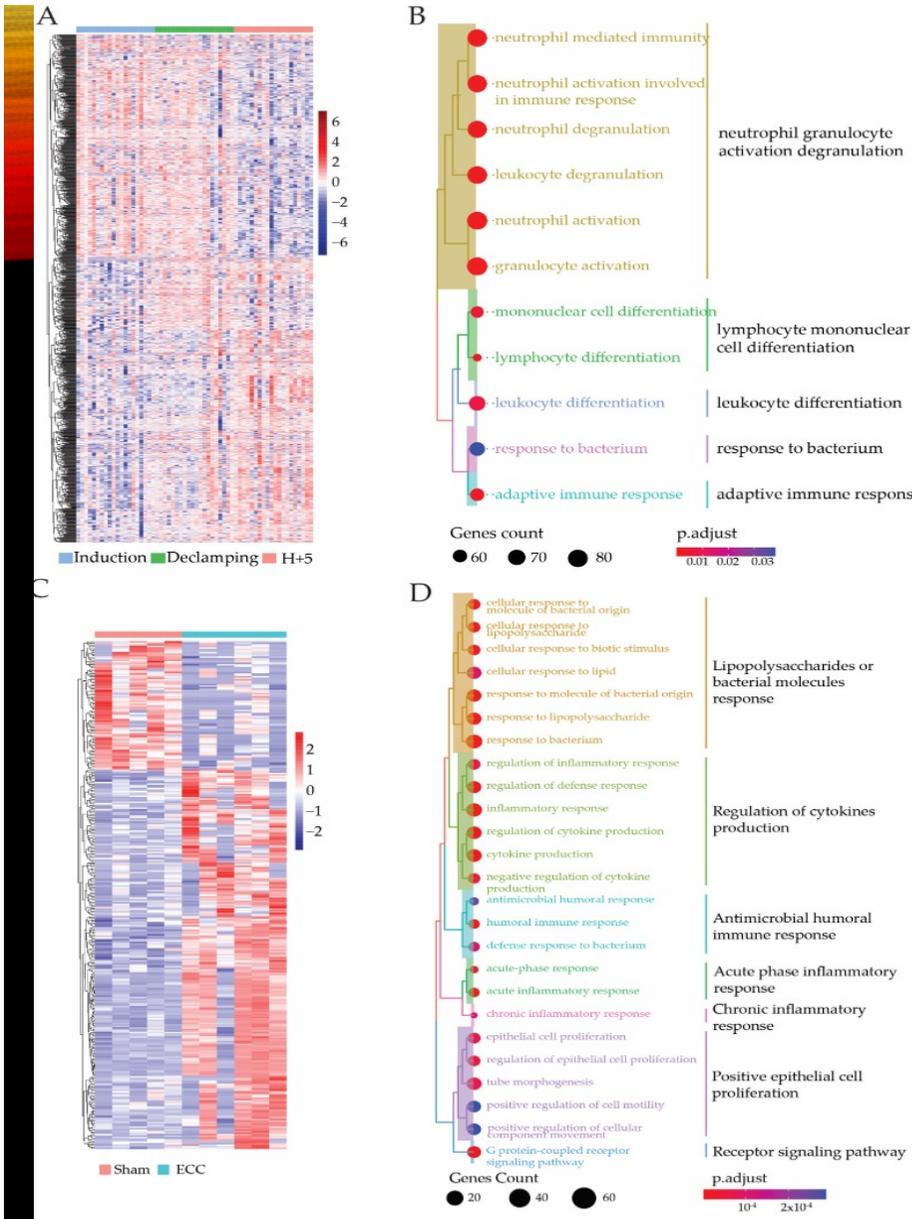
RESULTS バイオマーカーの比較



- ヒト: 麻酔導入から術後5時間にかけて有意なクレアチニン、LDH、CKの上昇
- ラット: ECC群でクレアチニン、LDH、CKの有意な上昇 BUNも有意に上昇

RESULTS DGESEQ分析

- ラット: 計11匹のサンプル 333の遺伝子発現を確認
- 急性炎症に関わる遺伝子、細菌に対する免疫応答に関する遺伝子の過剰発現を認めた
- ヒト; 計20名のサンプル 1077の遺伝子発現を確認
- 細菌に対する免疫応答に関する遺伝子の過剰発現を認めた
- 特に好中球、白血球の遊走と活性化、好中球の脱顆粒に関与する遺伝子が過剰発現



DISCUSSION

- 実臨床に近い形でのECCのラットモデルの作成が可能
- ヒトと同様に早期臓器障害や組織障害、血行動態の不安定性はラットでも認められる
- 早期の腎機能障害
 - CPB回路が閉塞性回路でありチューブ閉塞により溶血のリスクがあったこと
 - 回路容積を制限、接触面積が制限でき、過剰な炎症反応の上昇を抑えることができること
 - 術中のラットの尿の排出がないこと
- シャム群では有意な腎機能障害がないこと
 - ECC施行による血液希釈や腎血流の低下、糸球体濾過亢進がなかったこと
- ヒトとラットではECCに対する反応や変化の差異はなく同じような血行動態
- 遺伝子レベルでもECCによる過剰発現する遺伝子は同じ遺伝子
 - ⇒ 以上の結果からラットとヒトの相関性がある

LIMITATION CONCLUSIONS

- Limitation

- 完全にヒトのECCを模倣することが手技的に困難であること
- ラットに輸血を行わなかったこと
- 麻酔中は純酸素管理のため、酸化ストレスや活性酸素の増加をきたしていた可能性があること

- Conclusions

- ECCにおけるヒトとラットの反応は相関性がある
- ラットはヒトよりもより早期の臓器障害を呈することがある
 - より重篤な臓器障害モデルの作成、研究が期待される