

UNIVERSITE DE LIEGE

FACULTE DE MEDECINE

Département de Médecine

Unité de soins intensifs médicaux



**Contribution à l'étude du
couplage ventriculo-artériel
pulmonaire au cours du choc
septique expérimental**

Bernard LAMBERMONT

Docteur en médecine

Spécialiste en médecine interne

Intensiviste

Docteur en Sciences Biomédicales

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade

d'Agrégré de l'Enseignement Supérieur

2006

UNIVERSITE DE LIEGE
FACULTE DE MEDECINE

Le présent mémoire peut être livré à l'impression

Liège, le 21 mars 2006

Le Secrétaire de la Faculté,
(s) Ph. BOXHO.

Le Doyen de la Faculté de Médecine,
(s) G. MOONEN.

Le Secrétaire du Jury,
(s) J.O. DEFRAIGNE.

"Article 6 de l'Arrêté Royal du 10 mai 1931 appliquant la loi du 21 mai 1929
sur la collation des grades académiques et le programme des examens
universitaires :

En aucun cas, les opinions de l'auteur ne peuvent être considérées, par le
fait de l'autorisation d'impression de la dissertation, comme étant celles
du Jury ou de l'Université."

Table des matières

Introduction générale.....	17
Objectifs et plan du travail.....	25
I. Chapitre 1: Etude critique des moyens d'analyse circulatoire et résumé du travail de doctorat	27
I.1. Analyse des propriétés hémodynamiques de la circulation pulmonaire.	29
I.1.1. L'analyse fréquentielle.....	29
I.1.1.1. Relation pression débit.....	33
I.1.2. Analyse temporelle	34
II. Chapitre 2 : Analyse du couplage ventriculo-artériel pulmonaire	41
II.1. Le réseau artériel pulmonaire	44
II.2. La chambre ventriculaire.	45
II.3. Le couplage ventriculo-artériel : signification physiologique.....	49
II.4. Le couplage ventriculo-artériel : Intérêt et applications cliniques.....	52
III. Chapitre 3: Méthodes générales.	53
III.1. Procédure chirurgicale.....	55
III.1.1. Enregistrement des paramètres circulatoires pulmonaires.....	55
III.1.2. Enregistrement des paramètres ventriculaires.	56
III.1.3. Acquisition des données.....	57
III.1.4. Analyse des données circulatoires pulmonaires	57
III.1.5. Identification des paramètres du modèle de windkessel.....	59
III.1.6. Analyse des données ventriculaires.....	61
III.2. Statistiques.....	62
IV. Chapitre 4: Comparaison entre les méthodes "single-beat" et "multiple-beat" pour estimer la contractilité ventriculaire droite..	63

IV.1. Introduction	65
IV.2. Matériel et méthodes	66
IV.2.1. Protocole expérimental.....	66
IV.2.2. Analyse des données.....	67
IV.2.2.1. Estimation de la contractilité ventriculaire droite par la méthode "multiple-beat"	67
IV.2.2.2. Estimation de la contractilité ventriculaire droite par la méthode "single-beat".....	67
IV.2.3. Analyse statistique	69
IV.3. Résultats.....	69
IV.3.1. Effets de l'administration de dobutamine.....	70
IV.3.2. Effets de l'administration d'esmolol	71
IV.3.3. Estimation de Ees par la méthode "multiple-beat" versus la méthode "single-beat"	72
IV.4. Discussion	72
IV.5. Conclusions.....	75
V. Chapitre 5: Effets circulatoires pulmonaires de l'endotoxine...	77
V.1. Introduction.....	79
V.2. Matériel et méthodes	80
V.2.1. Préparation chirurgicale	80
V.2.2. Protocole expérimental	80
V.3. Résultats	81
V.4. Discussion.....	84
V.5. Conclusions	87
VI. Chapitre 6: Effets ventriculaires de l'endotoxine et évolution du couplage ventriculo-artériel pulmonaire au cours du choc endotoxique	89
VI.1. Introduction.....	91
VI.2. Matériel et méthodes	91
VI.3. Résultats.....	92
VI.3.1. Effets de la perfusion d'endotoxine sur les données hémodynamiques conventionnelles	92

VI.3.2. Effets de la perfusion d'endotoxine sur les volumes et la pression télédiaastolique ventriculaires.....	94
VI.3.3. Effets de la perfusion d'endotoxine sur les données hémodynamiques calculées	95
VI.4. Discussion	97
VI.5. Conclusions.....	100
VII. Chapitre 7: Effets de l'hémodiafiltration sur la circulation pulmonaire au cours du choc endotoxique	103
VII.1. Introduction	105
VII.2. Matériel et méthodes.....	106
VII.2.1. Protocole expérimental	106
VII.3. Résultats	107
VII.3.1. Effets de l'hémodiafiltration seule (groupe Contrôle).....	107
VII.3.2. Effets de la perfusion d'endotoxine	109
VII.3.3. Effets de l'hémodiafiltration après la perfusion d'endotoxine.....	111
VII.4. Discussion	112
VII.5. Conclusions.....	114
VIII. Chapitre 8: Effets de l'hémofiltration avec une membrane à larges pores dans le choc endotoxique.....	117
VIII.1. Introduction.....	119
VIII.2. Matériel et méthodes	120
VIII.2.1. Protocole expérimental.....	120
VIII.3. Résultats	121
VIII.3.1. Données hémodynamiques conventionnelles	121
VIII.3.2. Hémodynamique pulmonaire.....	124
VIII.3.3. Couplage ventriculo-artériel pulmonaire	124
VIII.3.4. Clairance des cytokines et coefficient de tamisage	124
VIII.4. Discussion.....	125

VIII.5. Conclusions	129
IX. Chapitre 9: Effets du monoxyde d'azote inhalé sur la circulation pulmonaire au cours du choc endotoxique	131
IX.1. Introduction	133
IX.2. Matériel et méthodes	134
IX.2.1. Protocole expérimental.....	134
IX.3. Résultats.....	135
IX.3.1. Evolution du groupe contrôle.....	135
IX.3.2. Effets de l'inhalation de NO	136
IX.4. Discussion.....	137
IX.5. Conclusions.....	140
X. Chapitre 10: Etude des effets circulatoires pulmonaires du BM-573 au cours de l'administration de U 46619	143
X.1. Introduction	145
X.2. Matériel et méthodes	147
X.2.1. Préparation des produits pharmaceutiques.	147
X.2.2. Protocole expérimental.	147
X.2.3. Recueil et analyse des données.....	148
X.2.4. Analyse statistique.....	148
X.3. Résultats	149
X.3.1. Variables hémodynamiques conventionnelles	149
X.3.1.1. Groupe Ago	149
X.3.1.2. Groupe Anta	151
X.3.2. Hémodynamique pulmonaire.....	151
X.3.2.1. Groupe Ago	151
X.3.2.2. Groupe Anta	151
X.4. Discussion.....	153
X.5. Conclusions	154
XI. Chapitre 11: Effets du BM 573 sur la circulation pulmonaire au cours du choc endotoxique	155
XI.1. Introduction	157

XI.2. Matériel et méthodes	157
XI.2.1. Protocole expérimental.....	158
XI.2.2. Analyse des données.....	159
XI.3. Résultats.....	159
XI.3.1. Effets de la perfusion d'endotoxine.....	159
XI.3.2. Effets de la perfusion d'endotoxine au cours de l'administration de BM573.....	162
XI.3.3. Effets du BM573 sur l'agrégation plaquettaire et la production de TXB ₂	163
XI.4. Discussion	165
XI.5. Conclusions.....	168
XII. Chapitre 12: Effets du BM 573 sur le couplage ventriculo-artériel pulmonaire au cours du choc endotoxique	169
XII.1. Introduction	171
XII.2. Matériel et méthodes.....	172
XII.2.1. Protocole expérimental	172
XII.2.2. Analyse des données.....	173
XII.2.2.1. Circulation pulmonaire.....	173
XII.2.2.2. Fonction ventriculaire droite	173
XII.3. Résultats	174
XII.3.1. Effets de la perfusion d'endotoxine sur les variables hémodynamiques conventionnelles	174
XII.3.2. Effets de la perfusion d'endotoxine sur les volumes ventriculaires	175
XII.3.3. Effets de la perfusion d'endotoxine sur les variables hémodynamiques calculées.....	177
XII.3.4. Effets de la perfusion d'endotoxine au cours de l'administration de BM-573 sur les variables hémodynamiques conventionnelles.....	180
XII.3.5. Effets de la perfusion d'endotoxine au cours de l'administration de BM-573 sur les volumes ventriculaires droits	181

XII.3.6. Effets de la perfusion d'endotoxine pendant l'administration de BM-573 sur les variables hémodynamiques calculées	181
XII.4. Discussion	182
XII.5. Conclusions	185
Discussion et conclusions générales	187
Annexes	225

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à ceux qui de près ou de loin m'ont aidé dans la réalisation de ce travail.

Mes premières pensées vont d'abord à mon épouse, Pascale. Elle a su dans l'ombre, être là pour me soutenir tout au long des années nécessaires à la réalisation de ce travail et a fait preuve de beaucoup de patience. Romane et Mathis sont encore trop petits pour réaliser l'ampleur d'une telle tâche. Peut-être un jour me liront-ils? Tous les trois, je les remercie de m'avoir donné, sans le savoir, la force d'entreprendre ce travail.

Ma gratitude va aussi au Professeur Pierre Lefèvre qui m'a permis non seulement de mener à bien ma formation en médecine interne mais aussi de participer au programme de recherche du laboratoire de physiologie au sein du groupe HémoLiège.

Je voudrais tout particulièrement remercier le Professeur Roland Marcelle à la fois promoteur de ma formation d'intensiviste et des travaux de recherche qui firent l'objet de mon travail de doctorat. Son aide et ses conseils me furent très utiles.

Le Professeur Vincent D'Orio a largement contribué à ma formation d'interniste lors de mon stage au service des urgences comme au cours de mes activités à l'unité de soins intensifs médicaux. Sa compétence en physiologie fait l'unanimité et il m'en a largement fait bénéficier en m'apportant une aide très précieuse lors de la réalisation des protocoles expérimentaux, de l'interprétation de leurs résultats et de la rédaction des abstracts et des articles qui s'y rapportent. Son aide et ses conseils m'ont permis de mener à bien ma thèse de doctorat en sciences biomédicales puis cette thèse d'agrégation de l'enseignement supérieur, je lui en suis très reconnaissant.

Tous les travaux présentés dans ce mémoire n'auraient pu être réalisés sans HémoLiège et ses différents membres. J'ai déjà cité les Professeurs Roland Marcelle et Vincent D'Orio. J'aimerais aussi remercier les autres membres de ce groupe de recherche autonome. Son président, le Professeur Raymond Limet a été un des instigateurs de la demande de crédit obtenu auprès de la Communauté Française de Belgique (ARC 94/99-177). Ce crédit a

permis au laboratoire de fonctionner pendant les 5 premières années au cours desquelles ce travail a pu être réalisé. La vice-présidente, le Professeur Annie Fossion, y est active depuis sa fondation. Je la remercie de son omniprésence au sein du laboratoire, son aide me fut très précieuse.

Les bases physiques et mathématiques de ce travail n'auraient pu être établies sans la compétence de Thierry Pochet et Paul Gérard. Je tiens à remercier tout particulièrement ce dernier pour sa patience, son perfectionnisme, sa persévérance et son esprit inventif qui en font un chercheur de très grande qualité.

Nous devons la touche finale apportée au programme d'analyse des données à Philippe Potty, Cédric Gommes et Philippe Morimont. Grâce aux améliorations successives auxquelles ils ont chacun contribué, nous disposons d'un programme d'analyse des paramètres hémodynamiques circulatoires pulmonaires performant et convivial. Il s'agit là d'un outil de travail précieux sur lequel repose une grande partie de ce travail.

Grâce aux docteurs Olivier Detry, Philippe Kolh, et Nathalie Janssen, ainsi qu'aux Professeurs Jean-Olivier Defraigne et Raymond Limet, j'ai pu bénéficier d'une équipe chirurgicale efficace et disponible, indispensable à mes travaux. Je les en remercie.

Alexandre Ghuysen, Martial Moonen et Pierre Delanaye m'ont beaucoup aidé à la réalisation des différents protocoles expérimentaux. Je tiens à leur exprimer ma gratitude car sans leur aide, la plupart de ces manipulations n'auraient pu être menées à leur terme.

Le développement de nouvelles molécules est un travail de longue haleine. Les travaux menés par les Professeurs Jean-Michel Dogné, Bernard Masereel, Bernard Pirotte et Jacques Delarge sur les inhibiteurs du thromboxane nous ont permis de progresser dans les connaissances de pathologies telles que la thrombose coronaire, l'embolie pulmonaire et le choc septique. Leur collaboration fut précieuse et leur efficacité remarquable. Je tiens à les remercier de cette collaboration fructueuse et à les féliciter des travaux accomplis.

Ma gratitude va également à madame Ghislaine Rocoux et monsieur Alain Dewart qui m'ont apporté leur support logistique.

Jean-Paul Cheramy qui les a remplacés est un des éléments indispensables à l'élaboration d'un tel travail.

Enfin, j'exprime ma reconnaissance à Philippe Devel dont l'assistance technique nous a permis d'obtenir les dosages de cytokines et à mesdames Graceffa et Focan, infirmières au service de Néphrologie, qui m'ont apporté leur aide au cours des séances d'épuration extra-rénale nécessaires à certains protocoles.

LISTE DES ABREVIATIONS

- Ea : élastance artérielle
- Ees : élastance télésystolique
- Ees_{sb} : élastance télésystolique obtenue par la méthode "single-beat"
- Ees_{mb} : élastance télésystolique obtenue par la méthode "multiple-beat"
- C : compliance vasculaire pulmonaire
- HDF : hémodiafiltration
- NO : monoxyde d'azote
- PAP : pression artérielle pulmonaire
- PRSW : preload-recruitable stroke work
- PVA : pressure-volume area
- R₁ : résistance caractéristique pulmonaire
- R₂ : résistance périphérique pulmonaire
- RVP : résistances vasculaires pulmonaires totales
- SW : stroke work
- TNF : Tumor necrosis factor alpha
- TXA₂ : thromboxane A₂
- TXB₂ : thromboxane B₂
- UF : ultrafiltration
- WK4 : modèle de windkessel à 4 éléments

Introduction générale

Définition

Longtemps, les termes "sepsis", "septicémie", "bactériémie" et "choc septique" ont été utilisés de façon interchangeable, entraînant ainsi une certaine imprécision sémantique. De manière consensuelle, un large panel d'experts a proposé de définir le sepsis en considérant la réponse inflammatoire systémique qui se produit au cours d'une infection (Bone et al., 1992). Comme le montre le *tableau 1*, le sepsis associe au moins deux des symptômes suivants: tachycardie, tachypnée, hyperleucocytose ou fièvre (Bone et al, 1992). Lorsque la défaillance d'un organe s'ajoute à cette symptomatologie, on parle alors de sepsis sévère. Il peut s'agir d'une insuffisance rénale, hépatique, respiratoire, cardiaque ou simplement de l'existence d'une hypotension, d'une encéphalopathie ou d'une coagulopathie. Selon ce consensus, le choc septique est défini en tant que sepsis sévère ne répondant pas à l'expansion volémique.

Tableau 1: Définition du sepsis selon l'ACCP/SCCM:

SIRS	Au moins 2 des anomalies suivantes: Température $> 38^{\circ}\text{C}$ ou $< 36^{\circ}\text{C}$ Fréquence cardiaque $> 90/\text{min}$ Fréquence respiratoire $> 20/\text{min}$ ou $\text{Pa CO}_2 < 32 \text{ mmHg}$ Leucocytose $> 12000/\text{mm}^3$ ou $< 4000/\text{mm}^3$ ou $> 10\%$ de cellules immatures
Sepsis	SIRS en présence d'une infection
Sepsis sévère	Sepsis et dysfonction d'au moins un organe: Hypotension (tension artérielle systolique $< 90 \text{ mmHg}$ ou réduction d'au moins 40 mmHg des chiffres habituels en l'absence d'autre cause d'hypotension) Acidose lactique Oligurie Encéphalopathie aiguë Hypoxémie inexplicable Coagulopathie
Choc septique	Sepsis sévère et hypotension persistante malgré un remplissage vasculaire adéquat et/ou nécessité de drogues inotropes ou vaso-actives

Incidence

L'incidence du sepsis sévère aux Etats-Unis est estimée à 750.000 cas par an et est responsable de 215.000 décès chaque année (Angus et al., 2001). Le sepsis, le sepsis sévère et le choc septique sont responsables d'une morbidité et d'une mortalité importantes dans les unités de soins intensifs. La majorité des patients qui en décèdent présentent une hypotension réfractaire à l'administration de drogues vasoconstrictrices (Court et al., 2002).

Hypothèse pathogénique

L'inflammation est une réaction physiologique, immédiate et transitoire en réponse à toute agression compromettant l'intégrité de l'organisme. En présence d'un processus infectieux, la réponse immunitaire innée se confond alors avec la réaction inflammatoire précoce. A l'origine, un stimulus, telle la libération d'endotoxine, conduit à la production de médiateurs par les macrophages, dont le facteur de nécrose tissulaire alpha (Tumor necrosis factor alpha, TNF) et l'interleukine 1 beta (vanderPoll & van Deventer, 1999). Ces cytokines stimulent les polynucléaires, les macrophages et les cellules endothéliales qui, à leur tour, libèrent une série d'autres médiateurs dont le facteur d'activation des plaquettes (Platelet activating factor, PAF) et le monoxyde d'azote (Nitric oxide, NO) dont les effets sur la microcirculation sont déterminants.

Toutefois, à côté de cette réponse pro-inflammatoire, plusieurs autres médiateurs à polarité anti-inflammatoire sont également libérés. Ce sont principalement, les interleukines 4, 10 et 13, le TGF-beta et l'interferon-alpha (*Figure 1*).

C'est la balance entre les effets générés par ces médiateurs d'action opposée qui détermine la sévérité de l'épisode septique actuel comme le suggèrent certains auteurs (van Dissel et al., 1998).

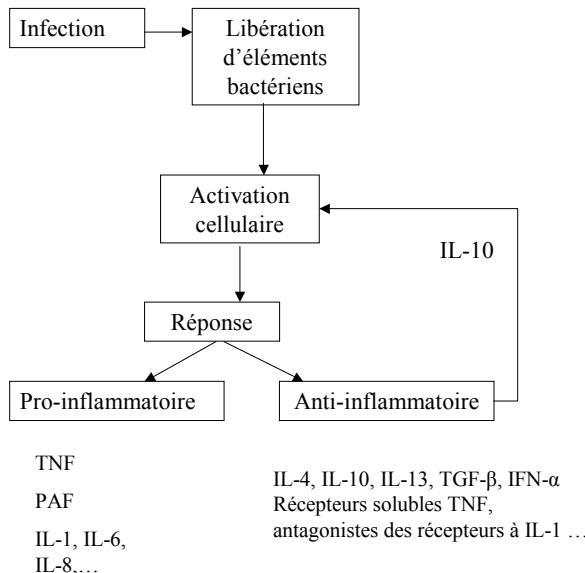


Figure 1: La cascade des médiateurs du sepsis.

Il peut être séduisant de supposer que la sévérité du sepsis est attribuable à un système immunitaire stimulé de manière excessive. Toutefois, pareille hypothèse n'est basée que sur des études animales qui ont fait appel à de larges doses d'endotoxine ou de bactéries pour reproduire l'état septique (Hotchkiss & Karl, 2003). Des taux élevés de cytokines circulantes telles que le TNF sont retrouvés dans de tels modèles: les animaux décèdent alors d'un "storm cytokinique" et les agents capables de bloquer l'effet de ces médiateurs conduisent à l'amélioration de la survie des modèles (Hotchkiss & Karl, 2003).

Certaines formes de sepsis rencontrés en clinique humaine s'accompagnent de taux élevés de TNF et sont significativement corrélés à la mortalité. Au cours d'une infection sévère à méningocoque, par exemple, la réponse hyperinflammatoire initiale est très importante et les taux de TNF, notamment, sont très élevés. La mort peut survenir dans ce contexte hyperinflammatoire et certains traitements à visée anti-inflammatoire peuvent accroître les chances de survie (van de Beek et al., 2004). De manière corollaire, chez la personne âgée dénutrie souffrant d'une diverticulite par exemple, la réponse initiale est limitée et, si

l'infection persiste, une dépression de la réponse inflammatoire se développe de manière prolongée et est suivie soit de guérison, soit de décès. De même, chez le patient diabétique insuffisant rénal chronique souffrant par exemple de pneumonie, la réponse initiale est masquée et la réponse immunitaire insuffisante conduit souvent au décès (Hotchkiss & Karl, 2003).

Bien que les cytokines soient considérées a priori comme délétères, ces exemples démontrent aussi leur effet bénéfique (Hotchkiss & Karl, 2003). L'incidence d'une réponse inflammatoire systémique exagérée au cours du sepsis est cependant plus rare que ce que l'on pouvait supposer. La réponse individuelle à l'infection est déterminée par de nombreux facteurs, incluant la virulence de l'organisme, la taille de l'inoculum, les comorbidités du patient, l'âge et la présence de polymorphismes dans les gènes codant pour la production des cytokines (Villar et al., 2004). En effet, le rôle de facteurs génétiques dans la susceptibilité aux infections est suspecté depuis plusieurs décennies (Villar et al, 2004).

Manifestations cardiovasculaires

Les effets cardiovasculaires du choc septique diffèrent fondamentalement selon que l'on s'adresse à la circulation systémique ou au réseau vasculaire pulmonaire. Au plan systémique, la vasopлегie prédomine. A l'inverse, au niveau de la petite circulation, le sepsis offre une réponse hypertensive artérielle pulmonaire.

La compréhension des manifestations cardiovasculaires du choc septique s'est considérablement étoffée grâce à l'apparition de techniques spécifiques d'évaluation de la performance cardiovasculaire. Avant l'introduction du cathéter pulmonaire artériel de Swan Ganz, le choc septique était caractérisé par deux configurations circulatoires: le choc chaud, associant des téguments chauds, une hypotension et un débit cardiaque élevé. A l'opposé, le choc froid combinant peau froide et débit cardiaque effondré (MacLean et al., 1967). Clowes et al. ont décrit de tels tableaux cliniques comme les étapes extrêmes d'un même processus morbide. Selon ces auteurs, les patients présentaient d'abord une phase hyperdynamique suivie d'une récupération ou d'une progression vers un état de choc hypodynamique les conduisant au décès (Clowes, Jr. et al., 1966). Cette conception hémodynamique était confortée par d'autres études cliniques qui

corrélaient positivement survie et index cardiaque (MacLean et al, 1967). A cette époque, peu de travaux se sont intéressés à la liaison entre le statut volémique et l'index cardiaque. Les auteurs qui défendaient le concept d'un choc froid terminal s'appuyaient sur la mesure de la pression veineuse centrale pour l'adéquation du remplissage vasculaire. La difficulté naît du fait que la pression veineuse centrale n'estime que la seule précharge ventriculaire droite et n'offre aucune appréciation valide de la charge volémique gauche et ce, particulièrement au cours du choc septique où les effets circulatoires sont dissociés (Packman & Rackow, 1983).

L'introduction du cathéter de Swan Ganz autorise la mesure de la pression capillaire bloquée. Ce paramètre évaluant plus précisément la précharge ventriculaire gauche a permis de mieux décrire l'état de dysfonction cardiovasculaire rencontré au cours du choc septique. Plusieurs études ont montré que les patients dont la précharge ventriculaire gauche était optimisée par une expansion volémique, développaient une configuration circulatoire hyperdynamique associant débit cardiaque élevé et résistances vasculaires systémiques réduites (Krausz et al., 1977; Winslow et al., 1973). Contrairement au concept antérieur, pareil profil hyperdynamique peut alors persister jusqu'au décès sans évoluer préalablement vers le stade hypodynamique (Parker et al., 1987).

C'est aussi le cathéter de Swan Ganz qui a permis la description de l'hypertension artérielle pulmonaire au cours des états septiques (Zapol & Snider, 1977). Ces auteurs ont en effet montré que les effets circulatoires du sepsis se caractérisaient par une vasoconstriction artérielle pulmonaire éventuellement responsable d'une défaillance ventriculaire droite.

Communauté pathogénique des altérations circulatoires du sepsis.

Les altérations circulatoires tant au niveau systémique que pulmonaire ont probablement en commun un état de dysfonction endothéliale. A cet égard le métabolisme du NO joue un rôle fondamental. De structure radicalaire libre, ce médiateur est produit par des enzymes appelées NO-synthase (NOS), représentées par trois isoformes: NOS-1 à NOS-3. Initialement retrouvées dans les cellules endothéliales des gros vaisseaux, ces enzymes sont en fait de distribution ubiquitaire. La seule isoforme insensible au calcium, la NOS-2, est caractérisée par un statut

inductible, notamment sous l'effet de différentes cytokines de l'inflammation. La vasodilatation du réseau vasculaire systémique, et l'hypotension qui en résulte, est non seulement attribuée à une production accrue de NO par la voie de l'activation de la NOS-2, mais est aussi secondaire à l'activation de canaux potassiques ATP-sensibles et à une déficience en vasopressine (Landry & Oliver, 2001). Les deux premiers mécanismes exercent leurs effets en réduisant le taux de calcium cytoplasmique et en accroissant le taux intracellulaire de c-GMP.

Au niveau de la circulation pulmonaire, la dysfonction endothéliale conduit à des répercussions très différentes de celles observées au niveau systémique, puisque s'installe une hypertension artérielle pulmonaire. Celle-ci est liée à une hausse du niveau des résistances vasculaires et à une chute de la compliance du réseau vasculaire pulmonaire. Les causes en sont multiples et leur contribution relative est variable au cours du temps. Les modèles expérimentaux du choc septique ont été particulièrement utiles pour la compréhension de tels effets. Ainsi, 30 minutes environ après le début de l'administration d'endotoxine, peut-on observer une augmentation précoce de la pression artérielle pulmonaire qui résulte d'une vasoconstriction précapillaire pulmonaire. Après une courte période d'amoindrissement, pareille hypertension artérielle pulmonaire se prolonge ensuite durant 4 à 5 heures. L'injection de TNF reproduit une séquence similaire. Cela suggère que l'endotoxine pourrait agir par la voie de la libération de TNF par les macrophages ainsi activés. Les métabolites de l'acide arachidonique semblent impliqués dans la genèse de cette hypertension artérielle pulmonaire. En effet, les inhibiteurs de la cyclooxygénase sont capables de significativement réduire cette réponse vasculaire pulmonaire à l'endotoxine. D'autres études ont même suggéré que la majorité du thromboxane A₂ (TXA₂) produit par l'administration d'endotoxine provenait directement du poumon mais était dépourvu d'un effet vasoconstricteur périphérique en raison de sa courte demi-vie (Brigham & Meyrick, 1986b). La phase précoce de vasoconstriction pulmonaire serait ainsi liée à l'effet du TXA₂. Ensuite, les processus inflammatoires, la génération de radicaux libres et une diminution de la production locale de NO seraient à l'origine d'altérations structurelles plus durables de la circulation pulmonaire (Berger et al., 1993; Myers et al., 1992; Weitzberg et al., 1993).

Incertitudes pathogéniques de l'hémodynamique cardiaque

Malgré l'expression habituelle d'un état hyperdynamique, la contractilité myocardique semble réduite par le choc septique, comme le suggère notamment la chute du travail systolique (Weisel et al., 1977). Toutefois le déplacement vers le bas de la relation de Frank-Starling, comme le suggèrent certaines études cliniques (D'Orio et al., 1990) pourrait s'expliquer non seulement par une chute du niveau de contractilité mais aussi par la baisse de la compliance ventriculaire gauche (Court et al, 2002).

L'hypothèse d'une dysfonction myocardique dans le sepsis est avancée depuis de nombreuses années. Son étiologie demeure mystérieuse et de nombreux mécanismes potentiels sont évoqués. Parmi ceux-ci figure l'intervention d'une hypoperfusion myocardique conduisant à une dépression myocardique spécifique. Plusieurs études vont à l'encontre d'une telle intervention. Cunnion et al. (Cunnion et al., 1986) ont en effet démontré que le débit coronaire était accru dans le choc septique, et qu'il n'existe pas, en outre, aucune différence hémodynamique coronaire entre les patients qui développaient une dysfonction myocardique et ceux qui en étaient dépourvus. Ces données ont été confirmées par Dhainaut et al. (Dhainaut et al., 1987) en utilisant une technique de mesure de débit coronaire similaire.

Certaines études conduites chez l'animal démontrent également que le métabolisme myocardique oxydatif ainsi que les concentrations cellulaires en phosphates à haute énergie sont préservés dans le choc septique expérimental, plaident ainsi contre l'intervention d'une ischémie myocardique (Cunnion et al, 1986; Gilles et al., 1994; Solomon et al., 1994). Plus récemment, Turner et al. ont mis en évidence des taux accrus de troponine I chez les patients en choc septique, suggérant l'existence d'une souffrance myocardique (Turner et al., 1999). Il demeure toutefois malaisé d'établir si une atteinte cardiaque directe est responsable de la dysfonction myocardique ou si elle résulte d'autres causes dont l'effet d'un facteur de dépression myocardique ou encore de l'administration de catécholamines exogènes à hautes doses.

Certains animaux de laboratoire tels que le cobaye et les modèles murins développent immédiatement une altération myocardique en réponse à l'endotoxinémie. Au contraire, les autres animaux de plus grande taille montrent qu'un délai de 6 à 24

heures est nécessaire entre l'exposition à l'endotoxine et le développement d'une dysfonction myocardique. En clinique, le choc septique qui se prolonge au-delà de 24 heures, s'accompagne régulièrement d'une dépression tant de la fonction diastolique que de la fonction systolique. Cette dépression cardiaque pourrait être générée par les mêmes médiateurs proinflammatoires que ceux qui sont à l'origine de la vasoplégie (Court et al, 2002).

L'hémodynamique circulatoire pulmonaire

L'étude de la circulation pulmonaire au cours du choc septique est toute aussi parcellaire que celle du versant systémique. Plus rares encore sont les études qui se sont intéressées aux répercussions de ces effets sur la mécanique ventriculaire droite. Cette carence trouve probablement son origine dans l'indisponibilité des techniques d'investigation adéquates. En pratique clinique, la description des propriétés mécaniques de la circulation pulmonaire se limite en effet au simple calcul, selon la loi d'Ohm, des résistances vasculaires pulmonaires. Une telle approche revient à considérer la circulation pulmonaire comme un circuit aux parois vasculaires rigides au sein duquel s'écoule un liquide newtonnien à débit constant. La réalité est autre (Naeije, 2003). La circulation pulmonaire est en effet un réseau vasculaire hautement compliant, répondant à certaines sollicitations par une vasoconstriction adaptative (par exemple l'hypoxie alvéolaire), et à d'autres, par une distension et un recrutement (en cas d'augmentation du débit cardiaque, notamment). En outre, le débit cardiaque est de nature pulsatile et s'écarte d'un régime continu. Il convient donc de déterminer au mieux les propriétés vasculaires pulmonaires en tenant compte de ces contraintes circulatoires qui rendent l'application de la loi d'Ohm obsolète. Enfin, l'étude des caractéristiques de la pompe indépendamment des contraintes du circuit vasculaire n'aboutit qu'à une évaluation parcellaire du système cardiovasculaire (Fourie et al., 1992; Kass & Kelly, 1992; Kussmaul et al., 1992; Piene, 1986; Pouleur et al., 1978). Il nous paraît dès lors plus judicieux d'approcher l'étude de la circulation pulmonaire au travers d'une évaluation simultanée des propriétés ventriculaires droites intrinsèques et des facteurs vasculaires extrinsèques qui déterminent ensemble les conditions de l'éjection du volume systolique.

La notion de couplage rend compte de la combinaison des propriétés de la pompe et des contraintes propres du circuit.

Longtemps considéré tel un conduit passif placé entre les circulations systémique et pulmonaire (Starr et al., 1943) il est actuellement acquis que l'insuffisance ventriculaire droite a des répercussions significatives sur la performance cardiaque globale (Cohn et al., 1974).

Certaines études ont en effet suggéré la survenue spécifique d'une dysfonction systolique ventriculaire droite au cours de l'expansion volémique du choc septique, traduite par la chute de sa fraction d'éjection et la dilatation ventriculaire secondaire (Dhainaut et al., 1988a; Kimchi et al., 1984; Schreuder et al., 1989). La signification de ces résultats reste imprécise, l'étude de la dysfonction ventriculaire ne pouvant être dissociée des effets liés aux modifications de sa charge.

Objectifs et plan du travail

Nous nous sommes attachés au cours de notre travail de doctorat, à l'étude critique des méthodes d'analyse de la circulation pulmonaire. Notre objectif est, à partir d'approches circulatoires ainsi validées, de les appliquer de manière spécifique au choc endotoxique expérimental. Plus particulièrement, l'objectif du présent travail est d'étendre l'étude hémodynamique de la circulation pulmonaire à la compréhension de la mécanique ventriculaire droite par l'évaluation de leur couplage.

Dès lors, nous avons cherché à répondre de manière spécifique aux questions suivantes:

Quelle est la signification physiologique du couplage ventriculo-artériel pulmonaire?

Nous envisageons au chapitre 2 l'analyse détaillée d'un tel concept de couplage en orientant sa signification dans le cadre de notre recherche.

La contractilité ventriculaire droite est-elle mesurable par une technique simple?

Nous envisageons au chapitre 4, l'analyse d'une mesure de la pente d'élastance télésystolique en l'absence de toute manipulation de la charge ventriculaire.

Quel est le profil de la réponse circulatoire pulmonaire à l'endotoxine et quelle est sa nature structurelle?

Nous étudions au chapitre 5 les effets spécifiques de l'endotoxine sur les propriétés résistives et capacitives de la circulation pulmonaire.

Comment l'endotoxine affecte-t-elle l'état du couplage ventriculo-artériel pulmonaire?

Nous contribuons au chapitre 6 à la connaissance des effets propres de l'endotoxine sur les propriétés contractiles du ventricule droit et les dissociations des effets qui résultent des modifications secondaires à la charge appliquée au ventricule.

Forts de la connaissance des effets de l'endotoxine sur le couplage ventriculo-artériel pulmonaire, nous avons voulu ensuite préciser le rôle pathogénique de certains médiateurs. Ainsi avons-nous naturellement poursuivi notre travail en tentant de répondre aux interrogations suivantes:

Quel est l'effet du retrait de certains des médiateurs éventuellement impliqués dans la dépression myocardique?

Au chapitre 7, nous étudions les conséquences de l'épuration plasmatique par l'hémodiafiltration sur les caractéristiques circulatoires pulmonaires au cours de l'endotoxinémie. Les effets de l'utilisation d'une membrane à larges pores au cours de l'hémofiltration sont étudiés au cours du chapitre 8.

Quel est l'effet de l'inhalation de NO?

Nous analysons les effets de l'inhalation du NO sur les propriétés circulatoires pulmonaires au chapitre 9.

Quel rôle joue le TXA₂ dans la réponse hypertensive pulmonaire au cours du choc endotoxinique?

Après avoir montré dans le chapitre 10 que le BM-573, nouvelle molécule dérivée du torasémide, est capable d'inhiber les effets d'un agoniste stable du TXA₂ au sein de la circulation pulmonaire, nous la testons au cours du choc endotoxinique et rapportons notre analyse aux chapitres 11 et 12.

**I. Chapitre 1: Etude critique des moyens
d'analyse circulatoire et résumé du travail
de doctorat**

I.1. Analyse des propriétés hémodynamiques de la circulation pulmonaire.

L'ensemble des éléments qui s'opposent à l'éjection ventriculaire porte le nom de « postcharge » (Milnor, 1975). Les cliniciens assimilent le plus souvent la postcharge ventriculaire droite à la pression artérielle pulmonaire moyenne ou à la résistance vasculaire pulmonaire. Malheureusement ces dernières variables dépendent soit de la contractilité cardiaque, soit du rapport de la pression et du débit moyens, et donc, in fine, de l'activité cardiaque qui les a générées. Ces paramètres devraient être supplantés par des indices mécaniques liés de manière intrinsèque aux caractéristiques mécaniques du réseau vasculaire pulmonaire et établis indépendamment de l'activité ventriculaire (Naeije, 2003). La grande complexité du réseau vasculaire pulmonaire rend illusoire et stérile toute tentative de le caractériser par ses paramètres naturels physiques : diamètres, bifurcations et élasticité des vaisseaux qui le composent.

C'est pourquoi plusieurs approches analytiques ont été proposées pour aborder avec plus de détails les propriétés du circuit vasculaire pulmonaire. Ce sont l'analyse fréquentielle, la relation pression débit et l'analyse temporelle. Nous croyons utile de rappeler brièvement les grands principes de ces trois méthodes.

I.1.1. L'analyse fréquentielle

Selon le théorème de Fourier, un signal périodique peut être décomposé en un certain nombre d'ondes sinusoïdales (appelées harmoniques) d'amplitudes différentes, dont la fréquence propre est un multiple de la fréquence fondamentale de celui-ci. La somme de ces ondes fournit une reconstruction du signal dont la correspondance avec l'aspect originel s'accroît avec le nombre d'harmoniques utilisés (*Figure 1.1*).

L'amplitude des différents harmoniques diminue avec l'augmentation de leur fréquence propre. Puisque l'onde de pression et l'onde de débit sanguins pulmonaires sont des signaux périodiques ils peuvent faire l'objet d'une semblable analyse spectrale de Fourier dont le résultat s'exprime par un spectre de fréquences où chacune d'elles est caractérisée par un module et une phase. Le rapport de ces deux spectres permet d'obtenir le spectre d'impédance, caractérisé à son tour par un module et une phase pour chaque fréquence. Ce module est obtenu par le rapport entre les modules de la pression et du débit pour chaque harmonique alors que la phase est obtenue par la différence entre les phases de la pression et du débit pour chaque harmonique (*Figure 1.2.*).

Le spectre d'impédance, dont le module s'exprime en mmHg seconde par millilitre et la phase en degré ou en radian, s'est révélé être un bon moyen d'appréciation de la postcharge ventriculaire droite et a d'ailleurs été pendant longtemps, le seul accessible aux chercheurs (Altavilla et al., 1995; Chen et al., 1997a; Piene, 1986). Il présente cependant plusieurs écueils. Son application aux signaux de débit et de pression est aléatoire lorsque ceux-ci ne sont pas stables pendant une période suffisante. C'est que toute variation transitoire de ces paramètres échappent à ce mode d'analyse (Grant & Lieber, 1996). En outre, cette analyse nécessite des enregistrements continus de pression et de débit de haute qualité car elle est très sensible aux artefacts qu'elle interprète comme des harmoniques constituants (D'Orio et al., 1998). Au-delà du cinquième harmonique, les spectres de la pression et du débit sont de faibles amplitudes et leur rapport est donc numériquement instable. Son application et son interprétation ne sont pas aisées pour des physiologistes car cette analyse fournit ses informations sous forme de données quantitatives mais aussi qualitatives. Enfin, la méthode de Fourier ne permet pas de caractériser la compliance vasculaire, ni l'inertance, caractéristiques mécaniques circulatoires pourtant très influentes sur les modalités d'éjection systolique car l'information qu'apporte le spectre d'impédance est dispersée sur tous les harmoniques.

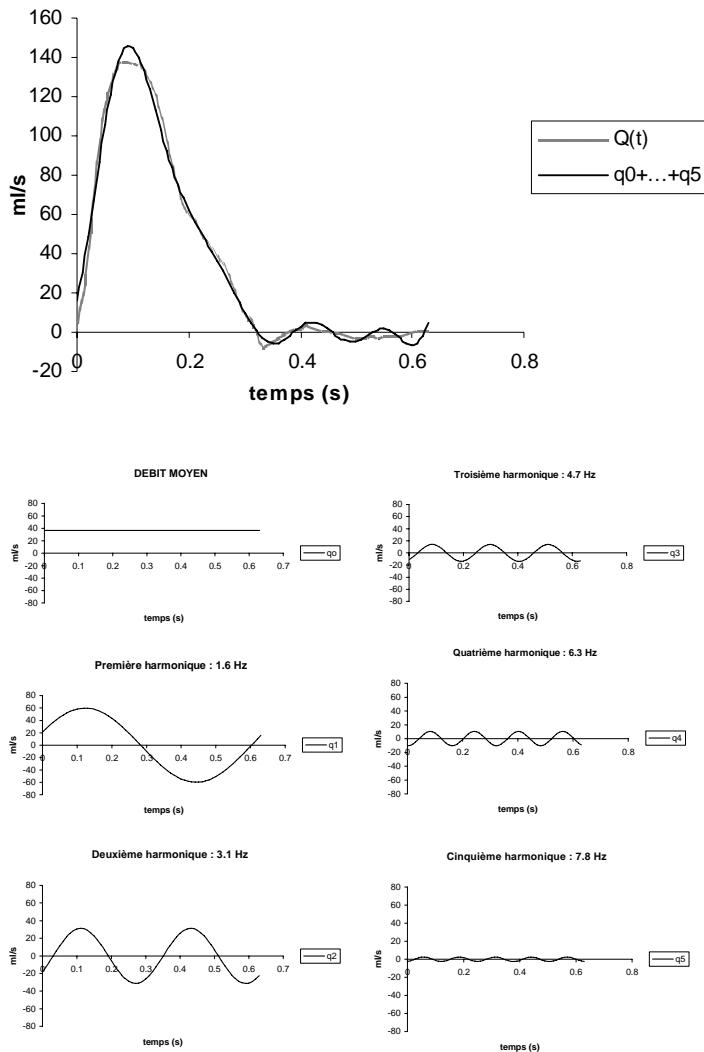


Figure 1.1. Enregistrement d'une onde de débit sanguin pulmonaire en fonction du temps ($Q(t)$, en pointillé) superposée à sa reconstitution par séries de Fourier (en continu) obtenue au moyen de la somme des cinq premiers harmoniques (q_1 à 5) et du débit moyen (q_0). Les discordances entre les deux courbes s'estompent au fur et à mesure que des harmoniques supplémentaires sont ajoutés.

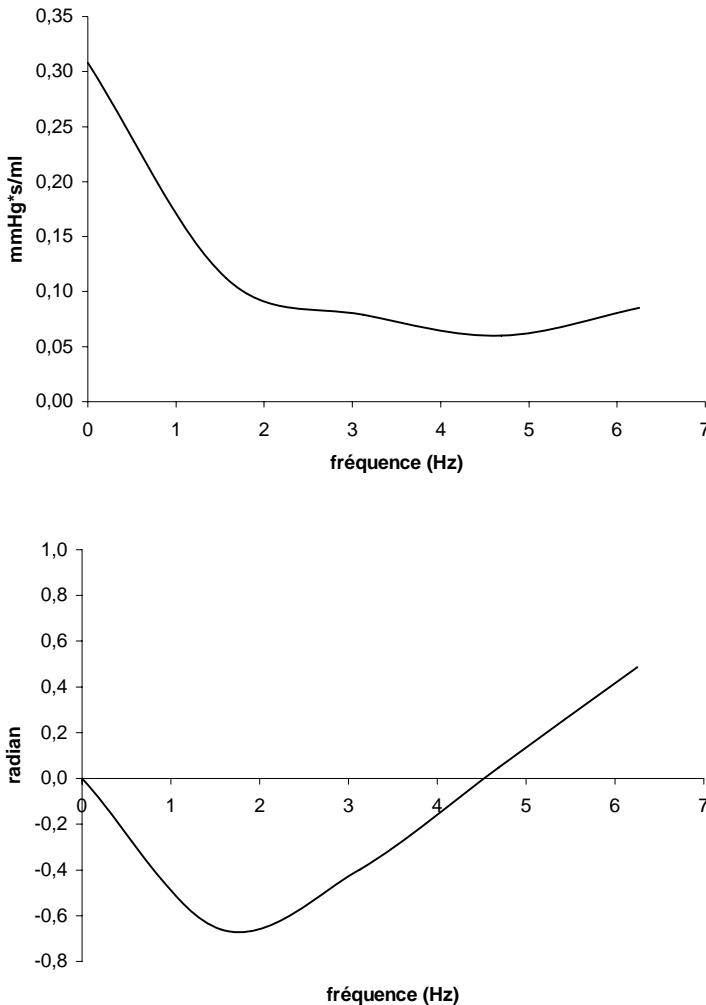


Figure 1.2. Illustration d'un spectre d'impédance de la circulation pulmonaire résultant du rapport entre les séries de Fourier du signal de pression et du signal de débit. En haut, le module attribué à chaque fréquence résulte du rapport entre le module de la pression et du débit pour cette même fréquence. En bas, la phase attribuée à chaque fréquence résulte de la différence entre la phase de l'harmonique correspondant de la pression et celle du même harmonique du débit.

I.1.1.1. Relation pression débit

Une autre approche plus récente de la petite circulation met en œuvre la relation entre la pression et le débit sanguin pulmonaire (D'Orio et al., 1993; Delcroix et al., 1990; Ducas et al., 1986; Ducas et al., 1988). En conditions physiologiques cette relation linéaire en coordonnées perpendiculaires, est caractérisée par une pente, mesurant la résistance à l'écoulement du sang. L'intersection de cette droite avec l'axe de la pression mesure le niveau du resistor de Starling qu'oppose le lit artériolaire pulmonaire à la circulation sanguine (Ducas et al, 1986; Ducas et al., 1987) (Figure 1.3.).

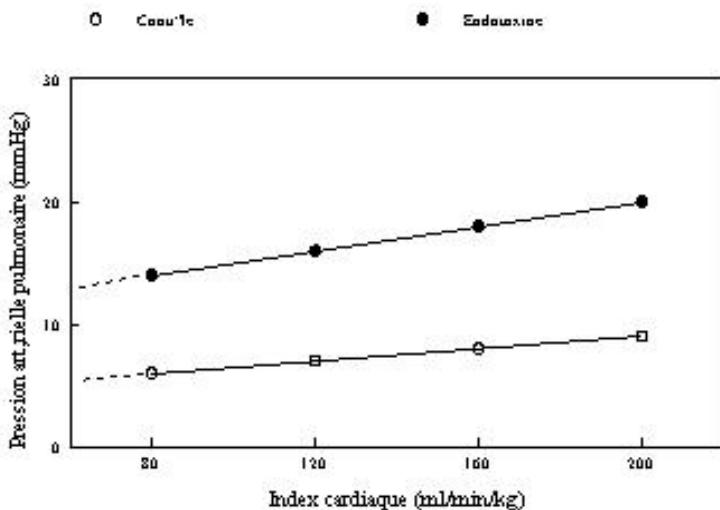


Figure 1.3. Exemple de relation entre la pression et le débit sanguin pulmonaire lors d'une diminution progressive de celui-ci en période contrôle (cercle vide) et après perfusion d'endotoxine (cercle plein). La pente de la relation mesure la résistance à l'écoulement du sang et son intersection (en pointillé) avec l'axe de la pression mesure le niveau du resistor de Starling.

On considère qu'une fois ce resistor franchi, plus aucun obstacle ne s'oppose au passage du sang qui dès lors s'écoule en bloc dans le réseau veineux à la manière d'une chute d'eau. Deux difficultés principales s'opposent à la mise en pratique de cette méthode. La première est de réaliser les conditions soit de diminution soit d'augmentation progressive du débit afin d'obtenir le nombre de points nécessaires au tracé de la pente de la résistance. L'autre est de modifier ainsi le débit sanguin sans provoquer de réactions d'adaptation cardiaque ou vasomotrice altérant les conditions circulatoires, et en particulier le niveau du resistor de Starling, dont la stabilité dépend de celle de la pression auriculaire gauche (Ducas et al, 1988). Cette méthode se révèle ainsi peu maniable et son intérêt reste limité dans la mesure où comme la précédente, elle ne permet pas d'apprécier la compliance vasculaire puisque elle ne considère que les valeurs de débit et de pression moyennes. En fait, l'information contenue dans la pente est à la fois relative à la résistance et à la compliance. Dès lors, le modèle pression-débit peut être entièrement interprété soit par une propriété résistive soit par une propriété distensible du circuit vasculaire pulmonaire.

I.1.2. Analyse temporelle

L'étude des variations en fonction du temps de paramètres prévus par des modèles inspirés de réseaux électriques a retenu toute notre attention au cours de notre travail de doctorat. Sa mise en œuvre ne présente pas la complexité de l'analyse dans le domaine fréquentiel, tandis que son champ d'investigation est plus étendu que celui des relations pression-débit.

De tels modèles explicitent au travers d'une équation la relation entre les deux signaux directement accessibles à la mesure: le gradient de pression $P-P_o$ (différence entre la pression P à l'entrée et P_o , la pression de remplissage) et le débit à l'entrée du circuit. En fait, ces modèles sont des analogues électriques comportant un nombre réduit de composants (résistance, capacité, inductance) simulant les caractéristiques hydrauliques essentielles du réseau. Dans cette analogie électrique de l'écoulement sanguin, les pressions ($P-P_o$) sont interprétées par des voltages, les débits (Q) par des intensités, les résistances hydrauliques (R) par des

résistances électriques, les compliances (C) par des capacités et l'inertance (L) de la masse sanguine par des inductances.

Le plus rudimentaire de ces circuits analogiques est constitué par une seule résistance (R), c'est le modèle résistif pur. Une telle modélisation circulatoire revient à faire appel à la loi d'Ohm : $P_{Po} = RQ$. On postule que le réseau vasculaire étudié peut être assimilé à un conduit rigide dans lequel l'écoulement est continu et en régime laminaire. La valeur de la résistance est estimée par le rapport entre la pression de perfusion moyenne et le débit moyen (résistance dite ohmique). Par définition, ce modèle est inapte à prendre en compte le caractère pulsatile de l'écoulement sanguin. Bien que trop sommaire, ce modèle a néanmoins le mérite de montrer que pour assurer un même débit, un réseau plus résistif requiert une pression de perfusion plus élevée et donc un travail cardiaque d'éjection systolique plus important.

Le premier modèle prenant en compte, au moins partiellement, le régime pulsatile de l'écoulement et la capacité de stockage des artères fut introduit par Frank (Frank, 1899). Il comporte une capacité (C) placée en parallèle avec la résistance (R). La capacité exprime la possibilité de stockage du réseau grâce à la propriété de compliance des vaisseaux, principalement celle des grosses artères. Ce modèle connu sous l'abréviation WK2, pour windkessel à deux éléments, en raison de la dénomination allemande de son analogue hydraulique. Il a ensuite donné son nom à l'ensemble des circuits électriques qui appartiennent à la même famille et qui ont été ultérieurement développés pour représenter au mieux l'écoulement dans les réseaux artériels (Grant & Paradowski, 1987).

En effet, le défaut majeur du WK2 est qu'il sous-tend que l'onde de pression soit identique et simultanée en tous points du réseau. Cette conception implique dès lors une vitesse infinie pour la propagation de l'onde de pression.

Pareille insuffisance explique qu'un modèle windkessel à trois éléments ou WK3 fut développé par Broemser (Broemser & Ranke, 1930). Il s'obtient en disposant une résistance d'entrée R_1 en série devant le windkessel à deux éléments, dont la résistance se note alors R_2 et porte le nom de résistance périphérique. La résistance d'entrée R_1 peut alors être interprétée comme l'impédance caractéristique du réseau vasculaire pulmonaire (Grant & Paradowski, 1987). La somme $R_1 + R_2$ des deux résistances

constitue la résistance totale à l'écoulement dans le réseau considéré. L'introduction d'une résistance d'entrée améliore grandement la description de l'écoulement notamment en terme d'impédance (rapport entre les modules des composantes, établies dans le domaine fréquentiel, des ondes de pression et de débit). En pratique, le rapport entre les composantes de basses fréquences (< 3 Hz) est représenté de manière très satisfaisante par ce modèle, au contraire des valeurs d'impédance à plus haute fréquence où la qualité de cette représentation se détériore. Finalement, pour remédier à cet inconvénient, une inductance L a été introduite en série à l'entrée du modèle WK3, afin de modéliser l'inertie de la masse sanguine. On obtient ainsi le modèle WK4, schématisé à la *figure 1.4*. Ce modèle permet de prendre en compte le déphasage existant entre les ondes de pression et de débit.

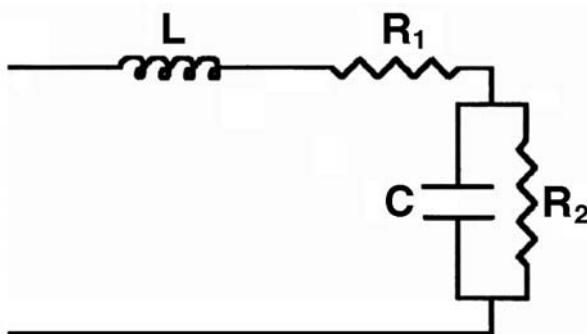


Figure 1.4.: Représentation du modèle de windkessel à quatre éléments. Par analogie avec l'électricité, la pression correspond à la différence de potentiel et le débit à l'intensité du courant. Le résistor R_1 est utilisé pour représenter la résistance caractéristique. R_2 représente les propriétés résistives de la circulation pulmonaire. La capacité C représente les propriétés compliantes de l'arbre circulatoire pulmonaire et L dépend essentiellement de l'inertie et de la compliance de l'artère pulmonaire principale.

L'expérience montre que les modèles plus complexes que le WK4 n'apportent pas de renseignement supplémentaire physiologiquement exploitable malgré une exigence accrue dans la qualité des signaux acquis.

En substance, la caractérisation du réseau artériel pulmonaire requiert l'enregistrement des signaux de pression et débit à la racine de l'artère pulmonaire et leur analyse numérique subséquente. L'utilisation du modèle WK4 permet d'estimer les valeurs de quatre paramètres caractéristiques: une résistance d'entrée R_1 physiologiquement identifiée comme la résistance de l'artère pulmonaire, une résistance périphérique R_2 qui traduit globalement la résistance des vaisseaux d'aval, une capacitance C qui rend compte de la compliance des vaisseaux et une inertance L qui traduit l'inertie de la masse sanguine (Grant & Paradowski, 1987; Lambermont, 1998).

Dans notre travail de doctorat nous avons élaboré une méthode d'identification performante et rapide des paramètres proposés pour les modèles de windkessel (Lambermont et al., 1998b). Cette méthode originale se distingue des autres précédemment décrites par sa simplicité d'exécution qui améliore la procédure sans nuire à la grande précision des résultats qu'elle permet d'obtenir. Entièrement automatisée sur micro-ordinateur, elle permet la comparaison des différents modèles entre eux (Lambermont et al., 1997; Lambermont et al., 1998a). Nous avons validé cette méthode en comparant les valeurs qu'elle fournit avec celles obtenues par une méthode antérieurement décrite prise en référence (Lambermont et al., 1998c; Lambermont et al., 1998b). Ensuite, nous avons comparé les deux modèles les plus fréquemment cités dans la littérature, les modèles de windkessel à trois et à quatre éléments, dans leur capacité respective à analyser les modifications circulatoires pulmonaires produites par différentes situations proches de celles rencontrées en pathologie humaine. Nous avons ainsi montré que l'addition d'un quatrième élément au modèle de windkessel à trois éléments accroît la précision de l'analyse (Lambermont et al., 1998a). Raison pour laquelle nous avons sélectionné le modèle à quatre éléments représenté dans la *figure 1.4.* pour nos analyses ultérieures. La dernière partie de notre travail de doctorat démontre l'intérêt de l'analyse par modèle de windkessel, appliquée à la physiopathologie de la circulation pulmonaire. Nous l'avons éprouvée dans le choc endotoxique, modèle du choc septique, pathologie redoutable, fréquente dans les unités de soins intensifs médicaux. V.D'Orio dans son travail d'agrégation de l'enseignement supérieur (D'Orio, 1993) a fait une étude très fouillée des phénomènes induits par ce choc au niveau de la circulation systémique, comme au niveau de la

circulation pulmonaire. Par la méthode qui consiste à construire les relations pression-débit, il arrivait à la conclusion que l'hypertension artérielle pulmonaire observée à la fin de la perfusion d'endotoxine avait pour origine un accroissement des résistances artérielles pulmonaires globales ainsi qu'un relèvement du niveau d'un resistor de Starling localisé dans la microcirculation interalvéolaire. A ces notions d'un très grand intérêt, notre méthode d'analyse par le windkessel à 4 éléments apporte des précisions et des informations complémentaires dont l'intérêt n'est pas moindre.

Tout d'abord, en raison de sa facilité d'exécution, sans interférence possible avec le déroulement des phénomènes induits, nous avons reproduit notre analyse plusieurs fois au cours de l'évolution du choc endotoxique. Nous avons ainsi observé qu'en réalité, l'hypertension pulmonaire du choc endotoxique évolue en deux phases séparées par une courte période de rémission. La première est précoce, s'installant dès la fin de la perfusion d'endotoxine ; la seconde atteint son maximum après deux heures d'évolution (Lambertmont et al., 1999b). Une telle séquence suggère que deux types de médiateurs interviennent successivement pour induire cette hypertension artérielle et ouvre la porte notamment à des explorations autopharmacologiques pour en préciser la nature. En outre, interrogeant plusieurs propriétés mécaniques de la circulation pulmonaire, notre méthode d'analyse a permis de préciser que des mécanismes différents participent à la genèse de ces deux phases d'hypertension pulmonaire. C'est l'accroissement de résistance artérielle distale qui caractérise la première poussée hypertensive tandis que c'est la perte de compliance des gros vaisseaux artériels pulmonaires qui distingue la seconde. Ces précisions confortent l'hypothèse d'inducteurs distincts pour l'amorce de chacune des deux phases. Elles ont encore le mérite de proposer une réflexion sur la nature des thérapeutiques à mettre en œuvre dans le choc septique selon qu'il se présente dans sa phase initiale ou, au contraire, après plusieurs heures d'évolution.

Comme le soulignent les objectifs de notre travail actuel, c'est l'étude de la performance globale de l'hémodynamique pulmonaire que nous avons voulu estimer au cours du choc septique expérimental. Pareille approche passe nécessairement par l'étude simultanée de la postcharge ventriculaire droite, obtenue à partir des propriétés hémodynamiques de la circulation

pulmonaire, et des caractéristiques hémodynamiques intrinsèques du ventricule droit. En effet, le ventricule droit est couplé au circuit vasculaire pulmonaire ce qui signifie que toute modification des propriétés hémodynamiques du réseau vasculaire pulmonaire a des répercussions sur la performance ventriculaire droite (Kussmaul et al, 1992). Ce concept de couplage ventriculo-artériel est développé dans le chapitre suivant.

II. Chapitre 2 : Analyse du couplage ventriculo-artériel pulmonaire

The role of right ventricular-pulmonary arterial coupling to differentiate between effects of inotropic agents in experimental right heart failure

Bernard Lambermont, Vincent D'Orio

Critical Care Medicine (in press)

(Annexe 1)

Le concept de couplage ventriculo-artériel a été développé par Sunagawa et al (Sunagawa et al., 1983). La difficulté de sa mesure, les imprécisions de son analyse et sa portée clinique incertaine représentent autant de raisons qui ont négligé la transposition d'un tel concept aux investigations hémodynamiques de routine clinique. Pourtant la performance ventriculaire quelle que soit son expression doit être interprétée comme le résultat d'une interaction permanente entre la pompe cardiaque et le réseau vasculaire dans lequel elle débite. Dans cette optique, le ventricule droit est considéré comme une pompe chargée de fournir à la masse sanguine une énergie suffisante pour pouvoir circuler au sein du circuit pulmonaire afin d'y permettre les échanges gazeux et d'atteindre l'oreillette gauche. Les caractéristiques ventriculaires intrinsèques fixent les conditions initiales pour l'écoulement vasculaire. En corollaire, par ses propriétés élastiques et résistives, le réseau vasculaire pulmonaire a la valeur d'une contrainte physique qui fixe les caractéristiques de l'environnement dans lequel la pompe doit opérer. Dès lors, l'évaluation de la performance cardiovasculaire requiert d'abord de caractériser chacun des constituants, le réseau vasculaire pulmonaire et la contractilité ventriculaire droite, tout en tenant compte du caractère spécifiquement pulsatile de la circulation. Ensuite puisque ces deux composants travaillent simultanément, leur interaction, c'est à dire leur couplage doit en justifier sa résultante: le volume d'éjection systolique.

Dans son analyse initiale de l'appareil cardiovasculaire, Sunagawa proposait de le modéliser selon deux chambres élastiques placées en série. La *figure 2.1.* permet de schématiser pareille modélisation. Les deux chambres considérées peuvent être caractérisées au moyen de deux variables communes : le volume d'éjection systolique (VS) et la pression télésystolique (Pts). Pour le ventricule, la relation entre Pts et VS est linéaire et décroissante : Pts s'abaisse à mesure que VS augmente. L'abscisse à l'origine est représentée par le volume télédiastolique (VTD), traduisant le fait que si la résistance opposée à l'éjection est nulle, alors Pts tend vers 0 et le volume systolique éjecté se confond avec la valeur du volume de remplissage de fin de diastole (éjection complète). Pour une résistance infinie, le volume systolique s'annule (ventricule non éjectant) et Pts atteint une valeur maximale, représentant l'ordonnée à l'origine de la relation. La pente de la relation dépend

fondamentalement des propriétés inotropes du ventricule.

Au niveau artériel pulmonaire, la relation entre P_{ts} et VS est aussi linéaire mais croissante : P_{ts} augmente avec VS. Lorsque VS est nul, la relation croise l'axe des ordonnées au point de pression du remplissage vasculaire P_o . La pente de la relation dépend nécessairement des caractéristiques visco-élastiques et résistives de l'arbre artériel pulmonaire et de la période du cycle cardiaque.

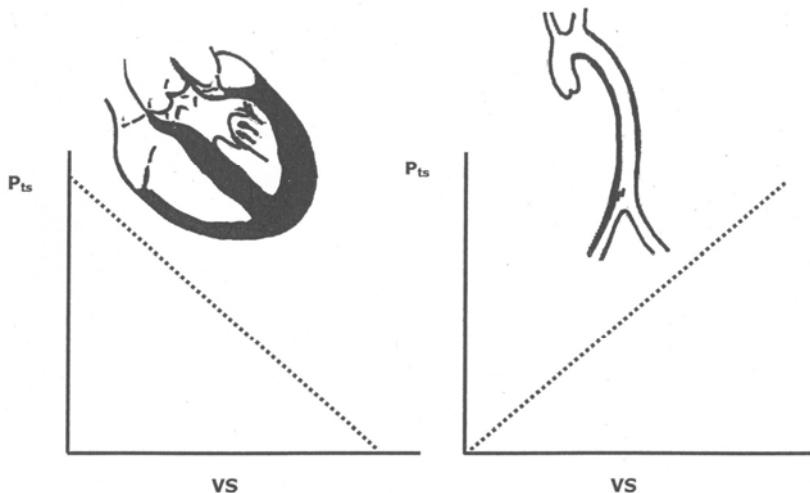
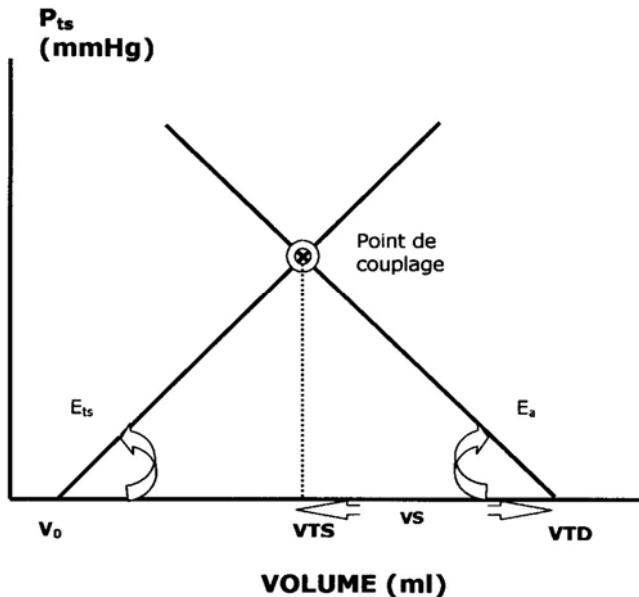


Figure 2.1.: Le concept mécanique du couplage ventriculo-artériel selon Sunagawa. Le système est représenté par deux chambres élastiques (l'une ventriculaire, l'autre artérielle), chacune étant caractérisée par une relation linéaire entre le volume systolique (VS) et la pression télésystolique (P_{ts}).

Dès lors, si l'on accouple les deux éléments du système et puisque, au point télésystolique de la boucle cardiaque, P_{ts} est identique dans les deux chambres, alors les deux relations se croisent en un point qui correspond au couplage ventriculo-artériel (Figure 2.2).



**Figure 2.2.: Représentation graphique du couplage ventriculo-
artériel.** Le point d'intersection des relations E_{ts} (élastance télésystolique) et E_a (élastance artérielle) correspond au point de couplage ventriculo-
artériel qui fixe la valeur du volume télésystolique (VTS). Le volume
d'éjection systolique (VS) est égal à la différence entre le volume
télédiastolique (VTD) et VTS.

La poursuite d'un tel modèle implique la définition des relations pression-volume pour chacun des composants, ventriculaire et vasculaire, du système.

II.1. Le réseau artériel pulmonaire

L'information incluse dans les paramètres R_1 , R_2 , C et L du modèle de windkessel à quatre éléments décrit au chapitre 1 qui caractérise l'aspect physique du réseau vasculaire pulmonaire peut être rassemblée dans une grandeur appelée élastance artérielle (E_a). Comme nous l'avons déjà signalé, la pression artérielle pulmonaire en fin de systole (P_{ts}) est une fonction linéaire du volume éjecté (VS) selon l'équation:

$$P_{ts} = P_0 + E_a * VS \text{ (Equation 2.1.)}$$

Ainsi, dans un diagramme pression-volume de fin d'éjection, les propriétés du réseau vasculaire pulmonaire sont représentées par une droite dont la pente est l'élastance artérielle. Cette pente peut être estimée directement à partir des paramètres du modèle windkessel adopté et de la fréquence cardiaque. Dans le cas du modèle résistif pur, l'expression de E_a s'écrit $E_a = R/T$ où T est la durée du cycle cardiaque. Le recours aux modèles plus évolués rend l'expression de E_a plus complexe. Pour les modèles WK3 et WK4, elle s'écrit :

$$E_a = (R_1 + R_2) / [T_s + R_2 C (1 - e^{-R_2 C / T_d})] \text{ (Equation 2.2.)}$$

où R_1 , R_2 , C sont les paramètres du modèle considéré et où T_s , T_d sont les intervalles de temps systolique et diastolique, respectivement.

Cette notion d'élastance artérielle représentera le réseau vasculaire pulmonaire dans l'expression du couplage ventriculo-artériel.

II.2. La chambre ventriculaire.

Le développement et la validation de la méthode du cathéter à conductance pour l'enregistrement des boucles pression-volume, d'abord pour le ventricule gauche (Baan et al., 1984), ensuite pour le ventricule droit (Dickstein et al., 1995), a rendu la mesure de la contractilité myocardique plus accessible. L'absence de linéarité des courbes de fonction ventriculaire, la dépendance vis à vis de la précharge et de la postcharge de certains indices de contractilité, la géométrie particulière du ventricule droit rendent les choses complexes (Dell'Italia & Santamore, 1998).

L'élastance télésystolique, c'est à dire la pente de la droite reliant le point de fin de systole de la boucle pression-volume à

l'origine des axes est un indice de contractilité souvent utilisé. Toutefois, afin de rendre cet indice indépendant des conditions de charge du ventricule, il est préférable d'utiliser la pente de la droite reliant les points de fin de systole des boucles pression-volume obtenues lors d'une diminution progressive de la précharge.

D'autres indices tels la pression ventriculaire maximale, la variation maximale instantanée de la pression ventriculaire (dp/dt), le volume éjecté, le travail systolique, la fraction d'éjection, ou le débit moyen sont autant d'approches qui souffrent du même défaut de dépendance face aux conditions de charge ventriculaire et de la fréquence cardiaque. Afin de les rendre indépendants de la précharge et donc plus fiables, il a été proposé d'utiliser préférentiellement la pente de la relation qui existe entre certains de ces indices, d'une part, et le volume télediastolique, d'autre part, au cours d'une manoeuvre de réduction de la précharge. C'est notamment le cas du travail systolique (SW) et du dp/dt (Karunanthi et al., 1992).

D'autres indices ont été développés afin de se libérer de la nécessaire variation de la précharge. Ainsi, un indice déjà utilisé pour le ventricule gauche par Kass et al. (Kass & Beyar, 1991) et dérivé de la puissance du ventricule ajustée à la précharge (preload-adjusted maximal power, PAMP) a suscité au cours de la dernière décennie un regain d'intérêt (Nakayama et al., 1998; Segers et al., 2003). Son principal avantage consiste en l'absence de la nécessité de modifier la précharge pour son calcul. La puissance générée par le ventricule au cours de l'éjection peut être mesurée par le produit instantané de la pression ventriculaire et du débit d'éjection. La puissance maximale du ventricule gauche divisée par le carré du volume télediastolique pourrait refléter les modifications de contractilité tout en étant insensible aux modifications de postcharge. L'utilisation de cet indice pour le ventricule droit est cependant moins convaincante (Leather et al., 2002).

Des indices échographiques tels que l'accélération myocardique durant la contraction isovolumique ont aussi été étudiés (Vogel et al., 2002). Ils sont opérateurs dépendants mais permettent de refléter des modifications de contractilité et semblent indépendants de la précharge et de la postcharge.

La pente d'élastance télesystolique obtenue à partir d'une seule boucle pression volume et appelée méthode "single-beat" a aussi été testée (Brimioulle et al., 2003; Lambermont et al., 2004b).

Comme pour quasi toutes les autres méthodes elle est adaptée à partir des données relatives au ventricule gauche où malheureusement les résultats qu'elle fournit demeurent incertains (Kjorstad et al., 2002). Cette approche est fondée sur l'extrapolation à partir d'un cycle éjectant de la courbe de pression d'un cycle isovolumique. Sur une boucle pression volume, la droite qui relie alors le point de fin de systole au point correspondant à la pression maximum du cycle isovolumique extrapolé représente l'élastance télésystolique (*Figure 2.3.*). Nous y reviendrons dans le chapitre 4.

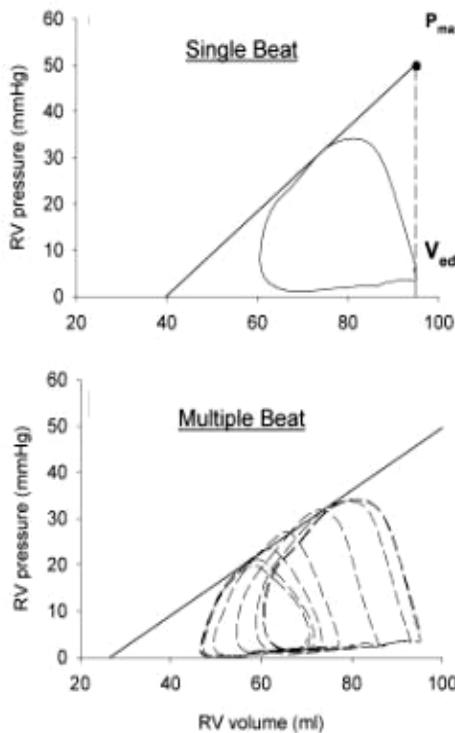


Figure 2.3.: Evaluation de la contractilité ventriculaire par la méthode "single beat" (haut) et par la méthode "multiple beat" (bas).

La relation pression-volume peut être décrite par l'équation suivante:

$$P(t) = E(t) [V(t) - V_0] \quad (\text{Equation 2.3.})$$

où V_0 est le volume mort ou résiduel du ventricule.

La contractilité s'exprime alors quantitativement par la fonction $E(t)$ appelée « élastance ventriculaire ». La valeur maximale de l'élastance E_{max} précède légèrement le point d'élastance télésystolique (E_{es}). En pratique, l'assimilation de E_{max} à E_{es} n'est associée qu'à une erreur insignifiante.

E_{max} possède la propriété remarquable suivante: pour une même contractilité ventriculaire et pour une même fréquence cardiaque, les points de fin de systole d'une série de boucles pression-volume correspondant à des niveaux de charge différents (précharge ou postcharge qui sont rendues variables), s'alignent sur une même droite dont la pente est précisément E_{es} (*Figure 2.4.*).

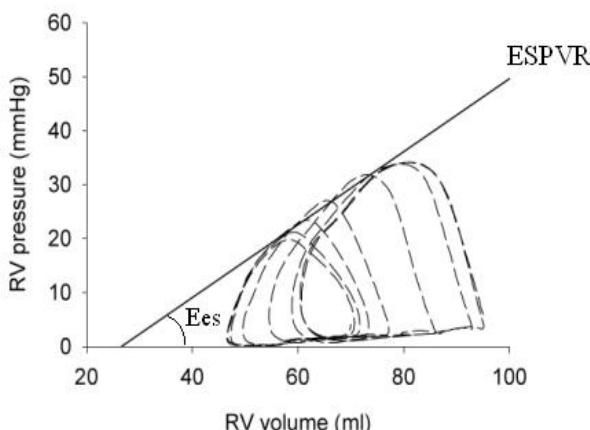


Figure 2.4.: Relations pression-volume ventriculaires (7 boucles P-V successives) lors d'une variation de la précharge obtenue en gonflant un ballon de Fogarty introduit dans la veine cave inférieure (réduction du retour veineux). La relation linéaire qui unit les points télésystoliques des boucles ainsi créées correspond à la droite d'élastance télésystolique (ESPVR, end-systolic pressure-volume relationship). La pente de cette droite correspond à l'élastance télésystolique (E_{es} , end-systolic elastance). E_{es} est ainsi un indice de contractilité indépendant de la précharge.

Ainsi E_{es} apparaît comme un indice de contractilité indépendant de la précharge et de la postcharge. En fin de systole, la pression ventriculaire P_{ts} et le volume ventriculaire télésystolique V_{TS} sont donc liés par la relation $P_{ts} = E_{es} (V_{TS} - V_0)$, c'est-à-dire, puisque $VS = V_{TD} - V_{TS}$, par l'équation :

$$P_{ts} = E_{es} (V_{TD} - V_0 - VS) \quad (\text{Equation 2.4.})$$

Cette équation montre que dans un diagramme pression-volume de fin d'éjection, les caractéristiques du ventricule sont effectivement représentées par une droite dont la pente est égale à E_{es} . Cette notion d'élastance ventriculaire représentera le ventricule dans l'expression du couplage ventriculo-artériel.

II.3. Le couplage ventriculo-artériel : signification physiologique.

En conditions physiologiques, les pressions ventriculaire droite et artérielle pulmonaire sont égales durant la phase d'éjection (systole isotonique). Les caractéristiques du réseau pulmonaire (R_1 , R_2 , C et L) imposent d'une part que la pression soit une fonction du débit (cfr *Eq. 2.1.*) et les caractéristiques ventriculaires imposent à leur tour que d'autre part la pression ventriculaire soit aussi une fonction du volume ventriculaire (cfr *Eq. 2.4.*). L'égalité des deux pressions durant l'éjection entraîne l'égalité de ces deux fonctions. Il en résulte que débit pulmonaire et volume ventriculaire sont liés par une équation pendant la phase d'éjection. Puisque $Q(t) = -dV(t)/dt$, on conclut que $V(t)$ est constraint à vérifier une équation différentielle; ce qui détermine complètement $V(t)$ dès que sa valeur initiale V_{TD} est connue. En d'autres termes, le volume éjecté VS est complètement pré-déterminé tant par les caractéristiques ventriculaires qu'artérielles et V_{TD} . On peut montrer que VS est effectivement défini à partir des élastances artérielle E_a et ventriculaire E_{es} , de V_0 et de V_{TD} , selon :

$$VS = E_{es}(VTD - V_0) / (E_{es} + E_a) \quad (\text{Equation 2.5.})$$

Cette détermination de VS à partir de VTD et des caractéristiques ventriculo-artérielles est illustrée sur la *figure 2.2.* Il apparaît clairement qu'une augmentation de Ees ou de VTD conduit à une augmentation du VS et qu'à l'inverse, une augmentation de Ea entraîne une diminution du VS.

Le rapport Ees / Ea est par définition le point de couplage ventriculo-artériel puisqu'il représente le point de croisement des droites d'élastance, respectivement des composants ventriculaire et artériel du système.

Ainsi défini, le point de couplage ventriculo-artériel joue un rôle essentiel dans l'économie de l'énergétique cardiaque. Le travail externe ou stroke work (SW) (surface de la boucle P-V ventriculaire) n'est qu'une partie du travail effectué par le ventricule. Il représente en effet l'énergie transmise au système artériel d'aval. Mais lorsque se termine l'éjection, il demeure dans le ventricule une masse de sang égale au volume télésystolique VTS et soumise à la pression télésystolique Pts. Autrement dit, à la fin de l'éjection ventriculaire, il demeure une énergie potentielle (EP) qui sera dissipée en chaleur lors de la relaxation diastolique isovolumétrique. Cette énergie potentielle est représentée au sein du diagramme pression-volume par l'aire comprise entre la droite de relaxation isovolumétrique, la droite d'élastance télésystolique et la courbe d'élastance diastolique ventriculaire (*Figure 2.5.*). Cette énergie potentielle représente un travail qui a été effectivement fourni par le ventricule en dépit de sa déperdition calorique de telle sorte que l'énergie totale dénommée PVA (Pressure Volume Area) développée par le ventricule lors d'un cycle est la somme de l'énergie potentielle et du travail externe :

$$PVA = EP + SW \quad (\text{Equation 2.6.})$$

Suga et al. ont montré que la consommation en oxygène du ventricule gauche (VO_2) est une fonction linéaire de PVA indépendante de la forme et de l'aire de la boucle pression-volume et donc indépendante des volumes télodiastolique et télésystolique (Suga et al., 1981). Autrement dit, PVA est un déterminant unique

de la VO_2 .

L'efficience mécanique du ventricule est définie par le rapport SW/VO_2 tandis que l'efficience myocardique de conversion est alors naturellement définie par le rapport PVA/VO_2 . Le rapport de ces deux efficiences SW/PVA représente la part de l'énergie développée par le ventricule qui est effectivement transmise au système artériel.

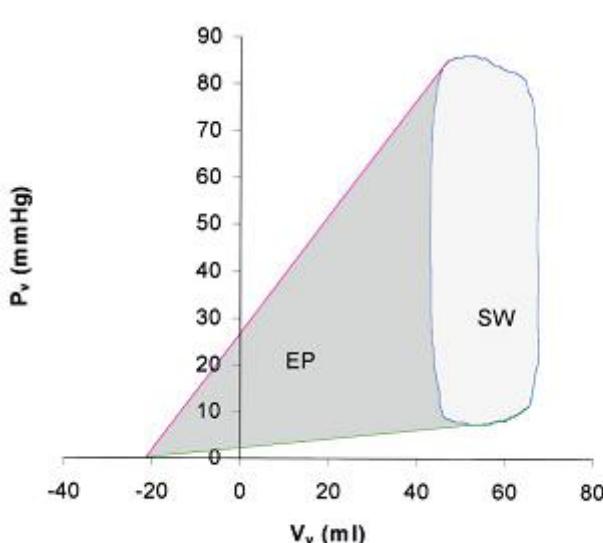


Figure 2.5.: Relation pression-volume ventriculaire. EP: énergie potentielle; SW: stroke work.

Il est probable que le système vise un point de couplage qui représente un état de transfert optimal d'énergie ventriculaire vers l'arbre circulatoire au meilleur coût. Les mécanismes de régulation qui contrôlent pareille oscillation de la valeur du couplage sont inconnus. Toutefois, à partir d'un modèle expérimental, nous avons récemment montré que de tels ajustements du couplage étaient indépendants de l'intervention de la boucle du réflexe barosensible (Kohl et al., 2003).

A l'aide d'un modèle analytique simple pour représenter l'interaction entre le ventricule et la circulation d'aval, Burkhoff et al. ont pu montrer que le travail systolique est maximal quand le rapport E_{es}/E_a est égal à 1 et que l'efficience mécanique est

maximale quand ce rapport est égal à 2 (Burkhoff & Sagawa, 1986). En-dessous de 1, la décompensation cardiaque se produit et le système est dit découplé.

II.4. Le couplage ventriculo-artériel : Intérêt et applications cliniques

L'intérêt clinique des notions et modèles théoriques qui ont été exposés est manifeste. Il vise à :

1. Caractériser quantitativement la postcharge, c'est à dire l'opposition à l'éjection ventriculaire créée par le système vasculaire d'aval. Les paramètres des modèles windkessel (particulièrement le WK4) donnent une information précise et indépendante de la fonction ventriculaire sur les caractéristiques mécaniques du réseau vasculaire.
2. Caractériser l'inotropisme cardiaque, c'est à dire la contractilité, de façon indépendante de la postcharge et de la précharge; l'élastance télésystolique E_{es} et V_0 répondent à cette préoccupation.
3. Evaluer l'interaction ventriculo-artérielle et l'énergétique cardiaque. Le couplage mesuré par E_{es}/E_a et l'efficience mécanique mesurée par SW/PVA permettent d'investiguer la thermodynamique du système.

Ces différents paramètres fournissent une appréciation quantitative précise sur le système cardiovasculaire. Les variations de ces paramètres permettent d'évaluer l'impact d'un traitement ou de suivre l'évolution objective d'une affection cardiovasculaire.

Ce sont donc ces paramètres que nous utiliserons dans les chapitres suivants pour évaluer d'une part les effets de la perfusion d'endotoxine sur le système circulatoire pulmonaire et d'autre part les effets de différentes interventions thérapeutiques sur l'évolution de ce modèle porcin de choc septique.

III. Chapitre 3: Méthodes générales.

III.1. Procédure chirurgicale

Tous les procédés expérimentaux et les protocoles utilisés dans ce travail ont été révisés et approuvés par le Comité d'Ethique de la Faculté de Médecine de l'Université de Liège. Toutes les investigations ont été réalisées en accord avec les « Principes pour les Soins et l'Utilisation des Animaux de Laboratoire » publiés par l'Institut National de la Santé Américain (NIH Publication No 85-23, révisée en 1996).

Les expériences ont été réalisées sur des porcs sains, de pure race piétrain, des deux sexes, et pesant entre 15 et 31 kg. Les animaux, à jeun depuis la veille, ont reçu une injection intramusculaire sédatrice composée de ketamine (20 mg/kg) et de diazepam (1 mg/kg). L'anesthésie, proprement dite a été réalisée à l'aide d'une perfusion continue de sufentanil (0.5 µg/kg/h) et de propofol (7.5 mg/kg/h) ou de pentobarbital (5 mg/kg/h). Afin de supprimer tout mouvement spontané, une curarisation a été induite par l'administration de pancuronium bromide (0.2mg/kg/h). Après mise en place d'un tube endotrachéal au travers d'un orifice de trachéostomie, les porcs ont été soumis à la respiration artificielle au moyen d'un respirateur à volume contrôlé (Evita 2, *Dräger*, Lübeck, Germany) insufflant un volume courant de 10 ml/kg à la fréquence de 20/min avec une FiO₂ de 0.4. Des mesures de CO₂ de fin d'expiration (ET CO₂) ont été réalisées en continu (Capnomac, *Datex*, Helsinki, Finland) afin de s'assurer de l'efficacité de la ventilation. Les réglages du respirateur ont été ajustés afin de maintenir ET CO₂ entre 30 et 35 mmHg.

III.1.1. Enregistrement des paramètres circulatoires pulmonaires

Une sternotomie médiane a donné accès à l'artère pulmonaire dont la pression sanguine a été mesurée à l'aide d'un cathéter à capteur interne (Sentron pressure-measuring catheter, *Cordis*, Miami, FL, USA) inséré dans le vaisseau au travers d'une bourse réalisée dans la paroi de la chambre de chasse du ventricule

droit. Le débit sanguin pulmonaire a été mesuré au même niveau que la pression en plaçant autour de l'artère pulmonaire, juste à l'endroit où se trouvait le capteur interne de pression, une bague à débit sanguin d'un diamètre de 14 mm (*Transonic Systems Inc.*, Ithaca, NY, USA) raccordée au débitmètre qui lui était adapté (HT 207, *Transonic Systems Inc.*, Ithaca, NY, USA). La pression auriculaire gauche a été enregistrée à l'aide d'un deuxième cathéter à capteur interne (Sentron pressure-measuring catheter, *Cordis*, Miami, FL, USA) inséré au travers d'une bourse pratiquée dans l'auricule gauche. Enfin un troisième cathéter à capteur interne (Sentron pressure-measuring catheter, *Cordis*, Miami, FL, USA) placé dans l'artère fémorale gauche a permis de mesurer la pression artérielle systémique. La fréquence cardiaque a été obtenue à partir d'un enregistrement électrocardiographique continu comportant 3 dérivations.

Les mesures hémodynamiques effectuées à chaque étape expérimentale comprenaient: le débit artériel pulmonaire, la fréquence cardiaque, les pressions artérielle pulmonaire (PAP), auriculaire gauche, et artérielle systémique.

III.1.2. Enregistrement des paramètres ventriculaires

Les boucles pression-volume du ventricule droit ont été obtenues à l'aide de cathéters à conductance (Dickstein et al, 1995). Bien que originellement destinée au ventricule gauche, la validité de cette technique pour le ventricule droit a aussi été démontrée (Dickstein et al, 1995). Brièvement, un cathéter muni de plusieurs électrodes placé dans le ventricule droit est utilisé pour générer un champ magnétique. Les paires d'électrodes adjacentes mesurent la conductivité locale du sang qui est proportionnelle au volume sanguin local (Dickstein et al, 1995). Les signaux de conductance instantanés $G(t)$ sont convertis en signaux de volume $V(t)$ selon l'équation suivante:

$$V(t) = (1/a)[L^2 \cdot \rho \cdot G(t) - V_c]$$

où a est un facteur de gain sans dimension, L la distance entre deux électrodes, ρ la résistivité du sang et V_c la correction du volume pour la conductance des tissus avoisinants, communément

appelée conductance parallèle. Cette dernière peut être estimée en modifiant de manière transitoire la conductance du sang à l'aide de l'injection de liquide salin hypertonique (Dickstein et al, 1995). Pour déterminer le facteur de gain a , une autre méthode de mesure du volume est nécessaire (Dickstein et al, 1995). Dans cette étude, nous avons utilisé le volume systolique mesuré par la sonde de débit ultrasonique au niveau de l'artère pulmonaire. Avant chaque mesure, la conductance parallèle a été déterminée grâce à l'injection de 3 ml de NaCl 10% dans la veine cave inférieure (Dickstein et al, 1995).

III.1.3. Acquisition des données

Les signaux analogiques de débit, de pression et de volume ont été convertis en signaux numériques et stockés dans un micro-ordinateur en temps réel. La gestion de ces données numériques et leur stockage ont été réalisés à l'aide d'un programme spécialement conçu à cet effet (Cudas, *DataQ instruments Inc.*, Akron, OH, USA). L'échantillonnage de chacune des variables s'est effectué à la fréquence de 200 Hertz, soit 200 points par seconde.

Afin de réduire les artefacts et ainsi d'augmenter la qualité des signaux, l'analyse a été réalisée à partir d'une onde de pression, de débit, et une courbe de volume reconstruites pour être représentatives de la moyenne des ondes de pression, de débit et de volume enregistrées au cours de dix cycles cardiaques consécutifs. Les cycles cardiaques ont été délimités par les ondes R détectées automatiquement sur l'électrocardiogramme.

III.1.4. Analyse des données circulatoires pulmonaires

Pour les raisons expliquées au chapitre 1, nous avons utilisé un modèle de windkessel à quatre éléments (WK4) pour décrire les propriétés hémodynamiques de la circulation pulmonaire (Lambermont et al, 1998b). Une représentation de ce modèle est schématisée à la *figure 3.1*.

Le resistor R_2 représente les propriétés résistives de la circulation pulmonaire qui résident principalement dans le système artériolaire. La capacitance C placée en parallèle avec R_2 représente les propriétés compliantes de l'arbre circulatoire pulmonaire. Le resistor R_1 est utilisé pour représenter la résistance caractéristique dont la valeur dépend essentiellement de l'inertance et de la compliance de l'artère pulmonaire principale. Enfin, une inductance L est placée à l'entrée du modèle pour permettre des angles de phase positifs entre le débit et la pression. Elle correspond aux propriétés inertielles de la circulation pulmonaire principalement due à l'inertie de la masse sanguine (Grant & Paradowski, 1987).

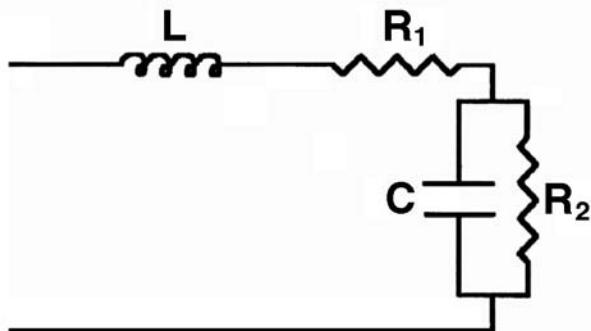


Figure 3.1.: Représentation du modèle de windkessel à quatre éléments. Par analogie avec l'électricité, la pression correspond à la différence de potentiel et le débit à l'intensité du courant. Le resistor R_1 est utilisé pour représenter la résistance caractéristique. R_2 représente les propriétés résistives de la circulation pulmonaire. La capacitance C représente les propriétés compliantes de l'arbre circulatoire pulmonaire et L correspond aux propriétés inertielles de la circulation pulmonaire essentiellement due à l'inertie de la masse sanguine.

III.1.5. Identification des paramètres du modèle de windkessel

Nous avons exprimé la relation existant entre le débit et la pression dans le WK4 au moyen de l'équation différentielle linéaire du second degré suivante (Shim et al., 1994) :

$$a_0 Q + a_1 \frac{dQ}{dt} + a_2 \frac{d^2Q}{dt^2} = b_0 P + b_1 \frac{dP}{dt} \text{ (Equation 3.1.)}$$

Afin d'éviter l'utilisation de dérivées du second degré qui accroît significativement le rapport signal bruit, l'équation 1.1 a été intégrée (Pochet et al., 1996) :

$$\int_{t_0}^t Q(\tau) d\tau = k_1 \int_{t_0}^t P(\tau) d\tau + k_2 [P(t) - P(t_0)] + k_3 [Q(t) - Q(t_0)] + k_4 \left[\frac{dQ}{dt}(t) - \frac{dQ}{dt}(t_0) \right] \text{ (Equation 3.2.)}$$

où

Q = débit sanguin pulmonaire

P = pression artérielle pulmonaire de perfusion

t_0 = début du cycle cardiaque dont le repère est l'onde R de l'électrocardiogramme.

La régression linéaire multiple estime les constantes k_i de manière à réduire la somme des carrés des résidus à sa valeur minimale c'est à dire la somme des carrés des différences mesurées entre les valeurs observées des deux membres de cette équation :

$$\begin{aligned}
 \text{RSS} = & \\
 \sum_t \{ & \int_{t_0}^t Q(\tau) d\tau - k_1 \int_{t_0}^t P(\tau) d\tau - k_2 [P(t) - P(t_0)] - \\
 & k_3 [Q(t) - Q(t_0)] - k_4 \left[\frac{dQ}{dt}(t) - \frac{dQ}{dt}(t_0) \right] \}^2
 \end{aligned}
 \quad (\text{Equation 3.3.})$$

La linéarité de la régression garantit l'unicité de l'estimation des paramètres k_i ($i = 1, 4$).

Les paramètres k_1 , k_2 , k_3 and k_4 sont des fonctions de L , R_1 , C et R_2 :

$$\begin{aligned}
 k_1 &= \frac{1}{R_1 + R_2} & k_2 &= \frac{C R_2}{R_1 + R_2} \\
 k_3 &= -\frac{L + C R_1 R_2}{R_1 + R_2} & k_4 &= -\frac{L C R_2}{R_1 + R_2} \quad (\text{Equation 3.4.})
 \end{aligned}$$

Les valeurs de L , R_1 , R_2 et C sont ensuite obtenues en résolvant les *Equations 3.4.* qui n'admettent qu'une seule solution. L'unicité de l'estimation de R_1 , R_2 , L et C est ainsi assurée.

La méthode a été programmée en Visual Basic (*Microsoft Corporation*, Santa Rosa, CA, USA). Après acquisition, les données de pression et de débit sont analysées par le programme (Lambertmont et al, 1998b).

L'élastance artérielle pulmonaire qui reflète la postcharge ventriculaire droite a été calculée selon la formule suivante (Fourie et al, 1992) :

$$Ea = (R_1 + R_2) / [Ts + R_2 C (1 - e^{-R_2 C / Td})] \quad (\text{Equation 3.5.})$$

où Ts et Td représentent la durée respective de la systole et de la diastole.

III.1.6. Analyse des données ventriculaires

Au cours d'une manœuvre rapide d'occlusion de la veine cave inférieure, la pente de la relation pression volume de fin de systole (Ees) a été déterminée (Dickstein et al, 1995). Un intercept de volume à une pression fixée à 25 mmHg (Vp25) a permis de quantifier la position de la relation pression volume de fin de systole (*Figure 3.2.*). Ees et Vp25 représentent une mesure indépendante de la charge de la performance contractile ventriculaire droite. Une augmentation de Ees, un déplacement vers la gauche de la relation pression volume de fin de systole signé par une diminution de Vp25, ou les deux, représentent une amélioration de la fonction systolique (De Vroomen et al., 2001; Dickstein et al, 1995).

La valeur du travail systolique (Stroke work, SW) a été obtenue en calculant l'aire de la boucle pression-volume. La relation linéaire entre la volume télodiastolique et SW au cours d'une variation de précharge représente le preload-recruitable stroke work (PRSW), une mesure de la contractilité ventriculaire droite indépendante de la précharge (Erb et al., 2002; Glower et al., 1985).

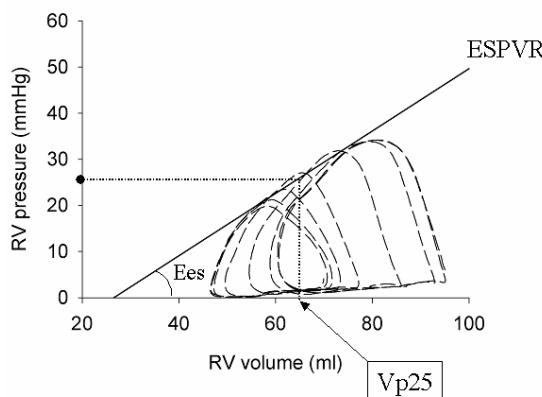


Figure 3.2.: Exemple de boucles pression-volume enregistrées au cours d'une occlusion de la veine cave inférieure.

ESPVR = end-systolic pressure-volume relationship.

Ees = end-systolic elastance (pente de la droite ESPVR).

Vp 25 = intercept avec l'axe des volumes pour une pression de 25 mmHg permettant de quantifier la position de ESPVR dans l'espace.

L'aire contenue entre la relation pression volume de fin de systole et de fin de diastole et la portion systolique de la boucle pression-volume (Pressure-volume area, PVA) (*Figure 2.5.*) est un marqueur fiable de la consommation en oxygène du myocarde (Fourie et al, 1992; Suga et al, 1981).

L'efficience mécanique ventriculaire droite a été calculée par le rapport de SW et de PVA (Burkhoff & Sagawa, 1986; Fourie et al, 1992).

La fraction d'éjection a été calculée par le rapport du volume systolique et du volume de fin de diastole du ventricule droit.

Le couplage ventriculo-artériel a été obtenu par le rapport E_{es}/E_a . En conditions normales, le ventricule droit opère à une efficience maximale et à un travail systolique sous-maximal ($E_{es}/E_a > 1$). Le travail systolique maximal est obtenu quand $E_{es}/E_a = 1$. Le système est découplé lorsque E_{es}/E_a est inférieur à 1 (Fourie et al, 1992).

III.2. Statistiques

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm erreurs types de la moyenne (SEM).

Les modifications observées au niveau des différents paramètres ont été soumises à une analyse de variance pour mesures répétées. Lorsque le test s'est avéré significatif, nous avons calculé les intervalles de confiance simultanés de Scheffé.

La comparaison des moyennes dans les cas de deux groupes a été réalisée à l'aide du classique test t de Student.

Tous les tests statistiques ont été considérés comme significatifs au niveau d'incertitude de 5 % ($P < 0.05$). Les calculs statistiques ont été effectués à l'aide du logiciel Statistica for Windows, Release 5.1 (*Statsoft Inc*, Tulsa, OK, USA).

IV. Chapitre 4: Comparaison entre les méthodes "single-beat" et "multiple-beat" pour estimer la contractilité ventriculaire droite.

Comparison between single-beat and multiple-beat methods for estimation of right ventricular contractility

Lambermont B, Segers P, Ghuysen A, Tchana-Sato V, Morimont P, Dogne JM, Kolh P, Gerard P, D'Orio V.

Critical Care Medicine 2004 Sep;32(9):1886-90

(Annexe 2)

IV.1. Introduction

Comme nous le précisions au chapitre 2, deux paramètres sont nécessaires pour étudier le couplage ventriculo-artériel pulmonaire: un paramètre d'évaluation globale de la postcharge ventriculaire droite, E_a , et un paramètre d'évaluation de la contractilité ventriculaire droite, E_{es} . Si l'obtention du premier, à savoir E_a , est relativement aisée lorsque l'on dispose de l'enregistrement de l'onde de pression et de débit artériel pulmonaire, par contre l'évaluation du second, à savoir E_{es} , demeure complexe. En effet, la mesure de E_{es} requiert une modification transitoire de la précharge ou de la postcharge ventriculaire afin de générer plusieurs boucles pression-volume. Au laboratoire, de telles conditions sont habituellement obtenues grâce à une occlusion notamment de la veine cave inférieure. En clinique, cependant, cette procédure peut-être dangereuse et critiquable sur le plan éthique.

Pour contourner cet impératif de réduction de précharge, plusieurs méthodes dites "single-beat" ont été proposées pour le ventricule gauche. Elles sont basées sur des données enregistrées au cours de conditions stables sur le plan hémodynamique, c'est à dire sans modification des conditions de charge du ventricule. Bien que différentes méthodes semblent intéressantes, Kjorstad et al. (Kjorstad et al, 2002) ont montré qu'aucune des méthodes "single-beat" proposées n'était capable de fournir une évaluation adéquate de la contractilité ventriculaire gauche.

Cependant, comme la physiologie et l'anatomie du ventricule gauche et du ventricule droit diffèrent considérablement, il restait à démontrer si les conclusions formulées par Kjorstad et al. (Kjorstad et al, 2002) pour le ventricule gauche étaient transposables au ventricule droit.

Le but de ce protocole était donc d'évaluer pour le ventricule droit, la méthode "single-beat" basée sur un travail original de Sunagawa et al. (Sunagawa et al., 1980) et revisitée plus tard par Takeuchi et al. (Takeuchi et al., 1991). Des boucles pression-volume enregistrées par un cathéter à conductance placé dans le ventricule droit ont été utilisées pour comparer les valeurs

d'élastance télésystolique obtenues par la méthode "single-beat" ($E_{es_{sb}}$) avec celles obtenues par la méthode standard "multiple-beat" ($E_{es_{mb}}$) au cours d'interventions pharmacologiques dont les effets sur la contractilité ventriculaire droite sont connus.

IV.2. Matériel et méthodes

Huit animaux ont été anesthésiés et préparés pour analyser la fonction ventriculaire droite comme décrit au chapitre des méthodes générales.

IV.2.1. Protocole expérimental.

Les données ont été enregistrées avant et au cours de l'administration d'agents pharmacologiques dont les effets sont opposés:

- a) perfusion d'esmolol à 1 mg/kg/min pendant 5 minutes pour diminuer la contractilité
- b) perfusion de dobutamine à 10 µg/kg/min pendant 15 minutes pour augmenter la contractilité.

Les perfusions d'esmolol et de dobutamine ont été administrées dans un ordre aléatoire chez chaque animal et séparées d'une période de récupération de 30 minutes.

Les données hémodynamiques comprenaient la mesure des pressions artérielle pulmonaire (PAP), auriculaire gauche, artérielle systémique, et ventriculaire droite, ainsi que de l'onde de débit artériel pulmonaire, la fréquence cardiaque, le volume ventriculaire droit et les boucles pression-volume droites. Ces paramètres ont été enregistrés au cours d'une courte phase d'apnée et stockés pour une analyse ultérieure.

A chaque étape, deux séries de données ont été enregistrées et analysées.

IV.2.2. Analyse des données.

IV.2.2.1. Estimation de la contractilité ventriculaire droite par la méthode "multiple-beat"

Les boucles pression-volume ventriculaires droites ont été obtenues par la méthode du cathéter à conductance (Dickstein et al, 1995). L'application, la validation et la calibration de cette technique pour mesurer le volume ventriculaire ont été décrites dans les méthodes générales. $E_{es_{mb}}$ et PRSW ont été déterminés au cours d'une occlusion de la veine cave inférieure comme décrit dans les méthodes générales.

IV.2.2.2. Estimation de la contractilité ventriculaire droite par la méthode "single-beat"

Dix cycles cardiaques consécutifs ont été sélectionnés à partir d'un enregistrement en conditions stables au cours de chaque condition expérimentale. Les données ont été ensuite analysées à l'aide d'un programme informatique réalisé par nos soins. Les courbes de pression et de volume pour chaque période d'enregistrement ont été moyennées pour fournir une courbe moyenne afin d'éliminer les artefacts et les variations entre chaque cycle. Le coin supérieur gauche de la boucle détermine le point de fin de systole (Pes, Ves), tandis que le coin inférieur droit de la boucle pression-volume détermine la fin de diastole (Ved). La méthode a consisté à ajuster une onde sinusoïdale sur l'onde de pression ventriculaire au cours de la contraction isovolumique et au cours de la période de relaxation selon l'équation suivante:

$$P_{\text{sine}}(t) = A + B \sin(Ct + D)$$

A, B, C et D sont des paramètres obtenus par la procédure d'ajustement qui a été basée sur une méthode de minimisation des carrés de la différence entre l'onde mesurée et l'onde ajustée au cours des périodes isovolumiques. Le début de la période de contraction isovolumique a été considéré comme le point où le dp/dt atteignait 10% de la valeur maximale positive du dP/dt , alors que la fin a été considérée comme le moment où le dP/dt

atteignait sa valeur positive maximale. De manière similaire, le début de la relaxation isovolumique a été considéré comme le moment où le dp/dt atteignait sa valeur négative maximale, alors que la fin a été considérée comme le moment où le dp/dt atteignait 10% de la valeur maximale négative. P_{\max} est la valeur maximale de P_{sine} , une estimation de la pression que générerait le ventricule lors d'une contraction ventriculaire isovolumique à V_{ed} (Figure 4.1.).

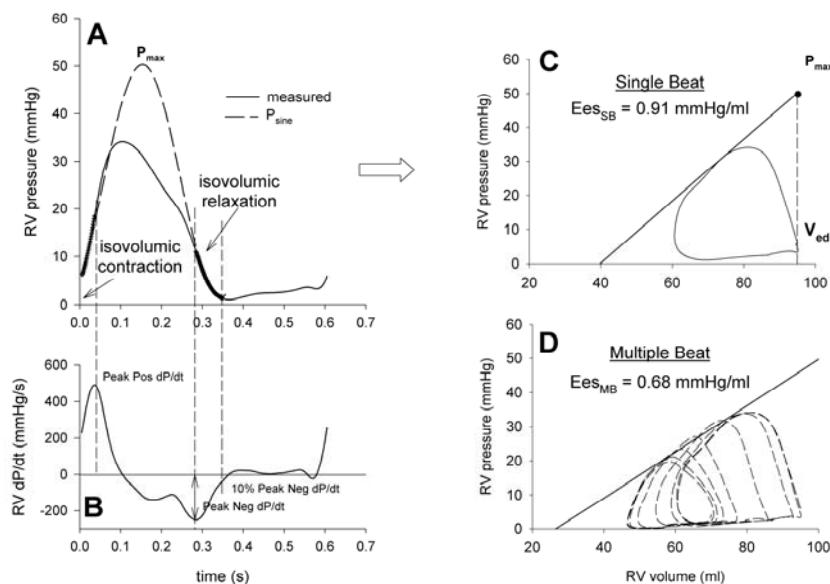


Figure 4.1.: Méthode "single-beat" pour obtenir la pente d'élastance télésystolique (explications voir dans le texte).

L'élastance "single-beat", $E_{\text{es,SB}}$, est donc la pente de la droite reliant deux points de la relation pression-volume: (V_{ed} , P_{\max}) et (V_{es} , P_{es}), et est donc donnée par:

$$E_{\text{es,SB}} = (P_{\max} - P_{\text{es}}) / (V_{\text{ed}} - V_{\text{es}})$$

IV.2.3. Analyse statistique

La comparaison entre les deux méthodes a été obtenue par l'application d'une analyse d'agrément (Bland & Altman, 1986).

$P < 0.05$ est considéré comme significatif sur le plan statistique.

IV.3. Résultats

Deux séries de données ont été collectées chez chaque animal au cours de chacune des 4 conditions expérimentales suivantes: avant et pendant l'infusion de dobutamine, avant et pendant l'infusion d'esmolol. De ces 64 séries de données, 5 ont finalement été exclues de l'analyse. A trois reprises la méthode "single-beat" a été inapplicable en raison des difficultés à obtenir un ajustement de la courbe sinusoïdale sur la courbe mesurée, alors que la mauvaise qualité d'enregistrement de deux boucles pression-volume a été responsable d'une application inappropriée à la fois des méthodes "single-beat" et "multiple-beat".

Il n'y a pas eu de différence significative entre les valeurs de $E_{es_{mb}}$ et $E_{es_{sb}}$ (1.7 ± 0.2 et 1.4 ± 0.1 mmHg/ml, respectivement) au début de la période expérimentale.

IV.3.1. Effets de l'administration de dobutamine

Au cours de l'administration de dobutamine, la fréquence cardiaque a augmenté de 117 ± 8 à 142 ± 7 battements par minute ($p < 0.05$), la PAP moyenne de 17 ± 2 à 20 ± 2 mmHg ($p < 0.05$), le débit cardiaque de 62 ± 3 à 82 ± 4 ml/s ($p < 0.05$) tandis que la pression artérielle systémique moyenne est restée inchangée.

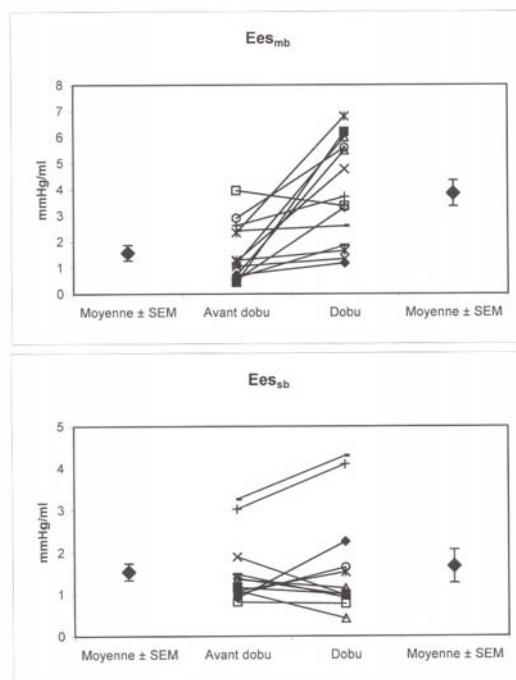


Figure 4.2.: Pente d'élastance télésystolique avant et pendant l'infusion de dobutamine obtenue par la méthode "single-beat" (Ees_{sb}) et par la méthode "multiple-beat" (Ees_{mb}).

L'administration de dobutamine a augmenté les valeurs de Ees_{mb} de 1.6 ± 0.3 à 3.8 ± 0.5 mmHg/ml ($p = 0.001$), tandis que il y a eu seulement une tendance à l'augmentation des valeurs de Ees_{sb} de 1.5 ± 0.2 à 1.7 ± 0.4 mmHg/ml ($p = 0.5$) (Figure 4.2.). L'administration de dobutamine a augmenté les valeurs de la pente de la relation PRSW de 27 ± 6 à 41 ± 6 mmHg ($p < 0.05$).

IV.3.2. Effets de l'administration d'esmolol

Au cours de l'administration d'esmolol, la fréquence cardiaque a diminué de 116 ± 7 à 98 ± 3 battements par minute ($p < 0.05$), la PAP moyenne a augmenté de 18 ± 2 à 20 ± 2 mmHg ($p < 0.05$), le débit cardiaque a diminué de 64 ± 2 à 50 ± 2 ml/s ($p < 0.05$) et la pression artérielle systémique moyenne de 84 ± 6 à 77 ± 5 mmHg ($p < 0.05$).

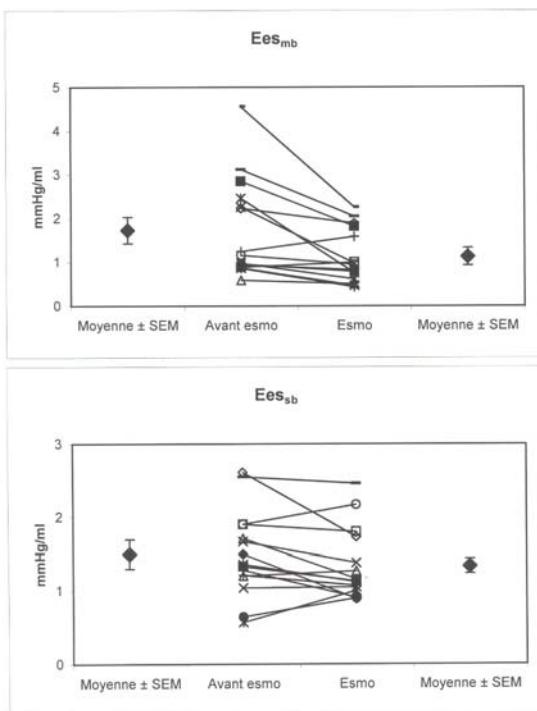


Figure 4.3.: Pente d'élastance télésystolique avant et pendant l'infusion d'esmolol obtenue par la méthode "single-beat" (Ees_{sb}) et par la méthode "multiple-beat" (Ees_{mb}).

Après l'administration d'esmolol, Ees_{mb} a diminué de 1.7 ± 0.3 à 1.1 ± 0.2 mmHg/ml ($p = 0.006$), alors que il y a seulement eu une tendance à la diminution des valeurs de Ees_{sb} de 1.5 ± 0.2 à 1.3 ± 0.1 mmHg/ml ($p = 0.09$) (Figure 4.3.). L'administration d'esmolol a diminué les valeurs de la pente de la relation PRSW de 25 ± 4 à 15 ± 2 mmHg ($p < 0.05$).

IV.3.3. Estimation de Ees par la méthode "multiple-beat" versus la méthode "single-beat"

La corrélation entre les valeurs de Ees_{mb} et de Ees_{sb} après intervention pharmacologique est présentée dans la *figure 4.4.*. Les valeurs de Ees_{sb} ont été aussi comparées avec celles de Ees_{mb} grâce à l'application d'une analyse d'agrément (Bland & Altman, 1986). Le biais a été de 0.54 mmHg/ml et les limites d'agrément de ± 3.4 mmHg/ml (*Figure 4.4.*).

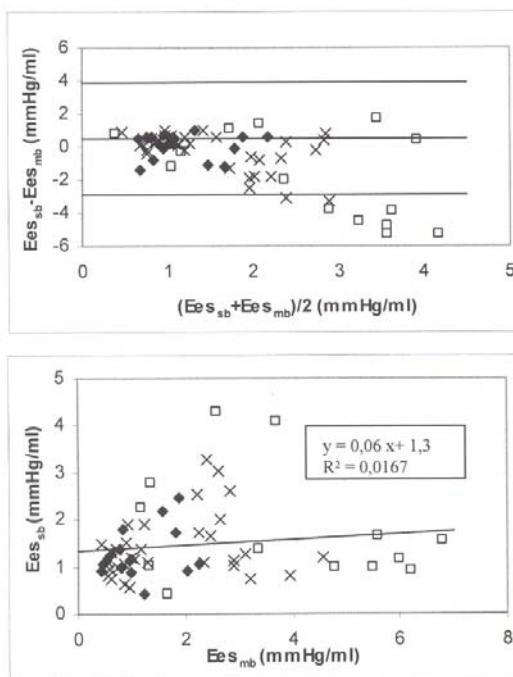


Figure 4.4.:Analyse d'agrément selon la méthode de Bland et Altman (Bland & Altman, 1986) et corrélation entre la méthode "single-beat" et la méthode "multiple-beat" avant (x) et pendant l'infusion de dobutamine (□) ou d'esmolol (♦).

IV.4. Discussion

Plusieurs méthodes "single-beat" ont été proposées pour évaluer la contractilité ventriculaire sans modifications des conditions de charge. Cependant, aucune d'entre elles n'a pu fournir de meilleur résultat que celle décrite originellement par Takeuchi et al. (Takeuchi et al, 1991), et sélectionnée ici comme la

méthode "single-beat" de référence pour évaluer la contractilité ventriculaire droite. Nous avons dès lors comparé cette méthode d'évaluation de la contractilité "single-beat" avec la méthode standard "multiple-beat" au cours d'une situation basale, et au cours de l'administration de dobutamine et d'esmolol. Ces indices de contractilité ont été dérivés de boucles pression-volume enregistrées par la technique du cathéter à conductance au cours soit d'un état stable (méthode "single-beat") soit d'une réduction transitoire de la précharge par occlusion de la veine cave inférieure (méthode "multiple-beat"). Nos résultats montrent que $E_{es_{sb}}$ est moins précis que $E_{es_{mb}}$ pour prédire les modifications de contractilité induites par les interventions pharmacologiques.

Les valeurs de base de contractilité mesurées dans ce travail sont similaires à celles rapportées dans la littérature (Brimioule et al, 2003; Dickstein et al, 1995). Bien que il n'y ait pas eu de différence entre la moyenne des valeurs basales obtenues par les deux méthodes, considérant le biais systématique de 0.54 mmHg/ml comme acceptable, les limites d'agrément (± 3.4 mmHg/ml) entre les deux méthodes ont été au contraire inacceptables. Pareille déviance reflète les erreurs aléatoires de la méthode "single-beat" et est directement lié à la valeur prédictive de la méthode.

Comme attendu, $E_{es_{mb}}$ a augmenté au cours de l'administration de dobutamine et diminué au cours de l'administration d'esmolol (Brimioule et al, 2003; Dickstein et al, 1995; Vogel et al, 2002). Parallèlement, la valeur de la pente de la relation PRSW a augmenté de manière significative au cours de la perfusion de dobutamine et diminué de manière significative au cours de l'administration d'esmolol. Par contre, ni l'administration de dobutamine, ni celle d'esmolol n'ont induit de modifications significatives des valeurs de $E_{es_{sb}}$. Ces résultats sont en accord avec ceux de Kjorstad et al. (Kjorstad et al, 2002) pour le ventricule gauche, où aucune des méthodes "single-beat" appliquées n'a été capable de mesurer une augmentation de contractilité induite par la dopamine. Cependant, la physiologie et l'anatomie du ventricule gauche et du ventricule droit diffèrent et, pour cette raison, la méthode "single-beat" a dû être étudiée spécifiquement pour le ventricule droit (Dell'Italia & Santamore, 1998).

Dans un travail récent, Brimiouille et al. (Brimiouille et al, 2003) ont montré que le P_{max} ventriculaire droit d'une contraction isovolumique peut être calculé par une analyse "single-beat" et ensuite être utilisé pour calculer Ees_{sb} . Les valeurs de Ees_{sb} obtenues par une telle méthode ont permis de rendre compte des modifications de contractilité ventriculaire droite induite par la dobutamine. Cependant, leur constat a été fragilisé par l'absence de comparaison entre cette méthode et un gold standard pris en référence. En outre, le paramètre volumique des boucles pression-volume a été obtenu par l'intégration du débit artériel pulmonaire instantané, et non par une mesure directe (Steendijk, 2004).

L'absence d'une chute significative de Ees_{sb} que nous avons observée au cours de l'administration d'esmolol pourrait, en plus de la faible sensibilité de la méthode "single-beat", être attribuée à une réduction plutôt modeste de la contractilité induite par l'esmolol. En utilisant la méthode "single-beat", Brimiouille et al. (Brimiouille et al, 2003) n'ont pas trouvé non plus de différence de contractilité après administration de propranolol, tandis que Dickstein et al. (Dickstein et al, 1995) ont montré une réduction très faible de Ees après administration d'esmolol.

La comparaison de nos résultats issus des méthodes "single-beat" et "multiple-beat" a montré un biais systématique et des limites d'agrément similaires à ceux rapportés dans la littérature pour le ventricule gauche (Kjorstad et al, 2002). Ce constat suggère un défaut de précision de la méthode "single-beat" et ce, particulièrement lorsque les valeurs de Ees s'éloignent des valeurs physiologiques notamment au cours de l'administration de dobutamine.

Dans la méthode "single-beat" utilisée dans ce travail, une onde sinusoïdale est ajustée à l'onde de pression ventriculaire pendant les périodes de contraction et de relaxation isovolumiques. Cela conduit à une série de problèmes inhérents à la méthode qui expliquent nos résultats. D'abord, comme le mentionne Kjorstad et al. (Kjorstad et al, 2002), une onde sinusoïdale est plutôt rigide et a une forme symétrique. La contraction isovolumique et la relaxation isovolumique ne sont pas nécessairement symétriques, particulièrement au cours des interventions pharmacologiques. L'augmentation de l'inotropisme conduit à des modifications spécifiques dans la forme de l'onde de pression ventriculaire par rapport à son aspect basal. En effet, l'augmentation de pression au

cours de la contraction isovolumique devient considérablement plus rapide que la chute de pression au cours de la relaxation isovolumique (Kjorstad et al, 2002). De tels effets impliquent que la pression maximale développée par le ventricule soit nécessairement déplacée vers la gauche. Le déplacement du point de pression maximale conduit l'onde de pression ventriculaire à adopter un profil asymétrique. Pareille asymétrie n'est pas prise en compte par une extrapolation sinusoïdale utilisée pour ajuster l'onde de pression ventriculaire. Il en résulte que la méthode single-beat sous estime les valeurs d'élastance télesystolique au cours de l'administration d'agents inotropes puisque ce déplacement vers la gauche de l'onde de pression ventriculaire est systématiquement négligé.

Ensuite le ventricule droit se caractérise par la courte durée des périodes isovolumiques et plus particulièrement de la période de relaxation isovolumique. Cela ajoute une nouvelle incertitude liée au choix du début et de la fin de la période de contraction et de relaxation isovolumiques.

Dès lors, nous attribuons les écarts de mesure de contractilité entre $E_{es_{sb}}$ et $E_{es_{mb}}$ à deux limitantes, au détriment du second indice: d'une part, le recours à une onde sinusoïdale pour modéliser la courbe de pression ventriculaire, d'autre part, les imprécisions dans la délimitation des périodes isovolumiques du cycle cardiaque.

IV.5. Conclusions

A notre connaissance, notre travail est le premier à comparer la méthode "single-beat" et la méthode standard "multiple-beat" pour évaluer la contractilité ventriculaire droite. La méthode "single-beat" est incertaine pour évaluer la contractilité ventriculaire, puisque elle ne détecte ni une augmentation ni une diminution de contractilité ventriculaire droite induite par des interventions pharmacologiques spécifiques. Pour cette raison, bien que fastidieuse la méthode "multiple-beat" constituera notre référence pour l'évaluation de la fonction ventriculaire droite dans notre travail.

V. Chapitre 5: Effets circulatoires pulmonaires de l'endotoxine

Analysis of endotoxin effects on the intact pulmonary circulation.

Lambermont B, Kolh P, Detry O, Gerard P, Marcelle R, D'Orio V.

Cardiovascular Research 1999 Jan;41(1):275-81.

(Annexe 3)

V.1. Introduction

L'hypertension artérielle pulmonaire consécutive à l'administration d'endotoxine est liée à une élévation de résistance vasculaire, interprétée comme une vasoconstriction. A quel secteur vasculaire s'applique ce phénomène? S'agit-il d'un accroissement isolé de la résistance artérielle ou l'accroissement de résistance implique-t-il le segment veineux? La vasoconstriction modifie-t-elle la compliance vasculaire pulmonaire?

Semblable interrogation, outre son intérêt théorique, a pour but d'offrir une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques en cause et par conséquent d'ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques. En effet, une approche thérapeutique adéquate de l'hypertension artérielle pulmonaire nécessite aujourd'hui de distinguer les agents intervenant sur le territoire artériel de ceux qui ont un autre site d'action. Dans son travail intitulé « Contribution à l'étude expérimentale de l'hémodynamique pulmonaire au cours de la phase précoce du choc septique », V.D'Orio a grandement contribué à élucider la complexité des mécanismes en cause dans le choc septique (D'Orio, 1993). Son analyse basée sur les relations pression-débit mesurées à l'entrée du circuit pulmonaire a notamment suggéré l'apparition d'un resistor de Starling sous l'effet de la perfusion d'endotoxine (D'Orio et al, 1993). Toutefois, cette analyse n'offre pas de distinction entre les parts respectives prises par la vasoconstriction et la compliance vasculaire pulmonaire dans les variations de résistance du circuit pulmonaire. En d'autres termes, le modèle pression-débit pulmonaire peut être interprété tant par les propriétés de résistance que par celles de distensibilité du réseau vasculaire pulmonaire.

Par l'application du WK4, nous avons voulu étendre les frontières de l'analyse du circuit pulmonaire au cours de l'administration d'endotoxine.

V.2. Matériel et méthodes

V.2.1. Préparation chirurgicale

Cette étude a été réalisée sur 12 porcs de pure race piétrain des deux sexes pesant entre 16 et 28 kg. Les animaux ont été préparés selon les modalités prévues dans les méthodes générales.

V.2.2. Protocole expérimental

Après une période de stabilisation de 30 minutes nous avons procédé à l'enregistrement des paramètres hémodynamiques de base suivants: pression artérielle pulmonaire (PAP), débit sanguin pulmonaire, pression auriculaire gauche, pression artérielle systémique, et fréquence cardiaque. Ensuite, les animaux ont été divisés en deux groupes égaux. Un groupe (groupe endotoxine) a été soumis à une perfusion de 0,5 mg/kg d'endotoxine (Lipopolysaccharide, E.Coli serotype 0127 :B8, *Sigma Chemical and Co*, St Louis, MO, USA) administrée en 30 minutes. L'autre groupe (groupe contrôle) servant de référence, a été soumis au même protocole de mesures et a reçu en perfusion un volume de liquide physiologique équivalent au volume nécessaire à l'administration de l'endotoxine dans le premier groupe.

Ensuite dans les deux groupes, les différents paramètres ont à nouveau été enregistrés de façon séquentielle toutes les 30 minutes soit à T30, T60, T90, T120, et T150. La collecte et l'analyse des données ont été effectuées selon les mêmes méthodes que celles décrites dans les méthodes générales.

Les résistances vasculaires pulmonaires totales (RVP), selon le modèle ohmique, ont été obtenues en divisant la différence entre les valeurs de PAP moyenne et de pression auriculaire gauche par la valeur du débit cardiaque moyen.

V.3. Résultats

L'évolution des variables hémodynamiques habituelles à partir des conditions basales dans le groupe endotoxine et le groupe contrôle est illustrée par la *figure 5.1*. On peut y voir que sous l'action de l'endotoxine la PAP s'est accrue de manière biphasique en réponse à l'administration d'endotoxine. Elle a atteint un premier maximum après la perfusion d'endotoxine, puis s'est abaissée lentement jusqu'à T90. A T120 elle a amorcé une nouvelle ascension qui a culminé à T150. Cette évolution de la PAP est à rapprocher de celle des RVP dont le profil de T0 à T150 a été semblable. Tandis que le débit sanguin s'est abaissé dès la fin de la perfusion, la pression artérielle systémique n'a diminué qu'à partir de T60 pour se stabiliser comme la chute de débit cardiaque entre T90 et T120. L'évolution de ces deux paramètres a été à nouveau liée pour s'abaisser parallèlement entre T120 et T150.

La fréquence cardiaque a augmenté progressivement de 103 ± 13 à 153 ± 13 battements par minute entre T30 et T150 ($p < 0.05$). Par contre la pression auriculaire gauche a été mesurée tout au long de l'expérience à une valeur de 6 mmHg.

Remarquons qu'aucune variation significative de ces paramètres n'a été observée chez les animaux contrôles pendant une durée d'observation égale à celle des animaux traités.

L'évolution sous l'action de l'endotoxine des variables mécaniques de la circulation pulmonaire qu'analyse le WK4 est reprise dans la *figure 5.2*. La résistance artérielle périphérique R_2 et la résistance proximale R_1 de la circulation pulmonaire ont évolué de façon propre quantitativement et qualitativement. R_2 a augmenté significativement dès la fin de la perfusion d'endotoxine et s'est stabilisé ensuite à ce niveau jusque T150. R_1 a aussi augmenté dès la fin de la perfusion de l'endotoxine mais plus faiblement que R_2 et est ensuite revenu à sa valeur basale, pour augmenter à nouveau plus faiblement entre T90 et T120. C a diminué immédiatement après l'infusion d'endotoxine, et est resté au même niveau entre T60 et T120, pour décroître encore de façon significative à la fin de l'expérience. L'inductance a été faible en valeur absolue et s'est modifiée de manière peu significative tout au long de l'expérience.

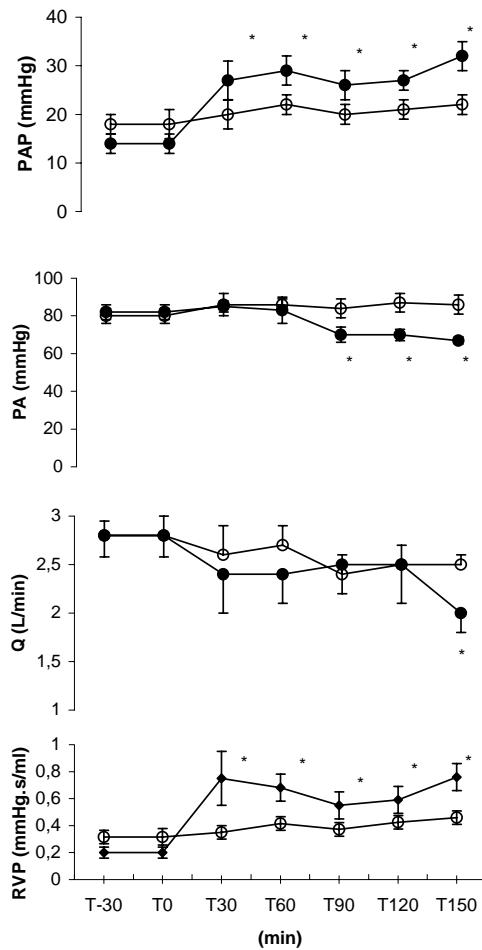


Figure 5.1. Evolution des variables hémodynamiques dans le groupe contrôle (cercle vide) et durant l'évolution du choc septique induit par la perfusion de 0.5 mg/kg d'endotoxine de T0 à T30 (cercle plein) (* P < 0.05 vs T0 et vs groupe contrôle). PAP : pression artérielle pulmonaire moyenne ; PA : pression artérielle systémique moyenne ; Q : débit cardiaque ; RVP : résistances vasculaires pulmonaires totales. (Voir explications dans le texte)

Aucune variation des paramètres hémodynamiques ou mécaniques circulatoires observés chez les animaux du groupe

contrôle pendant une durée identique à celle de l'étude ne s'est avérée significative.

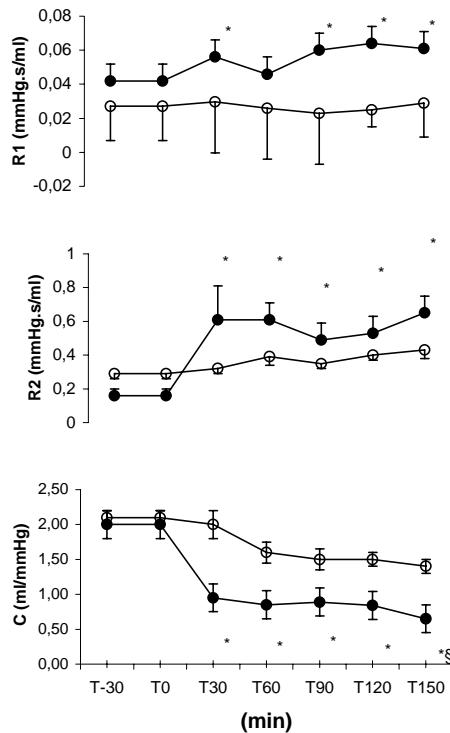


Figure 5.2. Evolution des paramètres vasculaires fournis par le WK4 dans le groupe contrôle (cercle vide) et au cours de l'évolution du choc septique induit par l'infusion de 0,5mg/kg d'endotoxine entre T0 et T30 (cercle plein). (Voir explications dans le texte)

$P < 0,05$ vs T0 et vs groupe contrôle

$\S P < 0,05$ vs T30 et vs groupe contrôle

V.4. Discussion

La perfusion continue de faible dose d'endotoxine chez l'animal est un modèle de choc septique fréquemment utilisé. En effet, ce dernier résulte très certainement d'une libération continue ou répétée dans le sang, de petites quantités d'endotoxine plutôt que d'un bolus massif que les premières études expérimentales ont utilisé comme modèle de ce choc (D'Orio et al., 1987). L'absence d'état hyperdynamique, c'est-à-dire de phase au cours de laquelle le débit sanguin s'accroît, s'explique dans notre étude par le stockage périphérique de sang que nous n'avons pas compensé par une charge volémique. Comme V. D'Orio et al. l'ont très bien démontré en clinique, un état hyperdynamique est le plus souvent observé au début du choc septique puisque les impératifs thérapeutiques imposent d'emblée le recours au remplissage vasculaire (D'Orio et al., 1989). L'accroissement biphasique de PAP ainsi que la chute en deux temps du débit sanguin sous l'action de l'endotoxine sont similaires dans notre étude et dans les observations rapportées par d'autres auteurs (Dahm et al., 1994; Fang et al., 1996; Olson et al., 1992; Weitzberg et al, 1993). Cette double évolution est clairement distincte de celle observée chez les animaux contrôles et met nos résultats à l'abri de toute interférence résultant d'une détérioration de nos préparations expérimentales.

Si l'on considère la seule loi de Poiseuille, toute diminution du débit sanguin accompagnée d'un accroissement de pression artérielle découle d'une augmentation des résistances à l'écoulement du sang. En effet, dans notre étude, l'endotoxine induit un accroissement progressif de RVP habituellement interprété par une vasoconstriction, soit artérielle, soit veineuse (D'Orio et al., 1986). Mais avec les notions les plus récentes, plusieurs autres mécanismes peuvent encore rendre compte d'une semblable chute de débit en présence d'une élévation de PAP. Outre l'accroissement de la résistance des vaisseaux distaux provoqué par une élévation de leur tonus, une altération de la compliance vasculaire du lit pulmonaire peut être invoquée aussi bien qu'une augmentation de la résistance caractéristique secondaire à une réduction de calibre des artères proximales ou

encore qu'un accroissement du frein qui s'oppose à l'accélération du flux systolique.

Ce sont ces mécanismes qu'interroge notre méthode d'analyse utilisant le modèle windkessel à 4 éléments.

Le premier intérêt de notre étude par rapport à celles qui ont été réalisées jusqu'ici est qu'elle renseigne sur l'évolution dans le temps du choc endotoxique car notre méthode d'analyse autorise à multiplier les mesures sans la moindre perturbation des conditions expérimentales. On s'aperçoit ainsi que durant les 150 minutes d'observation, la réponse à l'endotoxine s'effectue en deux phases séparées par une courte période de rémission. Le deuxième intérêt est de permettre l'analyse de l'évolution des paramètres mécaniques circulatoires parallèle à celle des paramètres hémodynamiques mesurés. Ainsi peut-on constater que les deux augmentations successives des résistances vasculaires pulmonaires totales justifient les deux poussées d'hypertension pulmonaire mettant en cause simultanément un accroissement des résistances proximale R_1 et distale R_2 mais aussi une chute de la compliance vasculaire pulmonaire. L'accroissement de la résistance périphérique est en valeur relative et en valeur absolue beaucoup plus déterminante que la résistance proximale. Outre les phénomènes vasomoteurs artériolaires, l'élévation de R_2 englobe le relèvement du resistor de Starling que V. D'Orio avait observé dans son étude (D'Orio et al, 1993). Le rôle de la perte de compliance vasculaire dans l'hypertension artérielle pulmonaire observée est tout aussi important puisque sa valeur à la fin de l'observation est réduite au quart de la valeur de départ. Il peut évidemment s'agir autant d'une perte apparente de compliance, liée à une distension vasculaire, que d'un effet direct de l'endotoxine sur les propriétés élastiques des parois vasculaires. Pour en débattre, des observations complémentaires qui sortent de l'objet de notre étude doivent être réalisées. Quelle qu'en soit la nature, on peut aisément admettre que semblable perte d'élasticité des gros vaisseaux pulmonaires constitue un obstacle à l'éjection systolique (Fourie et al, 1992). Entre les deux phases d'hypertension artérielle pulmonaire, la tendance à la rémission porte essentiellement sur R_1 et sur R_2 dont l'accroissement se réduit. Ainsi, lors de la seconde phase d'hypertension artérielle pulmonaire, l'effet sur les deux résistances se traduit par une récupération de leur élévation première tandis que l'effet sur l'élasticité des parois vasculaires se traduit par un approfondissement de la perte de compliance déjà

observé lors de la première phase. Cette évolution en deux phases est en accord avec l'hypothèse qui propose que le thromboxane A₂ serait l'agent actif au début du choc endotoxique tandis que plus tard, interviendraient des mécanismes inflammatoires associés à une déplétion locale de fourniture de monoxyde d'azote (Berger et al, 1993; Myers et al, 1992; Weitzberg et al, 1993). On sait que le thromboxane A₂ est un puissant vasoconstricteur à courte durée d'action tandis que les processus inflammatoires seraient responsables d'une altération plus soutenue et que le défaut de NO supprime le processus protecteur vasodilatateur local.

Remarquons encore que la chute du débit sanguin n'est pas liée aux perturbations circulatoires pulmonaires. Elle trouve son origine, comme V. D'Orio l'a très justement démontré, dans un accroissement de la compliance veineuse systémique qui a pour effet de séquestrer une partie non négligeable du volume sanguin (D'Orio et al, 1989).

De ces observations, notre travail suggère les pistes thérapeutiques dans le choc septique. Tant que l'hypertension artérielle pulmonaire résulte de l'accroissement de R₁ et de R₂, alors l'administration des vasodilatateurs représente le meilleur choix thérapeutique (Berger et al, 1993; D'Orio et al, 1987; Dahm et al, 1994; Offner et al., 1995; Weitzberg et al., 1991; Weitzberg et al, 1993).

Plus tard, l'effet sur la compliance étant dominant, il s'agira plutôt de réduire la réponse inflammatoire vasculaire. Certains travaux ont montré que même une légère diminution de la compliance vasculaire pulmonaire peut avoir des effets très délétères sur la fonction ventriculaire droite: face à une compliance vasculaire réduite, le ventricule droit change son statut opérationnel, passant d'une pompe à débit à une pompe à pression. Cette adaptation s'établit au détriment du volume éjecté (Fourie et al, 1992). C'est peut-être ce que nous observons à la phase tardive de l'endotoxinémie, lorsque le ventricule droit est forcé d'accroître le niveau de pression destinée à vaincre la postcharge, au détriment de l'éjection de son volume systolique initial (D'Orio et al, 1998).

V.5. Conclusions

Nous avons montré que la perfusion d'endotoxine conduit à une évolution biphasique de l'augmentation de la pression artérielle pulmonaire. Notre analyse révèle que les modifications précoces sont dues à une vasoconstriction et à une réduction de la compliance vasculaire pulmonaire mais l'hypertension artérielle pulmonaire ainsi créée est aussi partiellement tributaire de changements s'opérant au niveau de la résistance de la partie proximale du réseau artériel pulmonaire. La seconde phase d'hypertension artérielle pulmonaire résulte d'une nouvelle chute de compliance vasculaire pulmonaire sans accroissement des propriétés résistives par rapport à l'initiation des effets de l'endotoxine.

Cette étude démontre que la seule connaissance des résistances vasculaires pulmonaires selon la loi de Poiseuille est impropre à dégager les mécanismes responsables des modifications hémodynamiques complexes observées en réponse au choc endotoxique que notre méthode d'analyse peut, au contraire, individualiser avec précision.

Au cours du chapitre 2 nous avons montré que l'étude de la performance hémodynamique pulmonaire globale nécessitait l'étude simultanée du versant circulatoire et ventriculaire. Dès lors, avant d'étudier les effets de certaines modalités thérapeutiques, il est nécessaire de s'intéresser aux effets des désordres circulatoires pulmonaires induits par l'endotoxine sur le couplage ventriculo-artériel pulmonaire. Cela fait l'objet du chapitre suivant.

VI. Chapitre 6: Effets ventriculaires de l'endotoxine et évolution du couplage ventriculo-artériel pulmonaire au cours du choc endotoxinique

Effects of endotoxic shock on right ventricular systolic function and mechanical efficiency.

Lambertmont B, Ghysen A, Kohl P, Tchana-Sato V, Segers P, Gerard P, Morimont P, Magis D, Dogne JM, Masereel B, D'Orio V.

Cardiovascular Research 2003 Aug 1;59(2):412-8

(Annexe 4)

VI.1. Introduction

Parmi les nombreuses complications fatales rencontrées au cours du choc septique, figure l'insuffisance cardiaque droite (Kimchi et al, 1984). Pourtant les effets du choc septique sur la fonction ventriculaire droite restent peu connus (Wojtczak & Szalados, 2002). En effet, alors que les résistances vasculaires périphériques diminuent la postcharge ventriculaire gauche, l'augmentation des résistances vasculaires pulmonaires contribuent à augmenter la postcharge ventriculaire droite (Sibbald et al., 1978). Pour cette raison, la fonction ventriculaire droite nécessite d'être étudiée spécifiquement au cours du choc septique.

L'augmentation de postcharge ventriculaire droite n'est pas la seule cause de la dépression ventriculaire droite observée au cours du choc septique (Kimchi et al, 1984; Parker et al., 1990). Selon D'Orio et al., l'altération de la fonction ventriculaire droite résulterait notamment d'un couplage inapproprié entre l'inotropisme ventriculaire droit et l'impédance vasculaire pulmonaire (D'Orio et al, 1998). La plupart des études citées ont utilisé la fraction d'éjection (Dhainaut et al., 1988b; Dhainaut et al, 1988a; Kimchi et al, 1984; Redl et al., 1991) ou la relation pression-diamètre ventriculaire (Fourie et al, 1992; Karunanithi et al, 1992; Szabo et al., 1998) pour mettre en évidence une atteinte de performance cardiaque droite.

Pour les raisons décrites au chapitre 4, nous avons utilisé la technique du cathéter à conductance pour obtenir les indices de fonction ventriculaire robustes et sensibles précédemment décrits et validés: la pente de la relation pression-volume de fin de systole et son intercept avec l'axe des volumes (De Vroomen et al, 2001; Dickstein et al, 1995).

VI.2. Matériel et méthodes

Après une période de stabilisation de 30 minutes (T0), 12 porcs sains pesant entre 20 et 30 kilogrammes et équipés selon les

méthodes décrites au chapitre 1 ont été répartis au hasard en deux groupes.

Alors que dans le premier groupe (Control, $n = 6$) les animaux ont été perfusés avec du placebo, dans le second groupe (Endo = 6), ils ont reçu une perfusion de 0.5 mg/kg d'endotoxine (lipopolysaccharide d'*Escherichia coli* serotype 0:127:B8; Sigma Chemical, St Louis, MO, USA) en 30 minutes.

Les données hémodynamiques et les boucles pression-volume ont été enregistrées toutes les 30 minutes. D'abord au cours d'une courte apnée puis au cours d'une courte apnée accompagnée d'une réduction progressive et transitoire du retour veineux par gonflement dans la veine cave inférieure d'un ballon de Fogarty.

L'analyse des données circulatoires pulmonaires et ventriculaires et leur interprétation statistique ont été réalisées selon les méthodes décrites au chapitre des méthodes générales.

VI.3. Résultats

VI.3.1. Effets de la perfusion d'endotoxine sur les données hémodynamiques conventionnelles

L'évolution des paramètres hémodynamiques consécutive à l'administration de la perfusion de l'endotoxine est présentée dans la *figure 6.1*.

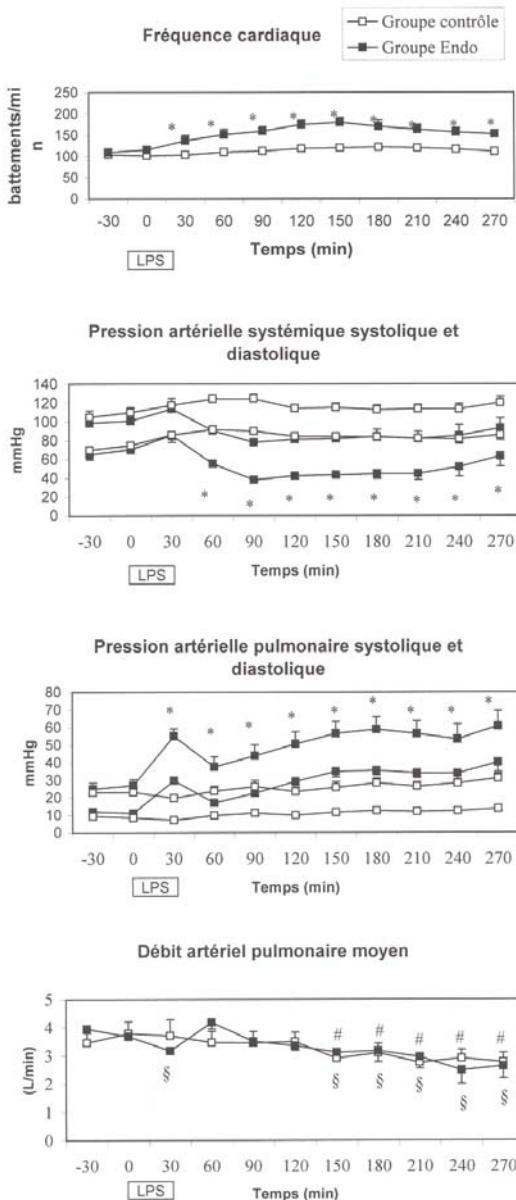


Figure 6.1.: Evolution des paramètres hémodynamiques conventionnels dans le groupe contrôle et dans le groupe Endo. LPS indique la perfusion d'endotoxine. Les données sont des moyennes \pm SEM.

* $p < 0.05$ groupe Endo vs T0 et groupe contrôle. # $p < 0.05$ groupe contrôle vs T0. § $p < 0.05$ groupe Endo vs T0.

La PAP moyenne dans le groupe Endo a atteint un premier maximum à T30 (c'est à dire 30 minutes après le début de la perfusion d'endotoxine), pour ensuite atteindre des valeurs moindres, et progressivement augmenter jusqu'à T270. Au contraire, la pression artérielle systémique moyenne a diminué de 95 ± 5 (T30) à 67 ± 4 mmHg (T60) ($p < 0.05$) et est restée inférieure à 60 mmHg de T90 à T210. À T240 et T270, la pression artérielle systémique moyenne est revenue à des valeurs supérieures à 60 mmHg, 63 ± 11 et 74 ± 11 mmHg, respectivement.

L'évolution du débit moyen de l'artère pulmonaire est restée similaire dans le groupe contrôle et Endo au cours de la période expérimentale. La fréquence cardiaque a augmenté de 115 ± 7 (T0) à 137 ± 12 battements par minute (T30) et est restée supérieure à 150 battements par minute au cours du reste de la période expérimentale.

VI.3.2. Effets de la perfusion d'endotoxine sur les volumes et la pression télediastolique ventriculaires

L'évolution du volume télediastolique ventriculaire droit est présentée dans la *figure 6.2*. Dans le groupe Endo, le volume télediastolique a augmenté de 56 ± 6 ml (T0) à 64 ± 11 ml ($p < 0.05$) à la fin de la perfusion d'endotoxine (T30) et est resté ensuite à des valeurs plus élevées durant le reste de la période expérimentale. Par contre, le volume éjecté a diminué de façon progressive de 31 ± 5 ml (T0) à 21 ± 4 ml (T270) ($p < 0.05$). En conséquence, la fraction d'éjection a diminué progressivement de 54 ± 2 % (T0) à 33 ± 5 % (T270) ($p < 0.05$).

La pression télediastolique ventriculaire droite a augmenté de 5 ± 1 mmHg (T0) à 8 ± 2 mmHg (T30) après la fin de la perfusion d'endotoxine ($p < 0.05$ vs T0 and vs groupe contrôle) et est restée proche de 8 mmHg de T90 à T270. Ces dernières valeurs étaient significativement plus élevées que celles obtenues dans le groupe contrôle ($p < 0.05$).

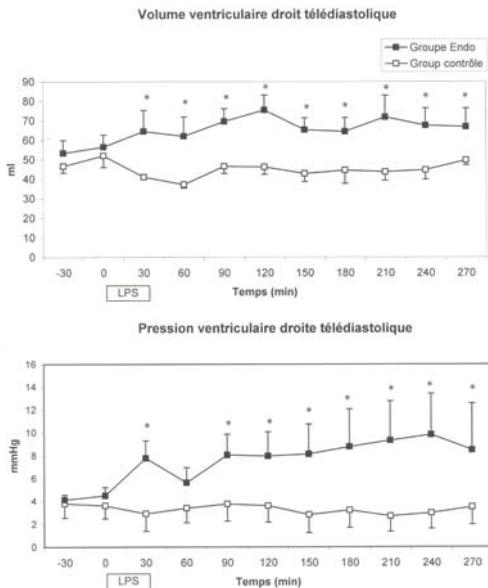


Figure 6.2.: Evolution du volume et de la pression télediastoliques du ventricule droit dans le groupe contrôle et le groupe Endo. LPS indique l'infusion d'endotoxine. Les données présentées sont des moyennes \pm SEM.

* $p < 0.05$ groupe Endo vs groupe contrôle et T0.

VI.3.3. Effets de la perfusion d'endotoxine sur les données hémodynamiques calculées

Ea dans le groupe Endo a eu un profil d'évolution similaire à celui de la PAP (Figure 6.3). Après un pic à T30, Ea a augmenté de nouveau à partir de T90 jusqu'à la fin de la période expérimentale. Les valeurs de Ees dans le groupe Endo ont augmenté de 1.4 ± 0.2 mmHg/ml (T0) à 2.9 ± 0.4 mmHg/ml (T30) ($p < 0.05$) et sont restées plus élevées que les valeurs de base de T60 à T150. A partir de T180, les valeurs de Ees dans le group Endo ont été similaires à celles du groupe contrôle (Figure 6.3.).

Ees/Ea est resté à un niveau optimal de 2 de T0 à T60. A T120, les valeurs de couplage ont atteint 0.9 ± 0.1 et se sont dégradées progressivement pour atteindre une valeur de 0.5 (T270) à la fin de la période expérimentale (Figure 6.3.). La valeur Vp_{25} a diminué d'une valeur de base de 20 ± 8 ml à 2 ± 2 ml à T30 ($p < 0.05$) et ensuite est restée inférieure aux valeurs basales ($p < 0.05$).

La valeur de PVA a augmenté progressivement de 1154 ± 127 mmHg/ml (T0) à 1475 ± 152 (T90) ($p < 0.05$). Elle a atteint une valeur de 1798 ± 122 mmHg/ml à T180 ($p < 0.05$) et est restée élevée jusqu'à la fin de la période expérimentale.

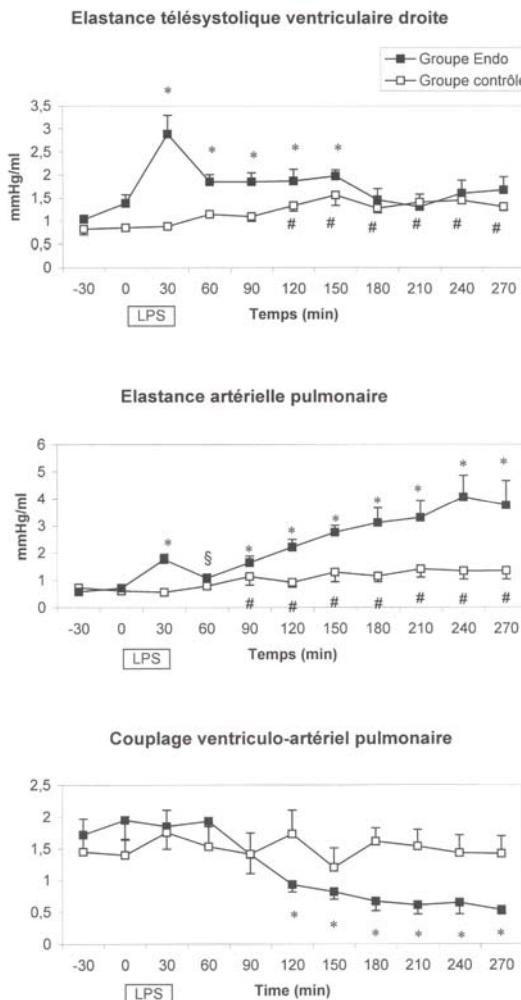


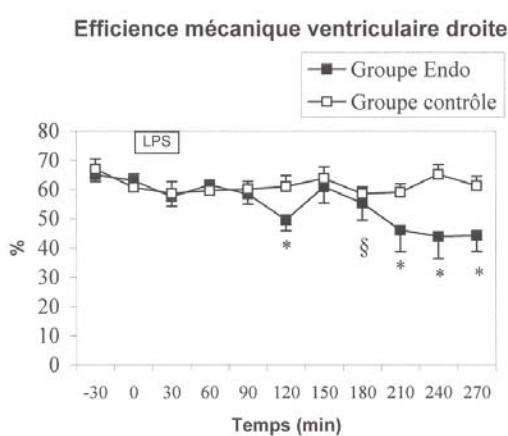
Figure 6.3.: Evolution des paramètres hémodynamiques calculés dans le groupe contrôle et dans le groupe Endo. LPS indique l'infusion d'endotoxine.

* $p < 0.05$ Groupe Endo vs groupe contrôle et vs T0.

$p < 0.05$ Groupe contrôle vs T0.

§ $p < 0.05$ Groupe Endo vs T0.

L'efficience ventriculaire droite a diminué de façon significative ($p < 0.05$) de $63 \pm 2\%$ (T0) à $45 \pm 5\%$ à la fin de la période expérimentale (T270) (Figure 6.4.).



VI.4. Discussion

Les effets de la perfusion d'endotoxine sur l'hémodynamique pulmonaire et le couplage ventriculo-vasculaire droit ont été étudiés précédemment dans notre laboratoire (D'Orio et al, 1986; D'Orio et al, 1993; D'Orio et al, 1998; Lambermont et al, 1999b). La présente étude, conduite grâce à une méthodologie plus fiable, confirme ces résultats. Nous démontrons en outre que la perfusion d'endotoxine induit une diminution de l'efficience mécanique du ventricule droit.

L'adaptation physiologique du ventricule droit à une augmentation de la postcharge peut être obtenue par deux mécanismes différents mais complémentaires: les régulations hétérométrique (le mécanisme de Frank-Starling) et homéométrique. Au cours de la régulation hétérométrique, le volume systolique est maintenu par les changements de précharge ventriculaire. Au contraire, au cours de la régulation homéométrique, la contractilité ventriculaire, c'est à dire E_{es} , augmente alors que le volume de fin de diastole reste inchangé. Des études préalables réalisées chez le mouton suggèrent que la

réponse ventriculaire droite à l'augmentation aiguë de la postcharge résulte à la fois d'une augmentation de la contractilité et d'une sollicitation du mécanisme de Frank-Starling (Hon et al., 2001). Toutefois chez le jeune agneau, la régulation du débit cardiaque face à une augmentation de la postcharge ventriculaire droite, est obtenue au travers de la seule régulation homéométrique (De Vroomen et al., 2000; De Vroomen et al, 2001; Lopes Cardozo et al., 2000). Chez des chiens soumis à la perfusion d'endotoxine, nous avions mis en évidence que la dégradation de la performance ventriculaire droite était due à une adaptation inappropriée entre l'inotropisme ventriculaire droit et la postcharge ventriculaire droite, avec altération secondaire du couplage ventriculo-vasculaire pulmonaire (D'Orio et al, 1998).

Notre étude suggère que l'adaptation ventriculaire droite au cours de la phase précoce de l'hypertension artérielle pulmonaire induite par l'endotoxine (T30) est le résultat d'une régulation homéométrique et hétérométrique. En effet, Ees mais aussi le volume ventriculaire droit de fin de diastole ont été augmentés, maintenant le couplage ventriculo-vasculaire à un niveau d'efficience maximal (Fourie et al, 1992). Toutefois, 90 minutes après la fin de la perfusion d'endotoxine (T120), alors que l'accroissement de postcharge (Ea) est inchangé, le niveau de contractilité droite s'est altéré et le couplage ventriculo-vasculaire a diminué depuis des valeurs proches de 2 à des valeurs inférieures à 1. Ces résultats suggèrent la survenue d'une atteinte de régulation homéométrique à T120.

Lors d'une augmentation de la postcharge ventriculaire gauche, la régulation homéométrique peut être expliquée par une augmentation de la perfusion coronaire secondaire à un accroissement de la pression aortique. Dans notre étude, en raison de l'hypotension artérielle systémique observée, la régulation homéométrique ventriculaire droite ne peut être induite par une augmentation de perfusion coronaire. Elle devrait plutôt être attribuée à des mécanismes tels que l'activation par étirement de certains canaux, le relargage de catécholamines endogènes, ou la libération de certains facteurs stimulant à partir de l'endothélium (De Vroomen et al, 2000).

Nous observons que la PVA, hautement corrélée à la consommation en oxygène du myocarde (Suga et al, 1981), a augmenté de manière significative à T120, par rapport à TO. Ce

constat suggère que le ventricule droit a consommé plus d'oxygène au cours du sepsis que lors des conditions basales.

Une telle augmentation de la consommation en oxygène du myocarde par le ventricule droit alors que le travail est similaire, signifie une chute de son efficience mécanique.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette réduction de l'efficience mécanique ventriculaire droite au cours du choc endotoxinique.

Bien que Cunnion et al. démontrèrent une augmentation du débit sanguin dans le sinus coronaire chez les patients en état septique (Cunnion et al., 1986), il existe, cependant, des arguments permettant de dire que la circulation coronaire est sujette à des troubles de perfusion régionale (Sibelius et al., 2000) et que le flux sanguin myocardique peut ne pas augmenter de manière suffisante en réponse à la demande accrue en oxygène (Bloos et al., 1996). Ainsi, puisque au cours du choc endotoxinique le coût énergétique du travail myocardique fourni est augmenté et que parallèlement le flux sanguin myocardique pourrait être insuffisant, il doit en résulter une atteinte des propriétés contractiles.

Un nombre important de médiateurs humoraux et intracellulaires ont été aussi impliqués dans la dysfonction cardiaque endotoxinique. L'ischémie myocardique n'est pas le seul mécanisme contribuant à la dépression myocardique observée (Court et al., 2002). L'endotoxine induit la synthèse et la libération de TNF-alpha et d'interleukine 1 par les monocytes et les macrophages (Michie et al., 1988). L'activation subséquente de la NO synthase inductible et de la NO synthase constitutive augmente la production de NO (Kumar et al., 1999) qui à son tour stimule la guanylate cyclase et la production de cGMP, nucléotide connu pour déprimer la fonction myocardique (Brady et al., 1992; Kumar et al., 1999). Le TNF-alpha peut aussi réduire la réponse de l'adénylate cyclase à la stimulation par les catécholamines et inhiber le flux calcique au travers des canaux calciques conduisant aussi à la dépression myocardique (Miyano et al., 1999). Des altérations au niveau des récepteurs bêta peuvent aussi contribuer à la dysfonction myocardique et diminuer la sensibilité myocardique aux catécholamines (Silverman et al., 1993). Enfin, l'augmentation de la production de superoxyde et de peroxynitrite et les lésions du stress oxydatif au niveau du myocarde des rats endotoxiques ont

été associées à une réduction de la contractilité et de l'efficience mécanique du myocarde (Khadour et al., 2002).

A notre connaissance, c'est le premier travail qui étudie le couplage ventriculo-vasculaire droit et le rendement myocardique au cours du choc septique à l'aide de la technique du cathéter à conductance. La diminution de l'efficience myocardique au cours du choc endotoxique n'a jamais été décrite préalablement chez l'animal à l'aide de cette dernière technique. Elle a cependant déjà été observée sur le cœur isolé de rats endotoxiques et sur des coeurs de chien isolés et soumis à une perfusion de TNF-alpha (Khadour et al, 2002; Miyano et al, 1999).

Une évaluation précise de la performance ventriculaire droite nécessite l'évaluation de la contractilité, de la précharge et de la postcharge. La détermination de la précharge et de la postcharge peut être facilement et directement réalisée par la mesure du volume ventriculaire de fin de diastole et de l'élastance artérielle. La quantification du niveau de contractilité nécessite l'enregistrement de boucles pression-volume ventriculaires au cours de différentes conditions de charge. Cependant, la principale limitation de notre étude est la technique du cathéter à conductance qui peut être impropre à la mesure exacte des volumes absolus. Il s'agit d'une technique de mesure indirecte et les signaux mesurés (la conductivité du sang dans le ventricule) nécessitent une calibration (résistivité spécifique du sang, conductance parallèle et facteur alpha). De plus, comparé au ventricule gauche le ventricule droit à une forme plus complexe et présente des trabéculations denses. Néanmoins, la mesure du volume fournie par cette méthode permet une estimation correcte de la contractilité ventriculaire droite et des modifications de volume ventriculaire, même à thorax fermé (Dickstein et al, 1995).

VI.5. Conclusions

Notre étude fait état d'une dysfonction myocardique ventriculaire droite chez le porc au cours du sepsis. Nos données montrent qu'à la phase précoce du choc endotoxique, le couplage ventriculo-vasculaire est maintenu grâce à une augmentation de contractilité ventriculaire droite. Plus tard, la consommation en

oxygène du myocarde et le coût énergétique de la contractilité ventriculaire droite sont accus comme en atteste la réduction de l'efficience ventriculaire droite et un découplage ventriculo-vasculaire apparaît à droite.

Ainsi, les traitements visant à rétablir le couplage ventriculo-vasculaire droit au cours du choc septique devraient viser à restaurer la contractilité et diminuer la postcharge ventriculaires droites de manière à préserver l'efficience mécanique du ventricule droit.

Pour ce faire, plusieurs approches thérapeutiques sont possibles. L'élimination de médiateurs délétères ou leur inhibition, ou encore l'administration de vasodilatateurs puissants pourraient contribuer à corriger les désordres circulatoires pulmonaires et de là, à améliorer le couplage. Au cours des deux chapitres suivants, nous étudierons les effets de deux techniques d'épuration extrarénale qui pourraient permettre l'extraction de certains médiateurs considérés néfastes. Au chapitre 7, l'hémodiafiltration qui utilise à la fois la convection et la diffusion comme mécanisme d'épuration, sera étudiée. Tandis que au chapitre 8, l'hémofiltration avec une membrane à haute perméabilité sera étudiée.

VII. Chapitre 7: Effets de l'hémodiafiltration sur la circulation pulmonaire au cours du choc endotoxinique

Effect of hemodiafiltration on pulmonary hemodynamics in endotoxic shock.

Lambermont B, Kolh P, Ghuysen A, Moonen M, Morimont P, Gerard P, Tchana-Sato V, Rorive G, D'Orio V.

Artifical Organs 2003 Dec;27(12):1128-33

(Annexe 5)

VII.1. Introduction

Nous avons montré au cours des chapitres précédents que l'hypertension artérielle pulmonaire aiguë du choc endotoxique peut conduire à un découplage ventriculo-artériel pulmonaire incluant une insuffisance cardiaque droite. De nombreuses interventions ont été testées pour s'opposer aux effets hémodynamiques délétères rencontrés au cours du choc septique (Eichacker et al., 2002; Natanson et al., 1998).

Dans ce contexte, l'épuration extra-rénale continue est apparue comme une nouvelle approche prometteuse. Elle a d'abord été utilisée chez des patients en défaillance multisystémique et en insuffisance rénale puisque la dialyse intermittente est indésirable chez des patients aussi instables. Comme une amélioration hémodynamique a pu être observée chez des patients souffrant à la fois de choc septique et d'insuffisance rénale qui bénéficiaient d'une hémofiltration, il a été suggéré que cette d'épuration extra-rénale pourrait aussi améliorer ceux souffrant d'un choc septique sans insuffisance rénale (Grootendorst, 1994).

Un telle justification de ces techniques d'épuration repose sur le fait qu'une partie des effets systémiques du sepsis peut être médiée par des molécules endogènes, hydrosolubles de petite (< 500 daltons) et de moyenne tailles (>500 mais < 60.000 daltons) dont le retrait du torrent circulatoire peut être bénéfique. En effet, il a été suggéré à partir de développements expérimentaux et cliniques que l'hémofiltration est susceptible d'extraire de la circulation certains médiateurs générateurs du sepsis (De Vriese et al., 1999). Au cours du choc septique clinique, les effets bénéfiques de l'hémofiltration sont modestes lorsque les taux d'ultrafiltration utilisés sont bas (10 to 15 ml/kg/h). Il a été dès lors suggéré que l'utilisation de taux d'ultrafiltration plus élevés allant jusque 200 ml/kg/h étaient la condition sine qua non à l'amélioration de l'hémodynamique des modèles expérimentaux (Grootendorst et al., 1992; Rogiers et al., 1999). Malheureusement, l'application de tels taux d'ultrafiltration est pratiquement impossible à obtenir chez l'homme.

Il était intéressant de tester si une hémofiltration moins agressive combinée à une dialyse aurait un effet bénéfique au cours de l'endotoxémie. Cette technique appelée hémodiafiltration (HDF) est déjà fréquemment utilisée comme technique dépurative extra-rénale intermittente et pourrait améliorer la qualité du traitement des patients souffrant d'insuffisance rénale terminale. En effet, la combinaison des mécanismes de diffusion et de convection devrait augmenter la clairance des petites molécules tout en améliorant le contrôle de l'azotémie chez les patients septiques en insuffisance rénale (Canaud et al., 1998).

Le but de la présente étude était de tester si l'HDF pouvait apporter une amélioration de l'hémodynamique pulmonaire similaire à celle obtenue sur le versant systémique par une hémofiltration à haut débit au cours du choc septique.

En particulier, les effets sur la concentration sanguine du TNF ont été étudiés puisque cette cytokine est l'un des médiateurs clé du sepsis, directement lié à la sévérité du choc septique (Cannon et al., 1990).

VII.2. Matériel et méthodes

Un total de 16 animaux ont été utilisés dans ce protocole expérimental. Ils ont été préparés selon les modalités détaillées dans le chapitre 2 pour l'étude de la circulation pulmonaire.

VII.2.1. Protocole expérimental

Après une période de stabilisation de 60 minutes, les données hémodynamiques de base ont été enregistrées (T0). Celles-ci comprenaient l'onde de pression artérielle pulmonaire (PAP), l'onde de débit artériel pulmonaire, la pression d'oreillette gauche, la pression artérielle systémique, et la fréquence cardiaque. Les animaux ont été ensuite divisés en trois groupes.

Le premier groupe ($n = 6$) a reçu à T0 une solution de 0.5 mg/kg d'endotoxine (lipopolysaccharide d'*Escherichia Coli* serotype O 127 B8; Sigma Chemical, St Louis, MO) en 30 minutes (groupe Endo).

Le second groupe ($n = 6$) a reçu une infusion d'endotoxine selon le même protocole que le groupe Endo (de T0 à T30) et a de plus été traité par HDF à partir de T60 durant 150 minutes (groupe HDF). Une hémodiafiltration on-line sans perte volémique a été effectuée à l'aide d'une machine de type AK100 Ultra (Gambro, Lund, Sweden). Le débit sanguin était de 4 ml/kg/min, avec un débit d'échange de 40 ml/kg/h. Un liquide de dialyse tamponné au bicarbonate a été utilisé (Na^+ : 140 mmol/l, K^+ : 3 mmol/l, Ca^{++} : 1.75 mmol/l, Mg^{++} : 0.5 mmol/l, glucose: 1 g/l and bicarbonate: 32 mmol/l) à un débit de 500 ml/min et à une température de 36.5°C. Le liquide de substitution était produit on-line par la machine de dialyse et était infusé afin d'obtenir une balance liquidienne nulle. Le rinçage du circuit a d'abord été réalisé à l'aide de 5000 UI héparine diluée dans un litre de liquide physiologique (NaCL 0.9%) suivi par un litre de liquide physiologique sans héparine. Un bolus initial de 2000 UI héparine suivi par une perfusion de 1000 UI/h a été utilisé pour l'anticoagulation systémique. La membrane de dialyse était une F40 polysulfone avec une surface effective de 0.7 m^2 (High-flux polysulfone, Fresenius, St. Wendel, Germany).

Le troisième groupe ($n = 4$) a servi de contrôle et a reçu une HDF selon les mêmes modalités à partir de T60 pendant 150 minutes (groupe contrôle).

Dans les trois groupes, les données hémodynamiques ont été acquises toutes les 30 minutes pendant la durée de l'étude et analysées selon les modalités décrites dans les méthodes générales.

Les concentrations de TNF plasmatique ont été mesurées par méthode ELISA (BioSource International, Inc., Camarillo, CA, USA) toutes les 60 minutes.

VII.3. Résultats

VII.3.1. Effets de l'hémodiafiltration seule (groupe Contrôle)

L'évolution des variables hémodynamiques conventionnelles au cours de l'HDF seule est présentée à la *figure 7.1..* L'HDF n'a

pas altéré pas de manière significative les paramètres hémodynamiques conventionnels. Le TNF est resté indosable au cours de toute la période expérimentale.

Les variables hémodynamiques pulmonaires, obtenues par le modèle de windkessel à 4 éléments de la circulation pulmonaire, sont reprises dans la *figure 7.2.* R₁ et R₂ sont restés inchangés de T0 à T210. C a diminué légèrement de 3.25 ± 1.68 ml/mmHg (T0) à 2.6 ± 0.5 mmHg (T210)(NS) au cours de cette période d'observation.

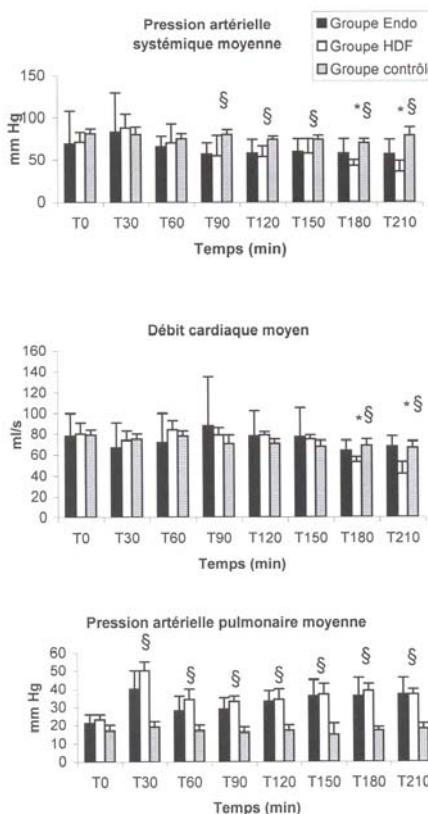


Figure 7.1.: Evolution des paramètres hémodynamiques conventionnels dans les groupes Endo, HDF et contrôle.

* p < 0.05 groupe Endo vs groupe HDF

§ p < 0.05 vs T0 dans les groupes Endo et HDF

VII.3.2. Effets de la perfusion d'endotoxine

L'évolution des effets de l'endotoxine sur les variables hémodynamiques conventionnelles est présentée à la *figure 7.1.* La PAP a montré une réponse biphasique après l'injection d'endotoxine atteignant un maximum à la fin de l'infusion d'endotoxine. Un hypotension artérielle systémique est apparue à partir de T90. Le débit cardiaque a diminué significativement à T30 et, après une amélioration transitoire, a diminué continuellement à partir de T150 jusqu'à la fin de la période expérimentale.

Les paramètres hémodynamiques pulmonaires, obtenus à partir du modèle de windkessel à 4 éléments de la circulation pulmonaire, sont décrits à la *figure 7.2.* R_1 a rapidement augmenté après le début de l'infusion d'endotoxine et est retourné aux valeurs de base à T90 et a ensuite subi une deuxième augmentation. L'évolution de R_2 a suivi un profil d'évolution semblable à celui de la PAP. La compliance vasculaire a diminué rapidement après le début de l'infusion d'endotoxine. Elle est restée à un niveau intermédiaire entre T60 and T120 et a ensuite encore diminué significativement jusqu'à T210.

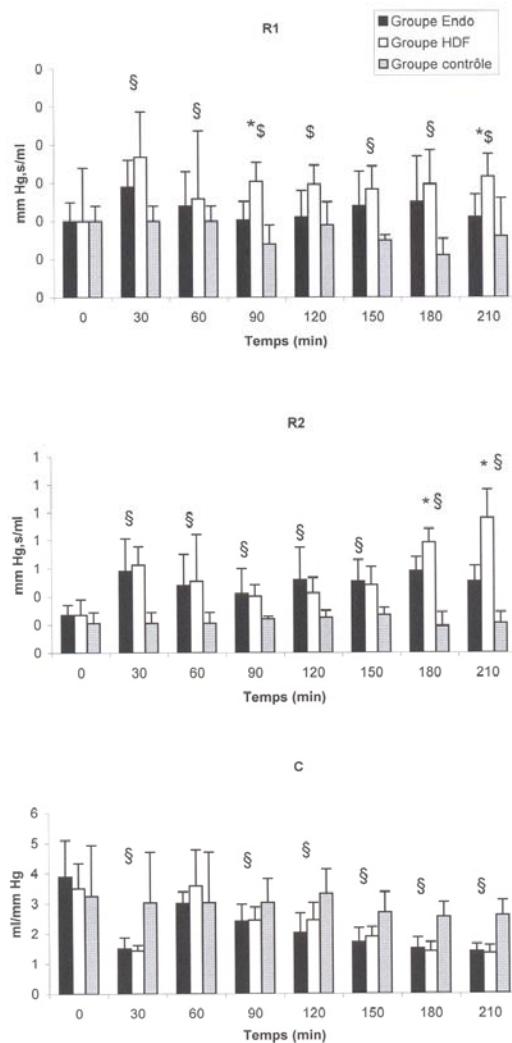


Figure 7.2.: Evolution de la valeur des paramètres R₁, R₂ et C obtenus à l'aide du modèle de windkessel à quatre éléments dans les groupes Endo, HDF et contrôle.

* p < 0.05 Groupe Endo vs groupe HDF

§ p < 0.05 vs T0 dans les groupes Endo et HDF

\$ p < 0.05 vs T0 dans le groupe HDF

La concentration plasmatique de TNF a atteint un pic une heure après le début de l'infusion d'endotoxine et a diminué ensuite progressivement au cours des deux heures suivantes (*Figure 7.3.*).

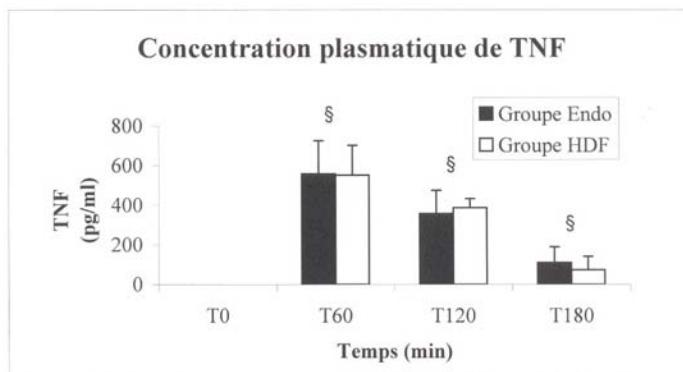


Figure 7.3: Evolution du taux plasmatique de TNF dans le groupe Endo et HDF.

§ $p < 0.05$ vs T0 dans les groupes Endo et HDF.

VII.3.3. Effets de l'hémodiafiltration après la perfusion d'endotoxine

La *figure 7.1.* décrit l'évolution des paramètres hémodynamiques conventionnels qui a été similaire dans les groupes HDF et Endo jusque T150. Au delà, la pression artérielle systémique a été significativement plus basse dans le groupe HDF que dans le groupe Endo.

La PAP a été semblable dans les groupes Endo et HDF tout au long de la période expérimentale. Cependant, dans le groupe HDF le débit cardiaque a diminué progressivement au cours de l'expérience et est devenu inférieur au groupe Endo à T180 et T210.

La *figure 7.2.* montre que l'évolution de la compliance vasculaire pulmonaire a été identique dans les deux groupes au cours de toute la période expérimentale. Par contre, R_2 a augmenté de manière brutale dans le groupe HDF et a atteint des valeurs significativement plus élevées que celle de R_2 dans le groupe Endo à T180 et T210. R_1 a été significativement plus élevé dans le groupe HDF après le début de l'HDF (T90) et à T210.

La concentration plasmatique de TNF a suivi exactement le même profil dans le groupe HDF et le groupe Endo. Elle a atteint un maximum une heure après le début de l'infusion d'endotoxine et a diminué progressivement au cours des deux heures suivantes (*Figure 7.3.*). Il n'y a pas eu de différence entre les deux groupes.

Dans le groupe HDF, deux animaux sont décédés avant la fin de la période expérimentale (T90 and T120).

VII.4. Discussion

A notre connaissance, peu d'études ont évalué les effets de l'HDF au cours du choc septique expérimental. La comparaison de nos résultats avec d'autres études est donc rendue malaisée.

Parmi les études préalables ayant évalué les effets de l'hémofiltration au cours du choc septique, seules celles qui ont utilisé des volumes d'échange élevés ont suggéré une amélioration hémodynamique (Grootendorst et al, 1992; Heering et al., 1997; Rogiers et al, 1999).

Dans notre modèle, l'administration d'endotoxine a conduit à une réponse vasculaire pulmonaire complexe incluant une interaction dynamique entre R_1 , R_2 et C (Lambertmont et al, 1999b). Pareil effet séquentiel sur les propriétés résistives et compliantes de la circulation pulmonaire semble avoir été affectée par l'HDF. Dans le groupe HDF, R_1 a augmenté dès le début de l'HDF et R_2 de manière brutale 90 minutes plus tard, tandis que la compliance vasculaire n'a pas été pas affectée par l'HDF.

Un tel accroissement de R_1 peut être interprété comme une réduction de la compliance de l'artère pulmonaire principale et/ou comme une diminution du rayon de la lumière des vaisseaux, suggérant qu'un enraideissement sélectif s'est produit sous l'effet

d'une augmentation du tonus musculaire lisse de l'artère pulmonaire.

L'accroissement brutal de la résistance vasculaire pulmonaire à T180 a augmenté la post-charge ventriculaire droite et, par conséquent, est responsable d'une chute de débit cardiaque et de pression artérielle systémique. L'augmentation des résistances vasculaires pulmonaires dans le groupe HDF puise son origine au sein de diverses hypothèses pathogéniques.

Remarquons que chez les animaux anesthésiés par des produits administrés par voie intra-veineuse, l'hypothèse d'une élimination de ces substances par la HDF ne peut être retenue comme mécanisme de cette altération hémodynamique puisque le groupe où l'HDF est utilisée seule ne présente pas de telles variations hémodynamiques.

D'abord, la dialyse peut conduire à une séquestration temporaire de leucocytes activés dans la circulation pulmonaire (Kaupke et al., 1996). Cependant, ce mécanisme n'affecterait pas R_1 et devrait conduire à l'augmentation isolée de R_2 témoin de la résistance vasculaire pulmonaire distale. De plus, ce processus a été plus fréquemment incriminé chez les patients en insuffisance rénale terminale lorsque des membranes de type cuprophane ont été utilisées (Chollet-Martin et al., 1991).

Ensuite, une embolie pulmonaire pourrait aussi avoir été responsable d'un tel état. Dans ces conditions, R_1 et R_2 auraient été augmentés non seulement en raison d'une obstruction vasculaire mais aussi par la libération de médiateurs tels les catécholamines, le thromboxane A₂ ou la sérotonine (Ghysen et al., 2004; Maggiorini et al., 1998). De plus, nos animaux ont été correctement anticoagulés au cours de l'expérience ce qui rend l'intervention de ce mécanisme peu probable.

Enfin, l'HDF pourrait soit avoir retiré un facteur inhibiteur de la production des cytokines pro-inflammatoires comme récemment suggéré par Lonnemann et al. (Lonnemann et al., 1999), soit conduire à l'élimination d'une molécule de faible poids aux effets bénéfiques sur le plan hémodynamique et qui ne serait pas éliminée par l'hémofiltration seule.

Vu que l'application de l'HDF aux animaux anesthésiés qui n'ont pas reçu pas d'endotoxine n'a pas modifié leur profil hémodynamique, il est suggéré que la membrane n'est pas toxique

et que la contamination du dialysat par des agents pyrogènes ou des substances inductrices du TNF semble peu probable.

Divers travaux de la littérature semblent montrer que la production de cytokine peut être déclenchée par les surfaces artificielles bioincompatibles (Kamijo et al., 2000). La première étape dans ce processus est l'adhésion des monocytes à la membrane synthétique qui conduit à une production accrue d'interleukines 1 et 2. Toutefois, les membranes synthétiques en polysulfone et polyacrylonitrile ne représentent à elles seules qu'un stimulus léger et induisent la production de modestes quantités d'interleukine 1. Plus significative est la stimulation simultanée de ces monocytes adhérents par les composants circulatoires de la paroi bactérienne (spécialement les fragments d'endotoxine). Ainsi les membranes artificielles pourraient agir comme inducteur et ensuite l'endotoxinémie pourrait agir comme promoteur de la production de cytokines (Krafft et al., 1994).

Ainsi, l'HDF pourrait être un inducteur complémentaire à l'activité délétère de l'endotoxine par un mécanisme indépendant de la production de TNF, puisque les concentrations de TNF ont été équivalentes dans les groupes Endo et HDF.

Ces résultats soulignent la différence entre l'hémofiltration et HDF. En effet, si certains résultats de la littérature suggèrent que l'hémofiltration à haut débit peut être bénéfique au cours du choc septique, de telles conclusions ne peuvent être transposées à l'HDF. Ce constat est conforme aux résultats de Kellum et al. qui ont comparé diffusion et convection chez des patients présentant un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS) et une insuffisance rénale. Ces auteurs ont montré que la convection diminue le taux circulant de TNF alors que la diffusion l'augmente (Kellum et al., 1998).

VII.5. Conclusions.

Nos résultats ont montré que l'HDF au cours du choc septique augmente la réponse vasculaire pulmonaire à l'endotoxine par un mécanisme indépendant des concentrations en TNF et doit donc être utilisée avec prudence puisque elle pourrait précipiter

une insuffisance ventriculaire droite par augmentation de la postcharge ventriculaire droite.

Puisque le mécanisme de convection semble plus efficace pour obtenir l'élimination des cytokines, nous allons au cours du chapitre suivant étudier les effets de l'hémofiltration sur le couplage ventriculo-artériel pulmonaire. Afin d'obtenir une élimination maximale des cytokines, nous utiliserons des membranes à haute perméabilité.

VIII. Chapitre 8: Effets de l'hémofiltration avec une membrane à larges pores dans le choc endotoxinique

Large pore membrane hemofiltration increases cytokine clearance and improves right ventricular-vascular coupling during endotoxic shock in pigs

Bernard Lambermont, Pierre Delanaye, Jean-Michel Dogné,
Alexandre Ghysen, Nathalie Janssen, Bernard Dubois,
Thomas Desaive, Philippe Kolh, Vincent D'Orio, Jean-Marie
Krzesinski.

Artificial Organs (in press)

(Annexe 6)

VIII.1. Introduction

Nous avons montré au cours du chapitre précédent que l'HDF, qui associe convection et diffusion, n'a pas d'effet bénéfique sur les altérations hémodynamiques pulmonaires rencontrées au cours du choc endotoxinique.

Au cours du choc septique, les effets bénéfiques de l'hémofiltration qui utilise uniquement un mécanisme de convection sont modestes quand le débit d'ultrafiltration est faible (10 to 15 ml/kg/h). Il a donc été suggéré d'augmenter ce débit à des valeurs atteignant jusqu'à 200 ml/kg/h pour obtenir une amélioration hémodynamique dans les modèles expérimentaux (Grootendorst et al, 1992; Rogiers et al, 1999).

Cependant, la plupart des études utilisant l'hémofiltration, même à des débits d'ultrafiltration élevés, ne sont pas arrivées pas à mettre en évidence une clairance significative des cytokines ni une réduction significative de leur taux plasmatique. Dans le meilleur des cas on observe une clairance faible et transitoire (De Vriese et al, 1999; Kellum et al, 1998). L'absence de clairance significative peut être expliquée en partie par la petite taille des pores des membranes utilisées. En effet, dans la majorité des études, le cut-off des membranes utilisées est environ de 30 kDa alors que, par exemple, le poids moléculaire du TNF est supérieur à 50 kDa.

Les membranes à larges pores ont permis d'obtenir dans les études ex-vivo des clairances pour les cytokines largement plus élevées que les membranes classiques (Uchino et al., 2002). Par exemple, des membranes dont le cut-off est de 60 kDa ont induit une clairance significative d'interleukine 6, interleukine 8, et interleukine 1.

Dans ce chapitre nous nous proposons d'étudier les effets d'une hémofiltration à l'aide d'une membrane à larges pores dont le cut-off est de 80 kDa sur le couplage ventriculo-artériel pulmonaire au cours du choc endotoxinique et sur la clairance de l'interleukine 6 et de l'interleukine 10.

VIII.2. Matériel et méthodes

Les 13 animaux utilisés dans ce protocole expérimental ont été préparés selon les modalités décrites dans les chapitre des méthodes générales pour l'étude du couplage ventriculo-artériel pulmonaire.

Un cathéter à double lumière de 12F (Arrow International, Reading, PA, USA) a été inséré en plus dans la veine fémorale gauche.

VIII.2.1. Protocole expérimental.

Après une période de stabilisation de 30 minutes (T0), les animaux ont été répartis en deux groupes.

Dans le premier groupe (groupe Endo, n = 6) les animaux ont reçu une perfusion de 0.5 mg/kg d'endotoxine (Lipopolysaccharide, Escherichia Coli serotype 0127:B8; Sigma Chemical, St Louis, MO) en 30 minutes (de T0 à T30). Dans le second groupe (groupe EndoHF, n = 7), ils ont reçu, comme le groupe Endo, une perfusion de 0.5 mg/kg d'endotoxine en 30 minutes (de T0 à T30), et en plus, à partir de T60, une hémodialfiltration avec une ultrafiltration de 45 ml/kg/h (Ronco et al., 2000) . Une membrane à larges pores (78 Å) de 0.7 m² de surface dont le cut-off est de 80 kDa (Sureflux FH 70, Nipro, Osaka, Japon) et une machine Baxter BM 25-BM 14 (Baxter Health Care, Munich, Allemagne) ont été utilisées. Le débit sanguin de la pompe extra-corporelle a été déterminé par la formule suivante:

$$\text{Débit sanguin (ml/min)} = \text{UF (ml/min)} \times 3.5$$

L'ultrafiltrat a été remplacé en post-dilution par un liquide de substitution tamponné au bicarbonate (Na⁺: 150 mmol/l, K⁺: 3 mmol/l, bicarbonate: 30 mmol/l) à une température de 37°C. L'anticoagulation du circuit extra-corporel a été obtenue par l'administration d'un bolus de 5000 UI d'héparine suivi par une perfusion continue de manière à maintenir le TCA entre 100 et

200. Le débit de la perfusion du CaCl₂ (100 mg/ml) a été calculé selon la formule suivante:

$$\text{CaCl}_2 \text{ (ml/h)} = \text{UF} \text{ (ml/h)} \times 1.2/1000$$

Les données hémodynamiques habituelles ont été recueillies et analysées toutes les 30 minutes selon les modalités décrites dans le chapitre des méthodes générales.

La concentration en interleukine 6 et 10 dans le plasma et dans l'ultrafiltrat a été mesurée à T0, T60, T120 et T240. La clairance et le coefficient de tamisage (sieving coefficient) ont été calculés à T120 et T240.

VIII.3. Résultats

VIII.3.1. Données hémodynamiques conventionnelles

Comme le montre la *figure 8.1.*, l'évolution de la pression artérielle systémique moyenne, de la fréquence cardiaque et du débit cardiaque ont été similaires dans les deux groupes de T0 à T240.

La PAP moyenne a atteint un premier maximum à T30 dans les groupes Endo et EndoHF. Après le début de l'hémofiltration, de T90 à T240, la PAP moyenne dans le groupe EndoHF est restée inférieure à celle du groupe Endo ($P < 0.05$) (*Figure 8.1.*).

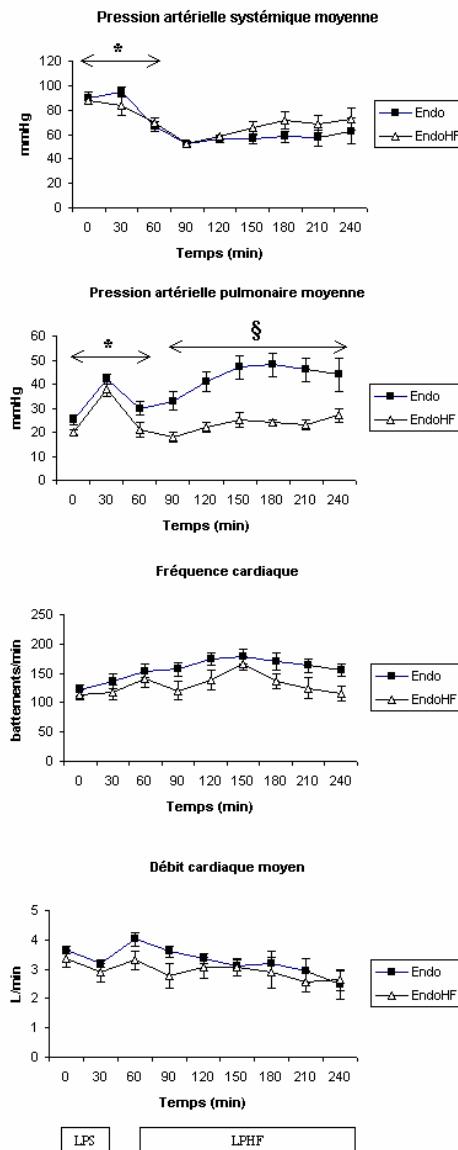


Figure 8.1.: Evolution de la pression artérielle systémique moyenne, de la pression artérielle pulmonaire moyenne, de la fréquence cardiaque et du débit cardiaque moyen au cours du choc endotoxique dans les groupes Endo et EndoHF. Le groupe Endo a reçu une perfusion d'endotoxine (LPS) pendant 30 minutes de T0 à T30. Le groupe EndoHF a reçu une perfusion d'endotoxine pendant 30 minutes de T0 à T30 et une hémodéfiltration avec une membrane à larges pores (LPHF) de T60 à T240.

* $p < 0.05$ pour l'effet du temps

§ $p < 0.05$ pour l'effet du groupe

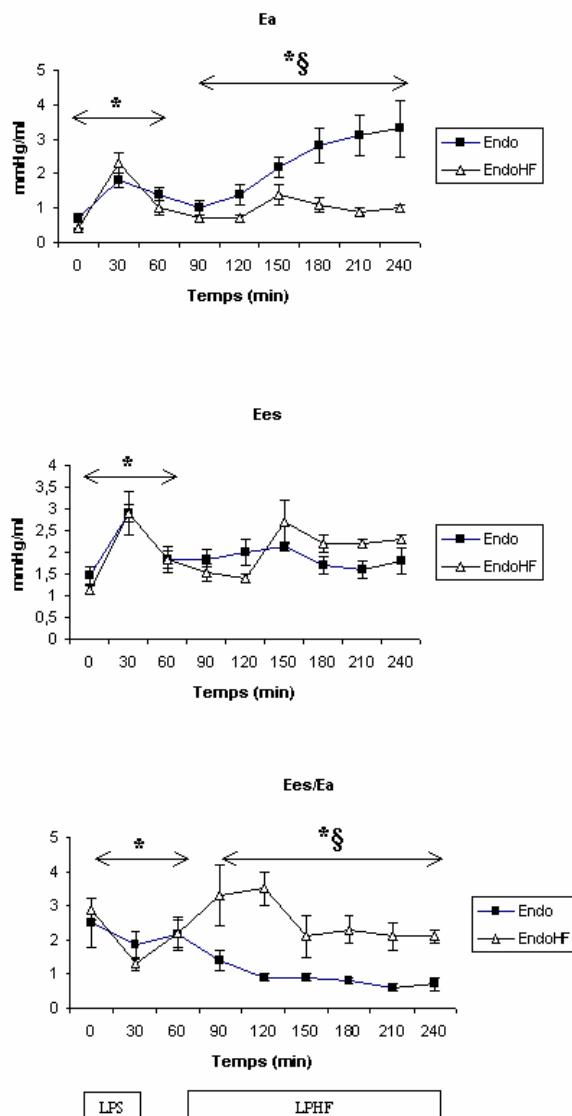


Figure 8.2.: Evolution de l'élastance artérielle pulmonaire (Ea), de l'élastance télésystolique ventriculaire droite (Ees), et du couplage ventriculo-artériel pulmonaire (Ees/Ea) au cours du choc endotoxique dans les groupes Endo et EndoHF. Le groupe Endo a reçu une perfusion d'endotoxine (LPS) pendant 30 minutes de T0 à T30. Le groupe EndoHF a reçu une perfusion d'endotoxine pendant 30 minutes de T0 à T30 et une hémodéfiltration avec une membrane à larges pores (LPHF) de T60 à T240.

* $p < 0.05$ pour l'effet du temps

§ $p < 0.05$ pour l'effet du groupe

VIII.3.2. Hémodynamique pulmonaire

L'évolution de Ea, R₁, R₂ et C après l'administration d'endotoxine dans le groupe Endo a été décrite au cours des chapitres 5 et 6.

L'évolution de R₁ et C a été similaire dans les deux groupes de T0 à T240.

Ea et R₂ ont présenté une évolution similaire à celle de la PAP dans chaque groupe (*Figure 8.2*). Ea et R₂ ont atteint un premier maximum à T30 dans les deux groupes. Toutefois, après le début de l'hémofiltration, de T90 à T240, les valeurs de Ea et de R₂ dans le groupe EndoHF sont restées inférieures à celles du groupe Endo (P < 0.05).

VIII.3.3. Couplage ventriculo-artériel pulmonaire

L'évolution de Ees a été semblable dans les deux groupes. De T0 to T30, la valeur de Ees a augmenté brutalement alors que, de T90 à T240, elle reste inchangée (*Figure 8.2*). Par conséquent, le rapport Ees/Ea a diminué légèrement de T0 à T30 dans les deux groupes. De T90 à T240, le rapport Ees/Ea dans le groupe EndoHF est resté supérieur à 2 alors que dans le groupe Endo le rapport Ees/Ea a diminué progressivement (*Figure 8.2*). Cette différence entre les deux groupes a été significative sur le plan statistique (P < 0.05).

Il n'y a pas eu de différence de température rectale entre les deux groupes de T0 à T240.

VIII.3.4. Clairance des cytokines et coefficient de tamisage

A T120 et T240, la clairance de l'interleukine 6 a été de 22 \pm 7 et 15 \pm 3 ml/min, respectivement. La valeur du coefficient de tamisage de l'interleukine 6 a été de 0.84.

A T120 et T240, la clairance de l'interleukine 10 a été de 14 ± 4 et de 10 ± 7 ml/min, respectivement. La valeur du coefficient de tamisage de l'interleukine 10 a été de 0.55.

Les concentrations plasmatiques moyennes des interleukines 6 et 10 à T0, T60, T120 et T240 sont montrées dans la *figure 8.3*.

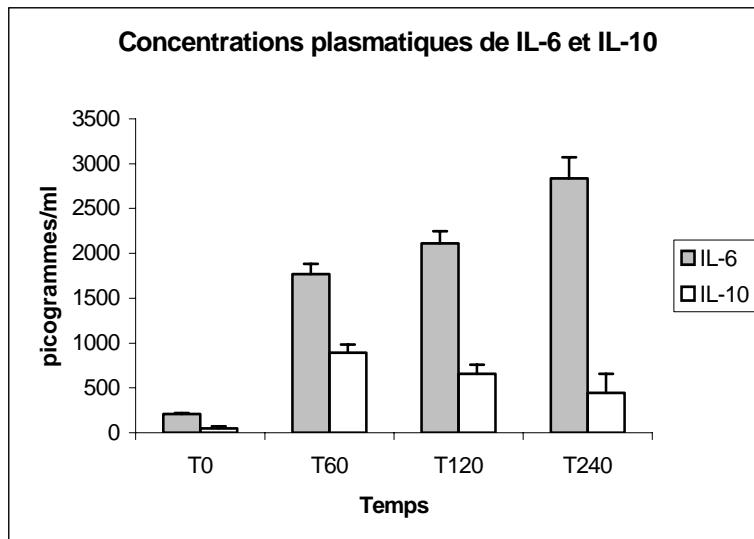


Figure 8.3: Evolution de la concentration plasmatique d'interleukine 6 (IL-6) et d'interleukine 10 (IL-10) dans le groupe EndoHF.

VIII.4. Discussion

Les résultats montrent que l'hémofiltration à l'aide d'une membrane à larges pores est responsable d'une clairance significative des interleukines 6 et 10 et prévient l'altération du couplage ventriculo-artériel pulmonaire que l'on rencontre habituellement au cours de la phase tardive du choc endotoxique.

Les effets de l'administration d'endotoxine sur le couplage ventriculo-artériel pulmonaire et l'hémodynamique pulmonaire ont été décrits en détail au cours des chapitres 5 et 6. Au cours de la phase précoce du choc endotoxique, l'augmentation des valeurs de Ea et de PAP peuvent être principalement attribuées à l'action du thromboxane A₂ comme nous le montrons au chapitre 11 (Lambermont et al., 2003a) et le couplage ventriculo-artériel pulmonaire est préservé grâce à une augmentation de la contractilité ventriculaire droite (Lambermont et al., 2003b). Ensuite, l'augmentation des valeurs de Ea et de PAP est due aux altérations structurelles vasculaires pulmonaires induites par les cytokines et les autres médiateurs inflammatoires (Lambermont et al., 1999b). A ce moment, la consommation myocardique d'oxygène et le coût énergétique de la contraction ventriculaire droite sont accrus comme le montre la chute d'efficience et l'altération du couplage ventriculo-artériel pulmonaire (Lambermont et al., 2003b).

En raison du protocole expérimental du présent travail, il est normal qu'il n'y ait eu aucune différence entre les deux groupes de T0 à T60, c'est à dire avant le début de l'hémofiltration.

Par contre, alors que la valeur de Ea a augmenté dans le groupe Endo, elle est restée inchangée dans le groupe EndoHF du début de l'hémofiltration jusqu'à la fin de la période expérimentale (de T90 à T240). Puisque le débit cardiaque est resté similaire dans les deux groupes, la différence de PAP moyenne observée entre les deux groupes est forcément due à une différence de Ea.

La valeur de Ea dépend de plusieurs paramètres comme le montre l'équation qui permet d'en calculer la valeur (*Equation 3.5.*). Ainsi, une augmentation de la valeur de Ea peut être consécutive à une augmentation de la fréquence cardiaque, de la résistance caractéristique ou de la résistance périphérique ou à une diminution de la compliance vasculaire pulmonaire. Dans ce chapitre, la différence de valeur entre les deux groupes au cours de la seconde phase du choc endotoxique résulte d'une différence de valeur des résistances vasculaires pulmonaires puisque tous les autres facteurs contribuant à la valeur de Ea sont restés à des valeurs équivalentes dans les deux groupes.

Les effets de l'hémofiltration sur les caractéristiques hémodynamiques pulmonaires ont été déjà été investigues par plusieurs auteurs. Globalement leurs résultats sont en accord avec

les nôtres, bien qu'une comparaison précise soit difficile en raison des différences qui existent dans l'induction du choc septique, le type de membrane utilisé et le débit d'ultrafiltration. Dans un modèle porcin de choc septique, Stein et al. ont montré que l'initiation précoce d'une CVVH (UF 20 ml/kg/h) avec une membrane polysulfone réduit la pression artérielle pulmonaire par le biais d'une réduction des résistances vasculaires pulmonaires (Stein et al., 1990). Chez le chien, au cours du choc endotoxique, Rogiers et al. ont montré que la CVVH (UF 3L/h) prévient l'accroissement de PAP et des résistances vasculaires pulmonaires (Rogiers et al., 2003).

Les effets de l'hémofiltration avec une membrane à larges pores sur le couplage ventriculo-vasculaire au cours du choc septique n'ont jamais été testés. Au mieux, Grootendorst et al. ont testé les effets de la CVVH avec une UF de 6 L/h sur la fraction d'éjection ventriculaire droite chez le porc au cours du choc endotoxique. Dans leur modèle, ces auteurs concluent que l'hémofiltration à haut débit améliore la fraction d'éjection ventriculaire droite et la performance cardiaque en enlevant des médiateurs responsable de la dépression myocardique (Grootendorst et al, 1992). Au cours de la phase tardive du choc endotoxique, le découplage ventriculo-vasculaire survient parce que la contractilité ventriculaire droite n'augmente pas quand Ea augmente (Lambertmont et al, 2003b). Nos résultats montrent que l'hémofiltration avec une membrane à larges pores prévient l'altération du couplage ventriculo-vasculaire pulmonaire au cours de la phase tardive du choc endotoxique. Il faut souligner que cette préservation du découplage ventriculo-vasculaire est obtenue grâce à l'absence d'augmentation de Ea et non grâce à une meilleure contractilité ventriculaire droite qui est restée semblable dans les deux groupes.

L'hémofiltration avec une membrane à larges pores n'a pas amélioré les valeurs de pression artérielle systémique moyenne ni de débit cardiaque qui sont restées similaires dans les deux groupes. Ces résultats sont en accord avec ceux de Stein et al. (Stein et al, 1990), mais sont en opposition avec ceux de Grootendorst et al. qui ont montré une augmentation de la pression artérielle systémique moyenne et du débit cardiaque dans le groupe de porcs endotoxiques recevant une hémofiltration à haut volume (Grootendorst et al, 1992; Grootendorst et al., 1994). Lee et al., par contre, n'ont pas trouvé d'augmentation significative

de la pression artérielle systémique chez les porcs endotoxiques bénéficiant d'une hémofiltration avec une membrane à larges pores bien que la survie des animaux ait été améliorée (Lee et al., 1998).

Les concentrations plasmatiques moyennes d'interleukines 6 et 10 avant et après l'administration d'endotoxine ont été similaires à celles mesurées chez les patients non septiques et septiques dans l'étude de Heering et al. (Heering et al, 1997). Cependant, les valeurs de clairance et le coefficient de tamisage calculés pour ces cytokines ont été largement supérieurs dans le présent travail à ceux obtenus avec des membranes d'hémofiltration classiques. Heering et al. ont mesuré un coefficient de tamisage de 0.04 pour l'interleukine 6 et l'interleukine 10 a été indéetectable dans l'ultrafiltrat (Heering et al, 1997). Kellum et al. ont mesuré un taux très faible d'interleukine 10 dans l'ultrafiltrat et une clairance d'interleukine 6 de 3.3 ml/min (Kellum et al, 1998).

Les cytokines sont considérées comme des facteurs très importants dans la physiopathologie du choc septique et il a été suggéré que l'hémofiltration pouvait réduire les défaillances d'organe et améliorer la survie en retirant de telles molécules et d'autres médiateurs toxiques. Plusieurs études ont mis évidence une extraction de cytokines de la circulation de patients septiques par l'hémofiltration (Bellomo et al., 1993; Heering et al, 1997; Sander et al., 1997). Puisque un des mécanismes de retrait des cytokines est la clairance par convection, l'augmentation de celle-ci devrait augmenter cet effet de purification du sang (Kellum et al, 1998). Une des manières d'atteindre cet objectif est d'utiliser des membranes d'hémofiltration à larges pores (van Deuren & van der Meer, 2000). In vitro les membranes à larges pores peuvent induire une clairance pour les cytokines comparables à celle obtenue pour l'urée avec une épuration extra-rénale classique (Uchino et al, 2002). In vivo, Morgera et al. ont montré que des membranes dont le cut-off est de 60 kDa induisent une clairance significative de cytokines (Morgera et al., 2004). Dans ce travail, une membrane dont le cut-off est de 80 kDa a permis d'obtenir une clairance significative d'interleukine 6 et 10, sans perte transmembranaire significative d'albumine.

VIII.5. Conclusions

L'utilisation de l'hémofiltration avec une membrane à larges pores au cours du choc endotoxique a été responsable d'une clairance significative d'interleukines 6 et 10 et d'une amélioration du couplage ventriculo-vasculaire en prévenant l'augmentation de Ea.

Nous avons montré au chapitre 5 que la réponse hypertensive pulmonaire suit une cinétique biphasique dont la première phase pourrait être le résultat d'une vasoconstriction isolée. Une possibilité thérapeutique alternative destinée à améliorer l'hémodynamique circulatoire pulmonaire serait d'administrer un vasodilatateur pulmonaire spécifique. Au cours du chapitre suivant nous étudierons les effets d'un tel agent, le monoxyde d'azote, sur la circulation pulmonaire au cours du choc endotoxique.

IX. Chapitre 9: Effets du monoxyde d'azote inhalé sur la circulation pulmonaire au cours du choc endotoxinique

Effects of inhaled nitric oxide on pulmonary hemodynamics in a porcine model of endotoxin shock.

Lambermont B, D'Orio V, Kolh P, Gerard P, Marcelle R.

Critical Care Medicine 1999 Sep;27(9):1953-7.

(Annexe 7)

IX.1. Introduction

L'hypertension artérielle pulmonaire du choc endotoxique trouve vraisemblablement son origine dans l'installation d'une vasoconstriction et de processus thrombotiques intravasculaires (Berger et al, 1993; Brigham & Meyrick, 1986a; D'Orio et al, 1993; McCuskey et al., 1996). Cet ensemble d'anomalies vasculaires pulmonaires produit plusieurs effets cardio-pulmonaires délétères incluant la décompensation ventriculaire droite et les troubles du rapport ventilation-perfusion avec hypoxémie. En conséquence, les traitements vasodilatateurs en vue de réduire l'hypertension pulmonaire ont été largement testés sur des modèles animaux aussi bien que chez des patients souffrant de choc septique et présentant un syndrome de détresse respiratoire de l'adulte (ARDS) (Berger et al, 1993; Weitzberg et al, 1993). L'inhalation de monoxyde d'azote (NO) a fait l'objet de beaucoup d'attention parce que cette molécule est capable de conduire à une réduction sélective des résistances vasculaires pulmonaires et du shunt intra-pulmonaire en agissant uniquement sur le lit vasculaire pulmonaire des zones ventilées (Rossaint et al., 1993; Zapol et al., 1994). Cet effet bénéfique se distingue des résultats des traitements vasodilatateurs intraveineux qui eux, aggravent les anomalies de la relation ventilation-perfusion et sont fréquemment responsables d'hypotension systémique qui à leur tour peuvent précipiter la décompensation cardiaque droite (Frostell et al., 1991). Toutefois, à notre connaissance peu de travaux se sont spécifiquement attachés à comprendre les mécanismes responsables de l'échec ou du succès du traitement par NO inhalé sur la circulation pulmonaire (Bigatello & Hurford, 1999; Matthay et al., 1998).

Ce chapitre a pour but d'étudier les modifications des propriétés mécaniques vasculaires pulmonaires induites par la perfusion d'endotoxine et finalement d'étudier l'action spécifique du NO sur ces phénomènes.

IX.2. Matériel et méthodes

Les expériences ont été réalisées sur 12 cochons pesant entre 15 et 31 kg, prémédiqués, anesthésiés et équipés comme décrit dans le chapitre des méthodes générales.

IX.2.1. Protocole expérimental

Après une période de stabilisation hémodynamique de 60 minutes, les données hémodynamiques de base ont été acquises. Elles ont inclu la PAP, le débit sanguin pulmonaire, la pression auriculaire gauche, la pression artérielle systémique et la fréquence cardiaque. Ensuite 0.5 mg/kg d'endotoxine ont été administrés en une demie heure (Lipopolysaccharide de E.Coli serotype 0127 :B8, *Sigma Chemical and Co*, St Louis, MO, USA).

Trente minutes après la fin de l'infusion d'endotoxine, l'inhalation de NO a été instaurée (T60) durant une heure (de T60 à T120) chez six animaux sélectionnés de façon randomisée (Groupe NO). Le NO a été délivré au travers d'un cathéter inséré dans le tube endotrachéal à un débit ajusté afin de délivrer une concentration inspiratoire de 40 ppm. Cette concentration a été sélectionnée car elle constitue la valeur médiane des concentrations maximales bien tolérées chez l'animal et dépourvue d'effet systémique (Frostell et al, 1991). Le NO est fourni à partir d'un réservoir où il est stocké à une concentration de 800 ppm (*Air Liquide*, Haren, Belgium). La concentration inspirée de NO est vérifiée par un analyseur grâce à la méthode de chémoluminescence et ce après une calibration réalisée à l'aide de concentration connue de NO (NOX 4000, *Seres*, Aix-en-Provence, France). La concentration inspirée et expirée de NO₂ est en permanence inférieure à 1 ppm. Ensuite l'inhalation de NO a été arrêtée (T120) et une dernière série de données hémodynamiques a été enregistrée (T150).

Les six autres animaux ont constitué le groupe contrôle ; ils ont été observés pendant 150 minutes après le début de l'infusion d'endotoxine.

Dans les deux groupes d'animaux, les données hémodynamiques circulatoires pulmonaires ont été acquises toutes les trente minutes pendant la durée de l'expérience et analysées selon les modalités décrites dans le chapitre des méthodes générales. Les résistances vasculaires pulmonaires ont aussi été calculées en divisant le gradient de pression transpulmonaire (PAP moyenne – pression auriculaire gauche) par le débit cardiaque moyen.

IX.3. Résultats

IX.3.1. Evolution du groupe contrôle

L'évolution des effets de l'infusion de l'endotoxine sur les variables hémodynamiques conventionnelles sont présentées dans la *figure 9.1*. La PAP a évolué de façon biphasique atteignant un premier maximum à T90, retournant ensuite à des valeurs identiques à celles de T30 pour enfin croître à nouveau à T150. Par contre, la pression artérielle systémique a diminué graduellement de 82 ± 4 à 67 ± 2 mmHg durant la totalité de l'expérience. Le débit cardiaque a commencé à décroître à T30 et est resté ensuite à cette valeur pendant le reste de l'expérience. Les résistances vasculaires pulmonaires calculées ont évolué parallèlement à la PAP.

Les paramètres hémodynamiques calculés grâce au WK4 sont décrits dans la *figure 9.2*. R_1 a augmenté rapidement après le début de l'infusion d'endotoxine et est retourné à des valeurs basales, pour s'accroître à nouveau entre T90 et T120. La compliance vasculaire globale a rapidement diminué après le début de l'infusion d'endotoxine et est restée ensuite à ce niveau. R_2 a évolué de façon parallèle à la PAP. Au contraire, l'inertance est demeurée pratiquement inchangée tout au long de l'expérience à une valeur égale à 0.001 ± 0.0002 mmHg.s².ml⁻¹.

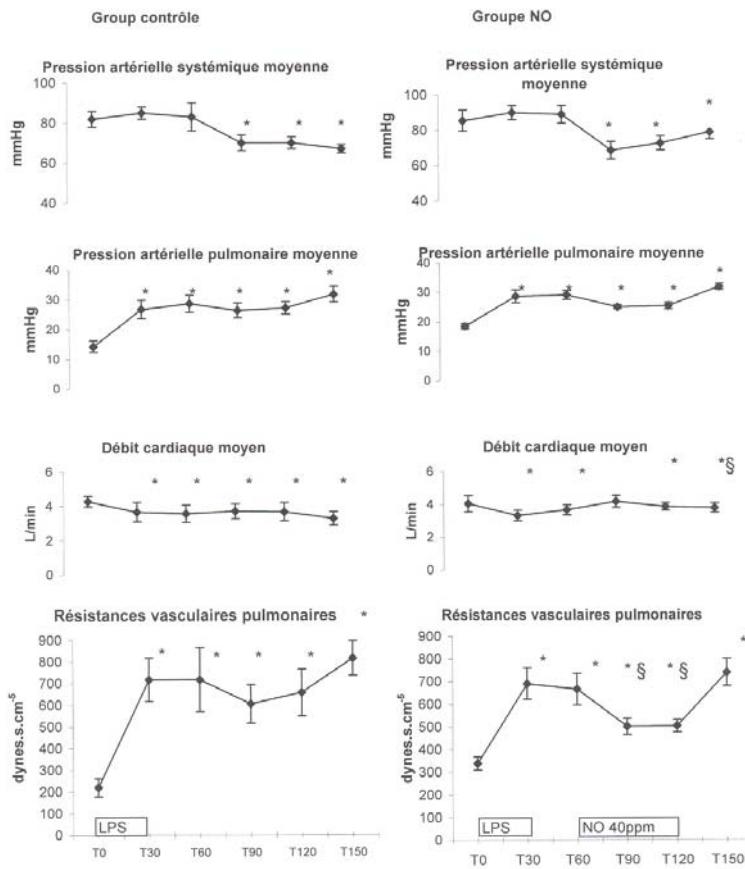


Figure 9.1.: Evolution des paramètres hémodynamiques conventionnels dans le groupe contrôle et le groupe NO.

* $p < 0.05$ vs T0

§ $p < 0.05$ Groupe NO vs groupe contrôle

IX.3.2. Effets de l'inhalation de NO

La figure 9.1. montre que l'inhalation de NO a été sans effet sur la pression artérielle systémique. Le débit cardiaque a été modérément accru par le NO, mais cette accroissement n'a pas atteint une valeur statistiquement significative, sauf en fin d'expérience. Comparé au groupe contrôle, le NO a légèrement

réduit la PAP, accrue préalablement par l'administration d'endotoxine. Toutefois, cet effet n'a pas atteint de signification statistique. Les résistances vasculaires pulmonaires ont été significativement réduites par le NO et cette réduction a duré aussi longtemps que l'inhalation de NO. La *figure 9.2.* illustre que tant la compliance vasculaire que la résistance caractéristique ont échappé à l'action du NO. Au contraire, R_2 a été significativement réduit durant la période d'administration du NO, et est retourné à sa valeur contrôle dès l'arrêt de celui-ci.

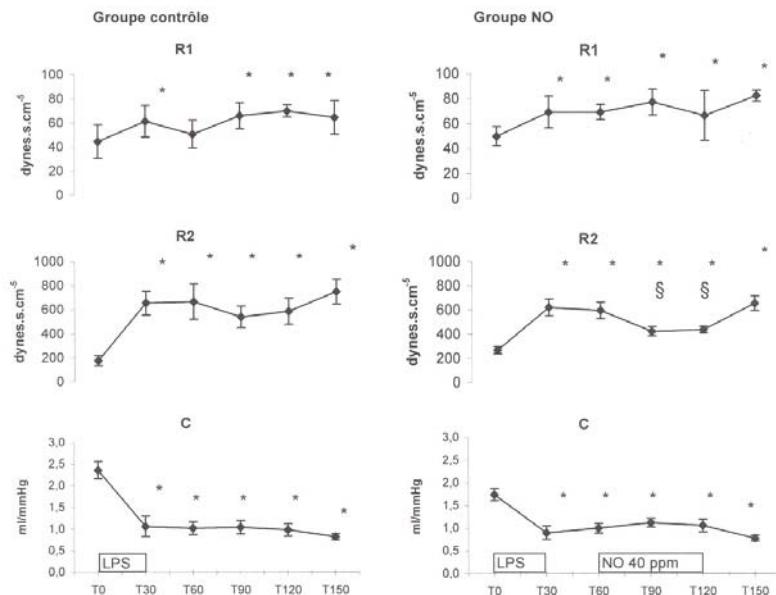


Figure 9.2.: Evolution des paramètres R_1 , R_2 et C du modèle de windkessel à quatre éléments dans le groupe contrôle et le groupe NO.

* $p < 0.05$ vs T0

§ $p < 0.05$ Groupe NO vs groupe contrôle

IX.4. Discussion

Nous avions déjà mis en évidence au sein de notre laboratoire que le site de l'obstruction vasculaire pulmonaire induite par l'endotoxine intéressait les petites artères et de façon

prédominante, les petites veines (D'Orio et al, 1986). On attribuait à ce dernier effet la responsabilité de l'augmentation de la pression capillaire pulmonaire qui induisait à son tour l'apparition d'un oedème interstitiel indépendamment de tout accroissement de perméabilité vasculaire (D'Orio et al, 1986).

Au plan théorique, les hypothèses pathogéniques qui rendent compte de l'accroissement de la résistance au débit pulmonaire comprennent la vasoconstriction active, une compression par l'oedème interstitiel, des altérations de la paroi vasculaire et des thromboses intravasculaires (Brigham & Meyrick, 1986a). Il a été suggéré que ces anomalies vasculaires pourraient apparaître de manière séquentielle, en fonction des différents stades évolutifs du choc endotoxique. La phase précoce de l'hypertension artérielle pulmonaire induite par l'endotoxine est probablement due à l'action des médiateurs issus du métabolisme de l'acide arachidonique conduisant à une vasoconstriction. Par contre, la phase tardive est vraisemblablement associée à une activation en cascade de médiateurs qui provoquent des altérations au niveau des parois vasculaires et du tissu pulmonaire (Berger et al, 1993; Brigham & Meyrick, 1986a; McCuskey et al, 1996). Théoriquement, l'existence d'un oedème pulmonaire suffit à accroître, per se, la pression artérielle pulmonaire. L'intervention d'une vasoconstriction a été évoquée en raison de la réversibilité partielle de l'hypertension artérielle pulmonaire, par la PGE1 (Marini et al., 1990). Toutefois, cette dernière étude était limitée par une approche hémodynamique basée sur le concept ohmique de la résistance, incapable de fournir une analyse tant sur la nature des effets que sur le site d'action des prostaglandines.

Le choix du modèle à quatre éléments pour représenter la circulation pulmonaire à déjà été discuté dans le premier chapitre de ce travail et au cours de notre travail de doctorat. Basé sur ce modèle, l'étude présente met clairement en évidence que l'accroissement de PAP lors de l'infusion d'endotoxine résulte de l'association d'effets variés sur la circulation pulmonaire. L'endotoxine était responsable d'une augmentation de la résistance caractéristique et de la résistance périphérique ainsi que d'une chute de la compliance vasculaire. Notre analyse démontre que l'inhalation de NO est active sur les résistances vasculaires périphériques pulmonaires alors que la résistance caractéristique et la compliance vasculaire y sont insensibles. Cette observation peut être expliquée par deux types d'arguments. Tout d'abord, la

résistance caractéristique décrit la résistance à l'entrée du circuit en l'absence de phénomène de réflexion d'ondes de pression et de débit et est essentiellement dépendante des propriétés de l'artère pulmonaire principale dont la compliance vasculaire qui rend compte des propriétés globales d'élasticité du circuit pulmonaire indépendamment du tonus vasculaire (Bergel & Milnor, 1965; Grant & Paradowski, 1987). D'autre part, l'inhalation de NO est supposée agir chez l'animal intact, à une courte distance des alvéoles puisque il est rapidement inactivé par l'hémoglobine circulante (Roos et al., 1994; Zapol et al, 1994). En conséquence, le NO inhalé agit sur les petits vaisseaux dont le tonus est préalablement accru par l'effet de l'endotoxine.

En raison des altérations persistantes de résistance caractéristique et de compliance, la PAP n'a pas été réduite par le NO. Ces résultats sont en opposition avec ceux d'autres auteurs qui ont rapporté une chute de PAP face à un débit cardiaque inchangé dans un modèle canin d'altérations pulmonaires induites par l'injection de microsphère (Melot et al., 1997) et dans un modèle ovin de lavage alvéolaire bilatéral (Rovira et al., 1994). Chez le chien, 80 ppm de NO ont conduit à la diminution de la PAP de 35 à 31 mmHg et 60 ppm de NO ont réduit la PAP de 20 à 16 mmHg. Dans ces études, l'hémodynamique pulmonaire a été évaluée en utilisant des relations pression-débit. Cependant, seul le modèle canin a suggéré que le NO diminuait la résistance des petits vaisseaux mais demeurait sans effet sur la pression critique de fermeture de la circulation pulmonaire. L'absence d'effet significatif du NO dans l'autre modèle a été interprétée par une atteinte vasculaire minime, suggérant que le NO ne peut relaxer des vaisseaux dont le tonus n'est pas augmenté. Nos résultats confirment non seulement que le NO agit à une faible distance des alvéoles sur les petits vaisseaux dont le tonus est au préalable augmenté, mais suggère aussi que les propriétés résistives et capacitives ne sont pas localisées au même endroit. L'indépendance entre les sites vasculaires de compliance et de résistance vasculaire pulmonaire a déjà été mise en évidence par d'autres auteurs (Chen et al., 1997b). Ces derniers ont développé un modèle canin d'hypertension artérielle pulmonaire chronique induit par l'injection de monocrotaline pyrole. Ces auteurs ont rapporté que l'inhalation de NO agit sur la résistance vasculaire pulmonaire mais demeure inactive sur la compliance vasculaire. On pouvait s'attendre intuitivement à ce que la circulation

pulmonaire réponde à l'inhalation de NO en fonction des mécanismes physiopathologiques qui sous tendent les anomalies mécaniques vasculaires sous-jacentes. On peut en effet raisonnablement supposer que le NO tend à restaurer le tonus basal des petits vaisseaux comme le suggère la réduction de R_2 . Par contre, dès que des altérations structurelles sont existantes comme le suggère une diminution de la compliance vasculaire ou un augmentation de R_1 , le NO s'avère incapable de réduire l'hypertension artérielle pulmonaire induite par l'endotoxine.

L'évaluation de l'efficacité des échanges respiratoires suite à la perfusion d'endotoxine et après inhalation du NO sort du cadre de cette expérience. L'hypoxémie a donc été prévenue par l'ajustement de la FiO_2 afin d'éviter l'apparition de tout vasoconstriction d'origine hypoxique additionnelle.

IX.5. Conclusions

Notre étude suggère que la perfusion d'endotoxine induit un accroissement de PAP associé à une augmentation du tonus vasculaire et à une chute de la compliance vasculaire. L'inhalation de NO relaxe les petits vaisseaux mais n'a pas d'effet significatif sur la compliance du circuit vasculaire pulmonaire. Il en résulte que si les modifications de compliance vasculaire prédominent lors d'une atteinte vasculaire pulmonaire, on peut alors prédire que l'inhalation de NO sera sans effet sur l'hypertension artérielle pulmonaire (Bigatello & Hurford, 1999).

Puisque ni l'hémodiafiltration supposée retirer des médiateurs aux effets néfastes, ni l'utilisation d'un vasodilatateur pulmonaire puissant tel que le NO ne permettent de corriger de manière significative les désordres circulatoires pulmonaires, d'autres moyens thérapeutiques méritent d'être testés.

Comme le TXA_2 semble impliqué dans le génèse de l'hypertension artérielle pulmonaire induite au cours du choc septique, son inhibition pourrait être une option thérapeutique intéressante. Ce sera l'objet des chapitres suivants. Au préalable, nous étudierons, dans le chapitre 10, la capacité d'une nouvelle molécule dérivée du torasémide, le BM 573, à bloquer l'effet vasoconstricteur pulmonaire du TXA_2 . Cette molécule inhibitrice

de la synthèse du TXA₂ semble, en effet, être aussi un antagoniste des récepteurs au TXA₂. Ensuite nous étudierons les effets de cette molécule sur la circulation pulmonaire et sur le couplage ventriculo-artériel pulmonaire au cours du choc septique.

**X. Chapitre 10: Etude des effets circulatoires
pulmonaires du BM-573 au cours de
l'administration de U 46619**

Effects of U-46619 on pulmonary hemodynamics before and after administration of BM-573, a novel thromboxane A2 inhibitor.

Lambermont B, Kolh P, Dogne JM, Ghysen A, Tchana-Sato V, Morimont P, Benoit P, Gerard P, Masereel B, Limet R, D'Orio V

Archives of Physiology and Biochemistry 2003 Jul;111(3):217-23

(Annexe 8)

X.1. Introduction

Le thromboxane A₂ (TXA₂) est un agent doté de propriétés vasoconstrictrices et agrégantes produit par les plaquettes, les globules blancs et les cellules endothéliales (Hamberg et al., 1975; Oates et al., 1988). C'est une molécule instable dont la demi-vie est environ de 30 secondes en milieu aqueux et qui est rapidement hydrolysée en un métabolite stable mais inactif, le thromboxane B₂ (TXB₂) (Oates et al, 1988).

Le TXA₂ a été impliqué comme médiateur pro-inflammatoire au cours de la phase d'hypertension artérielle pulmonaire observée au cours du choc septique induit par les bactéries Gram négatives (Wise et al., 1981) et au cours du rejet pulmonaire hyperaigu (Collins et al., 2001; Ogletree & Brigham, 1982). C'est aussi un agent responsable d'une vasoconstriction pulmonaire au cours de l'embolie pulmonaire (Ghuysen et al, 2004; Smulders, 2000) et un médiateur induisant thrombose, vasospasme, arythmies, et progression des dommages induits par l'ischémie après occlusion coronaire (Oates et al, 1988; Rolin et al., 2003).

Dans de telles conditions pathologiques, les effets bénéfiques potentiels de l'inhibition de l'action du TXA₂ ont d'abord été étudiés en utilisant des inhibiteurs de la biosynthèse du TXA₂. Ces inhibiteurs se sont révélés inefficaces en raison d'une part d'un blocage incomplet de la thromboxane synthase au dosage utilisé, et d'autre part en raison d'une accumulation d'un précurseur du TXA₂ appelé endoperoxide H₂ qui est chimiquement plus stable et exerce des effets biologiques similaires par l'activation de récepteurs communs au TXA₂. Cependant les inhibiteurs spécifiques de la TXA₂ synthase sont aussi responsables d'une augmentation de la production de prostanoïdes tels que la prostaglandine I₂, qui a un effet opposé au TXA₂ dont la diminution de l'activation plaquettaire et la relaxation des résistances vasculaires. Ces éléments expliquent que l'attention se soit focalisée sur des agents capables de bloquer la synthèse de TXA₂ et d'antagoniser à la fois PGH₂ et TXA₂ au niveau de leur récepteur commun (Oates et al, 1988; Vandeplassche et al., 1991; Vandeplassche et al, 1993).

Le BM-573 est une molécule dérivée du torasémide, un diurétique de l'anse (Ghysen et al., 2005). Il peut être obtenu par le remplacement de l'anneau pyridine du torasémide par un nitrobenzène et la présence d'un groupe tert-butyl sur l'atome d'azote distal de la fonction sulfonylurée. Il en résulte une action antagoniste du TXA₂ et une inhibition de la TXA₂ synthase (Figure 10.1.) (Rolin et al., 2001). Ce nouvel antagoniste des récepteurs au TXA₂ et inhibiteur de la TXA₂ synthase possède une puissante action anti-plaquettaire, ce qui le rend capable de relâcher l'aorte de rat préalablement contractée par le U-46619, un agoniste stable du TXA₂ (Rolin et al., 2001).

Dans l'hypothèse où le TXA₂ joue un rôle dans divers processus pathologiques vasculaires pulmonaires, nous avons étudié si ce nouvel inhibiteur de la synthèse et antagoniste des récepteurs du TXA₂ est capable de bloquer les effets vasculaires pulmonaires du U-46619, un agoniste stable du TXA₂. A cette fin, nous avons analysé les effets du U-46619 sur l'hémodynamique pulmonaire après administration de BM-573 grâce au modèle de windkessel à quatre éléments (Grant & Paradowski, 1987; Lamberton et al, 1999b).

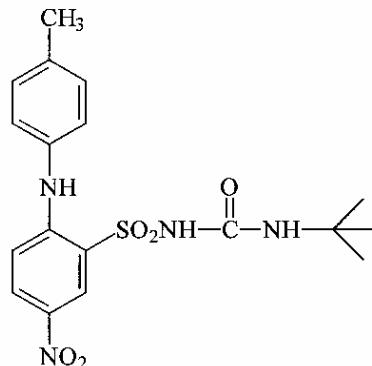


Figure 10.1.: Structure de la molécule BM-573, inhibiteur de la synthèse du thromboxane et antagoniste des récepteurs au thromboxane.

X.2. Matériel et méthodes

Les expériences ont été réalisées chez 12 animaux anesthésiés selon les modalités décrites au chapitre décrivant les méthodes générales. Ces animaux ont été équipés d'un capteur de pression à haute précision au niveau de l'artère pulmonaire, de l'oreillette gauche et de l'aorte descendante et d'une bague périvasculaire pour mesurer le débit de l'artère pulmonaire comme décrit au chapitre des méthodes générales.

X.2.1. Préparation des produits pharmaceutiques.

U-46619 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) a été fourni dans une solution d'éthanol et dilué dans une solution de NaCl 0.9% de manière à obtenir une concentration finale de 10 µg/ml.

BM-573 a été fourni par le laboratoire de chimie pharmaceutique de l'université de Liège. Il a été dissout dans un mélange d'eau et de propylène glycol afin d'obtenir une solution mère de 20 mg/ml.

X.2.2. Protocole expérimental.

Après une période de stabilisation de 30 minutes, les animaux ont été répartis au hasard en deux groupes.

Dans le premier groupe (n = 6) (groupe Ago) les animaux ont reçu six injections consécutives de la même dose de U-46619 (1.25 µg/kg) à 30 minutes d'intervalle. Les données hémodynamiques ont été enregistrées avant chaque injection de U-46619 (T0) et 2 (T2), et 15 (T15) minutes après chaque injection de U-46619. Les données hémodynamiques ont inclus l'onde de pression artérielle pulmonaire (PAP), l'onde de débit sanguin de

l'artère pulmonaire, la pression auriculaire gauche, la pression artérielle systémique, et la fréquence cardiaque.

Dans le second groupe (n = 6) (groupe Anta), une quantité croissante de BM-573 a été administrée en intraveineux 10 minutes avant chaque injection de U-46619, à l'exception de la première injection de U-46619 qui n'a pas été précédée de l'injection d'antagoniste. Les animaux ont reçu 0.125 mg/kg de BM-573 avant la deuxième injection, 0.250 mg/kg avant la troisième, 0.500 mg/kg avant la quatrième, 1 mg/kg avant la cinquième and 2 mg/kg avant la sixième injection de l'agoniste. Dans le groupe Anta, les données hémodynamiques ont été recueillies avant chaque injection d'antagoniste (Anta 0, Anta 0.125, Anta 0.25, Anta 0.5, Anta 1, Anta2), 10 minutes plus tard (c'est à dire juste avant l'injection de l'agoniste) (T0), et 2 (T2) et 15 (T15) minutes après chaque injection de U-46619.

Dans les deux groupes, chaque séquence d'injection d'agoniste et les enregistrements de données correspondants (T0, T2, T15) ont été appelés Run 0, Run 0.125, Run 0.250, Run 0.500, Run 1, Run 2, respectivement, selon la dose d'antagoniste injectée dans le groupe Anta.

X.2.3. Recueil et analyse des données

Les données ont été recueillies et analysées selon les modalités décrites au chapitre des méthodes générales.

X.2.4. Analyse statistique

Un plan factoriel comportant 3 critères de classification (temps, Run, animal) et leurs interactions d'ordre 2 a été utilisé pour évaluer les effets des facteurs temps et Run sur les différentes variables étudiées (Statistica '99 edition, Statsoft Inc, Tulsa, OK, USA).

P < 0.05 a été considéré comme statistiquement significatif.

X.3. Résultats

X.3.1. Variables hémodynamiques conventionnelles

L'évolution au cours du temps des variables hémodynamiques conventionnelles est présentée dans la *figure 10.2*.

X.3.1.1. Groupe Ago

Dans le groupe Ago, la PAP a augmenté d'une valeur basale moyenne de 22.8 ± 0.8 mmHg (T0) à 47.2 ± 1.7 mmHg ($p < 0.05$), 2 minutes après injection du U-46619 (T2) pour retourner à des valeurs de base (25 ± 0.8 mmHg) 15 minutes plus tard (T15). Une augmentation progressive des valeurs de PAP à T0, T2 et T15 a été observée entre les Runs (*Figure 10.2*).

Le débit cardiaque a diminué de 91.3 ± 2.9 ml/s (T0) à 63 ± 4.2 ml/s (T2) ($p < 0.05$) après administration du U-46619. Cette chute de débit cardiaque après l'administration du U-46619 à T2 est devenue de plus en plus importante au cours du temps. Le débit cardiaque a diminué de 110 ± 2.8 à 96 ± 3.2 ml/s ($p < 0.05$) au cours du premier Run (Run 0) et de 81 ± 3.1 à 47 ± 7.4 ml/s ($p < 0.05$) au cours du dernier Run (Run 2), tandis que la fréquence cardiaque s'est accélérée de 123 ± 3.4 battements/min (T0) à 137 ± 4.7 battements/min (T2) ($p < 0.05$) et est retournée à des valeurs de base à T15 (122 ± 3.5 battements/min).

La pression artérielle systémique a augmenté légèrement après l'injection du U-46619 au cours des premiers Runs (Run 0, Run 0.125, Run 0.250, Run 0.500) alors que au cours des Runs 1 et 2 elle a légèrement diminué après injection du U-46619.

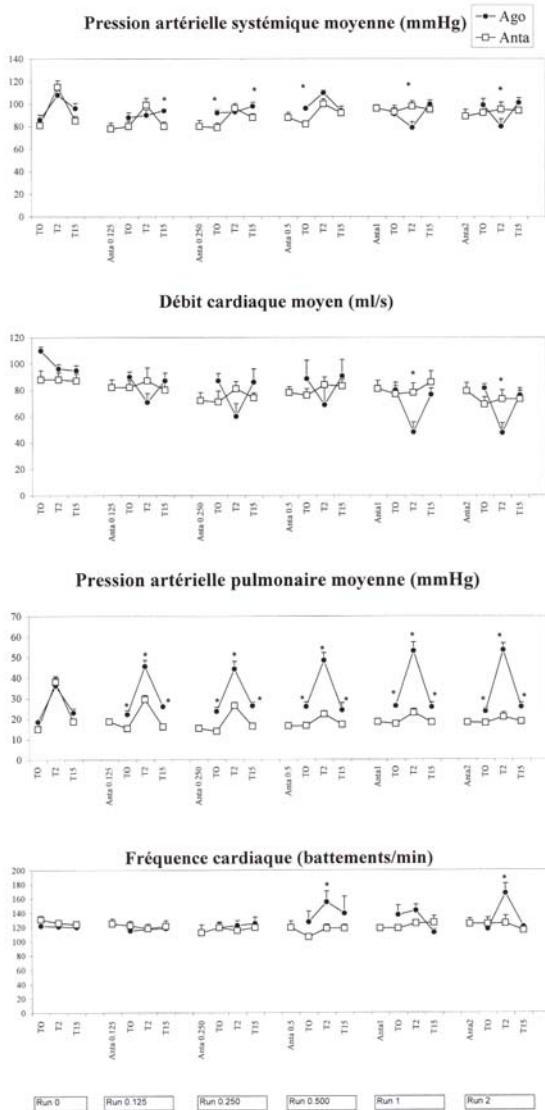


Figure 10.2.: Evolution des paramètres hémodynamiques conventionnels dans le groupe Ago et le groupe Anta avant l'injection de U-46619 (T0), deux minutes (T2) et 15 minutes (T15) après l'injection de U-46619 dans les deux groupes. Dans le groupe Anta avant injection du BM-573 (Anta 0.125, Anta 0.250, Anta 0.500, Anta 1, Anta 2) selon la dose injectée (mg/kg).

* p < 0.05 Groupe Ago vs groupe Anta

X.3.1.2. Groupe Anta

Il n'y a pas eu de différence entre les groupes Ago et Anta au cours du Run 0.

A partir du Run 0.125, la PAP a augmenté moins dans le groupe Anta que dans le groupe Ago ($p < 0.05$) et au cours du Run 2, la PAP est restée à une valeur constante malgré l'administration de U-46619.

La fréquence et le débit cardiaques n'ont pas été influencés par l'injection de U-46619 à partir du Run 0.125.

X.3.2. Hémodynamique pulmonaire

L'évolution des paramètres hémodynamiques pulmonaires calculés à l'aide du modèle de windkessel à quatre éléments est présentée dans la *figure 10.3*.

X.3.2.1. Groupe Ago

R_1 et R_2 ont suivi exactement le même profil d'évolution (*Figure 10.3.*). Ils ont augmenté à T2 pour retourner aux valeurs de base à T15. Les valeurs à T0 ont été remarquablement stables au cours des différents Runs successifs.

C a diminué largement à T2 au cours de chaque Run pour revenir à des valeurs proches de la valeur obtenue au T0 précédent. Les valeurs de C à T0 ont diminué légèrement au cours des Runs successifs.

X.3.2.2. Groupe Anta

Il n'y a pas eu de différence entre les groupes Ago et Anta au cours du Run 0.

A partir du Run 0.125 et du Run 0.250, R_1 et R_2 n'ont pas augmenté après l'administration de U-46619 et sont restés remarquablement stables au cours du temps. Cependant, U-46619 a diminué les valeurs de C à T2 au cours de tous les Runs dans les

deux groupes, mais C a été significativement plus élevé dans le group Anta group que dans le groupe Ago à T2 dès le Run 0.500 ($p < 0.05$).

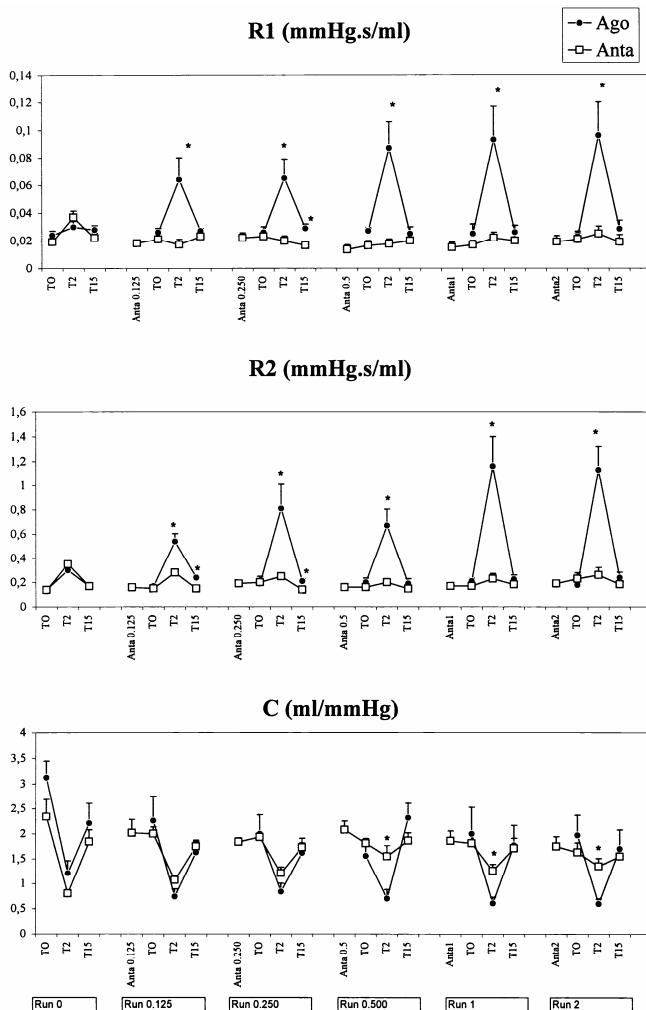


Figure 10.3: Evolution des paramètres hémodynamiques pulmonaires obtenus à l'aide du modèle de windkessel à quatre éléments.

* $p < 0.05$ Groupe Ago vs groupe Anta.

X.4. Discussion

Les résultats de la présente étude montrent que la réponse vasculaire pulmonaire au U-46619, un agoniste stable du TXA₂ est fortement réduite par l'injection de 2mg/kg de BM-573. Comme attendu, dans le groupe Ago, l'U-46619 a induit une augmentation de la PAP en raison d'une vasoconstriction (Kaye et al., 1995; Sjoberg & Steen, 1989). Au cours des Runs 1 et 2, la PAP a augmenté à un niveau tel que le débit cardiaque et la pression artérielle systémique en ont été réduits.

L'inhibition simultanée de la synthèse de prostaglandines et de TXA₂, par les inhibiteurs de la cyclooxygénase chez des chiens soumis à des lésions pulmonaires induites par l'acide oléique est associée à une augmentation significative des résistances vasculaires pulmonaires et à une amélioration des échanges gazeux, suggérant une inhibition de la vasoconstriction hypoxique par une prostaglandine vasodilatatrice (Leeman et al., 1988). L'atteinte directe de la microvascularisation pulmonaire par le seul TXA₂ reste toutefois controversée. Néanmoins, le TXA₂ possède des propriétés vasoconstrictrices sur le territoire postcapillaire (Schuster et al., 2001) et augmente la filtration de liquide au niveau du segment capillaire en raison de l'accroissement du niveau de la pression hydrostatique (Collins et al, 2001).

TXA₂ possède également des propriétés pro-inflammatoires et la diminution des effets du TXA₂ correspond généralement à l'atténuation de la réaction inflammatoire (Collins et al, 2001).

Au cours d'études préalables réalisées tant *in vitro* que *in vivo*, il a été suggéré que le BM-573 est capable de réduire à la fois la synthèse du TXA₂, grâce à l'inhibition de l'activité de la thromboxane synthase, et d'inhiber l'activité du TXA₂ (ou du PGH₂) en bloquant les récepteurs au TXA₂ (Rolin et al, 2001).

Nos données montrent que BM-573 bloque complètement les effets hypertenseurs pulmonaires du U-46619. Cependant, à 2 mg/kg et, en dépit de l'absence d'effets sur les résistances vasculaires pulmonaires, la compliance vasculaire pulmonaire s'est abaissée en réponse à l'administration de l'agoniste du TXA₂. Cet effet résiduel peut probablement s'expliquer par le maintien d'un tonus au niveau des muscles lisses de la paroi vasculaire

pulmonaire capable de réduire la compliance vasculaire pulmonaire mais insuffisant pour réduire le diamètre endoluminal. D'autres auteurs ont démontré que cet agent est capable d'abolir la production plaquettaire de TXB₂ induite par l'acide arachidonique (Rolin et al, 2001).

X.5. Conclusions

Nos données montrent que le BM-573 peut augurer la naissance d'une nouvelle classe thérapeutique capable de bloquer l'action hypertensive pulmonaire du TXA₂. Cette propriété résulte de la conjugaison d'une inhibition sa synthèse et du blocage de ses récepteurs. Son intérêt dans le choc endotoxique sera étudié au cours des deux chapitres suivants.

XI. Chapitre 11: Effets du BM 573 sur la circulation pulmonaire au cours du choc endotoxinique

Effects of BM-573, a novel thromboxane A2 inhibitor, on pulmonary hemodynamics in endotoxic shock.

Lambermont B, Ghuysen A, Dogne JM, Kolh P, Tchana-Sato V, Morimont P, Benoit P, Gerard P, Masereel B, D'Orio V.

Archives of Physiology and Biochemistry 2003 Jul;111(3):224-31

(Annexe 9)

XI.1. Introduction

Le TXA₂ est l'un des médiateurs incriminés dans l'augmentation des résistances vasculaires pulmonaires et des réactions pro-inflammatoires observées après l'administration d'endotoxine (Ogletree & Brigham, 1982; Redl et al, 1991; Wise et al, 1981). L'activité du TNF-alpha, la dégranulation des plaquettes et des neutrophiles jouent un rôle prépondérant dans la physiopathologie des lésions pulmonaires induites par l'endotoxine. Dans ces conditions pathologiques, l'hypoxémie résulte de la combinaison d'un oedème pulmonaire, d'atélectasie, de microthrombi pulmonaires, de l'inhibition de la vasoconstriction pulmonaire hypoxique et de la présence alvéolaire de débris et d'infiltration cellulaire. Pour cette raison, il a été suggéré que l'inhibition du TXA₂ soit par l'inhibition de la cyclooxygenase soit par l'utilisation d'antagoniste des récepteurs au TXA₂ ou par la conjugaison de ces deux mécanismes, pourrait jouer un rôle protecteur au cours des états qui s'accompagnent d'une atteinte pulmonaire. Le mécanisme de cette protection demeure obscur (Balk et al., 1988; Brimioule et al., 2002; Iglesias et al., 1994; Ogletree & Brigham, 1982; Schuster et al, 2001).

Nous avons montré au cours du chapitre précédent l'intérêt pharmacologique d'une molécule originale, le BM-573, capable d'inhiber la synthèse du TXA₂ et de bloquer son récepteur au niveau vasculaire.

Dans cette étude, nous étudions les effets du BM-573 sur l'hémodynamique pulmonaire et l'oxygénation artérielle au cours du choc endotoxique.

XI.2. Matériel et méthodes

Les expériences ont été réalisées sur 12 porcs sains pesant de 25 à 30 kg anesthésiés selon les modalités décrites au chapitre des méthodes générales .

La puissance des propriétés anti-agrégantes du BM-573 a été déterminée selon la méthode décrite précédemment (Dogne et al., 2000). La fraction plasmatique riche en plaquettes (PRP) a été obtenue à partir de la fraction surnageante après centrifugation pendant 20 minutes à 90 g (25°). Le sang restant a été centrifugé à 2000 g pendant 5 minutes (25°C) et la fraction surnageante a donné la fraction plasmatique pauvre en plaquettes (PPP). La concentration en plaquettes de PRP a été ajustée à 3.10^8 cells.mL⁻¹ grâce à une dilution avec du PPP. Les tests d'agrégation ont été réalisés selon la méthode turbidimétrique de Born à l'aide d'un agrégomètre à deux canaux (Chrono-log, Cordia, Leiden, The Netherlands). PPP a été utilisé pour ajuster la mesure photométrique à la densité optique minimale. PRP (225 µL) a été ajouté dans une cuvette silanisée et mélangé (1100 rpm). L'agrégation plaquettaire a été initiée par addition (5 µL) d'acide arachidonique (600 µM). Pour évaluer l'agrégation plaquettaire, l'augmentation maximale de transmission lumineuse a été déterminée à partir de la courbe d'agrégation 6 minutes après addition de l'inducteur.

XI.2.1. Protocole expérimental.

Après une période de 30 minutes de stabilisation (T0), les 12 animaux ont été répartis au hasard en deux groupes.

Tandis que dans le premier groupe (groupe Endo) les animaux ont reçu du placebo, dans le second groupe (groupe Anta), les animaux ont reçu de T0 à T300 une perfusion de 10 mg/kg/h de BM-573 pour atteindre une concentration stable de 14.11 ± 3.34 µg/ml. Chaque groupe a reçu une infusion de 0.5 mg/kg d'endotoxine (Lipopolysaccharide, Escherichia Coli serotype 0127:B8; Sigma Chemical, St Louis, MO) en 30 minutes (de T30 à T60).

Les données hémodynamiques ont inclus l'enregistrement de la PAP, l'onde de débit artériel pulmonaire, la pression auriculaire gauche, la pression artérielle, et la fréquence cardiaque. Ces paramètres ont été recueillis toutes les 30 minutes de T0 à T300 au cours d'une courte période d'apnée et stockés pour une analyse ultérieure. La pression auriculaire gauche a été maintenue stable au

cours de l'expérience grâce à l'administration de Ringer-lactate si nécessaire.

Des échantillons de sang artériel ont été prélevés toutes les 60 minutes pour mesurer les gaz sanguins (PO_2 and PCO_2), le pH, l'ionogramme et l'hématocrite à l'aide d'un analyseur (288 Blood Gas System analyser, CIBA-Corning, CA, USA). Un échantillon de sang a été aussi prélevé à T0, T30, T60, T180 et T300 avec du trisodium citrate (3.8% w/w) dans un tube de polypropylène pour déterminer le niveau d'agrégation plaquettaire. Le thromboxane B_2 (TXB_2), métabolite stable du TXA_2 , a été mesuré dans les échantillons de sang à T30, T60, T120, T180, T240 and T300 par un immunoassay à l'aide d'une enzyme spécifique (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA) selon les instructions du fabricant.

XI.2.2. Analyse des données.

L'analyse des données a été réalisée selon les méthodes décrites au chapitre des méthodes générales.

XI.3. Résultats

XI.3.1. Effets de la perfusion d'endotoxine

L'évolution au cours du temps des effets de l'endotoxine sur les variables hémodynamiques conventionnelles est présentée dans la *figure 11.1.*

La PAP moyenne a montré la réponse biphasique attendue suite à l'administration d'endotoxine. Sa valeur a atteint un premier maximum à T60 et est ensuite retournée directement à des valeurs inférieures, pour augmenter ensuite progressivement jusqu'à T300. A l'inverse, le niveau de pression artérielle systémique moyenne a diminué significativement ($p < 0.05$) de 95 ± 4 (T60) à 67 ± 4 mmHg (T90) et est resté inférieur à 60 mmHg de T120 à T240. A T270 et T300, la pression artérielle systémique moyenne est retournée à des valeurs supérieures à 60 mmHg, 63 ± 11 et $73 \pm$

11 mmHg, respectivement. Le débit sanguin moyen a diminué immédiatement après le début de l'infusion d'endotoxine et a ensuite diminué progressivement jusque à la fin de l'expérience.

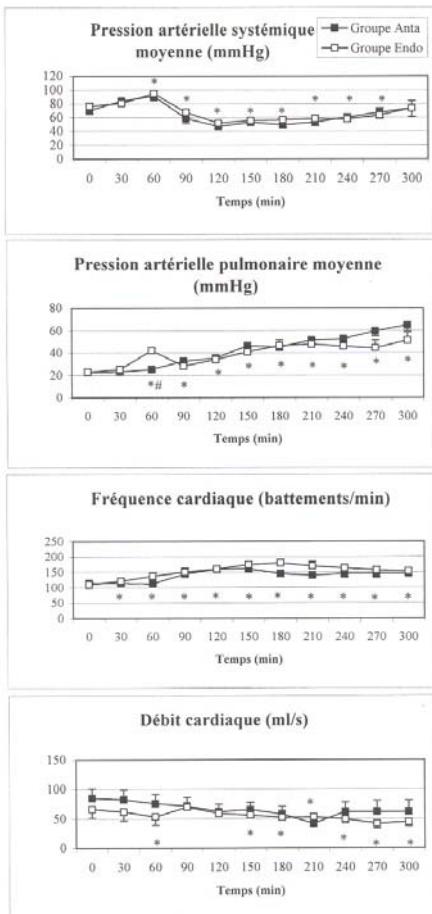


Figure 11.1.: Evolution des paramètres hémodynamiques conventionnels dans le groupe Endo et le groupe Anta.

* p < 0.05 vs T0 dans le groupe Endo

p < 0.05 groupe Endo vs groupe Anta

Les variables hémodynamiques pulmonaires, calculées à l'aide du modèle de windkessel à quatre éléments, sont présentées dans la *figure 11.2..*

R_1 a augmenté rapidement après le début de l'infusion d'endotoxine et a atteint un maximum à T90. Il a diminué légèrement à T120 et T150 pour rester ensuite à un niveau intermédiaire de T180 à T300. R_2 a montré un profil similaire aux modifications de PAP. C a diminué rapidement après le début de l'infusion d'endotoxine, et est ensuite retourné transitoirement à

des valeurs antérieures à l'administration de l'endotoxine à T90. Ensuite il a progressivement diminué jusqu'à T210 pour rester stable ensuite jusqu'à la fin de l'expérience. Ea a exprimé un profil similaire aux modifications observées pour la PAP et R_2 .

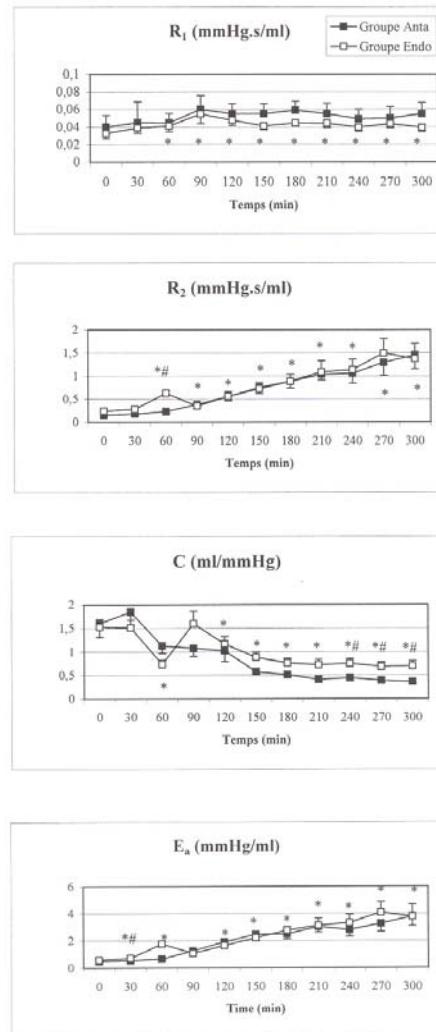


Figure 11.2.: Evolution des valeurs des paramètres du modèle de windkessel à quatre éléments dans le groupe Endo et Anta.

* $p < 0.05$ vs T0 dans le groupe Endo

$p < 0.05$ groupe Endo vs groupe Anta

Comme illustré dans la *figure 11.3.*, la PO_2 dans le groupe Endo a diminué de 131 ± 21 mmHg (T0) à 74 ± 12 mmHg (T300) ($p < 0.05$).

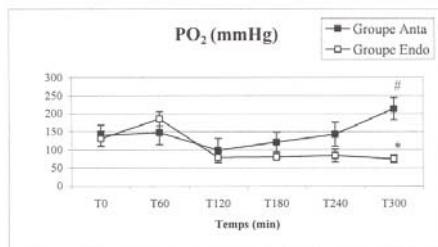


Figure 11.3.: Evolution de la pression artérielle en oxygène (PO_2) dans le groupe Endo et le groupe Anta.

* $p < 0.05$ vs T0 dans le groupe Endo

$p < 0.05$ groupe Endo vs groupe Anta

XI.3.2. Effets de la perfusion d'endotoxine au cours de l'administration de BM573

Comme illustré dans la *figure 11.1.*, l'infusion de BM573 n'a eu aucun effet sur l'évolution de la pression artérielle systémique, le débit cardiaque et la fréquence cardiaque après administration de l'endotoxine. Par contre, comparé avec le groupe Endo où la PAP moyenne a augmenté de 25 ± 2 mmHg (T30) à 42 ± 2 mmHg (T60), la PAP dans le groupe Anta a augmenté seulement de 23 ± 2 à 25 ± 2 mmHg après administration d'endotoxine. Une telle différence était significative au seuil de $p = 0.0001$. De T90 à T300 les valeurs de PAP moyenne ont évolué toutefois de manière semblable dans les deux groupes.

L'évolution de R_1 dans le groupe Anta a suivi celle observée dans le groupe Endo (*Figure 11.2.*). Par contre l'évolution de R_2 dans les deux groupes a été différente au cours de la phase initiale du choc septique. En effet, dans le groupe Anta, R_2 n'a pas augmenté de manière significative de T30 à T60 (0.18 ± 0.02 to

0.23 ± 0.03 mmHg.s/ml). R_2 a démarré son accroissement dès T90 pour suivre ensuite la même évolution que dans le groupe Endo. L'évolution de C a été parallèle dans les deux groupes, mais les valeurs de C ont été inférieures dans le groupe Anta à partir de T150 et jusque à la fin de la période expérimentale. Cependant, une telle différence a été trop faible pour avoir une quelconque signification sur le plan hémodynamique comme en témoignent les valeurs de Ea. A l'instar de la PAP et de R_2 , Ea a augmenté seulement de 0.53 ± 0.07 mmHg/ml (T30) à 0.66 ± 0.08 mmHg/ml (T60). Cette différence n'était pas significative. Toutefois, immédiatement après la fin de l'infusion d'endotoxine (T60), Ea dans le groupe Anta (0.66 ± 0.08 mmHg/ml) a été différent ($p = 0.0001$) de Ea dans le groupe Endo (1.76 ± 0.2 mmHg/ml). A partir de T90 jusqu'à la fin de la période expérimentale, il n'y a eu aucune différence de valeur de Ea entre les deux groupes.

Au contraire du groupe Endo, dans le groupe Anta, la PO_2 a augmenté de 140 ± 88 mmHg (T0) à 241 ± 31 mmHg (T300) au cours de l'expérience ($p = 0.5$). La différence entre les deux groupes à T300 était significative ($p = 0.02$) (*Figure 11.3.*).

Le pH artériel, la PCO_2 artérielle, l'ionogramme, et l'hématocrite sont restés dans les limites de la normale dans les deux groupes au cours de la période expérimentale.

XI.3.3. Effets du BM573 sur l'agrégation plaquettaire et la production de TXB₂

Comme le montre la *figure 11.4.*, l'infusion de BM573 a induit une inhibition significative de l'agrégation plaquettaire *ex vivo* activée par $600 \mu M$ d'acide arachidonique.

Cet effet inhibiteur a été observé de T30 à T360. Au contraire dans le groupe Endo, la capacité d'agrégation des plaquettes induite par l'acide arachidonique a été maintenue jusque à la fin de la période expérimentale.

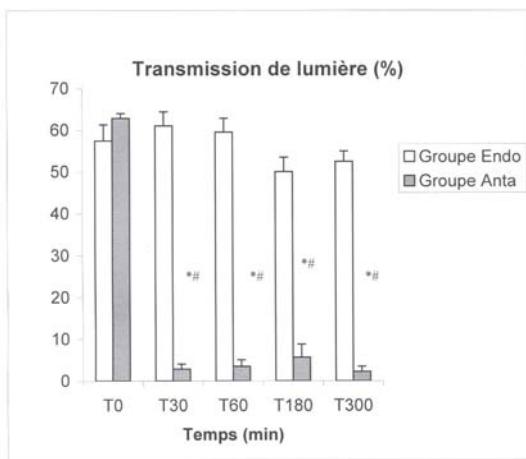


Figure 11.4.: Evolution de l'agrégation plaquettaire dans le groupe Endo et Anta mesurée par la transmission de lumière.

* p < 0.05 vs T0 dans le groupe Endo.

p < 0.05 groupe Endo vs groupe Anta

Comme le décrit la *figure 11.5.*, la production de TXB₂ est restée stable dans le groupe Anta au cours de l'expérience. Au contraire, dans le groupe Endo la production de TXB₂ a été multipliée par trois, 30 minutes après le début de l'infusion de l'infusion d'endotoxine (de 1528.73 pg/ml à 4949.18 pg/ml). Dans le même groupe, une augmentation plus faible de TXB₂ a été maintenue de T120 à T300.

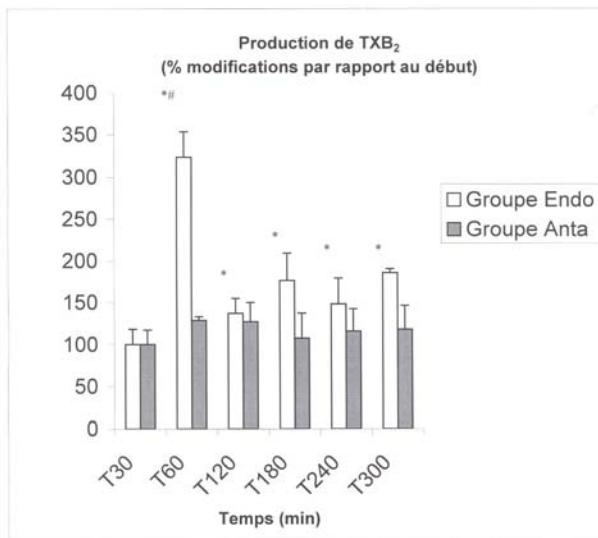


Figure 11.5.: Production de TXB₂ dans le groupe Endo et le groupe Anta.

* p < 0.05 vs T0 dans le groupe Endo

p < 0.05 groupe Endo vs groupe Anta

XI.4. Discussion

Les effets de la perfusion de faible dose d'endotoxine sur l'hémodynamique pulmonaire ont été décrits dans le chapitre 5. En substance, l'endotoxine est responsable d'une réponse vasculaire pulmonaire complexe incluant des modifications de R₁, R₂, et C (Lambertmont et al, 1999b). Nos conclusions font état d'une possible vasoconstriction pulmonaire initiale générée par la libération de TXA₂, alors que plus tard les modifications observées pourraient être liées à des lésions de la paroi vasculaire (Lambertmont et al, 1999b).

A partir de telles hypothèses pathogéniques, l'inhibition de la production des métabolites de l'acide arachidonique, principalement le TXA₂ et les prostaglandines, par des anti-inflammatoires non stéroïdiens au cours du choc septique a déjà été étudiée en détails chez l'animal et chez l'homme (Bernard et al.,

1997). Trois études utilisant de l'ibuprofène, un anti-inflammatoire non stéroïdien qui inhibe la production de TXA₂ et de prostacycline, ont été conduites chez des patients en choc septique. Ces études ont montré une faible réduction de mortalité, non significative (Bernard et al., 1991; Bernard et al, 1997; Haupt et al., 1991). L'augmentation de la pression artérielle systémique observée chez les patients en choc septique traités par ibuprofène trouve probablement son origine dans la réduction de la synthèse des prostaglandines (Wanecek et al., 1997). Cependant, puisque l'inhibition de la synthèse de prostaglandine augmente aussi les taux de cytokines au cours de l'endotoxémie, pareille résultante pourrait être responsable de l'absence d'effets globaux de l'ibuprofène (Spinas et al., 1991). En d'autres termes, bien qu'inhibiteur de la cyclooxygenase, le rôle protecteur de l'ibuprofène est atténué par l'augmentation des taux circulants de cytokine et par la dégranulation des leucocytes (Spinas et al, 1991).

Théoriquement, l'inhibition de l'action du TXA₂ peut être obtenue par deux types de molécules: les inhibiteurs de la synthèse du TXA₂ et les antagonistes des récepteurs au TXA₂.

Chez le mouton, l'inhibition de la synthèse du TXA₂ conduit à une augmentation de PAP 30 minutes après la perfusion d'endotoxine (Redl et al, 1991). Ces auteurs ont observé que les valeurs de PAP au cours des deux premières heures étaient significativement plus basses dans le groupe protégé par l'inhibition de la cyclooxygénase. Toutefois, les résistances vasculaires pulmonaires s'élevaient ensuite à un niveau identique au groupe témoin entre la troisième et la sixième heure de l'observation.

Utilisant un antagoniste des récepteurs au TXA₂ au cours de l'administration d'*Escherichia coli*, Jesmok et al. a montré que la phase précoce d'hypertension artérielle pulmonaire pouvait être inhibée bien que l'administration de cette molécule n'influait en rien sur le développement du choc septique et son évolution fatale (Jesmok & Gundel, 1995).

Effectivement, les antagonistes des récepteurs au TXA₂ pourraient s'avérer plus efficaces que les inhibiteurs de la synthèse du TXA₂ pour réduire la réponse hypertensive vasculaire pulmonaire précoce qui suit l'administration d'endotoxine. Cependant, ces résultats n'ont pas été confirmés par le travail de Iglesias et al.(Iglesias et al, 1994). Ces auteurs ont comparé

l'inhibition de la synthèse du TXA₂ et l'antagonisme des récepteurs au TXA₂ dans un modèle porcin de brûlure et n'ont trouvé aucune différence entre les deux molécules dans la prévention de l'hypertension artérielle pulmonaire (Iglesias et al, 1994). De plus, les antagonistes des récepteurs au TXA₂ étaient associés à une diminution de l'index cardiaque et à une vasoconstriction pulmonaire liée à l'inhibition de la synthèse de PGI₂. En fait, les inhibiteurs de la synthèse de TXA₂ utilisés seuls augmentent le taux sanguin de PGH₂ qui peut stimuler les récepteurs au TXA₂, alors que les antagonistes des récepteurs au TXA₂ utilisés seuls réduisent les taux sanguins de PGI₂.

Nos résultats confirment l'activité anti-agrégante du BM-573 puisque l'administration de celui-ci a empêché l'agrégation plaquettaire induite par l'acide arachidonique *ex vivo*. De plus, nous avons montré que le BM-573 peut bloquer complètement la phase précoce de l'hypertension artérielle pulmonaire qui suit l'administration d'endotoxine. La surproduction de TXB₂, attendue 30 minutes après l'administration d'endotoxine, a été absente dans le groupe Anta, confirmant ainsi l'action inhibitrice du BM-573 sur la synthèse du TXA₂. Dans ce groupe la production de TXB₂ est restée au niveau de base, lequel n'a pas été influencé par les inhibiteurs de la synthèse du TXA₂ (Uematsu et al., 1994). Dès lors, le BM-573 a prévenu l'accroissement de postcharge droite, mesurée par Ea, comparativement aux modifications attendues dans le groupe Endo à T60. L'absence de modifications des résistances vasculaires pulmonaires confirme donc que le TXA₂ est un médiateur clé de la réponse vasopressive pulmonaire de la phase initiale du choc endotoxinique.

Nos résultats montrent aussi que l'utilisation du BM-573 améliore l'oxygénation artérielle au cours de la perfusion d'endotoxine. En effet, dans le groupe Endo, la PO₂ a diminué alors que dans le groupe Anta la PO₂ est demeurée stable au cours de la période expérimentale. Cette différence d'évolution de la PO₂ entre les deux groupes était significative à T300 ($p = 0.02$). Bien que des taux sanguins élevés de TXA₂ ont été observés chez des patients présentant des lésions pulmonaires aiguës, suggérant que le TXA₂ est un médiateur important de ces lésions (Deby-Dupont et al., 1987), ces résultats semblent être en contradiction avec ceux de Suchner et al. qui ont rapporté que dans l'ARDS, le TXA₂ peut améliorer l'oxygénation en potentialisant le phénomène de vasoconstriction pulmonaire hypoxique (Suchner et al., 2001).

Cependant, TXA₂ est aussi un stimulateur de l'agrégation plaquettaire, promouvant l'adhérence des plaquettes au niveau de l'endothelium endommagé. L'adhérence des plaquettes et leur dégranulation conduit à la libération de médiateurs, aidant à perpétuer le cercle vicieux de l'agrégation leucocytaire sur l'endothelium lésé pour en augmenter les lésions. A ce titre, les leucocytes activés par la libération de radicaux libres et d'enzymes protéolytiques, jouent un rôle important dans les lésions pulmonaires aiguës (Suchner et al., 2002). En outre, Schuster et al. ont suggéré que l'inhibition du TXA₂ peut diminuer la veinoconstriction pulmonaire et donc la pression capillaire hydrostatique (Schuster et al, 2001). L'imidazole, un inhibiteur du TXA₂, est aussi susceptible de réduire la perméabilité des capillaires et la différence alvéolo-artérielle en oxygène dans un modèle de choc endotoxique canin (VanWylen et al., 1986). De cette manière, les antagonistes des récepteurs au TXA₂ pourrait conduire à la réduction de formation de l'oedème pulmonaire lésionnel (Brimioulle et al, 2002; Schuster et al, 2001).

XI.5. Conclusions

Ces résultats montrent que le TXA₂ joue un rôle majeur dans les modifications vasculaires pulmonaires observées au cours de la perfusion d'endotoxine. L'inhibition simultanée de la synthèse de TXA₂ et l'antagonisme des récepteurs au TXA₂ inhibent la réponse vasopressive pulmonaire précoce au cours du choc endotoxique. L'administration de BM-573 dans le choc endotoxique conduit à une amélioration de l'oxygénation probablement par la réduction du processus inflammatoire et de la composante oedémateuse alvéolaire.

Reste à déterminer d'une part si ces modifications circulatoires pulmonaires ont des répercussions sur le couplage ventriculo-artériel pulmonaire et d'autre part, si cette inhibition du TXA₂ a un effet sur la fonction ventriculaire intrinsèque. Ce sera l'objet du chapitre suivant.

XII. Chapitre 12: Effets du BM 573 sur le couplage ventriculo-artériel pulmonaire au cours du choc endotoxinique

**Effect of a novel thromboxane A2 inhibitor on right ventricular-
arterial coupling in endotoxic shock.**

Lambermont B, Kolh P, Ghuysen A, Segers P, Dogne JM, Tchana-Sato V,
Morimont P, Benoit P, Gerard P, Masereel B, D'Orio V.

Shock 2004 Jan;21(1):45-51

(Annexe 10)

XII.1. Introduction

Parmi les nombreuses complications du choc septique, la décompensation cardiaque droite peut conduire au décès (Kimchi et al, 1984). Dans ce contexte, il a été suggéré que l'altération de la fonction ventriculaire droite pourrait résulter d'un couplage inapproprié entre l'état d'inotropisme ventriculaire droit et l'impédance vasculaire pulmonaire (D'Orio et al, 1998).

Puisque le TXA₂ est impliqué dans l'accroissement des résistances vasculaires pulmonaires observée après l'administration d'endotoxine (Ogletree & Brigham, 1982; Redl et al, 1991; Wise et al, 1981), son inhibition semble une démarche logique visant à augmenter la performance ventriculaire droite et ainsi normaliser le couplage ventriculo-artériel pulmonaire.

Jusque à présent la plupart des études ont testé soit des inhibiteurs de la TXA₂ synthase (Mikashima & Muramoto, 1990; Redl et al, 1991) soit des antagonistes des récepteurs au TXA₂ (Altavilla et al., 1994; Jesmok & Gundel, 1995). Les résultats obtenus avec les inhibiteurs de la TXA₂ synthase sont décevants non seulement en raison d'une inhibition incomplète de la TXA₂ synthase, mais aussi parce que l'inhibition de la TXA₂ synthase induit une accumulation de l'endoperoxide H₂ (PGH₂), un précurseur du TXA₂, chimiquement plus stable et aux effets biologiques similaires à ceux du TXA₂ lui-même (FitzGerald et al., 1985). En outre les inhibiteurs spécifiques de la TXA₂ synthase sont aussi responsables d'une formation accrue de prostanoïdes tels que la prostaglandine I₂ qui est connue pour exercer un effet bénéfique potentiel par une diminution de l'agrégation plaquettaire, une diminution des résistances vasculaires et une réduction de la libération de leukotriènes (Altavilla et al, 1994; Fitzgerald et al., 1985; Redl et al, 1991; Tran et al., 2001). Ainsi, ces effets opposés rendent l'interprétation des résultats malaisée. La modulation des effets TXA₂ devrait se focaliser sur le choix d'agents capables de bloquer la biosynthèse du TXA₂ et d'antagoniser simultanément le PGH₂ et le TXA₂ au niveau de leur récepteur commun.

Au cours des chapitres 10 et 11, nous avons évalué les effets du nouvel inhibiteur du TXA₂, offrant à la fois des propriétés

d'inhibition de la TXA₂ synthase et d'antagoniste des récepteurs au TXA₂.

Afin d'étudier les effets de cette molécule sur le couplage ventriculo-artériel pulmonaire au cours du choc endotoxique, nous avons utilisé les indices de fonction ventriculaire et circulatoire pulmonaire décrits dans les deux premiers chapitres à savoir: la pente de la relation-pression volume de fin de systole et son intersection avec l'axe des volumes comme indice de contractilité, et l'élastance artérielle pulmonaire pour évaluer la postcharge ventriculaire droite.

XII.2. Matériel et méthodes

Douze animaux ont été préparés comme décrit précédemment au chapitre des méthodes générales pour analyser la fonction ventriculaire droite et les propriétés de la circulation pulmonaire.

XII.2.1. Protocole expérimental.

Après une période de stabilisation de 30 minutes (T0) les douze animaux ont été répartis en deux groupes et ont reçu une perfusion de 0.5 mg/kg d'endotoxine (Lipopolysaccharide, Escherichia Coli serotype 0127:B8; Sigma Chemical, St Louis, MO) en 30 minutes (de T30 à T60). Alors que dans le premier groupe (Endo groupe, n = 6) les animaux ont reçu une infusion de placebo, dans le second groupe (Anta groupe, n = 6), ils ont reçu de T0 à T300 une infusion de 10 mg/kg/h de BM-573 pour atteindre une concentration stable de 14.11 ± 3.34 µg/ml. A cette concentration, BM-573 bloque complètement l'activation des récepteurs au TXA₂ par le U-46619, un agoniste puissant du TXA₂ (Lambermont et al., 2003c).

Cette molécule a été obtenue au Laboratoire de Chimie Pharmaceutique de notre Université. Il a été dissout dans du propyléneglycol et de l'eau de manière à obtenir une solution mère de 20 mg/ml.

Les données hémodynamiques ont inclus l'onde de pression artérielle pulmonaire (PAP), l'onde de débit sanguin pulmonaire, la pression auriculaire gauche, la pression artérielle systémique, la fréquence cardiaque, la pression ventriculaire droite, le volume ventriculaire droit et les boucles pression-volume droites. Ces paramètres ont été enregistrés toutes les 30 minutes de T0 à T300 au cours d'une courte phase d'apnée et conservés pour une analyse ultérieure décrite au chapitre des méthodes générales. Un échantillon de sang artériel a été prélevé toutes les heures pour mesurer le pH, la PO₂, la PCO₂, l'excès de base, et le standard bicarbonate (288 Blood Gas System, CIBA-corning, CA, USA).

XII.2.2. Analyse des données.

XII.2.2.1. Circulation pulmonaire

Le modèle de windkessel à quatre éléments a été utilisé pour calculer l'élastance artérielle pulmonaire selon les méthodes décrites dans le chapitre des méthodes générales.

XII.2.2.2. Fonction ventriculaire droite

Des boucles pression-volume ventriculaires droites ont été obtenues et analysées à l'aide d'un cathéter à conductance selon les modalités décrites au chapitre des méthodes générales.

XII.3. Résultats

XII.3.1. Effets de la perfusion d'endotoxine sur les variables hémodynamiques conventionnelles.

L'évolution au cours du temps des effets de l'endotoxine sur les variables hémodynamiques conventionnelles est présentée dans la *figure 12.1.*..

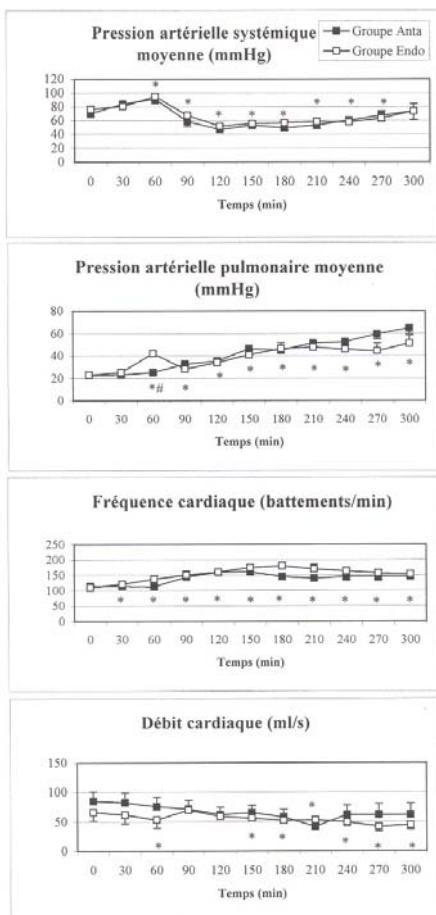


Figure12.1.:
Evolution des paramètres
hémodynamiques
conventionnels au cours
du choc endotoxinique
induit par la perfusion
d'endotoxine dans le
groupe Endo et le groupe
Anta.

* $p < 0.05$ vs T0 dans le
groupe Endo

$p < 0.05$ groupe Endo vs
groupe Anta

La PAP moyenne dans le groupe Endo a atteint un premier maximum à T60 (c'est à dire 30 minutes après le début de l'infusion d'endotoxine), et est ensuite retournée à des valeurs inférieures, pour augmenter progressivement jusque T300. Au contraire, la pression artérielle systémique moyenne a diminué de 95 ± 4 (T60) à 67 ± 4 mmHg (T90) ($p < 0.05$) et est restée inférieure à 60 mmHg de T120 à T240. A T270 et T300, elle est retournée à des valeurs supérieures à 60 mmHg, 63 ± 11 and 74 ± 11 mmHg, respectivement. Le débit cardiaque moyen a diminué immédiatement après le début de l'infusion d'endotoxine, et a diminué de façon progressive jusque à la fin de la période expérimentale. La fréquence cardiaque a augmenté de 110 ± 7 (T0) à 137 ± 12 battements/min (T60) après l'infusion d'endotoxine, et est restée supérieure à 150 battements/min jusque à la fin de la période expérimentale.

XII.3.2. Effets de la perfusion d'endotoxine sur les volumes ventriculaires.

L'évolution du volume télendiastolique ventriculaire droit est décrite dans la *figure 12.2.*

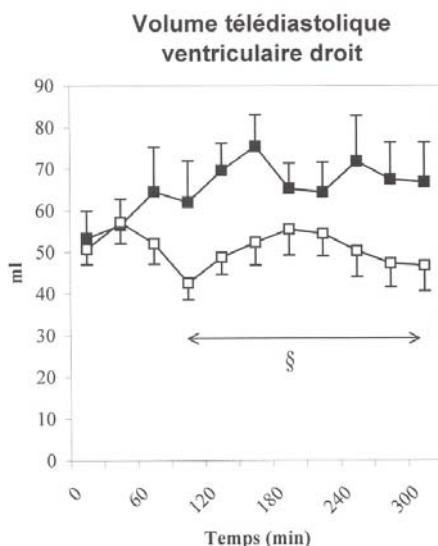


Figure 12.2.: Evolution du volume télendiastolique ventriculaire droit au cours du choc endotoxique dans le groupe Endo (■) et le groupe Anta (□). Les valeurs de p pour les interactions temps, groupe et groupe-temps sont données par une analyse de variance pour mesures répétées à deux facteurs.

§ $p < 0.05$ pour l'effet du groupe.

Dans le groupe Endo il a augmenté de 53 ± 6 ml (T0) à 64 ± 11 ml ($p < 0.05$) à la fin de l'infusion d'endotoxine (T60) et est ensuite resté inchangé jusque à la fin de la période expérimentale. Par contre, le volume systolique ventriculaire droit a diminué progressivement de 33 ± 5 ml (T0) à 21 ± 4 ml (T300) ($p < 0.05$) au cours de l'expérience. Par conséquent, la fraction d'éjection a diminué progressivement de $62 \pm 2\%$ (T0) à $33 \pm 5\%$ (T300) ($p < 0.05$) (Figure 12.3.).

Fraction d'éjection

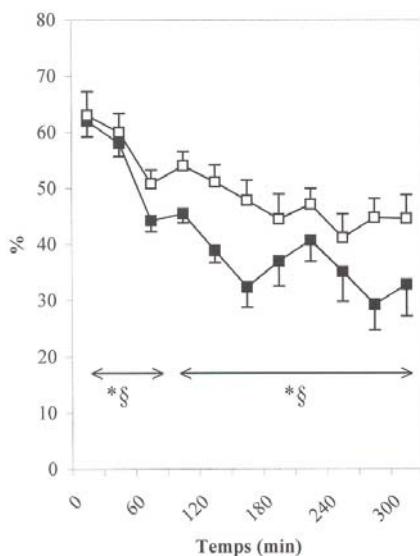


Figure 12.3.: Evolution de la fraction d'éjection au cours du choc endotoxique dans le groupe Endo (■) et le groupe Anta (□). Les valeurs de p pour les interactions temps, groupe et groupe-temps sont données par une analyse de variance à deux facteurs pour mesures répétées.

§ $p < 0.05$ pour l'effet du groupe

* $p < 0.05$ pour l'effet du temps

$p < 0.05$ pour l'effet groupe-temps

XII.3.3. Effets de la perfusion d'endotoxine sur les variables hémodynamiques calculées.

E_a dans le groupe Endo a montré un profil similaire aux modifications observées pour la PAP (Figure 12.4.).

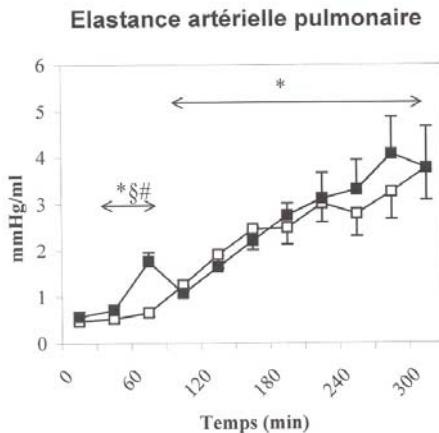


Figure 12.4.: Evolution de l'élastance artérielle pulmonaire au cours du choc endotoxique dans le groupe Endo (■) et le groupe Anta (□). Les valeurs de p pour les interactions temps, groupe et groupe-temps sont données par une analyse de variance à deux facteurs pour mesures répétées.

§ $p < 0.05$ pour l'effet du groupe

* $p < 0.05$ pour l'effet du temps

$p < 0.05$ pour l'effet groupe-temps

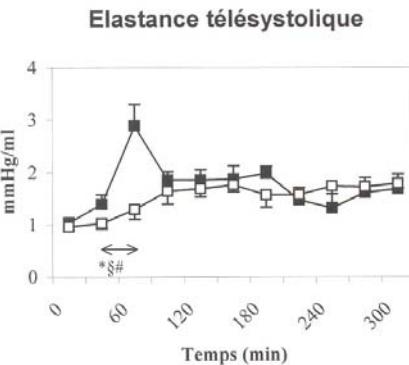


Figure 12.5.: Evolution de l'élastance télésystolique ventriculaire droite au cours du choc endotoxique dans le groupe Endo (■) et le groupe Anta (□). Les valeurs de p pour les interactions temps, groupe et groupe-temps sont données par une analyse de variance à deux facteurs pour mesures répétées.

§ $p < 0.05$ pour l'effet du groupe

* $p < 0.05$ pour l'effet du temps

$p < 0.05$ pour l'effet groupe-temps

Au cours de la première heure, les valeurs de Ees dans le groupe Endo ont augmenté de 1.0 ± 0.1 mmHg/ml (T0) à 2.9 ± 0.4 mmHg/ml (T60) ($p < 0.05$) et sont restées plus élevées que les valeurs de base au cours du reste de la période expérimentale (*Figure 12.5.*). Dans le groupe Endo, Ees/Ea est resté à une valeur de couplage optimale de 2 de T0 à T90. A partir de T120, le couplage ventriculo-artériel pulmonaire s'est progressivement dégradé et a atteint une valeur de 0.5 (T300) à la fin de la période expérimentale (*Figure 12.6.*).

Couplage ventriculo-artériel pulmonaire

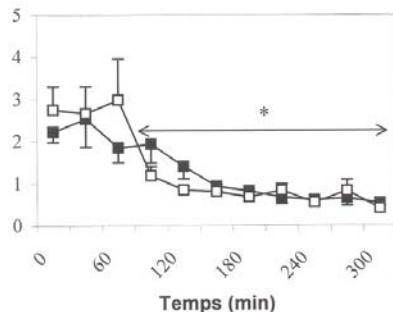


Figure 12.6.: Evolution du couplage ventriculo-artériel pulmonaire au cours du choc endotoxique dans le groupe Endo (■) et le groupe Anta (□). Les valeurs de p pour les interactions temps, groupe et groupe-temps sont données par une analyse de variance à deux facteurs pour mesures répétées.

§ $p < 0.05$ pour l'effet du groupe

* $p < 0.05$ pour l'effet du temps

$p < 0.05$ pour l'effet groupe-temps

Dans le groupe Endo, l'efficience mécanique ventriculaire droite a diminué de manière significative ($p < 0.05$) de $65 \pm 2\%$ (T_0) à $45 \pm 5\%$ à la fin de la période expérimentale (T_{300}) (Figure 12.7.).

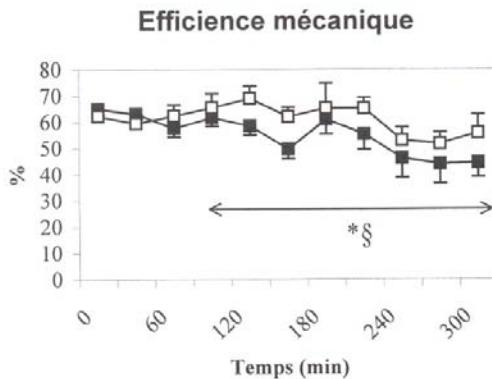


Figure 12.7.: Evolution de l'efficience mécanique ventriculaire droite au cours du choc endotoxique dans le groupe Endo (■) et le groupe Anta (□). Les valeurs de p pour les interactions temps, groupe et groupe-temps sont données par une analyse de variance à deux facteurs pour mesures répétées.

§ $p < 0.05$ pour l'effet du groupe

* $p < 0.05$ pour l'effet du temps

XII.3.4. Effets de la perfusion d'endotoxine au cours de l'administration de BM-573 sur les variables hémodynamiques conventionnelles.

Comme le montre la *figure 12.1.*, l'administration de BM-573 n'a pas eu d'effets sur l'évolution de la pression artérielle systémique, du débit cardiaque moyen et de la fréquence cardiaque après l'infusion d'endotoxine. Par contre, comparées avec le groupe Endo où la PAP moyenne a augmenté d'un valeur basale de 23 ± 2 mmHg à 42 ± 2 mmHg à T60, dans le groupe Anta, les valeurs de PAP moyenne à T60 (25 ± 2 mmHg) n'ont pas été différentes des valeurs de base (23 ± 2 mmHg). Une telle différence de valeur de PAP à T60 entre les deux groupes a été significative sur le plan statistique ($p = 0.0001$). A partir de T90 jusqu'à T300, cependant, l'évolution des valeurs moyennes de PAP a été similaire dans les deux groupes.

XII.3.5. Effets de la perfusion d'endotoxine au cours de l'administration de BM-573 sur les volumes ventriculaires droits.

Comme dans le groupe Endo, le volume systolique a diminué progressivement de 31 ± 3 ml (T0) à 20 ± 3 ml (T300) ($p < 0.05$) au cours de l'expérience. Cependant, contrairement au groupe Endo dans lequel les valeurs de volume télediastolique sont restées plus élevées que les valeurs de base au cours de la période expérimentale, dans le groupe Anta, les valeurs de volume télediastolique n'ont pas dépassé les valeurs de base de 55 ml (*Figure 12.2.*). Comme dans le groupe Endo, la fraction d'éjection a diminué dans le groupe Anta de $63 \pm 4\%$ (T0) à $45 \pm 5\%$ (T300) ($p < 0.05$). Cependant, la fraction d'éjection a été plus élevée dans le groupe Anta que dans le groupe Endo à T90, T120, T150 et T270 ($p < 0.05$) (*Figure 12.3.*).

XII.3.6. Effets de la perfusion d'endotoxine pendant l'administration de BM-573 sur les variables hémodynamiques calculées.

Comme décrit dans la *figure 12.4.*, Ea dans le groupe Anta n'a pas augmenté significativement entre T30 et T60. Par conséquent, Ea dans le groupe Anta était différent à T60 (0.66 ± 0.08 mmHg/ml) de Ea calculé dans le groupe Endo (1.76 ± 0.20 mmHg/ml) ($p = 0.0001$). A partir de T90 jusque à la fin du protocole expérimental, l'évolution de Ea a été similaire dans les deux groupes (*Figure 12.4.*).

L'évolution de R_2 a été différente dans les deux groupes au cours de la phase précoce du choc endotoxique. En effet dans le groupe Anta, R_2 n'a pas augmenté de manière significative de T30 à T60 (0.18 ± 0.02 to 0.23 ± 0.03 mmHg.s/ml), pour commencer à augmenter à T90 et, ensuite, suivre exactement la même évolution que R_2 dans le groupe Endo.

Dans le groupe Anta, Ees a augmenté progressivement de 0.96 ± 0.07 mmHg/ml (T0) à 1.78 ± 0.8 mmHg/ml (T300) ($p <$

0.05). A T60, la valeur Ees dans le groupe Anta (1.29 ± 0.19 mmHg/ml) a été significativement plus basse que dans le groupe Endo (2.89 ± 0.42 mmHg/ml) (*Figure 12.5.*). La valeur du rapport Ees/Ea dans le groupe Anta n'a pas été significativement différente celle dans le groupe Endo du début à la fin de la période expérimentale.

Comme décrit dans la *figure 12.5.*, l'efficience ventriculaire droite est restée inchangée du début à la fin de la période expérimentale T300 ($62 \pm 3\%$ et $57 \pm 6\%$, respectivement).

Tout au long de la période expérimentale, le pH artériel, la PCO_2 , l'ionogramme, et l'hématocrite sont restés dans les limites de la normale dans les deux groupes.

XII.4. Discussion

Nos données montrent que dans un modèle porcin de choc endotoxique, l'administration de BM-573 abolit la phase précoce d'hypertension artérielle pulmonaire, et préserve l'efficience ventriculaire droite.

Les effets de la perfusion d'endotoxine sur l'hémodynamique circulatoire pulmonaire et le couplage ventriculo-artériel pulmonaire ont été précédemment décrits dans notre laboratoire (D'Orio et al, 1998; Lambermont et al, 1999b). Il a été suggéré à la suite de ces travaux que les modifications précoces de PAP résultant de l'administration d'endotoxine sont associées à la libération de TXA_2 , alors que les modifications plus tardives pourraient être en relation avec des altérations de la paroi vasculaire et une diminution de production de NO (Berger et al, 1993; D'Orio et al, 1998; Lambermont et al., 1999a; Myers et al, 1992; Weitzberg et al, 1993).

L'adaptation ventriculaire droite à une augmentation brutale de postcharge peut être obtenue par deux mécanismes différents, mais complémentaires: la régulation hétérométrique (le mécanisme de Frank-Starling) et la régulation homéométrique. Au cours de la régulation hétérométrique, le volume éjecté est stable grâce aux modifications de précharge ventriculaire droite, c'est à dire du volume de fin de diastole, alors que la contractilité demeure inchangée. Au contraire, au cours de la régulation homéométrique,

la contractilité ventriculaire droite, c'est à dire Ees, augmente pour maintenir le volume éjecté tandis que le volume ventriculaire de fin de diastole reste inchangé. Des études réalisées au préalable chez le mouton soumis à un choc septique ont suggéré que la réponse ventriculaire droite à la surcharge en pression consistait à la fois en une augmentation de contractilité et une augmentation de volume ventriculaire droit (mécanisme de Frank-Starling) (Hon et al, 2001). Chez de jeunes agneaux soumis à un accroissement de postcharge droite, le débit cardiaque droit est maintenu en raison de la seule régulation homéométrique (De Vroomen et al, 2000; De Vroomen et al, 2001). Chez le chien soumis à l'endotoxine, D'Orio et al. ont montré que l'altération de la performance cardio-vasculaire est due à un couplage inapproprié entre l'état d'inotropisme ventriculaire et la post charge ventriculaire droite (D'Orio et al, 1998).

Dans le présent travail, l'adaptation ventriculaire droite au cours de la phase précoce de l'hypertension artérielle pulmonaire induite par l'administration d'endotoxine (T60) a été obtenue à la fois par la mise en place de la régulation homéométrique et de la régulation hétérométrique. En effet, tant Ees que le volume ventriculaire de fin de diastole ont augmenté et le couplage ventriculo-vasculaire pulmonaire a été maintenu à un niveau d'efficience maximal. De manière surprenante, une heure plus tard (T120), face au même accroissement de postcharge (Ea), le ventricule droit n'a plus pu maintenir sa contractilité à un niveau aussi élevé, et par conséquent, le couplage ventriculo-vasculaire pulmonaire est passé de valeurs supérieures à 2 à des valeurs inférieures à 1.

Dans le groupe Anta, en raison de la suppression de la réponse pulmonaire vasopressive précoce par le BM-573, Ees n'a pas augmenté à T60 et le couplage ventriculo-vasculaire est resté intact. Plus tard (T120), comme dans le groupe Endo, Ees n'a pas augmenté suffisamment pour maintenir le couplage ventriculo-vasculaire au niveau optimal.

Ces résultats suggèrent que, une heure après la fin de la perfusion d'endotoxine (T120), la régulation homéométrique est altérée et que ce phénomène n'est pas prévenu par les inhibiteurs du TXA₂ puisque l'évolution délétère du couplage ventriculo-vasculaire a été semblable dans les deux groupes. Cependant, alors que le volume ventriculaire de fin de diastole a augmenté progressivement dans le groupe Endo, il est resté proche des

valeurs de base dans le groupe Anta. Par conséquent, dans le groupe Endo, l'efficience ventriculaire droite a diminué.

Au cours d'une augmentation de postcharge ventriculaire gauche, la régulation homéométrique est expliquée par une augmentation de la perfusion coronaire secondaire à une augmentation de la pression aortique. Dans ce travail, en raison de l'hypotension artérielle systémique, une telle régulation homéométrique ventriculaire droite ne peut être induite par une augmentation de la perfusion coronaire mais plutôt par des mécanismes tels que l'activation mécanique des canaux par leur étirement, la libération de catécholamines endogènes, ou la libération de facteurs inotropes à partir de l'endothélium endocardique (De Vroomen et al, 2000). Le mécanisme précis par lequel la régulation homéométrique apparaît réduite par l'administration d'endotoxine mérite des investigations complémentaires. Une hypothèse explicatrice est basée sur la redistribution des circulations régionales au détriment de la circulation coronaire (Sibelius et al, 2000), de telle sorte que le débit myocardique est privé de toute adaptation à la demande accrue d'oxygène (Bloos et al, 1996). Ces anomalies de performance cardiaque sont largement attribuées à la formation de TXA₂ (Sibelius et al, 2000). C'est probablement en inhibant les effets délétères du TXA₂ sur la perfusion myocardique, mais aussi en améliorant l'oxygénéation artérielle que la diminution de l'efficience ventriculaire droite est prévenue par le BM-573. Cependant, puisque la perte de la régulation homéométrique a été semblable dans les deux groupes, la dépression myocardique progressive observée est nécessairement causée par d'autres agents que le TXA₂.

L'augmentation de fréquence cardiaque observée dans ce travail est principalement due à l'intervention du réflexe barosensible. En présence d'une hypotension systémique, la fréquence cardiaque a augmenté de manière similaire dans les deux groupes. Cette augmentation de fréquence cardiaque peut expliquer partiellement l'augmentation de Ea comme le prévoit l'équation 2.2. Cependant, comme la fréquence cardiaque a été semblable dans les deux groupes, d'autres facteurs ont dû entrer en ligne de compte pour expliquer la différence d'évolution de Ea entre les deux groupes. En effet, comme le suggèrent les modifications spécifiques de R₂, les différences de Ea entre les

deux groupes trouvent une origine au sein du comportement des résistances vasculaires pulmonaires.

XII.5. Conclusions

Dans ce chapitre nous avons montré que le BM-573 atténue la phase précoce de l'hypertension artérielle pulmonaire induite par l'endotoxine, et prévient la diminution de l'efficience myocardique et la dilatation ventriculaire droite.

Discussion et conclusions générales

De la nécessité d'un modèle cardio-circulatoire pulmonaire.

Depuis Permutt et al (Permutt et al., 1962), on sait que les propriétés mécaniques du réseau vasculaire pulmonaire peuvent être décrites par l'établissement des relations entre les variations de pression et celles du débit correspondant. C'est à partir d'une telle analyse que Mitzner et Sylvester ont démontré que l'hypoxie alvéolaire engendre un relèvement de la relation pression-débit, parallèlement à elle-même, vers des niveaux plus élevés de pression (Mitzner & Sylvester, 1981). De cette conception est né le modèle circulatoire pulmonaire qui met en jeu l'apparition d'une fermeture critique de ce réseau vasculaire, responsable du déplacement vers le haut de la relation pression-débit, observé dans certaines situations.

Ainsi, dans le modèle ohmique, la résistance est-elle décrite par une relation $P = RQ$ qui passe par l'origine des axes. Dans le modèle de Mitzner, la résistance prend la forme générale $P = RQ + P_C$. Si l'on admet volontiers que R équivaut à la pente de la relation pression-débit et représente l'ensemble des forces qui s'opposent à l'écoulement, il est plus malaisé d'attribuer à P_C sa signification physiologique. Dans un tel modèle, on peut assimiler P_C à un résistor de Starling où le débit ne s'installe que si une pression supérieure à une valeur critique de fermeture est d'abord atteinte (pression transmurale positive), rejoignant ainsi le point de vue mécanique du recrutement circulatoire pulmonaire. On peut également confondre P_C avec les propriétés mécaniques de compliance, faisant du réseau pulmonaire un circuit doté de distensibilité. L'un et l'autre des concepts, recrutement et distensibilité, ou encore leur association, peuvent rendre compte de P_C au sein de la relation générale $P = RQ + P_C$.

Dès lors, dans le modèle ohmique, toutes les propriétés mécaniques du circuit vasculaire sont réunies dans le seul terme R : la résistance traduit ici à la fois la capacité du réseau à se distendre mais aussi l'importance des forces de friction qui s'opposent à

l'écoulement du sang. Dans le modèle de Mitzner, s'ajoute à l'origine la notion de pression transmurale qui implique l'ouverture préalable du circuit. Ni l'un, ni l'autre de ces modèles ne permet réellement de quantifier, en les dissociant, les propriétés résistives des propriétés capacitatives qui caractérisent tout circuit vasculaire (Gorback, 1990). Ainsi, dans son analyse de la signification du calcul de la résistance vasculaire pulmonaire, Naeije considère que les propriétés mécaniques du réseau vasculaire issues des relations pression-débit, s'expriment selon le régime circulatoire actuel (Naeije, 2003). Cet auteur considère en effet que si la pression artérielle pulmonaire est très réduite, seuls quelques vaisseaux du réseau sont partiellement ouverts, alors que les autres sont clos. La résistance ohmique est alors maximale. A mesure que la pression artérielle s'accroît, les premiers vaisseaux se distendent alors que les autres s'ouvrent, dans un ordre qui est fonction de la valeur de leur pression critique de fermeture. Dans ces circonstances circulatoires, la résistance décroît avec l'accroissement progressif de la pression de perfusion. Ce constat renforce bien le concept que de tels modèles circulatoires, englobent sous une même notion de résistance des propriétés mécaniques vasculaires variées.

Notre souci analytique était double. D'abord quantifier les effets fondamentaux du choc septique sur les déterminants mécaniques vasculaires pulmonaires. Ensuite, réunir ces éléments sous la forme d'un indice circulatoire qui caractériserait la contrainte à l'éjection ventriculaire droite et déterminer ainsi l'intervalle physiologique de couplage et son écart en de telles situations pathologiques. Outre la problématique du choix d'un modèle circulatoire, un autre ordre de difficulté est de nature conceptuelle.

En effet, l'étude clinique des manifestations circulatoires pulmonaires rencontre de nombreux obstacles dont le caractère disparate des populations de patients atteints de choc septique. D'une part, les stades d'évolution de l'affection souffrent d'une grande variabilité au moment de leur prise en charge. D'autre part, le tableau clinique observé n'est généralement pas représentatif des seules anomalies du choc, mais résulte d'un ensemble complexe où se mêlent les effets des thérapeutiques antérieures, et les caractères propres du terrain qui a fait le lit à l'atteinte septique en cause.

Dès lors, la recherche des mécanismes physiopathologiques qui génèrent les désordres du couplage ventriculo-artériel

pulmonaire dans le choc septique nous a imposé le recours à un modèle animal. Seule cette approche offre les conditions d'une analyse précise, tant par le contrôle des conditions expérimentales que par la mise en œuvre d'un ensemble de techniques inaccessibles à l'exploration clinique.

Le modèle du choc septique.

Depuis une trentaine d'années, on s'accorde à considérer que l'endotoxine est à l'origine de la plupart des perturbations circulatoires du choc septique provoqué par les germes Gram négatif. L'injection d'une dose massive d'endotoxine, tel le bolus de 10 mg/kg, conduit à des manifestations circulatoires simulant d'emblée la phase hypodynamique du choc septique. Une dose faible, de l'ordre de 1 mg/kg fait apparaître un état hyperdynamique transitoire. De l'étude antérieure originale menée dans notre laboratoire, nous avons montré que la mise en œuvre d'une perfusion de faibles doses d'endotoxine, de 250 ng/kg.min durant 2 heures chez le chien (D'Orio et al, 1987; D'Orio, 1993) ou de 0.5 mg/kg en 30 minutes chez le porc (Lambertmont et al, 1999b) reproduit un tableau où se retrouvent les caractères hémodynamiques de la phase précoce du choc septique. Au plan biologique, un tel modèle s'accompagne de la production des médiateurs du choc septique, TNF –alpha et interleukine 1, selon une séquence semblable à la clinique humaine.

Nous avons estimé que ces éléments démontraient la représentativité que notre modèle offre de la phase initiale du choc septique.

Le modèle de windkessel à quatre éléments.

L'identification des facteurs circulatoires pulmonaires passe nécessairement par l'utilisation d'artifices techniques puisqu'elle s'adresse à des propriétés telles l'inertie, les résistances élastiques et les résistances visqueuses qui ne peuvent être autrement isolées de l'ensemble. L'artifice que nous avons choisi est le modèle de windkessel dont la composition varie avec la complexité des propriétés mécaniques visées par l'analyse. Notre travail de doctorat a consisté à justifier le choix d'un modèle à quatre

éléments et à définir une méthode d'analyse originale qui fournit une identification simultanée de tous les paramètres qui composent le modèle (Lambermont, 1998).

D'autres travaux menés au sein de notre laboratoire nous ont permis de démontrer la stricte correspondance entre les paramètres interrogés par ce modèle tels l'inertance, la compliance vasculaire, les résistances offertes au flux sanguin, et les phénomènes physiologiques considérés. Ainsi, l'incorporation d'une compliance physique mise en parallèle avec l'aorte proximale (Kolh et al., 2000) ou encore la réalisation d'une résistance en série par une constriction aortique (Kolh et al, 2003) sont autant d'états qui sont parfaitement et très précisément détectés et appréciés par l'application du modèle de windkessel à quatre éléments.

Avec Sunagawa (Sunagawa et al, 1983), nous avons considéré que l'élastance artérielle (E_a) regroupait au mieux les caractéristiques mécaniques qui s'opposent à l'éjection ventriculaire, paramètre de caractérisation circulatoire globale que nous recherchions.

A partir des mesures des constantes circulatoires pulmonaires offertes par le modèle de windkessel à 4 éléments, nous étions en mesure d'exprimer la charge opposée à l'éjection ventriculaire droite par E_a sans introduire d'éléments perturbateurs du système, et requis pour sa propre mesure.

Le modèle de contractilité ventriculaire.

A la suite des travaux de Suga et Sunagawa, on s'accorde pour considérer que le modèle de la pente d'élastance télésystolique regroupe l'ensemble des préoccupations des physiologistes relatives à l'évaluation de la propriété intrinsèque de contractilité ventriculaire (Suga & Sagawa, 1974). Pareille relation fournit en effet un indice de contractilité indépendant des autres facteurs qui conditionnent la performance ventriculaire dont la précharge et la postcharge.

Idéalement, sa mesure devrait s'opérer en l'absence de toutes formes de perturbations des conditions de travail du ventricule considéré, ce qu'offre théoriquement la méthode basée sur l'enregistrement d'une boucle pression-volume ventriculaire isolée.

Nous avons comparé les valeurs de contractilité obtenues par une approche basée sur une boucle pression-volume issue d'un battement unique, à celles qui étaient générées par une série de boucles pression-volume en faisant varier la précharge ventriculaire droite. Nos conclusions rejoignent celles de Kjorstad (Kjorstad et al, 2002), suggérant que la méthode par battement unique n'offre vraisemblablement pas d'évaluation satisfaisante du niveau de contractilité pour la cavité droite (Lambertmont et al, 2004b). En effet, les résultats que nous avons présentés au chapitre 4 objectivent le manque de sensibilité de la méthode, notamment lors de la perfusion d'un agent réputé inotope positif ou négatif. C'est la raison pour laquelle, bien que d'application fastidieuse, nous avons opté dans ce mémoire pour un modèle de calcul de la contractilité issu d'une succession de boucles pression-volume.

Munis de ces outils d'exploration de la circulation pulmonaire et de la fonction ventriculaire droite, nous avons mené l'étude actuelle des mécanismes physiopathologiques du couplage ventriculo-artériel pulmonaire au cours du choc septique expérimental.

Quelle est la nature de la réponse vasomotrice pulmonaire qu'engendre l'administration d'endotoxine dans notre modèle ?

Nous démontrons qu'une réponse hypertensive pulmonaire biphasique apparaît sous l'effet de l'administration d'endotoxine. Notre modèle circulatoire montre que l'hypertension pulmonaire initiale est générée par un accroissement de la résistance distale. Au contraire, nous attribuons la responsabilité de la seconde période d'hypertension à la chute prédominante de la compliance vasculaire pulmonaire (Lambertmont et al, 1999b).

Ce double mécanisme montre les limites interprétatives qui auraient été les nôtres par l'utilisation d'un modèle circulatoire linéaire ohmique. En effet, les deux phases s'accompagnent d'un accroissement du gradient longitudinal de pression vasculaire pulmonaire qui, en présence d'un débit cardiaque pratiquement inchangé, aurait suggéré l'intervention biphasique d'un même processus de vasoconstriction.

Par l'utilisation du modèle de Permutt, D'Orio et al (D'Orio et al., 1992a) ont montré dans notre laboratoire, que la perfusion d'endotoxine s'accompagnait non seulement d'une élévation

précoce de la pente de la relation pression-débit mais aussi d'une extrapolation à l'ordonnée plus tardivement déplacée vers le haut. Ces auteurs ont attribués ces modifications à une vasoconstriction du réseau artériel en phase précoce, et à l'apparition plus lente d'un résistor de Starling. La précision de ces altérations leur ont finalement permis de situer la fermeture critique des vaisseaux sur la portion veinulaire du circuit pulmonaire. Ces auteurs ont ainsi suggéré que de telles altérations circulatoires pouvaient également contribuer à l'installation d'un œdème pulmonaire hydrostatique (D'Orio, 1993). Ces résultats ont ensuite été confirmés par d'autres auteurs. Ainsi, la seconde phase hypertensive ne serait pas liée, sensu stricto, à une vasoconstriction mais au relèvement de la pression d'aval par la création d'un phénomène de chute d'eau. En d'autres termes, la perfusion d'endotoxine fait naître une pression critique de fermeture qui établit une séparation mécanique entre l'amont de la circulation pulmonaire et son aval naturel, l'oreillette gauche. Par une approche héodynamique différente, nos résultats actuels corroborent de telles conclusions préliminaires. En effet, le recours au modèle circulatoire de windkessel à 4 éléments suggère un accroissement de la résistance périphérique R_2 en phase précoce et une chute de la compliance vasculaire C en période plus tardive du choc endotoxique (Lambermont et al, 1999b). Le faible délai nécessaire à l'expression de cette variation de compliance rend peu vraisemblable une origine liée à une atteinte structurelle de la paroi vasculaire, mais favorise plutôt un mécanisme pathologique dont une modification du tonus propre et un environnement oedémateux. En effet, la relation de compliance n'est probablement pas linéaire mais dépend du tonus propre de base et de l'état de distension pariétale, responsables d'une hausse ou d'une baisse des propriétés de distensibilité. Afin de concilier l'ensemble de ces résultats, nous formulons l'hypothèse que par l'installation d'une fermeture critique et d'un œdème alvéolaire environnant, le réseau artériel d'amont est rendu plus distendu et de ce fait, manifeste une compliance moindre à l'à-coup systolique.

A quel mécanisme répondent les effets de l'endotoxine sur la circulation pulmonaire ?

Nous montrons que la perfusion de TXA₂ conduit à des effets vasomoteurs pulmonaires qui sont analogues aux altérations précoces de l'administration d'endotoxine dans notre modèle, tant

par son action vasomotrice que par la chute de compliance vasculaire (Lambermont et al, 2003c). Par ailleurs, nos expériences démontrent que ce médiateur est rapidement libéré par l'endotoxine, selon une cinétique qui relie la production de TXA₂ aux altérations hémodynamiques pulmonaires (Lambermont et al, 2003a). Le recours à un inhibiteur mixte expérimental, le BM-573 qui agit à la fois sur la synthèse du TXA₂ et son récepteur, suggère le blocage partiel des altérations hémodynamiques précoces attendues par l'administration d'endotoxine. Nos résultats démontrent aussi qu'un tel médiateur n'est actif que de manière temporaire (Lambermont et al, 2003a; Lambermont et al., 2004a). Au cours des deux heures qui suivent le début de la perfusion d'endotoxine, l'inhibition du TXA₂ ne prévient ni la vasoconstriction pulmonaire, ni la chute retardée de compliance vasculaire. Pareilles observations contribuent ainsi à confirmer le rôle probablement déterminant du TXA₂ dans la réponse hypertensive pulmonaire de la phase précoce du choc endotoxinique, mais suggèrent aussi que d'autres médiateurs prennent le relais dans la poursuite de l'altération hémodynamique. L'effet temporaire des inhibiteurs du TXA₂ limite les perspectives cliniques du BM-573 dans le choc septique.

L'effet de l'endotoxine sur la résistance artériolaire R₂, que l'on reproduit fidèlement par l'injection de TXA₂, est réduit par l'inhalation de NO (Lambermont et al, 1999a). Puisque l'effet du NO ne peut porter qu'à une courte distance des alvéoles, nous concluons que le site de vasoconstriction artériolaire est périphérique et qu'il résulte d'une stimulation directe de la musculature artériolaire.

Nous démontrons aussi que l'inhalation de NO, n'a pas d'effet sur la résistance caractéristique artérielle pulmonaire ni sur la compliance vasculaire (Lambermont et al, 1999a). Ceci peut signifier que les sites vasculaires responsables sont trop distants des alvéoles, ou encore que les structures intéressées, bien que proches des alvéoles, sont insensibles à cet agent. Rappelons que Melot et al (Melot et al, 1997), utilisant un modèle d'hypertension artérielle pulmonaire par obstruction mécanique ont conclu que l'inhalation du NO réduit la résistance vasculaire mais n'antagonise pas l'apparition d'un phénomène de fermeture critique vasculaire. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par D'Orio et al. dans notre laboratoire qui, utilisant un modèle endotoxinique, démontraient que la perfusion d'un puissant vasodilatateur

(Nitroprussiate de Na) réduisait la résistance artériolaire mais était sans effet sur le phénomène critique de fermeture (D'Orio et al., 1992b).

Nos observations indiquent que deux mécanismes différents, et séquentiels, sont initiés par l'administration d'endotoxine et rendent compte de l'hypertension artérielle pulmonaire du choc endotoxique expérimental. Le premier, responsable d'une vasoconstriction artériolaire périphérique, d'installation directe et rapide, est inhibé par le BM-573 (Lambermont et al, 2003a; Lambermont et al, 2003c). Le second mécanisme requiert un délai d'application et conduit à une chute de compliance vasculaire qui n'est ni sensible à l'effet d'un vasodilatateur direct tel le NO, ni sensible à l'inhibition du TXA₂.

Il convenait donc de se demander si les techniques d'épuration extra-rénale visant à soustraire les médiateurs potentiels étaient en mesure de modifier le profil circulatoire pulmonaire au cours du choc endotoxique.

Nos observations suggèrent que l'hémodiafiltration qui combine les phénomènes de convection et de diffusion des molécules vers le dialysat et utilise une membrane dont le cut-off est de 30 kDa, est dépourvue d'effet sur la cinétique de la variation de compliance vasculaire pulmonaire (Lambermont et al., 2003d). En outre, cette manœuvre aggrave les effets de l'endotoxine sur la résistance vasculaire, indépendamment d'une éventuelle surproduction de TNF par activation de la membrane de dialyse. Si l'on admet que l'hémodiafiltration a soustrait les agents vasoactifs dont le poids est inférieur à 30 kDa, nous concluons, sans pouvoir en préciser le mécanisme, que la balance vasomotrice était perturbée par la soustraction plus importante de médiateurs vasodilatateurs ou que les cytokines demeurées en place poursuivent leur activité.

Par contre, comme nous le montrons au chapitre 8, l'hémofiltration avec une membrane à larges pores dont le cut-off est de 80kDa et qui procède uniquement par convection est responsable d'une amélioration significative du couplage ventriculo-vasculaire pulmonaire en prévenant l'augmentation de Ea (Lambermont et al., 2006). Ceci suggère que l'élimination de médiateurs dont le poids moléculaire est compris entre 30 et 80 kDa serait bénéfique.

Quelle est l'implication de la fonction cardiaque droite dans les désordres circulatoires pulmonaires de la phase précoce du choc endotoxinique ?

Nos résultats démontrent que l'endotoxine génère une accroissement de la résistance caractéristique de l'artère pulmonaire ainsi qu'une chute de la compliance vasculaire (Lambertmont et al, 1999b). De telles modifications impliquent que la zone proximale du lit pulmonaire ne remplit plus son rôle de réservoir capable d'absorber sous la forme d'une énergie potentielle une part du travail d'éjection systolique fournie par le ventricule droit, restituables durant la diastole. Nous avons émis l'hypothèse que semblables modifications mécaniques de l'artère pulmonaire devait conduire à une dissipation d'énergie par découplage des fonctions cardiaques droite et artérielle pulmonaire. Nos résultats confirment cette hypothèse. Ils démontrent que sous l'effet de l'endotoxine, la boucle de fonction ventriculaire se déplace vers la droite et le haut (Lambertmont et al, 2003b). Un tel déplacement est obtenu par recours aux deux formes de régulation ventriculaire, hétérométrique et homéométrique. Notre modèle illustre parfaitement cette adaptation cardiaque par l'accroissement du volume télediastolique et le redressement de la pente d'élastance télésystolique. De pareilles adaptations résulte un accroissement de PVA lequel traduit une augmentation de la consommation d'oxygène par le ventricule droit. Cette augmentation de la consommation d'énergie par le ventricule est notamment dictée par une augmentation du travail ventriculaire interne. C'est à ce prix que le couplage ventriculo-artériel pulmonaire est maintenu à une valeur normale au cours de la première heure du choc endotoxinique. Ensuite, apparaît une baisse progressive du couplage en raison d'un niveau de contractilité insuffisant qui se traduit par une chute de la performance cardiaque droite : le travail interne demeure élevé alors que le travail externe se réduit. En d'autres termes, la postcharge appliquée au ventricule droit conduit celui-ci à favoriser la transmission de son énergie sous forme de pression au détriment du volume éjecté. Il est vraisemblable qu'un tel découplage entre les fonctions cardiaque droite et artérielle pulmonaire conduise à l'épuisement progressif du myocarde, faisant ainsi le lit à la survenue d'une décompensation. Toutefois, nos travaux ne nous permettent pas de préciser le mécanisme qui prévaut à cette altération de la mécanique cardiaque droite et

d'ainsi différencier un déterminisme autopharmacologique comme le suggèrent Court et al (Court et al, 2002) d'une ischémie ventriculaire relative selon Sibelius et al (Sibelius et al, 2000).

Nos résultats suggèrent cependant que le choc endotoxique modifie d'abord les caractéristiques mécaniques de la circulation pulmonaire qui ont pour effet d'induire une adaptation ventriculaire, propre à maintenir la valeur du couplage entre ces deux structures. L'administration du BM-573 qui soustrait la circulation pulmonaire aux effets précoce de l'endotoxine, prévient également les altérations du travail ventriculaire droit (Lambertmont et al, 2004a).

Du modèle expérimental à la clinique.

La principale limitation de ce travail est l'utilisation d'une perfusion d'endotoxine comme modèle du choc septique humain. Dans ce modèle porcin qui reproduit les effets hémodynamiques du choc septique rencontré en clinique (Lambertmont et al, 1999b), la production des deux médiateurs clés du choc septique, le TNF-alpha et l'interleukine 1, est induite par l'infusion d'endotoxine. La relation dose-réponse à l'endotoxine, et le début des effets cardio-vasculaires diffèrent d'une espèce à l'autre et, en plus, ces modèles animaux ne tiennent pas compte de la variabilité humaine due à l'âge, la réserve biologique et les facteurs génétiques (Michie, 1998). Nos données doivent donc être interprétées dans ce contexte.

Notre travail est important à plusieurs titres. Tout d'abord, il souligne que le système cardio-vasculaire doit être approché dans sa globalité et que considérer le ventricule droit de manière isolée peut conduire à des conclusions erronées. L'étude simultanée de la fonction ventriculaire droite et des propriétés circulatoires pulmonaires dans ce travail souligne l'importance du couplage qui existe entre le versant ventriculaire et le versant circulatoire. De plus, cette analyse détaillée des propriétés hémodynamiques circulatoires pulmonaires et ventriculaires droites permet de mieux dégager les effets des différentes interventions thérapeutiques et d'en approcher le mécanisme d'action (Lambertmont & D'orio, 2006).

Enfin, le caractère pulsatile du débit sanguin à la sortie du ventricule droit requiert l'utilisation de certains indices complexes pour étudier les caractéristiques hémodynamiques ventriculaires droites et circulatoires pulmonaires. Bien que ces indices hémodynamiques complexes puissent sembler austères pour le lecteur non initié, ils sont cependant nécessaires dans le domaine de la physiopathologie cardiovasculaire appliquée (Bigatello & Hurford, 1999). En effet la charge s'opposant à l'éjection ventriculaire droite est plus qu'une simple résistance ohmique. Afin de donner plus de signification au profil de l'onde de débit pulmonaire, il est donc crucial de considérer l'interaction qui existe entre l'éjection ventriculaire et les propriétés vasculaires du circuit d'aval en terme de compliance, de résistance et de phénomènes de réflexion des ondes de débit et de pression. Pour cette raison, des modèles circulatoires pulmonaires et ventriculaires ont dû être utilisés.

C'est maintenant un réel défi d'utiliser ces indices hémodynamiques au lit du malade où sont encore actuellement utilisées des approches intuitives dépourvues de signification physiologique réelle. L'application clinique de l'analyse conduite au plan expérimental requiert une approche nécessairement invasive, notamment pour la mesure du volume et de la pression ventriculaire et celle du débit pulmonaire. L'application du multiple-beat pour la détermination de la pente d'élastance télésystolique nous oblige en outre à manipuler la précharge. A priori, ces mesures devraient être réalisables au lit du malade.

Conclusion

Notre travail a consisté à étudier les modifications induites par la perfusion d'endotoxine au niveau de la circulation pulmonaire, de la performance ventriculaire droite mais aussi du couplage ventriculo-artériel pulmonaire. Cette étude expérimentale approfondie de la circulation pulmonaire, outre les renseignements physiopathologiques qu'elle nous apporte, nous a permis de développer des techniques d'analyse sophistiquées qu'il nous reste maintenant à appliquer en clinique humaine.

Références

1. **Altavilla D, Canale P, Squadrito F, Sardella A, Ammendolia L, Urna G, Ioculano M, Squadrito G, Caputi AP** (1994): Protective effects of BAY U 3405, a thromboxane A2 receptor antagonist, in endotoxin shock. *Pharmacol Res* 30: 137-151.
2. **Altavilla D, Squadrito F, Canale P, Ioculano M, Squadrito G, Campo GM, Serrano M, Sardella A, Urna G, Spignoli G, .** (1995): G 619, a dual thromboxane synthase inhibitor and thromboxane A2 receptor antagonist, inhibits tumor necrosis factor-alpha biosynthesis. *Eur J Pharmacol* 286: 31-39.
3. **Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR** (2001): Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 29: 1303-1310.
4. **Baan J, van der Velde ET, de Bruin HG, Smeenk GJ, Koops J, van Dijk AD, Temmerman D, Senden J, Buis B** (1984): Continuous measurement of left ventricular volume in animals and humans by conductance catheter. *Circulation* 70: 812-823.
5. **Balk RA, Jacobs RF, Tryka AF, Townsend JW, Walls RC, Bone RC** (1988): Effects of ibuprofen on neutrophil function and acute lung injury in canine endotoxin shock. *Crit Care Med* 16: 1121-1127.
6. **Bellomo R, Tipping P, Boyce N** (1993): Continuous veno-venous hemofiltration with dialysis removes cytokines from the circulation of septic patients. *Crit Care Med* 21: 522-526.
7. **Bergel DH, Milnor WR** (1965): Pulmonary vascular impedance in the dog. *Circ Res* 16: 401-415.

8. **Berger JI, Gibson RL, Redding GJ, Standaert TA, Clarke WR, Truog WE** (1993): Effect of inhaled nitric oxide during group B streptococcal sepsis in piglets. *Am Rev Resp Dis* 147: 1080-1086.
9. **Bernard GR, Reines HD, Halushka PV, Higgins SB, Metz CA, Swindell BB, Wright PE, Watts FL, Vrbanac JJ** (1991): Prostacyclin and thromboxane A2 formation is increased in human sepsis syndrome. Effects of cyclooxygenase inhibition. *Am Rev Resp Dis* 144: 1095-1101.
10. **Bernard GR, Wheeler AP, Russell JA, Schein R, Summer WR, Steinberg KP, Fulkerson WJ, Wright PE, Christman BW, Dupont WD, Higgins SB, Swindell BB** (1997): The effects of ibuprofen on the physiology and survival of patients with sepsis. The Ibuprofen in Sepsis Study Group. *N Engl J Med* 336: 912-918.
11. **Bigatello LM, Hurford WE** (1999): Inhaled nitric oxide and pulmonary vascular resistance. *Crit Care Med* 27: 2060-2061.
12. **Bland JM, Altman DG** (1986): Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1: 307-310.
13. **Bloos FM, Morisaki HM, Neal AM, Martin CM, Ellis CG, Sibbald WJ, Pitt ML** (1996): Sepsis depresses the metabolic oxygen reserve of the coronary circulation in mature sheep. *Am J Respir Crit Care Med* 153: 1577-1584.
14. **Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ** (1992): Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101: 1644-1655.

15. **Brady AJ, Poole-Wilson PA, Harding SE, Warren JB** (1992): Nitric oxide production within cardiac myocytes reduces their contractility in endotoxemia. *Am J Physiol* 263: H1963-H1966.
16. **Brigham KL, Meyrick B** (1986a): Endotoxin and lung injury. *Am Rev Resp Dis* 133: 913-927.
17. **Brigham KL, Meyrick B** (1986b): Endotoxin and lung injury. *Am Rev Respir Dis* 133: 913-927.
18. **Brimioulle S, Julien V, Gust R, Kozlowski JK, Naeije R, Schuster DP** (2002): Importance of hypoxic vasoconstriction in maintaining oxygenation during acute lung injury. *Crit Care Med* 30: 874-880.
19. **Brimioulle S, Wauthy P, Ewalenko P, Rondelet B, Vermeulen F, Kerbaul F, Naeije R** (2003): Single-beat estimation of right ventricular end-systolic pressure-volume relationship. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: H1625-H1630.
20. **Broemser P, Ranke O** (1930): Uerber die Messung des Schagnolumes des Herrens auf unblutigen Weg. *Z Biol* 90: 467.
21. **Burkhoff D, Sagawa K** (1986): Ventricular efficiency predicted by an analytical model. *Am J Physiol* 250: R1021-R1027.
22. **Canaud B, Bosc JY, Leray H, Stec F, Argiles A, Leblanc M, Mion C** (1998): On-line haemodiafiltration: state of the art. *Nephrol Dial Transplant* 13 Suppl 5: 3-11.
23. **Cannon JG, Tompkins RG, Gelfand JA, Michie HR, Stanford GG, van der Meer JW, Endres S, Lonnemann G, Corsetti J, Chernow B, .** (1990): Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever. *J Infect Dis* 161: 79-84.

24. **Chen EP, Bittner HB, Craig DM, Davis RD, Van Trigt P** (1997a): Pulmonary hemodynamics and blood flow characteristics in chronic pulmonary hypertension. *Ann thorac surg* 63: 806-813.
25. **Chen EP, Bittner HB, Davis RD, Van Trigt P** (1997b): Hemodynamic and inotropic effects of nitric oxide in pulmonary hypertension. *J Surg Res* 69: 288-294.
26. **Chollet-Martin S, Stamatakis G, Bailly S, Mery JP, Gougerot-Pocidalo MA** (1991): Induction of tumour necrosis factor-alpha during haemodialysis. Influence of the membrane type. *Clin Exp Immunol* 83: 329-332.
27. **Clowes GH, Jr., Vucinic M, Weidner MG** (1966): Circulatory and metabolic alterations associated with survival or death in peritonitis: clinical analysis of 25 cases. *Ann Surg* 163: 866-885.
28. **Cohn JN, Guiha NH, Broder MI, Limas CJ** (1974): Right ventricular infarction. Clinical and hemodynamic features. *Am J Cardiol* 33: 209-214.
29. **Collins BJ, Blum MG, Parker RE, Chang AC, Blair KS, Zorn GL, III, Christman BW, Pierson RN, III** (2001): Thromboxane mediates pulmonary hypertension and lung inflammation during hyperacute lung rejection. *J Appl Physiol* 90: 2257-2268.
30. **Court O, Kumar A, Parrillo JE, Kumar A** (2002): Clinical review: Myocardial depression in sepsis and septic shock. *Crit Care* 6: 500-508.
31. **Cunnion RE, Schaer GL, Parker MM, Natanson C, Parrillo JE** (1986): The coronary circulation in human septic shock. *Circulation* 73: 637-644.
32. **D'orio V** (1993): Contribution à l'étude expérimentale de l'hémodynamique pulmonaire au cours de la phase précoce du choc septique. Thèse d'agrégation de l'enseignement supérieur. Agrégation de l'enseignement supérieur. Université de Liège. 20-4-1993.

33. **D'Orio V, Fatemi M, Marnette JM, Fossion A, Marcelle R** (1993): Analysis of endotoxin effects on pulmonary circulation in terms of pressure-flow characteristics. *Circ Shock* 39: 285-292.
34. **D'Orio V, Fatemi M, Marnette JM, Mendes P, Saad G, Martinez C, Marcelle R** (1992a): Pressure-flow relationships of the pulmonary circulation during endotoxin infusion in intact dogs. *Crit Care Med* 20: 1005-1013.
35. **D'Orio V, Halleux J, Rodriguez LM, Wahlen C, Marcelle R** (1986): Effects of *Escherichia coli* endotoxin on pulmonary vascular resistance in intact dogs. *Crit Care Med* 14: 802-806.
36. **D'Orio V, Lambermont B, Detry O, Kohl P, Potty P, Gérard P, Marcelle R** (1998): Pulmonary impedance and right ventricular-vascular coupling in endotoxin shock. *Cardiovasc Res* 38: 375-382.
37. **D'Orio V, Martinez C, Saad G, Mendes P, Marcelle R** (1992b): Pulmonary artery pressure-flow plots in septic shock dogs: effects of prostaglandin E1 and nitroprusside (Abstract). *Intensive Care Med* 18: S228.
38. **D'Orio V, Mendes P, Saad G, Marcelle R** (1990): Accuracy in early prediction of prognosis of patients with septic shock by analysis of simple indices: prospective study. *Crit Care Med* 18: 1339-1345.
39. **D'Orio V, Rodriguez LM, Wahlen C, Fossion A, Juchmes J, Marcelle R** (1987): A comparison of single bolus endotoxin injection with low dose endotoxin infusion on pulmonary and systemic vascular changes in intact anaesthetised dogs. *Circ Shock* 21: 207-216.
40. **D'Orio V, Wahlen C, Naldi M, Fossion A, Juchmes J, Marcelle R** (1989): Contribution of peripheral blood pooling to central hemodynamic disturbances during

- endotoxin insult in intact dogs. *Crit Care Med* 17: 1314-1319.
41. **Dahm P, Blomquist S, Martensson L, Thorne J, Zoucas E** (1994): Circulatory and ventilatory effects of intermittent nitric oxide inhalation during porcine endotoxemia. *J Trauma* 37: 769-777.
 42. **De Vries AS, Vanholder RC, Pascual M, Lameire NH, Colardyn FA** (1999): Can inflammatory cytokines be removed efficiently by continuous renal replacement therapies? *Intensive Care Med* 25: 903-910.
 43. **De Vroomen M, Cardozo RH, Steendijk P, Van Bel F, Baan J** (2000): Improved contractile performance of right ventricle in response to increased RV afterload in newborn lamb. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278: H100-H105.
 44. **De Vroomen M, Steendijk P, Lopes Cardozo RH, Brouwers HH, Van Bel F, Baan J** (2001): Enhanced systolic function of the right ventricle during respiratory distress syndrome in newborn lambs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H392-H400.
 45. **Deby-Dupont G, Braun M, Lamy M, Deby C, Pincemail J, Faymonville ME, Damas P, Bodson L, Lecart MP, Goutier R** (1987): Thromboxane and prostacyclin release in adult respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med* 13: 167-174.
 46. **Delcroix M, Melot C, Vachiery JL, Lejeune P, Leeman M, Vanderhoeft P, Naeije R** (1990): Effects of embolus size on hemodynamics and gas exchange in canine embolic pulmonary hypertension. *J Appl Physiol* 69: 2254-2261.
 47. **Dell'Italia LJ, Santamore WP** (1998): Can indices of left ventricular function be applied to the right ventricle? *Prog Cardiovasc Dis* 40: 309-324.

48. **Dhainaut JF, Huyghebaert MF, Monsallier JF, Lefevre G, Dall'ava-santucci J, Brunet F, Villemant D, Carli A, Raichvarg D** (1987): Coronary hemodynamics and myocardial metabolism of lactate, free fatty acids, glucose, and ketones in patients with septic shock. *Circulation* 75: 533-541.
49. **Dhainaut JF, Lanore JJ, de Gournay JM, Huyghebaert MF, Brunet F, Villemant D, Monsallier JF** (1988a): Right ventricular dysfunction in patients with septic shock. *Intensive Care Med 14 Suppl 2*: 488-491.
50. **Dhainaut JF, Lanore JJ, de Gournay JM, Huyghebaert MF, Brunet F, Villemant D, Monsallier JF** (1988b): Right ventricular dysfunction in patients with septic shock. *Intensive Care Med 14 Suppl 2*: 488-491.
51. **Dickstein ML, Yano O, Spotnitz HM, Burkhoff D** (1995): Assessment of right ventricular contractile state with the conductance catheter technique in the pig. *Cardiovasc Res* 29: 820-826.
52. **Dogne JM, de Leval X, Neven P, Rolin S, Wauters J, David JL, Delarge J, Massereel B** (2000): Effects of a novel non-carboxylic thromboxane A2 receptor antagonist (BM-531) derived from torasemide on platelet function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 62: 311-317.
53. **Ducas J, Duval D, Dasilva H, Boiteau P, Prewitt RM** (1987): Treatment of canine pulmonary hypertension: effects of norepinephrine and isoproterenol on pulmonary vascular pressure-flow characteristics. *Circulation* 75: 235-242.
54. **Ducas J, Girling L, Schick U, Prewitt RM** (1986): Pulmonary vascular effects of hydralazine in a canine preparation of pulmonary thromboembolism. *Circulation* 73: 1050-1057.

55. **Ducas J, Schick U, Girling L, Prewitt RM** (1988): Effects of altered left atrial pressure on pulmonary vascular pressure-flow relationships. *Am J Physiol* 255: H19-H25.
56. **Eichacker PQ, Parent C, Kalil A, Esposito C, Cui X, Banks SM, Gerstenberger EP, Fitz Y, Danner RL, Natanson C** (2002): Risk and the efficacy of antiinflammatory agents: retrospective and confirmatory studies of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 166: 1197-1205.
57. **Erb TO, Craig DM, Gaskin PM, Cheifetz IM, Resai BA, Sanders SP** (2002): Preload recruitable stroke work relationship in the right ventricle: simultaneous assessment using conductance catheter and sonomicrometry. *Crit Care Med* 30: 2535-2541.
58. **Fang K, Krahmer RL, Rypins EB, Law WR** (1996): Starling resistor effects on pulmonary artery occlusion pressure in endotoxic shock provide inaccuracies in left ventricular compliance assessments. *Crit Care Med* 24: 1618-1625.
59. **FitzGerald GA, Reilly IA, Pedersen AK** (1985): The biochemical pharmacology of thromboxane synthase inhibition in man. *Circulation* 72: 1194-1201.
60. **Fitzgerald GA, Reilly IA, Pedersen AK** (1985): The biochemical pharmacology of thromboxane synthase inhibition in man. *Circulation* 72: 1194-1201.
61. **Fourie PR, Coetzee AR, Bolliger CT** (1992): Pulmonary artery compliance: its role in right ventricular-arterial coupling. *Cardiovasc Res* 26: 839-844.
62. **Frank O** (1899): Die Grundform des arteriellen Pulses erste Abhandlung: mathematische Analyse. *Z Biol* 37: 483-526.

63. **Frostell C, Fratacci MD, Wain JC, Jones R, Zapol WM** (1991): Inhaled nitric oxide: A selective pulmonary vasodilator reversing hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Circulation* 83: 2038-2047.
64. **Ghysen A, Dogne JM, Chiap P, Rolin S, Masereel B, Lambermont B, Kohl P, Tchana-Sato V, Hanson J, D'Orio V** (2005): Pharmacological profile and therapeutic potential of BM-573, a combined thromboxane receptor antagonist and synthase inhibitor. *Cardiovasc Drug Rev* 23: 1-14.
65. **Ghysen A, Lambermont B, Dogne JM, Kohl P, Tchana-Sato V, Morimont P, Magis D, Hanson J, Segers P, D'Orio V** (2004): Effect of BM-573 [N-tertbutyl-N'-(2-(4'-methylphenylamino)-5-nitro-benzenesulfonyl)urea], a dual thromboxane synthase inhibitor and thromboxane receptor antagonist, in a porcine model of acute pulmonary embolism. *J Pharmacol Exp Ther* 310: 964-972.
66. **Gilles RJ, D'Orio V, Ciancabilla F, Carlier PG** (1994): In vivo 31P nuclear magnetic resonance spectroscopy of skeletal muscle energetics in endotoxemic rats: a prospective, randomized study. *Crit Care Med* 22: 499-505.
67. **Glower DD, Spratt JA, Snow ND, Kabas JS, Davis JW, Olsen CO, Tyson GS, Sabiston DC, Jr., Rankin JS** (1985): Linearity of the Frank-Starling relationship in the intact heart: the concept of preload recruitable stroke work. *Circulation* 71: 994-1009.
68. **Gorback MS** (1990): Problems associated with the determination of pulmonary vascular resistance. *J Clin Monit* 6: 118-127.
69. **Grant BJB, Lieber BB** (1996): Clinical significance of pulmonary arterial input impedance. *Eur Respir J* 9: 2196-2199.

70. **Grant BJB, Paradowski LJ** (1987): Characterization of pulmonary arterial input impedance with lumped parameters models. *Am J Physiol* 252: H585-H593.
71. **Grootendorst AF** (1994): The potential role of hemofiltration in the treatment of patients with septic shock and multiple organ dysfunction syndrome. *Adv Ren Replace Ther* 1: 176-184.
72. **Grootendorst AF, van Bommel EF, van der HB, van Leengoed LA, van Osta AL** (1992): High volume hemofiltration improves right ventricular function in endotoxin-induced shock in the pig. *Intensive Care Med* 18: 235-240.
73. **Grootendorst AF, van Bommel EF, van Leengoed LA, Nabuurs M, Bouman CS, Groeneveld AB** (1994): High volume hemofiltration improves hemodynamics and survival of pigs exposed to gut ischemia and reperfusion. *Shock* 2: 72-78.
74. **Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B** (1975): Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72: 2994-2998.
75. **Haupt MT, Jastremski MS, Clemmer TP, Metz CA, Goris GB** (1991): Effect of ibuprofen in patients with severe sepsis: a randomized, double-blind, multicenter study. The Ibuprofen Study Group. *Crit Care Med* 19: 1339-1347.
76. **Heering P, Morgera S, Schmitz FJ, Schmitz G, Willers R, Schultheiss HP, Strauer BE, Grabensee B** (1997): Cytokine removal and cardiovascular hemodynamics in septic patients with continuous venovenous hemofiltration. *Intensive Care Med* 23: 288-296.
77. **Hon JK, Steendijk P, Khan H, Wong K, Yacoub M** (2001): Acute effects of pulmonary artery banding in

- sheep on right ventricle pressure-volume relations: relevance to the arterial switch operation. *Acta Physiol Scand* 172: 97-106.
78. **Hotchkiss RS, Karl IE** (2003): The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 348: 138-150.
 79. **Iglesias G, Zeigler ST, Lentz CW, Traber DL, Herndon DN** (1994): Thromboxane synthetase inhibition and thromboxane receptor blockade preserve pulmonary and circulatory function in a porcine burn sepsis model. *J Am Coll Surg* 179: 187-192.
 80. **Jesmok G, Gundel R** (1995): Thromboxane-blocked swine as an experimental model of severe intravascular inflammation and septic shock. *Shock* 4: 379-383.
 81. **Kamijo Y, Soma K, Sugimoto K, Tsuruta H, Ohwada T** (2000): The effect of a hemofilter during extracorporeal circulation on hemodynamics in patients with SIRS. *Intensive Care Med* 26: 1355-1359.
 82. **Karunanithi MK, Michniewicz J, Copeland SE, Feneley MP** (1992): Right ventricular preload recruitable stroke work, end-systolic pressure-volume, and dP/dt_{max} -end-diastolic volume relations compared as indexes of right ventricular contractile performance in conscious dogs. *Circ Res* 70: 1169-1179.
 83. **Kass DA, Beyar R** (1991): Evaluation of contractile state by maximal ventricular power divided by the square of end-diastolic volume. *Circulation* 84: 1698-1708.
 84. **Kass DA, Kelly RP** (1992): Ventriculo-arterial coupling: concepts, assumptions, and applications. *Ann Biomed Eng* 20: 41-62.
 85. **Kaupke CJ, Zhang J, Cesario T, Yousefi S, Akeel N, Vaziri ND** (1996): Effect of hemodialysis on leukocyte adhesion receptor expression. *Am J Kidney Dis* 27: 244-252.

86. **Kaye AD, Nossaman BD, Ibrahim IN, DeWitt BJ, Feng CJ, Kadowitz PJ** (1995): Analysis of thromboxane receptor-mediated responses in the feline pulmonary vascular bed. *Crit Care Med* 23: 164-170.
87. **Kellum JA, Johnson JP, Kramer D, Palevsky P, Brady JJ, Pinsky MR** (1998): Diffusive vs. convective therapy: effects on mediators of inflammation in patient with severe systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med* 26: 1995-2000.
88. **Khadour FH, Panas D, Ferdinand P, Schulze C, Csont T, Lalu MM, Wildhirt SM, Schulz R** (2002): Enhanced NO and superoxide generation in dysfunctional hearts from endotoxemic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H1108-H1115.
89. **Kimchi A, Ellrodt AG, Berman DS, Riedinger MS, Swan HJ, Murata GH** (1984): Right ventricular performance in septic shock: a combined radionuclide and hemodynamic study. *J Am Coll Cardiol* 4: 945-951.
90. **Kjorstad KE, Korvald C, Myrmel T** (2002): Pressure-volume-based single-beat estimations cannot predict left ventricular contractility in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H1739-H1750.
91. **Kohl P, D'Orio V, Lambermont B, Gerard P, Gommes C, Limet R** (2000): Increased aortic compliance maintains left ventricular performance at lower energetic cost. *Eur J Cardiothorac Surg* 17: 272-278.
92. **Kohl P, Ghysen A, Tchana-Sato V, D'Orio V, Gerard P, Morimont P, Limet R, Lambermont B** (2003): Effects of increased afterload on left ventricular performance and mechanical efficiency are not baroreflex-mediated. *Eur J Cardiothorac Surg* 24: 912-919.

93. **Krafft P, Felfernig M, Popousek A, Weinstabl C, Steltzer H, Hammerle AF** (1994): Removal of cytokines in septic patients using continuous veno-venous hemodiafiltration. *Crit Care Med* 22: 716-721.
94. **Krausz MM, Perel A, Eimerl D, Cotev S** (1977): Cardiopulmonary effects of volume loading in patients in septic shock. *Ann Surg* 185: 429-434.
95. **Kumar A, Brar R, Wang P, Dee L, Skorupa G, Khadour F, Schulz R, Parrillo JE** (1999): Role of nitric oxide and cGMP in human septic serum-induced depression of cardiac myocyte contractility. *Am J Physiol* 276: R265-R276.
96. **Kussmaul WG, Noordergraaf A, Laskey WK** (1992): Right ventricular-pulmonary arterial interactions. *Ann Biomed Eng* 20: 63-80.
97. **Lambermont B** (1998): Contribution à l'étude de l'hémodynamique pulmonaire: apport d'un modèle d'analyse mathématique. Doctorat en sciences biomédicales. Université de Liège.
98. **Lambermont B, D'orio V** (2006): The role of right ventricular-pulmonary arterial coupling to differentiate between effects of inotropic agents in experimental right heart failure. *Crit Care Med* (in press).
99. **Lambermont B, D'orio V, Kolh P, Gerard P, Marcelle R** (1999a): Effects of inhaled nitric oxide on pulmonary hemodynamics in a porcine model of endotoxin shock. *Crit Care Med* 27: 1953-1957.
100. **Lambermont B, Delanaye P, Dogne JM, Ghuyzen A, Jansen N, Dubois B, Desaive T, Kolh P, D'orio V, Krzesinski J** (2006): Large pore membranes hemofiltration increases cytokine clearance and improves right ventricular-vascular coupling during endotoxic shock in pigs. *Artif Organs* (in press).

101. **Lambermont B, Gérard P, Detry O, Kolh P, D'orio V, Marcelle R** (1997): Selection of lumped models to characterize vascular properties of the pulmonary circulation (Abstract). *Am J Respir Crit Care Med* 155: A115.
102. **Lambermont B, Gérard P, Detry O, Kolh P, Potty P, Defraigne JO, D'orio V, Marcelle R** (1998a): Comparison between three and four-element windkessel models to characterize vascular properties of pulmonary circulation. *Arch Physiol Biochem* 105: 625-632.
103. **Lambermont B, Gérard P, Kolh P, Detry O, Marcelle R, D'orio V** (1998b): Time domain method to identify simultaneously parameters of the windkessel model applied to the pulmonary circulation. *Arch Physiol Biochem* 106: 245-252.
104. **Lambermont B, Gérard P, Potty P, Kolh P, Detry O, Marcelle R, D'orio V** (1998c): A new time domain method to estimate windkessel parameters of pulmonary circulation (Abstract). *Am J Respir Crit Care Med* 157: A387.
105. **Lambermont B, Ghysen A, Dogne JM, Kolh P, Tchana-Sato V, Morimont P, Benoit P, Gerard P, Masereel B, D'orio V** (2003a): Effects of BM-573, a novel thromboxane A2 inhibitor, on pulmonary hemodynamics in endotoxic shock. *Arch Physiol Biochem* 111: 224-231.
106. **Lambermont B, Ghysen A, Kolh P, Tchana-Sato V, Segers P, Gerard P, Morimont P, Magis D, Dogne JM, Masereel B, D'orio V** (2003b): Effects of endotoxic shock on right ventricular systolic function and mechanical efficiency. *Cardiovasc Res* 59: 412-418.
107. **Lambermont B, Kolh P, Detry O, Gérard P, Marcelle R, D'orio V** (1999b): Analysis of endotoxin effects on the intact pulmonary circulation. *Cardiovasc Res* 41: 275-281.

108. **Lambermont B, Kohl P, Dogne JM, Ghuysen A, Tchana-Sato V, Morimont P, Benoit P, Gerard P, Masereel B, Limet R, D'orio V** (2003c): Effects of U-46619 on pulmonary hemodynamics before and after administration of BM-573, a novel thromboxane A2 inhibitor. *Arch Physiol Biochem* 111: 217-223.
109. **Lambermont B, Kohl P, Ghuysen A, Moonen M, Morimont P, Gerard P, Tchana-Sato V, Rorive G, D'orio V** (2003d): Effect of hemodiafiltration on pulmonary hemodynamics in endotoxic shock. *Artif Organs* 27: 1128-1133.
110. **Lambermont B, Kohl P, Ghuysen A, Segers P, Dogne JM, Tchana-Sato V, Morimont P, Benoit P, Gerard P, Masereel B, D'orio V** (2004a): Effect of a novel thromboxane A2 inhibitor on right ventricular-arterial coupling in endotoxic shock. *Shock* 21: 45-51.
111. **Lambermont B, Segers P, Ghuysen A, Tchana-Sato V, Morimont P, Dogne JM, Kohl P, Gerard P, D'orio V** (2004b): Comparison between single-beat and multiple-beat methods for estimation of right ventricular contractility. *Crit Care Med* 32: 1886-1890.
112. **Landry DW, Oliver JA** (2001): The pathogenesis of vasodilatory shock. *N Engl J Med* 345: 588-595.
113. **Leather HA, Segers P, Sun YY, De Ruyter HA, Vandermeersch E, Wouters PF** (2002): The limitations of preload-adjusted maximal power as an index of right ventricular contractility. *Anesth Analg* 95: 798-804, table.
114. **Lee PA, Weger GW, Pryor RW, Matson JR** (1998): Effects of filter pore size on efficacy of continuous arteriovenous hemofiltration therapy for *Staphylococcus aureus*-induced septicemia in immature swine. *Crit Care Med* 26: 730-737.

115. **Leeman M, Lejeune P, Hallemans R, Melot C, Naeije R** (1988): Effects of Increased Pulmonary Vascular Tone on Gas-Exchange in Canine Oleic-Acid Pulmonary-Edema. *J Appl Physiol* 65: 662-668.
116. **Lonnemann G, Bechstein M, Linnenweber S, Burg M, Koch KM** (1999): Tumor necrosis factor-alpha during continuous high-flux hemodialysis in sepsis with acute renal failure. *Kidney Int Suppl* 72: S84-S87.
117. **Lopes Cardozo RH, Steendijk P, Baan J, Brouwers HA, De Vroomen M, Van Bel F** (2000): Right ventricular function in respiratory distress syndrome and subsequent partial liquid ventilation. Homeometric autoregulation in the right ventricle of the newborn animal. *Am J Respir Crit Care Med* 162: 374-379.
118. **MacLean LD, Mulligan WG, McLean AP, Duff JH** (1967): Patterns of septic shock in man--a detailed study of 56 patients. *Ann Surg* 166: 543-562.
119. **Maggiorini M, Brimioule S, De Canniere D, Delcroix M, Naeije R** (1998): Effects of pulmonary embolism on pulmonary vascular impedance in dogs and minipigs. *J Appl Physiol* 84: 815-821.
120. **Marini CP, Woloszyn T, Coons M, Tachmes L, Nathan I, Cunningham JN, Jacobowitz IJ** (1990): Efficacy of right atrial infusion of PGE1 in sepsis-induced pulmonary hypertension. *J Surg Res* 49: 476-482.
121. **Matthay MA, Pittet JF, Jayr C** (1998): Just say NO to inhaled nitric oxide for the acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 26: 1-2.
122. **McCuskey RS, Urbaschek R, Urbaschek B** (1996): The microcirculation during endotoxemia. *Cardiovasc Res* 32: 752-763.
123. **Melot C, Vermeulen F, Maggiorini M, Gilbert E, Naeije R** (1997): Site of pulmonary vasodilation by

- inhaled nitric oxide in microembolic lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 156: 75-85.
124. **Michie HR** (1998): The value of animal models in the development of new drugs for the treatment of the sepsis syndrome. *J Antimicrob Chemother* 41 Suppl A: 47-49.
 125. **Michie HR, Manogue KR, Spriggs DR, Revhaug A, O'Dwyer S, Dinarello CA, Cerami A, Wolff SM, Wilmore DW** (1988): Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *N Engl J Med* 318: 1481-1486.
 126. **Mikashima H, Muramoto Y** (1990): Protective effect of Y-20811, a long-lasting thromboxane synthetase inhibitor, on endotoxin shock in rabbits. *Thromb Res* 57: 499-505.
 127. **Milnor WR** (1975): Arterial impedance as ventricular afterload. *Circ Res* 36: 565-570.
 128. **Mitzner W, Sylvester JT** (1981): Hypoxic vasoconstriction and fluid filtration in pig lungs. *J Appl Physiol* 51: 1065-1071.
 129. **Miyano H, Shishido T, Kawada T, Miyashita H, Sato T, Sugimachi M, Sunagawa K** (1999): Acute effect of tumor necrosis factor-alpha is minimal on mechanics but significant on energetics in blood-perfused canine left ventricles. *Crit Care Med* 27: 168-176.
 130. **Morgera S, Slowinski T, Melzer C, Sobottke V, Vargas-Hein O, Volk T, Zuckermann-Becker H, Wegner B, Muller JM, Baumann G, Kox WJ, Bellomo R, Neumayer HH** (2004): Renal replacement therapy with high-cutoff hemofilters: Impact of convection and diffusion on cytokine clearances and protein status. *Am J Kidney Dis* 43: 444-453.
 131. **Myers PR, Wright TF, Tanner MA, Adams HR** (1992): EDRF and nitric oxide production in cultured

- endothelial cells: direct inhibition by E.Coli endotoxin. *Am J Physiol* 262: H710-H718.
132. **Naeije R** (2003): Pulmonary vascular resistance. A meaningless variable? *Intensive Care Med* 29: 526-529.
 133. **Nakayama M, Chen CH, Nevo E, Fetics B, Wong E, Kass DA** (1998): Optimal preload adjustment of maximal ventricular power index varies with cardiac chamber size. *Am Heart J* 136: 281-288.
 134. **Natanson C, Esposito CJ, Banks SM** (1998): The sirens' songs of confirmatory sepsis trials: selection bias and sampling error. *Crit Care Med* 26: 1927-1931.
 135. **Oates JA, Fitzgerald GA, Branch RA, Jackson EK, Knapp HR, Roberts LJ** (1988): Clinical implications of prostaglandin and thromboxane A2 formation (1). *N Engl J Med* 319: 689-698.
 136. **Offner PJ, Ogura H, Jordan BS, Pruitt BA, Cioffi WG** (1995): Effects of inhaled nitric oxide on right ventricular function in endotoxin shock. *J Trauma* 39: 179-186.
 137. **Ogletree ML, Brigham KL** (1982): Effects of cyclooxygenase inhibitors on pulmonary vascular responses to endotoxin in unanesthetized sheep. *Prostaglandins Leukot Med* 8: 489-502.
 138. **Olson NC, Kruse-Elliott KT, Dodam JR** (1992): Systemic and pulmonary reactions in swine with endotoxemia and gram-negative bacteremia. *J Am Vet Med Assoc* 200: 1870-1884.
 139. **Packman MI, Rackow EC** (1983): Optimum left heart filling pressure during fluid resuscitation of patients with hypovolemic and septic shock. *Crit Care Med* 11: 165-169.
 140. **Parker MM, McCarthy KE, Ognibene FP, Parrillo JE** (1990): Right ventricular dysfunction and dilatation,

- similar to left ventricular changes, characterize the cardiac depression of septic shock in humans. *Chest* 97: 126-131.
141. **Parker MM, Shelhamer JH, Natanson C, Alling DW, Parrillo JE** (1987): Serial cardiovascular variables in survivors and nonsurvivors of human septic shock: heart rate as an early predictor of prognosis. *Crit Care Med* 15: 923-929.
 142. **Permutt S, Bromberger-Barnea B, Bane HN** (1962): Alveolar pressure, pulmonary venous pressure, and the vascular waterfall. *Med Thorac* 19: 239-260.
 143. **Piene H** (1986): Pulmonary arterial impedance and right ventricular function. *Phys Rev* 66: 606-652.
 144. **Pochet T, Gérard P, Lambermont B, Detry O, D'orio V, Defraigne JO, Fossion A, Limet R** (1996): Selection and identification of lumped models of the arterial vasculature using multiple regression and backward elimination in the time domain. *Med Biol Eng Comp* 34: 107-108.
 145. **Pouleur H, Lefevre J, van Eyll Ch, Jaumin PM, Charlier AA** (1978): Significance of pulmonary input impedance in right ventricular performance. *Cardiovasc Res* 12: 617-629.
 146. **Redl G, Abdi S, Traber LD, Nichols RJ, Flynn JT, Herndon DN, Traber DL** (1991): Inhibition of thromboxane synthesis reduces endotoxin-induced right ventricular failure in sheep. *Crit Care Med* 19: 1294-1302.
 147. **Rogiers P, Zhang H, Pauwels D, Vincent JL** (2003): Comparison of polyacrylonitrile (AN69) and polysulphone membrane during hemofiltration in canine endotoxic shock. *Crit Care Med* 31: 1219-1225.
 148. **Rogiers P, Zhang H, Smail N, Pauwels D, Vincent JL** (1999): Continuous venovenous hemofiltration improves

- cardiac performance by mechanisms other than tumor necrosis factor-alpha attenuation during endotoxic shock. *Crit Care Med* 27: 1848-1855.
149. **Rolin S, Dogne JM, Michaux C, Delarge J, Masereel B** (2001): Activity of a novel dual thromboxane A2 receptor antagonist and thromboxane synthase inhibitor (BM-573) on platelet function and isolated smooth muscles. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 65: 67-72.
 150. **Rolin S, Petein M, Tchana-Sato V, Dogne JM, Benoit P, Lambermont B, Ghysen A, Kolh P, Masereel B** (2003): BM-573, a dual thromboxane synthase inhibitor and thromboxane receptor antagonist, prevents pig myocardial infarction induced by coronary thrombosis. *J Pharmacol Exp Ther* 306: 59-65.
 151. **Ronco C, Bellomo R, Homel P, Brendolan A, Dan M, Piccinni P, La Greca G** (2000): Effects of different doses in continuous veno-venous haemofiltration on outcomes of acute renal failure: a prospective randomised trial. *Lancet* 356: 26-30.
 152. **Roos CM, Rich GF, Uncles DR, Daugherty MO, Frank DU** (1994): Sites of vasodilation by inhaled nitric oxide vs. sodium nitroprusside in endothelin-constricted isolated rat lungs. *J Appl Physiol* 77: 51-57.
 153. **Rossaint R, Falke KJ, Lopez F, Slama K, Pison U, Zapol WM** (1993): Inhaled nitric oxide for the adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 328: 399-405.
 154. **Rovira I, Chen T, Winkler M, Kawai N, Bloch KD, Zapol WM** (1994): Effects of inhaled nitric oxide on pulmonary hemodynamics and gas exchange in an ovine model of ARDS. *J Appl Physiol* 76: 345-355.
 155. **Sander A, Armbruster W, Sander B, Daul AE, Lange R, Peters J** (1997): Hemofiltration increases IL-6

- clearance in early systemic inflammatory response syndrome but does not alter IL-6 and TNF alpha plasma concentrations. *Intensive Care Med* 23: 878-884.
156. **Schreuder WO, Schneider AJ, Groeneveld AB, Thijs LG** (1989): Effect of dopamine vs norepinephrine on hemodynamics in septic shock. Emphasis on right ventricular performance. *Chest* 95: 1282-1288.
 157. **Schuster DP, Kozlowski JK, Brimioule S** (2001): Effects of thromboxane receptor blockade on pulmonary capillary hypertension in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 163: A820.
 158. **Segers P, Tchana-Sato V, Leather HA, Lambermont B, Ghysen A, Dogne JM, Benoit P, Morimont P, Wouters PF, Verdonck P, Kohl P** (2003): Determinants of left ventricular preload-adjusted maximal power. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: H2295-H2301.
 159. **Shim Y, Pasipoularides A, Straley CA, Hampton TG, Soto PF, Owen CH, Davis JW, Glower DD** (1994): Arterial windkessel parameter estimation: a new time-domain method. *Ann Biomed Eng* 22: 66-77.
 160. **Sibbald WJ, Paterson NA, Holliday RL, Anderson RA, Lobb TR, Duff JH** (1978): Pulmonary hypertension in sepsis: measurement by the pulmonary arterial diastolic-pulmonary wedge pressure gradient and the influence of passive and active factors. *Chest* 73: 583-591.
 161. **Sibelius U, Grandel U, Buerke M, Mueller D, Kiss L, Kraemer HJ, Braun-Dullaeus R, Haberbosch W, Seeger W, Grimminger F** (2000): Staphylococcal alpha-toxin provokes coronary vasoconstriction and loss in myocardial contractility in perfused rat hearts: role of thromboxane generation. *Circulation* 101: 78-85.

162. **Silverman HJ, Penaranda R, Orens JB, Lee NH** (1993): Impaired beta-adrenergic receptor stimulation of cyclic adenosine monophosphate in human septic shock: association with myocardial hyporesponsiveness to catecholamines. *Crit Care Med* 21: 31-39.
163. **Sjoberg T, Steen S** (1989): The strong contractile effect of the thromboxane receptor agonist U-46619 in isolated human pulmonary arteries and its competitive antagonism by BM-13.505. *Acta Physiol Scand* 136: 161-165.
164. **Smulders YM** (2000): Pathophysiology and treatment of haemodynamic instability in acute pulmonary embolism: the pivotal role of pulmonary vasoconstriction. *Cardiovasc Res* 48: 23-33.
165. **Solomon MA, Correa R, Alexander HR, Koev LA, Cobb JP, Kim DK, Roberts WC, Quezado ZM, Scholz TD, Cunnion RE** (1994): Myocardial energy metabolism and morphology in a canine model of sepsis. *Am J Physiol* 266: H757-H768.
166. **Spinas GA, Bloesch D, Keller U, Zimmerli W, Cammisuli S** (1991): Pretreatment with ibuprofen augments circulating tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, and elastase during acute endotoxinemia. *J Infect Dis* 163: 89-95.
167. **Starr I, Jeffers WA, Meade RH** (1943): The absence of conspicuous increments of venous pressure after severe damage to the RV of the dog, with discussion of the relation between clinical congestive heart failure and heart disease. *Am Heart J* 26: 291-301.
168. **Steendijk P** (2004): Right ventricular function and failure: methods, models, and mechanisms. *Crit Care Med* 32: 1087-1089.
169. **Stein B, Pfenninger E, Grunert A, Schmitz JE, Hudde M** (1990): Influence of continuous

- haemofiltration on haemodynamics and central blood volume in experimental endotoxic shock. *Intensive Care Med* 16: 494-499.
170. **Suchner U, Katz DP, Furst P, Beck K, Felbinger TW, Senftleben U, Thiel M, Goetz AE, Peter K** (2001): Effects of intravenous fat emulsions on lung function in patients with acute respiratory distress syndrome or sepsis. *Crit Care Med* 29: 1569-1574.
171. **Suchner U, Katz P, Furst P, Beck K, Felbinger W, Thiel M, Senftleben U, Goetz E, Peter K** (2002): Impact of sepsis, lung injury, and the role of lipid infusion on circulating prostacyclin and thromboxane A2. *Intensive Care Med* 28: 122-129.
172. **Suga H, Hayashi T, Shirahata M** (1981): Ventricular systolic pressure-volume area as predictor of cardiac oxygen consumption. *Am J Physiol* 240: H39-H44.
173. **Suga H, Sagawa K** (1974): Instantaneous pressure-volume relationships and their ratio in the excised, supported canine left ventricle. *Circ Res* 35: 117-126.
174. **Sunagawa K, Maughan WL, Burkhoff D, Sagawa K** (1983): Left ventricular interaction with arterial load studied in isolated canine ventricle. *Am J Physiol* 245: H773-H780.
175. **Sunagawa K, Yamada A, Senda Y, Kikuchi Y, Nakamura M, Shibahara T, Nose Y** (1980): Estimation of the hydromotive source pressure from ejecting beats of the left ventricle. *IEEE Trans Biomed Eng* 27: 299-305.
176. **Szabo G, Sebening C, Hagl C, Tochtermann U, Vahl CF, Hagl S** (1998): Right ventricular function after brain death: response to an increased afterload. *Eur J Cardiothorac Surg* 13: 449-458.
177. **Takeuchi M, Igarashi Y, Tomimoto S, Odake M, Hayashi T, Tsukamoto T, Hata K, Takaoka H,**

- Fukuzaki H** (1991): Single-beat estimation of the slope of the end-systolic pressure-volume relation in the human left ventricle. *Circulation* 83: 202-212.
178. **Tran HS, Quinn JV, Puc MM, Woolley DS, Puglisi RN, Slotman GJ** (2001): Prostacyclin is neither sufficient alone nor necessary to cause pulmonary dysfunction: Results from infusions of prostacyclin and antiprostacyclin antibody in porcine septic shock. *Crit Care Med* 29: 1445-1451.
179. **Turner A, Tsamitros M, Bellomo R** (1999): Myocardial cell injury in septic shock. *Crit Care Med* 27: 1775-1780.
180. **Uchino S, Bellomo R, Goldsmith D, Davenport P, Cole L, Baldwin I, Panagiotopoulos S, Tipping P** (2002): Super high flux hemofiltration: a new technique for cytokine removal. *Intensive Care Med* 28: 651-655.
181. **Uematsu T, Nagashima S, Inaba H, Mizuno A, Kosuge K, Nakashima M** (1994): Pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles of CS-518, a selective, long-lasting thromboxane synthase inhibitor, after single and multiple oral administration to healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 34: 41-47.
182. **van de Beek D, de Gans J, McIntyre P, Prasad K** (2004): Steroids in adults with acute bacterial meningitis: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 4: 139-143.
183. **van Deuren M, van der Meer JW** (2000): Hemofiltration in septic patients is not able to alter the plasma concentration of cytokines therapeutically. *Intensive Care Med* 26: 1176-1178.
184. **van Dissel JT, van Langevelde P, Westendorp RG, Kwappenberg K, Frolich M** (1998): Anti-inflammatory cytokine profile and mortality in febrile patients. *Lancet* 351: 950-953.

185. **Vandeplassche G, Hemans C, Van de Water A, Xhonneux R, Wouters L, Van Ammel K, de Clerck F** (1991): Differential effects of thromboxane A2 synthase inhibition, singly or combined with thromboxane A2/prostaglandin endoperoxide receptor antagonism, on occlusive thrombosis elicited by endothelial cell injury or by deep vascular damage in canine coronary arteries. *Circ Res* 69: 313-324.
186. **Vandeplassche G, Hermans C, Somers Y, Van de Werf F, de Clerck F** (1993): Combined thromboxane A2 synthase inhibition and prostaglandin endoperoxide receptor antagonism limits myocardial infarct size after mechanical coronary occlusion and reperfusion at doses enhancing coronary thrombolysis by streptokinase. *J Am Coll Cardiol* 21: 1269-1279.
187. **vanderPoll T, van Deventer SJ** (1999): Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis. *Infect Dis Clin North Am* 13: 413-426.
188. **VanWijlen SJ, Browning DP, Villalba M** (1986): The effect of imidazole in endotoxin shock in dogs. *Am Surg* 52: 413-417.
189. **Villar J, Maca-Meyer N, Perez-Mendez L, Flores C** (2004): Bench-to-bedside review: Understanding genetic predisposition to sepsis. *Crit Care* 8: 180-189.
190. **Vogel M, Schmidt MR, Kristiansen SB, Cheung M, White PA, Sorensen K, Redington AN** (2002): Validation of myocardial acceleration during isovolumic contraction as a novel noninvasive index of right ventricular contractility: comparison with ventricular pressure-volume relations in an animal model. *Circulation* 105: 1693-1699.
191. **Wanecek M, Rudehill A, Hemsen A, Lundberg JM, Weitzberg E** (1997): The endothelin receptor antagonist, bosantan, in combination with the cyclooxygenase inhibitor, diclofenac, counteracts pulmonary

- hypertension in porcine endotoxin shock. *Crit Care Med* 25: 848-857.
192. **Weisel RD, Vito L, Dennis RC, Valeri CR, Hechtman HB** (1977): Myocardial depression during sepsis. *Am J Surg* 133: 512-521.
193. **Weitzberg E, Rudehill A, Alving K, Lundberg JM** (1991): Nitric oxide inhalation selectively attenuates pulmonary hypertension and arterial hypoxia in porcine endotoxin shock. *Acta Physiol Scand* 143: 451-452.
194. **Weitzberg E, Rudehill A, Lundberg JM** (1993): Nitric oxide inhalation attenuates pulmonary hypertension and improves gas exchange in endotoxin shock. *Eur J Pharmacol* 233: 85-94.
195. **Winslow EJ, Loeb HS, Rahimtoola SH, Kamath S, Gunnar RM** (1973): Hemodynamic studies and results of therapy in 50 patients with bacteremic shock. *Am J Med* 54: 421-432.
196. **Wise WC, Cook JA, Halushka PV** (1981): Implications for thromboxane A2 in the pathogenesis of endotoxic shock. *Adv Shock Res* 6: 83-91.
197. **Wojtczak JA, Szalados JE** (2002): Right heart function: neither silent nor passive. *Crit Care Med* 30: 2601-2603.
198. **Zapol WM, Rimar S, Gillis N, Marletta M, Bosken CH** (1994): Nitric oxide and the lung. *Am J Respir Crit Care Med* 149: 1375-1380.
199. **Zapol WM, Snider MT** (1977): Pulmonary hypertension in severe acute respiratory failure. *N Engl J Med* 296: 476-480.

Annexes

Annexe 1

The role of right ventricular-pulmonary arterial coupling to differentiate between effects of inotropic agents in experimental right heart failure.

Bernard Lambermont, Vincent D'Orio

Critical Care Medicine (*in press*)

**The role of right ventricular-pulmonary arterial coupling to differentiate between
effects of inotropic agents in experimental right heart failure.**

Bernard Lambermont MD PhD^{1,2}, Vincent D'Orio MD PhD^{1,2}.

1. Hemodynamic Research Laboratory, HemoLiege, University of Liege, Belgium

2. Department of medicine, University of Liege, Belgium

Corresponding author and address for reprints (reprints will not be ordered):

Bernard LAMBERT

Medical Intensive Care Unit (-2C), Department of Medicine, CHU Sart Tilman, 4000 Liege,
Belgium

Phone: +3243667191

Fax: +3243667723

E-mail: b.lambermont@chu.ulg.ac.be

Key words: right ventricular-arterial coupling

In this month's issue of *Critical Care Medicine*, Kerbaul et al. (1) report the results of haemodynamic studies from dogs submitted to mechanical pulmonary arterial constriction to induce right ventricular failure. By using high fidelity probes to obtain pressure and flow waves simultaneously, the authors assessed the hydraulic load facing the failing right ventricle owing to the computation of pulmonary arterial (PA) input impedance spectrum as well as evaluation of the corresponding arterial elastance (Ea). In parallel, the right ventricular (RV) contractility was achieved by using the slope of the end-systolic volume- pressure relationship (Ees). The facilitation of energy transfer from the right ventricle to the pulmonary circuit was referred to as the ratio between Ees and Ea, i.e. RV-PA coupling. It is stated that under normal conditions, right ventricle is optimally match to its afterload (2). According to Burkhoff et al. (3) RV-PA coupling values of 2 are associated with a maximal ventricular efficiency (the ratio between mechanical work production and myocardial oxygen consumption) and values close to the unity with a maximal stroke work. It may be reasonably assumed that such a balance between Ees and Ea should lead to a better power transfer from the ventricular pump to the arterial vessels. In contrast, uncoupling occurs when Ees/Ea is lower than 1.

The authors found that constriction of pulmonary arteries not only induced shift upwards in both ohmic resistance and input impedance spectrum but resulted also in dramatic decrease in RV-PA coupling. Such an alteration in coupling was due to opposite effects on Ea and Ees, respectively increased and depressed. They evidenced that infusing a pure inotropic agent like dobutamine improved the value of coupling between RV and PA circuit, but at the cost of increased energy expenditure. In contrast, the use of a new agent, levosimendan, which combines inotropic and pulmonary arterial vasodilating properties, restored an optimal RV-PA state of coupling at low energy cost.

The present study (1) is remarkable under several aspects. One may firstly underscore that the cardio-vascular system should be approached as a whole and to consider the right ventricle in isolated terms may be misleading. By including the behaviour of the pulmonary circulation in their study, the authors evidenced that simultaneous improvement of the vascular load while ventricular contractility is increased enables less RV contractile adaptation requirements to restore an optimal RV-PA coupling.

Second, the use of state-of-the-art haemodynamic analysis provides insights into the separate actions of drugs on both components of the cardiovascular system, some of which might otherwise go unnoticed or even misleading. As a matter, dobutamine infusion increased cardiac output while PA pressure was slightly further increased suggesting therefore occurrence of direct arterial pulmonary vasodilation. Indeed, input impedance spectrum and Ea computations provided evidence against such a conclusion.

Levosimendan is a positive inotropic agent with direct vasodilative actions (4). It belongs to a class of drugs known as calcium sensitizers with positive effects on adenosine triphosphate K⁺ channels that are expressed in plasma and inner mitochondrial membranes (4). The authors evidenced that inotropic effects of levosimendan were similar to the dobutamine one but showed additional pulmonary vasodilatory effects as evidenced by almost normalization of both input impedance spectrum and Ea (1). This may play a major role in the clinical setting of congestive right heart failure.

Finally, because the pulsatile outflow of the right ventricle is converted into steady flow in the compliant pulmonary circuit, several complex indexes have been used in the present study to approach the two components of the cardiovascular system. Although such an haemodynamic analysis may induce some reluctance in the face of uninitiated readers, it is required in the field of applied cardiovascular physiology. Effectively, the hydraulic load facing the right ventricle is more than ohmic resistance alone (5). To give more sense to the

shape of the pulmonary wave pressure, it is of critical importance to consider the continuous interplay between ventricular ejection and mechanical pulmonary vascular properties in terms of compliance, resistance and back reflection of both pressure and flow waves (6). Therefore, models of both pulmonary circulation and pumping ventricle have emerged to achieve such a more valuable understanding of the cardiovascular system pattern and potential drug actions.

In this way, pressure-flow relationships and frequency-domain models have been used in this study (1), while Ees was referred as the most suitable index to approach the ventricular contractility. Such an analysis underscored the importance of vascular response in modulating the effects of contractile stimulation by different drugs on RV-AP coupling. It is now a real challenge to possibly apply these haemodynamic indexes in the clinical settings where investigations are usually conducted by more intuitive approaches but of reduced meaning.

Accordingly, further studies along with the lines of investigation of this report (1) are necessary to fully define whether or not the restoration of RV-AP coupling by increasing contractility and reducing afterload is of more clinical importance than either elevating only Ees or reducing Ea. This more complete definition will assuredly improve treatment aimed at relieving long-term symptoms in patients with right heart failure.

References

- 1.Kerbaul F, Rondelet B, Demester JP, et al: Effects of levosimendan vs dobutamine on pressure load-induced right ventricular failure. *Crit Care Med*
- 2.Piene H, Sund T: Does normal pulmonary impedance constitute the optimal load for the right ventricle? *Am J Physiol* 1982; 242: 154-160
- 3.Burkhoff D, Sagawa K. Ventricular efficiency predicted by an analytical model. *Am J Physiol* 1986; 250: 1021-1027

4. Figgitt DP, Gillies PS, Goa KL: Levosimendan. *Drugs* 2001; 61: 613-627
5. Naeije R: Pulmonary vascular resistance. A meaningless variable? *Intensive Care Med* 2003; 29: 526-529
6. Kussmaul WG, Noordergraaf A, Laskey WK: Right ventricular-pulmonary interactions. *Ann Biomed Eng* 1992; 20: 63-80

Annexe 2

Comparison between single-beat and multiple-beat methods for estimation of right ventricular contractility.

Lambermont B, Segers P, Ghuysen A, Tchana-Sato V, Morimont P, Dogne JM, Kolh P, Gerard P, D'Orio V.

Crit Care Med. 2004 Sep;32(9):1886-90

Comparison between single-beat and multiple-beat methods for estimation of right ventricular contractility

Bernard Lambertmont, MD, PhD; Patrick Segers, PhD; Alexandre Ghuyse, MD; Vincent Tchana-Sato, MD; Philippe Morimont, MD; Jean-Michel Dogne, PhD; Philippe Kolh, MD, PhD; Paul Gerard, PhD; Vincent D'orio, MD, PhD

Objective: It was investigated whether pharmacologically induced changes in right ventricular contractility can be detected by a so-called "single-beat" method that does not require preload reduction.

Design: Prospective animal research.

Setting: Laboratory at a large university medical center.

Subjects: Eight anesthetized pigs.

Interventions: End-systolic elastance values obtained by a recently proposed single-beat method (Ees_{sb}) were compared with those obtained using the reference multiple-beat method (Ees_{mb}).

Measurements and Main Results: Administration of dobutamine increased Ees_{mb} from 1.6 ± 0.3 to 3.8 ± 0.5 mm Hg/mL (p

= .001), whereas there was only a trend toward an increase in Ees_{sb} from 1.5 ± 0.2 to 1.7 ± 0.4 mm Hg/mL. Esmolol decreased Ees_{mb} from 1.7 ± 0.3 to 1.1 ± 0.2 mm Hg/mL (p = .006), whereas there was only a trend for a decrease in Ees_{sb} from 1.5 ± 0.2 to 1.3 ± 0.1 .

Conclusions: The present method using single-beat estimation to assess right ventricular contractility does not work as expected, since it failed to detect either increases or decreases in right ventricular contractility induced by pharmacologic interventions. (Crit Care Med 2004; 32:1886–1890)

Key Words: conductance catheter; contractile function; hemodynamics; inotropic agents; right ventricular function

The assessment of ventricular contractility is one of the cornerstones of the evaluation of ventricular systolic function (1). The development and validation of the conductance catheter method for the measurement of pressure-volume (PV) loops allowed the determination of indexes of ventricular contractility, first mainly in the left ventricle (2) and later in the right ventricle as well (3). However, determination of PV-based contractile indexes, such as the end-systolic PV or preload recruitable stroke work (PRSW) relationships, requires the recording of several PV loops during a transient preload reduction. Such conditions are usually obtained by caval vein occlusion, in the experimental setting. In hu-

mans, however, this procedure may be hazardous and rises ethical criticism.

To circumvent the necessity of preload reduction, several "single-beat" methods have been proposed for the left ventricle, based on data measured during hemodynamic steady-state conditions. Although the proposed methodologies appear attractive, Kjorstad et al. (4) demonstrated that none of the proposed single-beat methods was able to provide an accurate evaluation of left ventricular contractility.

However, since the physiology and anatomy of the left and right ventricles differ largely, it remains to be shown whether the conclusion of Kjorstad et al. (4), observed for the left ventricle, also applies to the right ventricle.

The aim of our study was therefore to evaluate, for the right ventricle, the original single-beat method based on work of Sunagawa et al. (5) and further elaborated by Takeuchi et al. (6). PV loops recorded by the conductance catheter were used to compare end-systolic elastance values obtained by the single-beat method (Ees_{sb}) with those obtained using the standard multiple beats method (i.e., the slope [Ees_{mb}] of the end-systolic PV

relationship) during pharmacologic interventions known to alter right ventricular contractility.

MATERIALS AND METHODS

All experimental procedures and protocols used in this investigation were reviewed and approved by the Ethics Committee of the Medical Faculty of the University of Liege. The investigation conforms with the guidelines (7) published by the U.S. National Institutes of Health.

Surgical Preparation

Experiments were performed on eight healthy Pietrain pigs of either gender weighing from 20 to 30 kg. The animals were premedicated with intramuscular administration of ketamine (20 mg/kg) and diazepam (1 mg/kg). Anesthesia was then induced and maintained by a continuous infusion of sufentanil ($0.5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$) and pentobarbital ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$). Spontaneous movements were prevented by pancuronium bromide (0.2 mg/kg). After endotracheal intubation through a cervical tracheostomy, the pigs were connected to a volume-cycled ventilator (Evita 2, Dräger, Lübeck, Germany) set to deliver a tidal volume of 10 mL/kg with an FiO_2 of 0.4 and at a respiratory rate of 20 breaths/

From the Hemodynamic Research Center (BL, AG, VT-S, PM, J-MD, PK, VD) and Department of Statistics (PG), University of Liege, Liege, Belgium; and the Hydraulics Laboratory (PS), Institute Biomedical Technology, Ghent University, Ghent, Belgium.

Supported, in part, by Fonds de la Recherche Scientifique Médicale (VT-S, PK).

Copyright © 2004 by the Society of Critical Care Medicine and Lippincott Williams & Wilkins

DOI: 10.1097/01.CCM.0000139607.38497.BA

min. End-tidal CO_2 measurements (Capnomac, Datex, Helsinki, Finland) were used to monitor the adequacy of ventilation. Respiratory settings were adjusted to maintain end-tidal CO_2 between 30 and 35 mm Hg.

The heart and the pulmonary trunk were exposed by means of medial sternotomy. A micromanometer-tipped catheter (Sentron pressure-measuring catheter, Cordis, Miami, FL) was inserted into the main pulmonary artery through a stab wound in the right ventricular outflow tract. A 14-mm diameter perivascular flow probe (Transonic Systems, Ithaca, NY) was closely adjusted around the main pulmonary artery 2 cm downstream of the pulmonary valve. The micromanometer-tipped catheter was manipulated so that the pressure sensor was positioned closely to the flow probe.

Left atrial pressure was measured with a micromanometer-tipped catheter inserted into the cavity through the left atrial appendage. Systemic arterial pressure was monitored with a micromanometer-tipped catheter inserted into the descending thoracic aorta through the right femoral artery.

A 7-Fr, 12-electrode (8 mm interelectrode distance) conductance micromanometer-tipped catheter (CD Leycom, Zoetermeer, The Netherlands) was inserted through the right ventricular infundibulum into the right ventricle and positioned so that all electrodes were in the right ventricular cavity.

A 6-Fr Fogarty balloon catheter (Baxter Healthcare, Oakland, CA) was advanced into the inferior vena cava through a right femoral venotomy. Inflation of this balloon produced a titratable gradual preload reduction.

Experimental Protocol and Physiologic Measurements

Data were recorded before and during pharmacologic modulation of ventricular contractility using a) esmolol infusion at 1 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ during 5 mins to decrease contractility; and b) dobutamine infusion at 10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ during 15 mins to enhance contractility. Esmolol and dobutamine infusions were randomly administered in each animal and separated by a 30-min resting period.

Hemodynamic data included measurement of pulmonary artery pressure (PAP), pulmonary artery blood flow, left atrial pressure, systemic arterial pressure, heart rate, right ventricular pressure, right ventricular volume, and right ventricular PV loops. These variables were recorded during a short apneic phase and stored for subsequent analysis. All analog signals were continuously converted to digital form with an appropriate AD converter system (Codas, DataQ Instruments, Akron, OH). Systemic arterial pressure, PAP, and pulmonary blood flow waves were integrated to calculate corresponding mean values. Right

ventricular PV loops were recorded during transient occlusion of the inferior vena cava using the Fogarty balloon.

At each step, two sets of data were recorded and analyzed.

Data Analysis

Multiple-Beat Estimation of Right Ventricular Contractility. Right ventricular PV loops were obtained using the conductance catheter method (3). The application, validation, and calibration of the conductance technique for measuring ventricular volume were described elsewhere (2). Although this technique was originally designed for use in the left ventricle, the feasibility of conductance catheter measurements in the right ventricle has been also demonstrated (3). Briefly, a multiple-electrode catheter placed in the right ventricle is used to set up an electrical field, and adjacent pairs of electrodes measure the local conductivity of blood, which is proportional to local blood volume (3). The instantaneous conductance signals, $G(t)$, are converted to volume signals, $V(t)$, owing to the following equation:

$$V(t) = (1/\alpha)[L^2 \cdot \rho \cdot G(t) - V_c] \quad [1]$$

where α is a dimensionless gain factor, L the distance between the sensing electrodes, ρ the resistivity of the blood, and V_c the correction volume for the conductance of the surrounding tissue, commonly referred to as parallel conductance. Parallel conductance can be estimated by transiently altering the conductivity of blood with hypertonic saline (3). To determine the gain factor α , an alternate method of measuring volume is needed (3). In this study, we used the value of stroke volume measured by the pulmonary artery ultrasonic flow probe. Before each measurement, parallel conductance was determined with the saline method by injecting 3 mL of NaCl 10% into the inferior vena cava (3).

Ees_{mb} was determined during a rapid inferior vena cava occlusion maneuver by fitting a straight line through the end-systolic PV points (3). During this interval of preload reduction, the slope of the linear relationship between stroke work and end-diastolic volume (PRSW) was calculated. Stroke work was referred to as the integrated area of each PV loop.

Single-Beat Estimation of Right Ventricular Contractility. Ten consecutive cardiac cycles were selected from steady-state portions during each experimental period. The digitized data for each group of measurements were analyzed by a computer-assisted system. Pressure and volume curves for each recording period were averaged to produce mean pressure and mean volume waveforms, in order to eliminate any noise artifact and compensate for beat-to-beat variations. Such obtained mean ventricular pressure and volume waves were then graphically opposed to gen-

erate a PV loop representative of each experimental period. Individual cycles were identified using the onset of ventricular contraction, time-aligned and numerically averaged. The left top corner of the PV loop determined the end-systolic point (Pes, Ves), whereas the right-bottom corner of the PV loop determined the end-diastolic volume (Ved). The method consisted of fitting ventricular pressure during the isovolumic contraction and relaxation periods to a sinusoidal function, given as

$$P_{\text{sin}}(t) = A + B \sin(Ct + D) \quad [2]$$

where A through D are variables obtained from the fitting procedure, which was based on minimizing the square difference between measured and fitted pressure during the isovolumic periods. The onset of the isovolumic contraction period was taken as the point where right ventricular change in pressure in time (dP/dt) reached 10% of peak positive dP/dt , whereas the end of the isovolumic contraction period was taken as the moment of peak positive dP/dt . Similarly, the onset of isovolumic relaxation was taken as the moment of peak negative dP/dt , whereas the end of this period was assumed to be the point where dP/dt reached 10% of peak negative dP/dt . P_{max} was the maximal value of P_{sin} and an estimate of the pressure that would be generated by the ventricle in an isovolumic beat at Ved (Fig. 1).

Single-beat elastance, Ees_{sb} , is then taken as the slope of the line connecting two points in the PV plane: (Ved, P_{max}) and (Ves, Pes), and is thus given by $Ees_{sb} = (P_{\text{max}} - Pes)/(Ved - Ves)$.

Statistical Analysis

Data are presented as mean \pm SEM. Statistical comparison of data before and after each intervention was conducted by a paired Student's *t*-test (Statistica, Statsoft, Tulsa, OK). Comparison of multiple-beat and single-beat Ees estimation was obtained by applying analysis of agreement (8). We considered $p < .05$ to be statistically significant.

RESULTS

Two sets of data were collected in the eight pigs during each of the four experimental conditions, that is, before and after both dobutamine and esmolol infusions. Out of these 64 sets of data, five were finally excluded from analysis due to the difficulty of making sine function fit the pressure curve in three single-beat records, whereas poor quality in two PV loops made it impossible to apply both multiple-beat and single-beat method analysis.

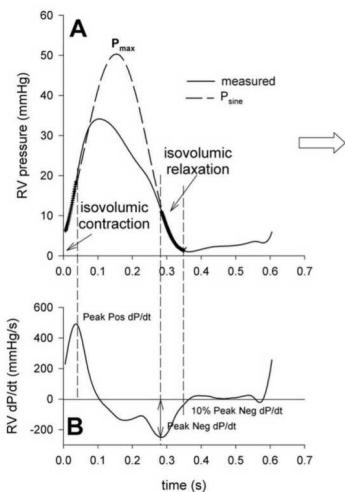


Figure 1. Single-beat method to obtain end-systolic pressure-volume relationship (ESPVR). *B*, delineation of both isovolumic contraction and isovolumic relaxation time delays is based on right ventricular (RV) change in pressure in time (dP/dt). *A*, a sinusoidal function (P_{sine}) is then adjusted to fit isovolumic segments of the ventricular pressure contour. The maximum amplitude of the sine wave is taken as P_{max} , referred to as the maximum pressure that the ventricle should release if ejection was impeded (nonejecting beat). ESPVR is then plotted as a line defined by two different points whose coordinates are P_{max} and V_{ed} (nonejecting beat) and P and V measured at end-systole (ejecting beat), respectively. *D*, as a reference, the corresponding multiple-beat ESPVR computation is provided. Ees_{sb} , end-systolic elastance values obtained by the single-beat method; Ees_{mb} , end-systolic elastance values obtained by the multiple-beat method.

There was no significant difference between values of Ees_{mb} and Ees_{sb} (1.7 ± 0.2 and 1.4 ± 0.1 mm Hg/mL, respectively) at the beginning of the experimental period.

Effects of Dobutamine Infusion

During administration of dobutamine, heart rate increased from 117 ± 8 to 142 ± 7 beats/min ($p < .05$), mean PAP values increased from 18 ± 2 to 20 ± 2 mm Hg ($p < .05$), cardiac output increased from 64 ± 2 to 50 ± 2 mL/sec ($p < .05$), and mean systemic arterial pressure remained unchanged.

Administration of dobutamine increased Ees_{mb} values from 1.6 ± 0.3 to 3.8 ± 0.5 mm Hg/mL ($p = .001$), whereas there was only a trend toward an increase in Ees_{sb} from 1.5 ± 0.2 to 1.7 ± 0.4 mm Hg/mL ($p = .5$; Fig. 2). Administration of dobutamine increased the slope values of PRSW relationships from 27 ± 6 to 41 ± 6 mm Hg ($p < .05$).

Effects of Esmolol Infusion

During administration of esmolol, heart rate decreased from 116 ± 7 to 98 (Fig. 4).

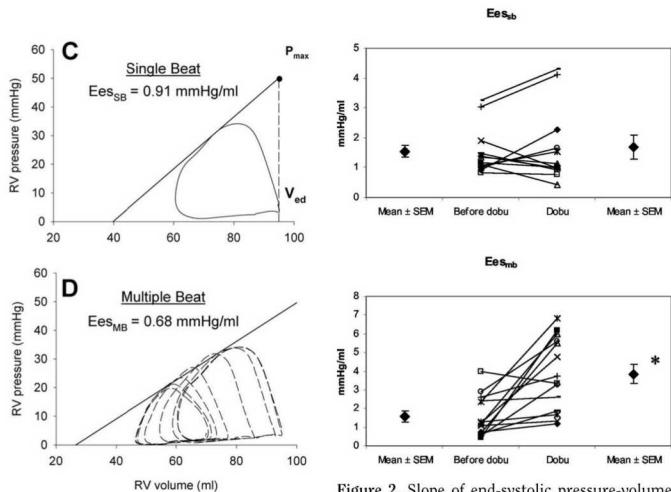


Figure 2. Slope of end-systolic pressure-volume relationship before (baseline) and during dobutamine (*Dobu*) infusion obtained by single-beat Ees_{sb} and multiple-beat (Ees_{mb}) methods. * $p < .05$.

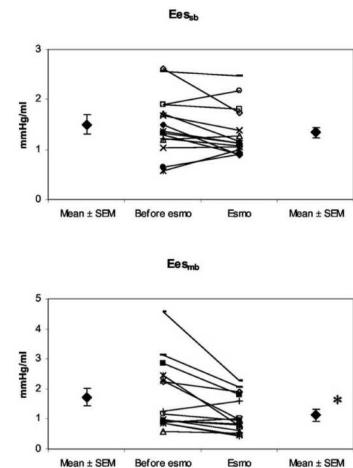


Figure 3. Slope of end-systolic pressure-volume relationship before (baseline) and during esmolol (*Esmo*) infusion obtained by single-beat (Ees_{sb}) and multiple-beat (Ees_{mb}) methods. * $p < .05$.

DISCUSSION

Several single-beat methods have been advanced to assess ventricular contractility without changing ventricular loading conditions. However, none of these variants could provide better results than the original analysis described by Takeuchi et al. (6), selected therefore as the reference single-beat method to evaluate right ven-

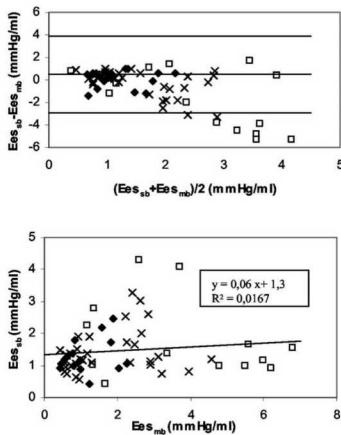


Figure 4. Scatterplots of analysis of agreement between single-beat (Ees_{sb}) and multiple-beat (Ees_{mb}) methods before (x) and during dobutamine (squares) or esmolol (diamonds) infusions and comparison between Ees_{sb} and Ees_{mb} before (x) and during dobutamine (squares) or esmolol (diamonds) infusions.

tricular contractility index in the present work. We therefore compared two methods for the evaluation of right ventricular contractility at baseline, during dobutamine and esmolol infusion. These contractile indexes were derived from PV loops recorded by the conductance catheter technique during either steady state (single-beat method) or transient preload reduction (multiple-beat method). Our results indicate that Ees_{sb} is less accurate than Ees_{mb} in predicting right ventricular contractility changes induced by pharmacologic interventions.

Baseline values of contractility measured in our study were similar to those reported in the literature (3, 9). Although there was no difference in mean basal Ees values obtained by the two methods, and although the systematic bias of 0.54 mm Hg/mL was acceptable, limits of agreement (± 3.4 mm Hg/mL) between the two methods were unacceptably high. This reflects the random errors of the single-beat method and is directly related to the predictive value of the test.

As expected, Ees_{mb} increased during dobutamine infusion and decreased during esmolol infusion (3, 9, 10). In parallel, PRSW relationship slope values were significantly increased by dobutamine infusion, whereas significant reduction occurred after esmolol administration. In contrast, neither dobutamine nor esmol-

ol infusions induced significant change in Ees_{sb} . These results are in accordance with those of Kjorstad et al. (4) for the left ventricle, where none of the applied single beat methods could predict an increase in contractility induced by dopamine. However, right and left ventricular physiology and anatomy differ, and, therefore, the present single-beat method had to be tested specifically for the right ventricle (11).

In recent work, Brimioule et al. (9) showed that the right ventricular P_{max} of a nonejecting beat can be calculated by a single-beat analysis and may subsequently be used to calculate Ees_{sb} . Ees_{sb} obtained by such a method could predict changes in right ventricular contractility induced by dobutamine. However, their conclusions were weakened by the absence of comparison between this method and a gold standard. Moreover, PV loops were obtained by integration of the instantaneous pulmonary arterial flow and not by using the conductance catheter technique (12).

The lack of a significant decrease in Ees_{sb} during esmolol infusion could, in addition to the low sensitivity of the single-beat method, be attributed to the rather modest reduction in contractility induced by esmolol. Using the single-beat method, Brimioule et al. (9) also found no difference in contractility after propranolol infusion, whereas Dickstein et al. (3) showed a very slight decrease in Ees after esmolol infusion.

Comparison of single-beat and multiple-beat estimation of contractility showed bias and limits of agreement similar to those reported in the literature for the left ventricle (4). It shows the lack of precision of the single-beat method particularly when Ees values are far from physiologic values, as it was the case in a number of animals after administration of dobutamine. In the single-beat method applied in this study, a sine wave is fitted to the ventricular pressure during isovolumic contraction and relaxation. This leads to a number of inherent problems. First, as noted by Kjorstad et al. (4), a sine wave is a rather stiff, symmetrical wave shape. Isovolumic ventricular contraction and relaxation are not necessarily symmetrical, especially in cardiovascular disease or during pharmacologic interventions. Inotropic stimulation leads to specific changes in the shape of ventricular pressure curve compared with the control period. In fact, the isovolumic contraction pressure increase becomes

The present method using single-beat estimation to assess right ventricular contractility does not work as expected, since it failed to detect either increases or decreases in right ventricular contractility induced by pharmacologic interventions.

considerably steeper than the decrease of the pressure decay during isovolumic relaxation (4). Such a feature implies that maximal pressure developed by the ventricle is necessarily shifted to the left leading to an asymmetry in the shape of the ventricular pressure curve. Such an asymmetry is not accounted for by the sine function used to fit the ventricular curve. As a result, the single-beat computation method leads to an underestimation of end-systolic elastance values during inotropic stimulation since it fails to accurately reflect the leftward-induced shift of maximum ventricular pressure.

Another problem, which mainly applies to the right ventricle, is the fact that the isovolumic periods are rather short, especially the isovolumic relaxation period. This means not only that there is little information available for the fitting procedure, increasing the uncertainty on the fitted curve and P_{max} , but also, and perhaps even more important, that the method is sensitive to the choice of the onset and end of the isovolumic contraction and relaxation period, respectively. It was not specified by Brimioule et al. (9) how the end and onset of the isovolumic relaxation periods were determined. Following Leeuwenburgh et al. (13), we selected cutoff values for dP/dt (the points where 10% of peak positive or negative dP/dt are reached) to delineate the isovolumic contraction and relaxation periods.

CONCLUSIONS

To the best of our knowledge, our work is the first one designed to compare

a single-beat method to the gold standard multiple-beat method for the assessment of right ventricular contractility. The method using single-beat estimation to assess right ventricular contractility does not work as expected, since it failed to detect either increases or decreases in right ventricular contractility induced by pharmacologic interventions. Therefore, single-beat methods still remain an open field of hemodynamic research and need to be further investigated to accurately assess right ventricular contractility.

REFERENCES

1. Wojtczak JA, Szalados JE: Right heart function: Neither silent nor passive. *Crit Care Med* 2002; 30:2601-2603
2. Baan J, van der Velde ET, de Bruin HG, et al: Continuous measurement of left ventricular volume in animals and humans by conductance catheter. *Circulation* 1984; 70: 812-823
3. Dickstein ML, Yano O, Spotnitz HM, et al: Assessment of right ventricular contractile state with the conductance catheter technique in the pig. *Cardiovasc Res* 1995; 29: 820-826
4. Kjorstad KE, Korvald C, Myrmel T: Pressure-volume-based single-beat estimations cannot predict left ventricular contractility in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282: H1739-H1750
5. Sunagawa K, Yamada A, Senda Y, et al: Estimation of the hydromotive source pressure from ejecting beats of the left ventricle. *IEEE Trans Biomed Eng* 1980; 27:299-305
6. Takeuchi M, Igarashi Y, Tomimoto S, et al: Single-beat estimation of the slope of the end-systolic pressure-volume relation in the human left ventricle. *Circulation* 1991; 83: 202-212
7. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NIH Publication No. 85-23). Bethesda, MD, U.S. National Institutes of Health, 1996
8. Bland JM, Altman DG: Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986; 1:307-310
9. Brimiouille S, Wauthy P, Ewelenko P, et al: Single-beat estimation of right ventricular end-systolic pressure-volume relationship. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284: H1625-H1630
10. Vogel M, Schmidt MR, Kristiansen SB, et al: Validation of myocardial acceleration during isovolumic contraction as a novel noninvasive index of right ventricular contractility: Comparison with ventricular pressure-volume relations in an animal model. *Circulation* 2002; 105:1693-1699
11. Dell'Italia LJ, Santamore WP: Can indices of left ventricular function be applied to the right ventricle? *Prog Cardiovasc Dis* 1998; 40:309-324
12. Steendijk P: Right ventricular function and failure: Methods, models, and mechanisms. *Crit Care Med* 2004; 32:1087-1089
13. Leeuwenburgh BP, Steendijk P, Helbing WA, et al: Indexes of diastolic RV function: Load dependence and changes after chronic RV pressure overload in lambs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282:H1350-H1358

Annexe 3

Analysis of endotoxin effects on the intact pulmonary circulation.

**Lambermont B, Kolh P, Detry O, Gerard P, Marcelle R,
D'Orio V.**

Cardiovasc Res. 1999 Jan;41(1):275-81.

Analysis of endotoxin effects on the intact pulmonary circulation

Bernard Lambertmont*, Philippe Kolh, Olivier Detry, Paul Gerard, Roland Marcelle, Vincent D'Orio

Hemodynamic Research Laboratory (Hemoliege), CHU Sart Tilman, University of Liege, 4000 Liege, Belgium

Received 13 January 1998; accepted 8 June 1998

Abstract

Objective: The mechanism of sustained alterations in pulmonary hemodynamics during endotoxin shock remains unclear. To gain more detailed knowledge we used the four-element windkessel model as a descriptor of the pulmonary circuit. **Methods:** Consecutive changes in characteristic resistance (R_1), vascular compliance (C), input resistance (R_2) and inductance (L) were continuously assessed following injection of endotoxin in 6 anaesthetised pigs, and were compared with the corresponding values measured in a similar group of sham-operated animals. **Results:** Endotoxin challenge resulted in a biphasic pulmonary artery pressure response. Blood flow decreased progressively from 2.8 ± 0.2 l/min to 2 ± 0.2 l/min. Ohmic pulmonary vascular resistance (PVR) increased gradually from 0.2 ± 0.04 to 0.76 ± 0.1 mm Hg s ml $^{-1}$. The early increase in PAP (from 14 ± 2 to 27 ± 4 mm Hg) was mediated by changes in both R_1 (from 0.04 ± 0.01 to 0.06 ± 0.01 mm Hg s ml $^{-1}$) and R_2 (from 0.16 ± 0.04 to 0.61 ± 0.2 mm Hg s ml $^{-1}$). These responses, in turn, altered the proximal vascular compliance. A subsequent increase in PAP (from 27 ± 2 to 32 ± 3 mm Hg) paralleled the specific decline in distal pulmonary vasculature compliance from 0.84 ± 0.1 to 0.65 ± 0.1 ml/mmHg. Analysis of the time course of PVR did not allow us to distinguish between vasoconstriction and stiffening of the vascular tree as mechanisms accounting for PAP changes. **Conclusions:** Endotoxemia leads to pulmonary hypertension, which is a result of constriction of proximal pulmonary arteries during the early phase, whereas the late phase is characterised by a decline in distal pulmonary vasculature compliance. 1999 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Pig; Pulmonary circulation; Septic shock; Endotoxin; Models; Vascular resistance; Vascular compliance

1. Introduction

The pulmonary hypertensive response to endotoxin is usually accounted for by vasoconstriction of the pulmonary bed. Although there is some question as to the exact magnitude of arterial and venous resistance ratios in the pulmonary circulation [3,16], even more uncertainty exists with regard to how vascular compliance and resistance vary simultaneously during endotoxin insult. Indeed, this knowledge is not only important from a theoretical, pathophysiological viewpoint, but also in terms of the potential for therapeutic interventions. The lack of detailed data may reflect the paucity of simple hemodynamic methods capable of clearly distinguishing the portion of the total pressure drop required to open or distend pulmon-

ary vessels from the pressure drop related to flow resistance itself.

Most studies examining the response of the pulmonary circulation to endotoxin administration have been flawed by an approach which calculates changes in pulmonary vascular resistance using an ohmic formula that divides the pressure gradient (the difference between input and output pressures) by flow [3,5,11,14–16,20,21]. Unfortunately, while such a calculation may give insight into the total energy loss required for a given flow through the system, it does not provide detailed knowledge of the system's fundamental mechanical properties, i.e., the compliance and resistance of the vascular tree. More recently, it has been postulated that more detailed knowledge of the functional state of the pulmonary circulation could be achieved by describing the relationship between pulmonary input pressure and flow [6,7]. Over the physiological range of flows, this relationship is essentially linear and can be characterised by a slope and a pressure intercept referred to

*Corresponding author. Address for correspondence: Intensive Care Unit (-2C), Department of Internal Medicine, CHU Sart Tilman (B35), University of Liege, 4000 Liege, Belgium. Tel.: +32-4-366-7111; fax: +32-4-366-7723.

Time for primary review 21 days.

as a Starling resistor effect [2,6,7]. Unfortunately, several problems associated with the determination of pressure–flow relationships remain to be solved. First, the Starling resistor model ignores the compliant property of the pulmonary vessels. Second, application of such an hemodynamic approach is very difficult because it requires generating pressure–flow plots under very rigorous conditions; in particular, the level of left atrial pressure must remain unchanged during flow manipulations [8]. Finally, experimental use of pressure–flow plots is hampered by the shifting to different curves that occurs during hemodynamic manipulations. The utility of pressure–flow plots is therefore potentially reduced because of these considerable technical limitations. In contrast, growing evidence is being gathered to favor the use of lumped parameter models to describe the global behavior of the pulmonary circulation [12]. The most significant reason for using such models is that changes in both vascular resistance and compliance may be assessed without the necessity for specific manipulations of the circulatory system under investigation. In order to obtain this more detailed knowledge, the effects of endotoxin on the pulmonary vasculature were investigated in intact animals by application of the four-element windkessel model to the pulmonary circulation.

2. Methods

All experimental procedures and protocols used in this investigation were reviewed and approved by the ethical committee of the Medical Faculty of the University of Liege. They were performed in accordance with the Guiding Principles for the Care and Use of Laboratory Animals approved by the Council of the American Physiological Society. Experiments were performed on 12 healthy pure pietran pigs of either sex weighing from 16 to 28 kg. The animals were premedicated with intramuscular administration of ketamine (20 mg/kg) and diazepam (1 mg/kg). Anaesthesia was then induced and maintained by a continuous infusion of sufentanil (0.5 µg/kg/h) and propofol (7.5 mg/kg/h). Spontaneous movements were prevented by pancuronium bromide (0.2 mg/kg/h). After endotracheal intubation via a cervical tracheostomy, the pigs were connected to a volume-cycled ventilator (Evita 2, Dräger, Lübeck, Germany) set to deliver a tidal volume of 15 ml/kg at a respiratory rate of 20/min. End-tidal CO₂ measurements (Capnomac, Datex, Helsinki, Finland) were used to monitor the adequacy of ventilation. Respiratory settings were adjusted to maintain end-tidal CO₂ between 30 and 35 mmHg. Arterial oxygen saturation was monitored and maintained above 95% by adjusting the FiO₂ as necessary.

The pulmonary trunk was exposed via a median sternotomy. A micromanometer-tipped catheter (Sentron pressure measuring catheter, Cordis, Miami, FL, USA) was

inserted into the main pulmonary artery through a stab wound in the right ventricular outflow tract. A 14 mm diameter perivascular flow-probe (Transonic Systems, Ithaca, NY, USA) was snugly fitted around the main pulmonary artery 2 cm downstream to the pulmonary valve. The micromanometer-tipped catheter was manipulated so that the pressure sensor was finally positioned at the level of the flow-probe.

Left atrial pressure was measured with a micromanometer-tipped catheter inserted into the cavity through the left atrial appendage. Finally, systemic blood pressure was monitored via a micromanometer-tipped catheter inserted into the abdominal aorta through the left femoral artery.

Total effective dynamic lung compliance (C_{eff}), a parameter reflecting the pulmonary compliance and resistance to gas flow together, was calculated as the ratio of tidal volume to peak tracheal pressure. Airway pressure was measured from a sideline connected to the inspiratory circuit and connected to a transducer. This was calibrated with a water manometer. Both inspiratory and expiratory gas flows were measured with a Fleisch pneumotachograph. Tidal volumes were obtained by integration of the expiratory flow signal (Capnomac, Datex, Helsinki, Finland). These values were not adjusted for the compression volume and breathing circuit expansion.

2.1. Experimental protocol

After surgical preparation, the animals were allowed to stabilise for 30 min. After an initial 30 min of baseline hemodynamic recording which included mean pulmonary artery pressure (PAP), pulmonary blood flow (Q), left atrial pressure (LAP), mean arterial blood pressure (BP), and heart rate (HR), the animals were then divided into two equal groups (*n*=6 each). In one group (endotoxin group) the animals had an intravenous infusion of 0.5 mg/kg of a freshly prepared endotoxin solution (lipopolysaccharide from *E. coli* serotype 0127:B8, Sigma, St Louis, MO, USA) over 30 min at T₀. The other group of animals (control group) served as control animals and were submitted to the same protocol, using an equivalent volume of saline infusion instead of endotoxin.

Hemodynamics and blood gases were then sequentially measured (*T*₃₀, *T*₆₀, *T*₉₀, *T*₁₂₀, and *T*₁₅₀ min) to characterise the progression of shock in this model.

2.2. Data collection

All analog signals were continuously digitalised with an appropriate system (Cadas, DataQ, Akron, OH, USA). The pulmonary pressure and flow waves were sampled at 200 Hz and stored. Cardiac cycles were defined by *R* wave detection provided by a permanent recording of a one lead electrocardiogram. Ten consecutive cycles were recorded during apnea and were numerically averaged to obtain

representative diagrams of pressure and flow waves corresponding to specific experimental conditions.

2.3. Data analysis

We used a lumped parameter model, i.e. the four-element windkessel model (WK4), in order to analyse the flow conditions in the pulmonary circulation throughout the experimental protocol. An electrical representation of the WK4 is displayed in Fig. 1.

The resistor R_2 represents the resistive properties of the pulmonary vasculature, which are considered to reside primarily in the arteriolar system. The capacitor C , placed in parallel with R_2 , represents the compliant properties of the pulmonary arterial tree [12].

The resistor R_1 is used to reflect characteristic resistance, the value of which depends principally on the inertance and compliance of the main pulmonary artery. Finally, an inductance L is used to allow positive phase angles between flow and pressure waves. It corresponds to the inertial properties of the pulmonary vasculature due to the mass of blood [12].

The four elements of the model were simultaneously calculated by using an original analytic procedure as described previously [17]. Details of this analysis are provided in Appendix A.

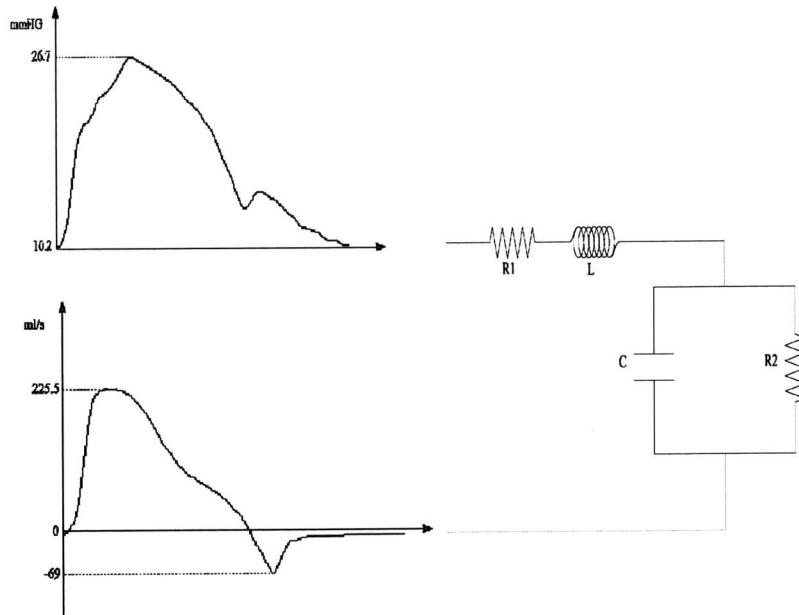


Fig. 1. Representation of the four element windkessel model with an example of computer record used to obtain averaged pulmonary pressure (upper panel) and flow (lower panel) waveforms from ten consecutive systoles. Key to symbols used: R_1 , characteristic vascular resistance; L , vascular inductance; C , vascular compliance; R_2 , peripheral vascular resistance.

2.4. Statistical evaluation.

Data are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM).

Changes in hemodynamics and in WK4 parameters within each group were evaluated by a repeated-measures analysis of variance. When necessary, a Scheffé's test was used for multiple comparisons. A t -test was used to evaluate statistical differences in behaviour between groups. A P value of less than 0.05 was considered as statistically significant.

3. Results

The time course of conventional hemodynamic variables for both groups during both the baseline period and the experimental period is presented in Fig. 2. During the baseline period, no statistical differences were noted in the hemodynamic variables between the two groups.

In the endotoxin group, PAP showed a biphasic, roughly M-shaped response following endotoxin infusion. After 1 h, PAP reached its first maximum, while at 90 min it had decreased to immediate post endotoxin infusion values. It then increased once again at 150 min.

In contrast, BP decreased gradually during the entire

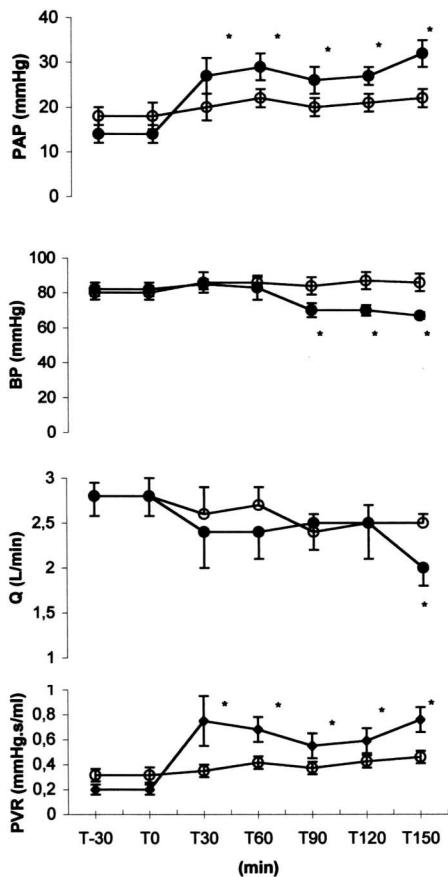


Fig. 2. Time course of conventional hemodynamic variables in the control group (open circles) and endotoxin group (closed circles). Endotoxin solution was infused from T_0 to T_{30} . Key to symbols used: PAP, mean pulmonary artery pressure; BP, mean arterial blood pressure; Q, pulmonary artery flow; PVR, pulmonary vascular resistance. PVR was referred to as the ratio between pulmonary pressure gradient (PAP-LAP) and pulmonary blood flow. * indicates significant changes from baseline values ($P < 0.05$).

experimental period and paralleled the changes observed in blood flow. PVR showed a profile similar to that of PAP.

HR increased gradually from 103 ± 13 to 153 ± 13 during the course of the experiment ($P < 0.05$). LAP remained almost unchanged at 6 mmHg.

During the same period, we recorded no significant hemodynamic changes in the control group. There were no statistical differences in the dose of anaesthetic or pancuronium administered during the protocol between endotoxin-treated and in control animals.

The time course of calculated pulmonary vascular parameters as provided by the WK4 model is presented in Fig. 3. In the control group, the characteristic resistance R_1 and the peripheral resistance R_2 remained remarkably stable. On the other hand, the vascular compliance C tended to decrease over time; these changes were, however, minor and failed to reach statistical significance. In contrast, R_1 and R_2 showed specific changes in the endotoxin group. R_2 increased significantly immediately following endotoxin insult and remained elevated thereafter. R_1 increased rapidly, subsequently returned baseline values, and then showed a secondary rise between T_{90} and T_{120} min. The vascular compliance C decreased immediately after endotoxin insult, remaining at the same low level between T_{60} and T_{120} , and then decreased significantly again at the end of the experiment. In contrast, inductance L remained essentially unchanged throughout

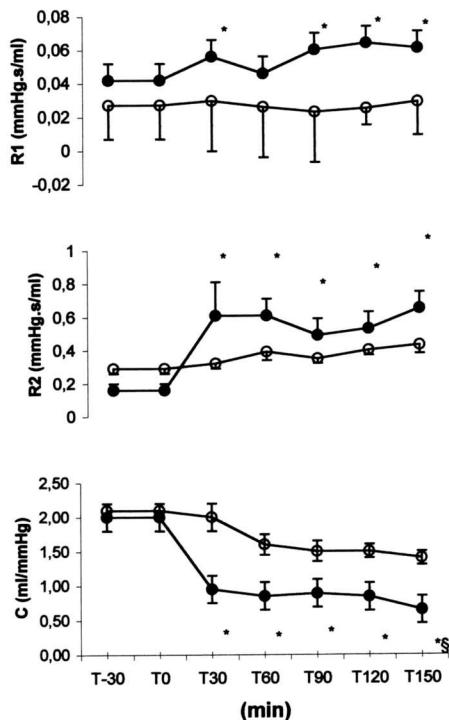


Fig. 3. Changes in detailed pulmonary vascular parameters as obtained by the four element windkessel model of the pulmonary circulation, in the control (open circle) and endotoxin groups (closed circles). Key to symbols used: R_1 , characteristic vascular resistance; R_2 , peripheral vascular resistance; C , global vascular compliance. Endotoxin solution was infused from T_0 to T_{30} . * indicates significant changes from baseline values ($P < 0.05$); § indicates significant difference from T_{30} values ($P < 0.05$).

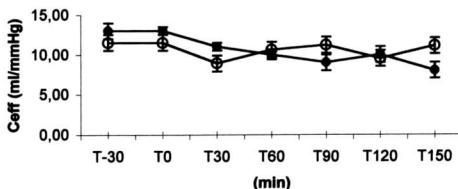


Fig. 4. Time course of effective dynamic lung compliance (C_{eff}) in the control group (open circles) and in endotoxin-injured animals (closed circles). Endotoxin infusion was started at T_0 and stopped at T_{30} . No statistical change occurred during the experimental period.

the experiment when compared to baseline values in both groups of animals.

Analysis of variance showed that dynamic lung compliance remained unchanged throughout the experiment in both groups, as illustrated in Fig. 4.

4. Discussion

Our laboratory has previously investigated effects of continuous endotoxin infusion, as this situation is more likely to reflect human sepsis [2,3]. Clinical sepsis would appear more likely to be associated with a continuous or repeated release of endotoxin, rather than a single bolus [4]. The absence of a clinical hyperdynamic circulatory state in the present experiment is explained by the fact that peripheral blood pooling was not compensated by fluid loading. In contrast, fluid challenge is initiated early in the clinical setting and allows expression of an hyperdynamic state.

The biphasic course of PAP, as well as the pattern of decrease in blood flow after endotoxin insult are quite similar to the observations of other authors. Such endotoxin effects are clearly different from the evolution of hemodynamics in sham-operated animals, as previously shown by others [5,9,15,21].

According to Ohm's law, decreases in blood flow associated with concomitant increases in the pulmonary pressure gradient imply that increases in PVR occurred. In our experiments, endotoxin insult resulted in a gradual increase in PVR. This is classically interpreted as being caused by vasoconstriction, without regard to predominant effects on either the arterial or venous side of the pulmonary circulation. In fact, several explanations, invoked separately or in association, are able to account for increases in PAP in presence of decreased blood flow. These include: (1) increase in the distal vascular resistance provoked by an elevation in vascular tone, (2) alteration of the vascular compliance of the pulmonary bed, or (3) increase in the characteristic resistance secondary to an endotoxin-induced stiffening of the proximal arterial tree.

Previous studies in which pulmonary hypertension has

been reported to result from endotoxin challenge have not been able to differentiate among these possibilities [3,5,11,14,16,20,21]. Our results suggest that the lumped parameter model provides relevant information regarding the vascular properties that govern pulmonary blood flow during basal conditions and endotoxin shock. Our results for characteristic resistance R_1 , total pulmonary vascular compliance C , and input resistance R_2 were comparable to values obtained in previous studies of animals of comparable size under baseline conditions [10,18]. It should be emphasised, however, that all existing methods of estimating total pulmonary vascular compliance are based on windkessel models; it is therefore impossible to validate these model-derived estimates using alternative, *in vivo* approaches, which are unable to provide definitive values for compliance. To our knowledge, there have been no previous measurements of compliance changes in the intact pulmonary circulation in response to endotoxic shock. Therefore, comparison of our results with those of other workers is fraught with difficulty. The present data suggest that endotoxin insult leads to a complex pulmonary vascular response involving a dynamic, time-dependent interplay between R_1 , C and R_2 . During early endotoxemia, the increase in PAP and the rise in PVR may be attributed to alterations in R_1 and R_2 and a decline in vascular compliance. It is of interest to note that the transient improvement in pulmonary hemodynamics appears to parallel changes in R_1 . This may result from the fact that the portion of the pulmonary circulation most affected during early endotoxemia is the proximal arterial segment. An increase of R_1 may be interpreted as reflecting a reduction in the compliance of the main pulmonary artery and/or a decrease of vessel radius, indicating that selective stiffening was produced by an increase in smooth muscle tone in the main pulmonary artery. On the other hand, the terminal phase of the biphasic PAP response appears to be accounted for by a selective decline in compliance of the distal pulmonary vasculature, since both R_1 and R_2 did not show further changes during this time interval. This feature is of particular interest, as it clearly shows that PAP and PVR may be increased in the absence of further alterations in the resistive properties of the vessels, but may, in fact, parallel changes in distal vascular compliance. The mechanism whereby endotoxin challenge leads to sequential effects on resistive and compliance properties of the various segments of the pulmonary vasculature remains unclear. To further complicate matters, increased interstitial fluid or pulmonary air trapping would both tend to increase perivascular pressure in distal vessels, adding to the effects of increased vascular wall tone. Thus, the occurrence of perivascular cuffing as well as bronchoconstriction could lead to exaggerated estimates of either the increase in vascular resistance or the decrease of vascular compliance. The degree of pulmonary interstitial edema was not directly measured in the present study. However, total effective dynamic compliance is generally

assumed, in open-chest animals, to reflect combined effects of parenchymal compliance plus the pressure required to overcome airway resistance. To test the hypothesis of the occurrence of air trapping and/or interstitial edema accumulation, we used an analysis of variance for the interaction between airway pressures and either air flow or volume. This showed that there were no significant differences in peak inspiratory pressures caused by corresponding flow nor volume changes in controls and after endotoxin insult. Although we were able to rule out the occurrence of both significant edema and bronchoconstriction to explain peripheral vascular narrowing, we cannot be entirely certain that lung volume remained constant during endotoxin infusion, because functional residual capacity was not measured in the present study. In contrast, convincing evidence has been accumulated to suggest that early changes in PAP are associated with the release of thromboxane A2, whereas later changes could be related to injury of the vascular wall and subsequent decrease in local NO production [1,13,21]. This is consistent with the loss of elastic properties of distal vessels. Our results raise questions that certainly need further, detailed investigation. The partitioning between resistive and vascular compliance changes revealed by application of our circulatory model may provide support for the idea that increases in PVR can only be counteracted by use of vasodilating drugs under certain circumstances. As long as the pressure response is primarily a result of vasoconstriction, the administration of vasodilators would represent a logical therapeutic step [1,5,14,20,21]. In contrast, the possibility that reduction in vascular compliance contributes to the observed response of PAP would theoretically preclude any success in attempts to restore basal tone by using vasodilators. This problem may be alleviated by reducing the inflammatory response associated with injury of the vascular wall. Previous work has shown that even minor decreases in pulmonary vascular compliance are responsible for marked deleterious effects on right ventricular function [10]. In the face of altered vascular compliance, the right ventricle's functional mode changes, from that of a flow pump to that of a pressure pump. This ventricular accommodation takes place to the detriment of stroke volume [10]. We observed this process during late endotoxemia.

In summary, we have shown that endotoxin infusion leads to a biphasic pulmonary arterial pressure response. Our analysis revealed that early changes are consistent with the occurrence of vasoconstriction, which in turn reduces the global compliance of the pulmonary bed. The PAP response was partially caused by changes in the characteristic resistance of the proximal vascular area. Late changes in PAP resulted from a specific decline in vascular compliance without further alterations in the resistive properties of the pulmonary bed. The present study reveals that analysis of PVR using an ohmic model of the pulmonary circulation fails to provide any substantial insight into the mechanisms responsible for the complex hemodynamic responses seen during endotoxin shock.

Acknowledgements

This work was supported by Grant ARC 94/99-177 from the Communauté Française de Belgique.

Appendix A

Calculation of WK4 parameters

The relationship between pressure and flow in standard models is described by a second order linear differential equation [19]:

$$a_0 Q + a_1 \frac{dQ}{dt} + a_2 \frac{d^2 Q}{dt^2} = b_0 P + b_1 \frac{dP}{dt} + b_2 \frac{d^2 P}{dt^2} \quad (1)$$

In order to avoid the use of a second derivative, which decreases signal-to-noise ratio, Eq. (1) is integrated and becomes:

$$\begin{aligned} \int_{t_0}^t Q(\tau) d\tau &= k_1 \int_{t_0}^t P(\tau) d\tau + k_2 (P(t) - P(t_0)) \\ &+ k_3 (Q(t) - Q(t_0)) + k_4 \left(\frac{dQ}{dt}(t) - \frac{dQ}{dt}(t_0) \right) \end{aligned} \quad (2)$$

where Q = pulmonary flow, P = pulmonary pressure, and t_0 = the beginning of the cardiac cycle defined as the R wave on the ECG.

The multiple regression technique estimates the constants k_i in order to minimise the residual sum of squares (RSS) i.e., the sum of the squared differences between the observed values of both parts of this equation:

$$\begin{aligned} RSS = \sum_t \left[\int_{t_0}^t Q(\tau) d\tau - k_1 \int_{t_0}^t P(\tau) d\tau - k_2 (P(t) - P(t_0)) \right. \\ \left. - k_3 (Q(t) - Q(t_0)) - k_4 \left(\frac{dQ}{dt}(t) - \frac{dQ}{dt}(t_0) \right) \right]^2 \end{aligned} \quad (3)$$

The parameters k_1 , k_2 , k_3 and k_4 are the following respective functions of L , R_1 , C and R_2 :

$$\begin{aligned} k_1 &= \frac{1}{R_1 + R_2} \quad k_2 = \frac{CR^2}{R_1 + R_2} \quad k_3 = -\frac{L + CR_1 R_2}{R_1 + R_2} \quad k_4 \\ &= -\frac{LCR_2}{R_1 + R_2} \end{aligned} \quad (4)$$

L , R_1 , R_2 and C values were then derived by solving Eq. (4).

References

- [1] Berger JI, Gibson RL, Redding GJ, Standaert TA, Clarke WR, Truog WE. Effect of inhaled nitric oxide during group B streptococcal sepsis in piglets. *Am Rev Resp Dis* 1993;147:1080–1086.

- [2] D'orio V, Fatemi M, Marnette JM, Fossion A, Marcelle R. Analysis of endotoxin effects on pulmonary circulation in terms of pressure-flow characteristics. *Circ Shock* 1993;39:285–292.
- [3] D'orio V, Halleux J, Rodriguez LM, Wahlen C, Marcelle R. Effects of *Escherichia coli* endotoxin on pulmonary vascular resistance in intact dogs. *Crit Care Med* 1986;14(9):802–806.
- [4] D'orio V, Rodriguez LM, Wahlen C, Fossion A, Juchmes J, Marcelle R. A comparison of single bolus endotoxin injection with low dose endotoxin infusion on pulmonary and systemic vascular changes in intact anaesthetised dogs. *Circ Shock* 1987;21:207–216.
- [5] Dahm P, Blomquist S, Martensson L, Thorne J, Zoucas E. Circulatory and ventilatory effects of intermittent nitric oxide inhalation during porcine endotoxemia. *J Trauma* 1994;37(5):769–777.
- [6] Ducas J, Duval D, Dasilva H, Boiteau P, Prewitt RM. Treatment of canine pulmonary hypertension: effects of norepinephrine and isoproterenol on pulmonary vascular pressure-flow characteristics. *Circulation* 1987;75(1):235–242.
- [7] Ducas J, Girling L, Schick U, Prewitt RM. Pulmonary vascular effects of hydralazine in a canine preparation of pulmonary thromboembolism. *Circulation* 1986;73(5):1050–1057.
- [8] Ducas J, Schick U, Girling L, Prewitt RM. Effects of altered left atrial pressure on pulmonary vascular pressure-flow relationships. *Am J Physiol* 1988;255(24):H19–H25.
- [9] Fang K, Krahmer RL, Rypins EB, Law WR. Starling resistor effects on pulmonary artery occlusion pressure in endotoxic shock provide inaccuracies in left ventricular compliance assessments. *Crit Care Med* 1996;24(10):1618–1625.
- [10] Fourie PR, Coetzee AR, Bolliger CT. Pulmonary artery compliance: its role in right ventricular-arterial coupling. *Cardiovasc Res* 1992;26:839–844.
- [11] Goldstein DJ, Dean DA, Smerling A, Oz MC, Burkhoff D, Dickstein ML. Inhaled nitric oxide is not a negative inotropic agent in a porcine model of pulmonary hypertension. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997;114:461–466.
- [12] Grant BJB, Paradowski LJ. Characterization of pulmonary arterial input impedance with lumped parameters models. *Am J Physiol* 1987;252(2):H585–H593.
- [13] Myers PR, Wright TF, Tanner MA, Adams HR. EDRF and nitric oxide production in cultured endothelial cells: direct inhibition by *E. coli* endotoxin. *Am J Physiol* 1992;262(3):H710–H718.
- [14] Offner PJ, Ogura H, Jordan BS, Pruitt BA, Cioffi WG. Effects of inhaled nitric oxide on right ventricular function in endotoxin shock. *J Trauma* 1995;39(2):179–186.
- [15] Olson NC, Kruse-Elliott KT, Dodam JR. Systemic and pulmonary reactions in swine with endotoxemia and gram-negative bacteremia. *J Am Vet Med Assoc* 1992;200(12):1870–1884.
- [16] Pearl RG, Baez ER, Siegel LC, Benson GV, Rice SA. Longitudinal distribution of pulmonary vascular resistance after endotoxin administration in sheep. *Crit Care Med* 1992;20(1):119–125.
- [17] Pochet T, Gerard P, Lambermont B, et al. Selection and identification of lumped models of the arterial vasculature using multiple regression and backward elimination in the time domain. *Med Biol Eng Comp* 1996;34(suppl 1 part 1):107–108.
- [18] Pouleur H, Lefevre J, van Eyll C, Jaumin PM, Charlier AA. Significance of pulmonary input impedance in right ventricular performance. *Cardiovasc Res* 1978;12:617–629.
- [19] Shim Y, Pasipoulardes A, Straley CA, et al. Arterial windkessel parameter estimation: a new time-domain method. *Ann Biomed Eng* 1994;22:66–77.
- [20] Weitzberg E, Rudehill A, Alving K, Lundberg JM. Nitric oxide inhalation selectively attenuates pulmonary hypertension and arterial hypoxia in porcine endotoxin shock. *Acta Physiol Scand* 1991;143:451–452.
- [21] Weitzberg E, Rudehill A, Lundberg JM. Nitric oxide inhalation attenuates pulmonary hypertension and improves gas exchange in endotoxin shock. *Eur J Pharmacol* 1993;233:85–94.

Annexe 4

Effects of endotoxic shock on right ventricular systolic function and mechanical efficiency.

Lambertmont B, Ghysen A, Kolh P, Tchana-Sato V, Segers P, Gerard P, Morimont P, Magis D, Dogne JM, Masereel B, D'Orio V.

Cardiovasc Res. 2003 Aug 1;59(2):412-8

Effects of endotoxic shock on right ventricular systolic function and mechanical efficiency

Bernard Lambermont^{a,*}, Alexandre Ghuyse^a, Philippe Kolh^a, Vincent Tchana-Sato^a,
Patrick Segers^b, Paul Gérard^{a-c}, Philippe Morimont^a, David Magis^c, Jean-Michel Dogné^d,
Bernard Masereel^e, Vincent D'orio^a

^aHemodynamics Research Laboratory (HemoLiege), University of Liege, Liege, Belgium

^bHydraulic Laboratory, University of Gent, Gent, Belgium

^cDepartment of Statistics, University of Liege, Liege, Belgium

^dDepartment of Pharmacy, University of Liege, Liege, Belgium

^eDepartment of Pharmacy, University of Namur, Namur, Belgium

Received 17 January 2003; accepted 27 March 2003

Abstract

Objective: To investigate the effects of endotoxin infusion on right ventricular (RV) systolic function and mechanical efficiency. **Methods:** Six anesthetized pigs (Endo group) received a 0.5 mg/kg endotoxin infusion over 30 min and were compared with six other anesthetized pigs (Control group) receiving placebo for 5 h. RV pressure–volume (PV) loops were obtained by the conductance catheter technique and pulmonary artery flow and pressure were measured with high-fidelity transducers. **Results:** RV adaptation to increased afterload during the early phase of endotoxin-induced pulmonary hypertension (T30) was obtained by both homeometric and heterometric regulations: the slope of the end-systolic PV relationship of the right ventricle increased from 1.4 ± 0.2 mmHg/ml to 2.9 ± 0.4 mmHg/ml ($P < 0.05$) and RV end-diastolic volume increased from 56 ± 6 ml to 64 ± 11 ml ($P < 0.05$). Consequently, right ventricular–vascular coupling was maintained at a maximum efficiency. Ninety minutes later (T120), facing the same increased afterload, the right ventricle failed to maintain its contractility to such an elevated level and, as a consequence, right ventricular–vascular uncoupling occurred. PV loop area, which is known to be highly correlated with oxygen myocardial consumption, increased from 1154 ± 127 mmHg/ml (T0) to 1798 ± 122 mmHg/ml (T180) ($P < 0.05$) while RV mechanical efficiency decreased from $63 \pm 2\%$ (T0) to $45 \pm 5\%$ (T270) ($P < 0.05$). **Conclusions:** In the very early phase of endotoxic shock, right ventricular–vascular coupling is preserved by an increase in RV contractility. Later, myocardial oxygen consumption and energetic cost of RV contractility are increased, as evidenced by the decrease in RV efficiency, and right ventricular–vascular uncoupling occurs. Therefore, therapies aiming at restoring right ventricular–vascular coupling in endotoxic shock should attempt to increase RV contractility and to decrease RV afterload but also to preserve RV mechanical efficiency.

2003 European Society of Cardiology. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Contractile function; Endotoxins; Hemodynamics; Pulmonary circulation; Septic shock

1. Introduction

Despite advances in supportive care, septic shock re-

mains one of the leading causes of death in critically ill patients [1]. Among the numerous complications of septic shock, right heart failure can be lethal [2], but little is known about dynamic right ventricular (RV) function during septic shock [3]. Indeed, while low peripheral vascular resistance in sepsis decreases left ventricular

*Corresponding author. Medical Intensive Care Unit (-2C), Department of Medicine, University Hospital of Liege, CHU Sart Tilman B35, 4000 Liege, Belgium. Tel.: +32-43-667-191; fax: +32-43-667-723.

E-mail address: b.lambermont@chu.ulg.ac.be (B. Lambermont).

Time for primary review 34 days.

afterload, increased pulmonary vascular resistance from acute lung injury increases RV afterload [4]. Therefore, RV function must be studied specifically.

In some studies, it was shown that increased RV afterload was not the dominant cause of RV depression in septic shock [2,5]. According to D’Orio et al., however, impaired RV function would rather result from inappropriate matching between ventricular inotropic state and pulmonary vascular impedance [6]. Although such studies have evidenced RV systolic dysfunction in septic conditions, most of them used RV ejection fraction as an index of RV performance [2,7] or RV pressure-length relationship [8–10] as an approximate of RV systolic function.

A better understanding of the mechanisms of RV dysfunction may lead to more effective therapies of myocardial depression in septic shock. Therefore, we investigated in this study the determinants of RV systolic function impairment during endotoxic shock.

In order to investigate accurately RV systolic function, we used the conductance catheter technique to obtain the robust and highly sensitive indices of ventricular function described earlier: the slope (End-systolic elastance, E_{es}) of the end-systolic pressure–volume (PV) relationship (ESPVR) and its volume intercept [11,12].

2. Methods

All experimental procedures and protocols used in this investigation were reviewed and approved by the Ethics Committee of the Medical Faculty of the University of Liege. The investigation conforms with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996).

2.1. Surgical preparation

Experiments were performed on 12 healthy pure Pietrain pigs of either sex weighing from 20 to 30 kg. The animals were premedicated with intramuscular administration of ketamine (20 mg/kg) and diazepam (1 mg/kg). Anesthesia was then induced and maintained by a continuous infusion of sufentanil (0.5 µg/kg/h) and pentobarbital (5 mg/kg/h). Spontaneous movements were prevented by pancuronium bromide (0.2 mg/kg). After endotracheal intubation through a cervical tracheostomy, the pigs were connected to a volume cycled ventilator (Evita 2, Dräger, Lübeck, Germany) set to deliver a tidal volume of 10 ml/kg with a FiO_2 of 0.4 and at a respiratory rate of 20 breaths/min. End-tidal CO_2 (PETCO₂) measurements (Capnomac, Datex, Helsinki, Finland) were used to monitor the adequacy of ventilation. Respiratory settings were adjusted to maintain PETCO₂ between 30 and 35 mmHg.

The pulmonary trunk was exposed by means of medial sternotomy. A micromanometer-tipped catheter (Sentron pressure-measuring catheter, Cordis, Miami, FL) was inserted into the main pulmonary artery through a stab wound in the RV outflow tract. A 14 mm diameter perivascular flow probe (Transonic Systems, Ithaca, NY, USA) was closely adjusted around the main pulmonary artery 2 cm downstream of the pulmonary valve. The micromanometer-tipped catheter was manipulated so that the pressure sensor was positioned closely to the flow probe.

Left atrial pressure was measured with a micromanometer-tipped catheter inserted into the cavity through the left atrial appendage. Systemic arterial pressure was monitored with a micromanometer-tipped catheter inserted into the descending thoracic aorta through the right femoral artery.

A 7F, 12-electrode (8 mm interelectrode distance) conductance micromanometer-tipped catheter (CD Leycom, Zoetermeer, The Netherlands) was inserted through the RV infundibulum into the right ventricle and positioned so that all electrodes were in the RV cavity.

A 6F Fogarty balloon catheter (Baxter Healthcare Corp., Oakland, CA, USA) was advanced into the inferior vena cava through a right femoral venotomy. Inflation of this balloon produced a titratable gradual preload reduction.

2.2. Experimental protocol and physiologic measurements

After a 30 min stabilization period (T0), 12 animals were randomly divided in two groups.

While in the first group (Control group, $n=6$) the animals were infused with placebo, in the second group (Endo group, $n=6$), they received a 0.5 mg/kg endotoxin (lipopolysaccharide from *Escherichia coli* serotype 0127:B8; Sigma Chemical, St Louis, MO, USA) infusion over 30 min (from T0 to T30).

Hemodynamic data included pulmonary artery pressure (PAP) wave, pulmonary blood flow wave, left atrial pressure, systemic arterial pressure, heart rate, RV pressure, RV volume and RV PV loops. These parameters were recorded every 30 min from T30 to T270 during a short apneic phase and stored for subsequent analysis. All analog signals were continuously converted to digital form with an appropriate system (Cadas, DataQ Instruments Inc., Akron, OH, USA). Pulmonary artery blood flow, left atrial pressure, systemic arterial pressure, heart rate, PAP, RV volume, RV pressure and RV PV loops, were also monitored on-line throughout the experiment. Systemic arterial pressure, PAP, and pulmonary blood flow waves were integrated to calculate corresponding mean values.

RV PV loops were recorded every 30 min from T30 to T270 during a transient occlusion of the inferior vena cava using the Fogarty balloon.

2.3. Data analysis

2.3.1. Pulmonary circulation

E_a , which reflects RV afterload, was calculated using the following equation [8]:

$$E_a = (R_1 + R_2) / [T_s + R_2 C (1 - e^{-R_2 C / T_d})] \quad (1)$$

where T_s and T_d are the systolic and diastolic time intervals, respectively.

A lumped parameter model, namely the four-element windkessel model (WK4), was used to calculate R_1 , R_2 and C using an original analytic procedure described previously [13]. In this model, R_1 represents the characteristic impedance of the pulmonary circulation, R_2 pulmonary vascular resistance, and C pulmonary artery compliance [14]. The fourth element of WK4, an inductance, is used to allow positive phase angles between flow and pressure waves. It corresponds to the inertial properties of the pulmonary vasculature due to the mass of blood [14].

2.3.2. Right ventricular function

Right ventricular PV loops were obtained using the conductance catheter method [12]. Briefly, a multiple-electrode catheter placed in the right ventricle is used to set up an electrical field, and adjacent pairs of electrodes measure the local conductivity of blood, which is proportional to local blood volume [12]. Structures surrounding the blood-filled ventricular cavity also contribute to the overall conductance signal. The resulting off-set, termed parallel conductance, can be estimated by transiently altering the conductivity of blood with hypertonic saline [12]. In addition, the conductance signal must be corrected to represent true volume. Therefore, to determine the gain factor (alpha slope factor), an alternate method of measuring volume is needed [12]. In this study, we used the value of stroke volume measured by the pulmonary artery ultrasonic flow probe.

Before each measurement, parallel conductance was determined with the saline method by injecting 3 ml of NaCl 10% into inferior vena cava [12].

During a rapid inferior vena cava occlusion maneuver, E_{es} was determined [12]. ESPVR was determined by fitting a straight line through the end-systolic PV points. However, these points could show some nonlinearity while ESPVR is calculated by linear regression. To avoid the problem of linear extrapolation to zero pressure, we used a volume intercept at a fixed pressure of 25 mmHg (V_{p25}) to quantify the position of ESPVR. Then, the slope of ESPVR, E_{es} , and its volume position, V_{p25} , represent relatively load-independent indices of ventricular contractility. Any increase in E_{es} , any decrease in V_{p25} , or both changes, suggest an improved contractile state [15].

Stroke work was calculated as the integrated area of each PV loop.

PVA was obtained by measuring the specific area in the PV plane bounded by the end-systolic and end-diastolic PV relationships and the systolic segment of the PV loop and serves as a reliable predictor of myocardial oxygen consumption [8,16].

RV efficiency was calculated as the ratio of stroke work to PVA [8,17].

Additionally, to assess right ventricular–vascular coupling, we examined the E_{es}/E_a ratio. Under normal operating conditions, the right ventricle operates at a maximum efficiency and a submaximal stroke work ($E_{es}/E_a > 1$). The maximal stroke work is obtained when $E_{es}/E_a = 1$, while uncoupling occurs when E_{es}/E_a is lower than 1 [8,18].

2.4. Statistical analysis

Data are presented as mean \pm S.E.M.

Statistical comparison of data over time and between groups was conducted by a two-way analysis of variance for repeated measurements with time and groups as factors, followed by Scheffé's multiple comparisons test if the analysis of variance resulted in P -value < 0.05 (Statistica[®]; Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA).

$P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Effect of endotoxin infusion on conventional hemodynamic data

The time-course of endotoxin insult on conventional hemodynamic variables is presented in Fig. 1. Mean PAP in Endo group reached a first maximum at T30 (i.e. 30 min after the start of endotoxin infusion), then immediately returned to lower values, and progressively increased until T270. In contrast, mean systemic arterial pressure decreased from 95 ± 5 (T30) to 67 ± 4 mmHg (T60) ($P < 0.05$) and remained below 60 mmHg from T90 until T210. At T240 and T270, mean systemic arterial pressure returned to values greater than 60 mmHg, 63 ± 11 and 74 ± 11 mmHg, respectively.

Evolution of mean pulmonary artery flow remained similar in Control and Endo groups throughout the experiment. Heart rate increased from 115 ± 7 (T0) to 137 ± 12 beats/min (T30) after endotoxin infusion, and remained higher than 150 beats/min throughout the experiment.

3.2. Effect of endotoxin infusion on right ventricular volumes and end-diastolic pressure

Right ventricular end-diastolic volume evolution is depicted in Fig. 2. In Endo group, end-diastolic volume increased from 56 ± 6 ml (T0) to 64 ± 11 ml ($P < 0.05$) at the end of endotoxin infusion (T30) and remained there-

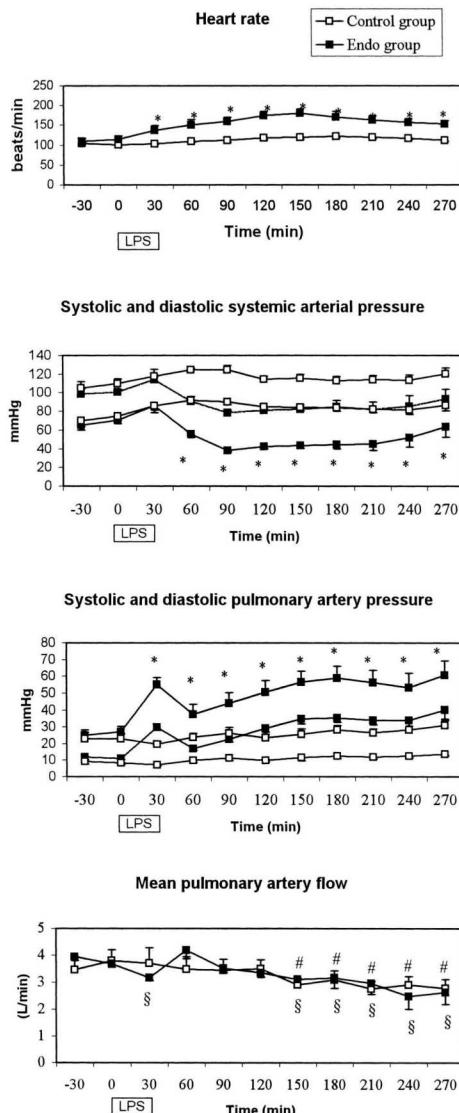


Fig. 1. Time-course of conventional hemodynamic parameters in Control group (open square) and in Endo group (closed square). LPS indicates endotoxin infusion. Data are presented as mean \pm S.E.M. * $P<0.05$ Endo group vs. T0 and vs. Control group. $^{\#}P<0.05$ Control group vs. T0. $^{\$}P<0.05$ Endo group vs. T0.

after at higher values throughout the experiment. In contrast, stroke volume decreased progressively from 31 ± 5 ml (T0) to 21 ± 4 ml (T270) ($P<0.05$). As a

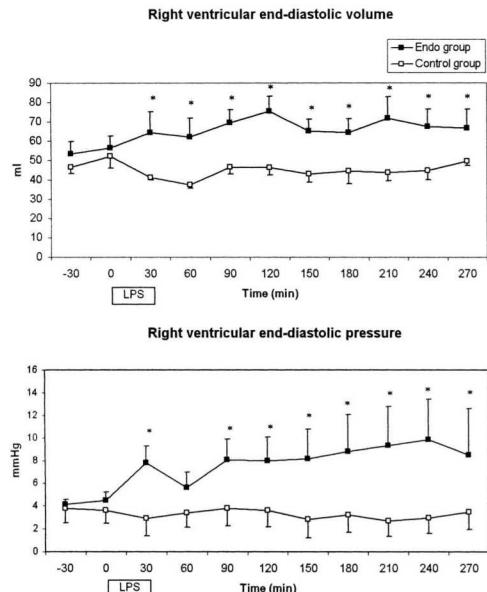


Fig. 2. Time-course of end-diastolic volume and end-diastolic pressure in Control group and in Endo group. LPS indicates endotoxin infusion. Data are presented as mean \pm S.E.M. * $P<0.05$ Endo group vs. T0 and vs. Control group.

consequence, ejection fraction progressively decreased from $54\pm 2\%$ (T0) to $33\pm 5\%$ (T270) ($P<0.05$).

Right ventricular end-diastolic pressure increased from 5 ± 1 mmHg at baseline (T0) to 8 ± 2 mmHg (T30) after the end of endotoxin infusion ($P<0.05$ vs. T0 and vs. Control group) and remained close to 8 mmHg from T90 to T270. These latter values were significantly greater than those obtained in the Control group ($P<0.05$).

3.3. Effect of endotoxin infusion on derived hemodynamic data

E_a in Endo group expressed a profile that was similar to the changes observed in PAP (Fig. 3). It showed a first peak at T30 and, after a drop, increased again from T90 until the end of the experiment. E_{es} values in Endo group increased from 1.4 ± 0.2 mmHg/ml (T0) to 2.9 ± 0.4 mmHg/ml (T30) ($P<0.05$) and remained higher than basal values from T60 to T150. From T180, E_{es} values in Endo group were similar to Control group (Fig. 3).

E_{es}/E_a remained at an optimal level of 2 from T0 to T60. At T120, right ventricular–vascular coupling reached a value of 0.9 ± 0.1 and deteriorated progressively reaching a value of 0.5 (T270) at the end of the experiment (Fig. 3).

V_{p25} decreased from a basal value of 20 ± 8 ml to 2 ± 2

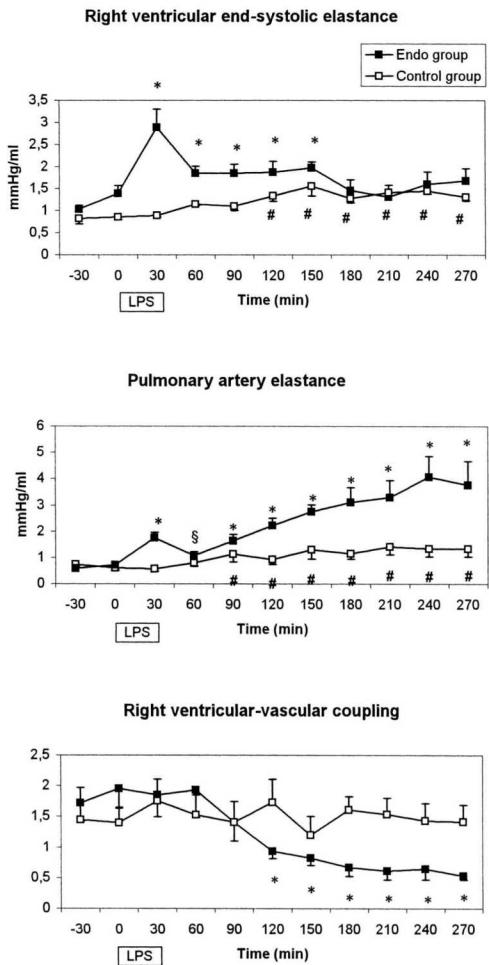


Fig. 3. Time-course of right ventricular end-systolic elastance (E_{es}), pulmonary arterial elastance (E_s), and right ventricular-vascular coupling (E_{es}/E_s) in Control group (open square) and Endo group (closed square). LPS indicates endotoxin infusion. Data are presented as mean \pm S.E.M. * P < 0.05 Endo group vs. T0 and vs. Control group. $^{\#}P$ < 0.05 Control group vs. T0. $^{\$}P$ < 0.05 Endo group vs. T0.

ml at T30 (P < 0.05) and thereafter remained lower than basal values (P < 0.05).

PVA progressively increased from 1154 ± 127 mmHg/ml (T0) to 1475 ± 152 (T90) (P < 0.05). It reached a value of 1798 ± 122 mmHg/ml at T180 (P < 0.05) and remained elevated until the end of the experimental period.

Right ventricular efficiency decreased significantly (P < 0.05) from $63 \pm 2\%$ (T0) to $45 \pm 5\%$ at the end of the experimental period (T270) (Fig. 4).

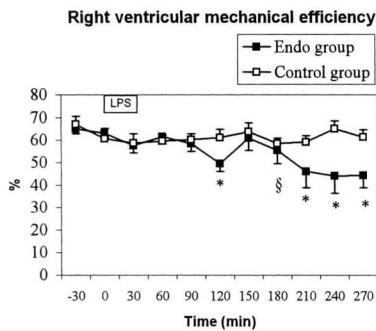


Fig. 4. Time-course of right ventricular mechanical efficiency in Control group (open square) and Endo group (closed square). LPS indicates endotoxin infusion. Data are presented as mean \pm S.E.M. * P < 0.05 Endo group vs. T0 and vs. Control group. $^{\$}P$ < 0.05 Endo group vs. T0.

4. Discussion

The effects of endotoxin infusion on pulmonary hemodynamics and right ventricular-vascular coupling have been studied previously in our laboratory [6,13]. In the present study, using a more reliable technique, i.e. the conductance catheter technique, we confirm these data, and improve the understanding of right ventricular dysfunction mechanism by demonstrating that endotoxin infusion induced a decrease in RV mechanical efficiency.

RV adaptation to an increase in afterload can be obtained by two different, but complementary, mechanisms: heterometric (the Frank-Starling mechanism) and homeometric regulations. During heterometric regulation, stroke volume is maintained owing to changes in RV preload, i.e. end-diastolic volume, while contractility, per se, remains unchanged. In contrast, during homeometric regulation, RV contractility, i.e. E_{es} , increases to maintain stroke volume while end-diastolic volume remains unchanged. Previous studies performed in sheep, have suggested that the RV response to acute pressure overload consisted in both enhanced contractility and the Frank-Starling mechanism [19]. However in newborn lambs, RV output in the face of increased afterload seems regulated only through homeometric regulation [11,15,20]. In endotoxic dogs, D'orio et al. evidenced that the impairment of cardiovascular performance is due to inappropriate matching between ventricular inotropic state and RV afterload, with secondary altered ventricular-vascular coupling [6].

In the present study, RV adaptation during the early phase of endotoxin-induced pulmonary hypertension (T30) was obtained by both homeometric and heterometric regulations. Indeed, both E_{es} and end-diastolic volume increased and right ventricular-vascular coupling was maintained at a maximum efficiency [8]. Surprisingly, 90 min after the end of endotoxin infusion (T120), facing the

same increased afterload (E_a), the right ventricle failed to maintain its contractility to such an elevated level and, as a consequence, right ventricular–vascular coupling decreased from values close to 2 to values lower than 1. These results thus suggest an impairment of homeometric regulation at T120.

During increased left ventricle afterload, homeometric regulation is explained by an increase in coronary perfusion secondary to the increased aortic pressure. However, in our study, because of systemic hypotension, RV homeometric regulation cannot be induced by increased coronary perfusion but rather could be related to mechanisms such as mechanical stretch-activated channels, release of endogenous catecholamines, or release of stimulating factors from the endocardial endothelium [15].

In the present work, PVA, which is known to be highly correlated with myocardial oxygen consumption even in the presence of marked changes in preload, afterload, and cardiac contractility [16], increased significantly at T120, as compared to T0. This suggests that the right ventricle requires significantly more oxygen in sepsis than during normal condition.

Such an increase in oxygen consumption by a right ventricle delivering a similar work represents a decrease in RV mechanical efficiency. In our study, RV mechanical efficiency, calculated as the ratio of stroke work to PVA, was decreased from T120: stroke work remained unchanged but PVA increased significantly during endotoxic shock.

Several hypotheses can explain this decrease in RV mechanical efficiency during endotoxic shock.

Although Cunnion et al. demonstrated an increase in coronary sinus blood flow in septic patients [21], there is, however, growing evidence that coronary circulation in sepsis is susceptible to maldistribution of regional blood flow [22] and that myocardial blood flow could be unable to augment sufficiently in response to oxygen demands [23]. Since, in endotoxic condition, the energetic cost of contractility is increased while, in parallel, myocardial blood flow and, consequently, contractility are unable to increase, homeometric regulation cannot occur.

A number of humoral and intracellular mediators have also been implicated in the endotoxic cardiac dysfunction, and myocardial ischemia is not the only mechanism contributing to myocardial depression [24]. Endotoxin induces the synthesis and release of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta by monocytes and macrophages [25]. Consecutive activation of constitutive and inducible nitric oxide synthase increases nitric oxide production [26] which, in turn, stimulates guanylate cyclase and production of cGMP, a nucleotide with known myocardial depressant function [26,27]. Tumor necrosis factor alpha may also impair the adenylyl cyclase response to catecholamines and inhibit calcium influx through calcium channel leading to myocardial depression [28]. Alterations of beta receptors may also contribute to

myocardial dysfunction and decrease myocardial sensitivity to catecholamines [29]. Finally, increased superoxide, and peroxynitrite generation as well as oxidative stress injury in the myocardium of endotoxicemic rats were associated with impaired cardiac contractility and depressed cardiac efficiency [30].

To our knowledge, it is the first study to look at right ventricular–vascular coupling and myocardial energetics by conductance catheter technique during septic shock. Decrease in RV mechanical efficiency during endotoxic shock has never been described previously by the conductance catheter technique in intact animals. However, it has already been observed in the isolated heart of endotoxicemic rats and in tumor necrosis factor alpha-infused isolated canine hearts [28,30].

Accurate evaluation of RV performance needs assessment of contractile state, preload and afterload. Determination of preload and afterload can be relatively straightforward by measurements of RV end-diastolic volume and pulmonary artery elastance, respectively. Quantification of contractile state needs analysis of pressure–volume loops under different loading conditions. However, conductance catheter can be inadequate to measure absolute volume. It is an indirect technique and the measured signals (the conductivity of the blood within the ventricle) require calibration (specific resistivity of the blood, parallel conductance and alpha slope factor). Moreover, compared to the left ventricle, the right ventricle has a complex shape and dense trabeculation. Nevertheless, volume measurement provided by this technique allows correct estimation of RV contractile state and RV volume changes, even in closed chest [12].

The major limitation of this study is the use of endotoxin infusion as a model of human septic shock. In this porcine model which mimics the cardiovascular effects of clinical septic shock [13], production of the two key mediators of human septic shock, tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta, is induced by endotoxin infusion. The dose–response relationship for endotoxin and the onset of cardiovascular effects differ between species and, moreover, animal models take no account of human variability due to age, biological reserve, and genetic factors [31]. Therefore, our data should be viewed in that context.

In conclusion, this is the first report of RV myocardial dysfunction in pigs during sepsis using the conductance catheter. Our data showed that in the very early phase of endotoxic shock, right ventricular–vascular coupling is preserved by an increase in RV contractility. Later, myocardial oxygen consumption and energetic cost of RV contractility are increased, as evidenced by the decrease in RV efficiency, and right ventricular–vascular uncoupling occurs. Therefore, therapies aiming at restoring right ventricular–vascular coupling in endotoxic shock should attempt to increase RV contractility and to decrease RV afterload but also to preserve RV mechanical efficiency. As

the key to future diagnostic and therapeutic interventions in patients with right heart dysfunction relies completely on the availability of a reliable and valid clinical physiologic monitor, conductance catheter technique should become a method of choice in the assessment of RV performance under clinical conditions.

Acknowledgements

This work is supported by FRSM (Fonds de la Recherche Scientifique Médicale) Grant no. 3.4.505.01.F. Vincent Tchana-Sato is Aspirant FNRS (Fonds National de la Recherche Scientifique). Patrick Segers is the recipient of a post-doctoral grant from FWO-Vlaanderen.

References

- Freeman BD, Natanson C. Anti-inflammatory therapies in sepsis and septic shock. *Expert Opin Invest Drugs* 2000;9(7):1651–1663.
- Kimchi A, Ellrodt AG, Berman DS et al. Right ventricular performance in septic shock: a combined radionuclide and hemodynamic study. *J Am Coll Cardiol* 1984;4(5):945–951.
- Wojciech JA, Szalados JE. Right heart function: neither silent nor passive. *Crit Care Med* 2002;30(11):2601–2603.
- Sibbald WJ, Paterson NA, Holiday RL et al. Pulmonary hypertension in sepsis: measurement by the pulmonary arterial diastolic-pulmonary wedge pressure gradient and the influence of passive and active factors. *Chest* 1978;73(5):583–591.
- Parker MM, McCarthy KE, Ognibene FP, Parrillo JE. Right ventricular dysfunction and dilatation, similar to left ventricular changes, characterize the cardiac depression of septic shock in humans. *Chest* 1990;97(1):126–131.
- D'Orio V, Lambermont B, Detry O et al. Pulmonary impedance and right ventricular-vascular coupling in endotoxin shock. *Cardiovasc Res* 1998;38(2):375–382.
- Redl G, Abdi S, Traber LD et al. Inhibition of thromboxane synthesis reduces endotoxin-induced right ventricular failure in sheep. *Crit Care Med* 1991;19(10):1294–1302.
- Fourie PR, Coetzee AR, Bolliger CT. Pulmonary artery compliance: its role in right ventricular-arterial coupling. *Cardiovasc Res* 1992;26:839–844.
- Karunanithi MK, Michniewicz J, Copeland SE, Feneley MP. Right ventricular preload recruitable stroke work, end-systolic pressure-volume, and dP/dt max-end-diastolic volume relations compared as indexes of right ventricular contractile performance in conscious dogs. *Circ Res* 1992;70(6):1169–1179.
- Szabo G, Sebening C, Hagl C et al. Right ventricular function after brain death: response to an increased afterload. *Eur J Cardiothorac Surg* 1998;13(4):449–458.
- De Vroomen M, Steendijk P, Lopes Cardozo RH et al. Enhanced systolic function of the right ventricle during respiratory distress syndrome in newborn lambs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280(1):H392–H400.
- Dickstein ML, Yano O, Spotnitz HM, Burkhoff D. Assessment of right ventricular contractile state with the conductance catheter technique in the pig. *Cardiovasc Res* 1995;29(6):820–826.
- Lambermont B, Kolh P, Detry O et al. Analysis of endotoxin effects on the intact pulmonary circulation. *Cardiovasc Res* 1999;41(1):275–281.
- Grant BJB, Paradowski LJ. Characterization of pulmonary arterial input impedance with lumped parameters models. *Am J Physiol* 1987;252(21):H585–H593.
- De Vroomen M, Cardozo RH, Steendijk P, Van Bel F, Baan J. Improved contractile performance of right ventricle in response to increased RV afterload in newborn lamb. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;278(1):H100–H105.
- Suga H, Hayashi T, Shirahata M. Ventricular systolic pressure-volume area as predictor of cardiac oxygen consumption. *Am J Physiol* 1981;240(1):H39–H44.
- Burkhoff D, Sagawa K. Ventricular efficiency predicted by an analytical model. *Am J Physiol* 1986;250(6 Pt 2):R1021–R1027.
- Kass DA, Kelly RP. Ventriculo-arterial coupling: concepts, assumptions, and applications. *Ann Biomed Eng* 1992;20:41–62.
- Hon JK, Steendijk P, Khan H, Wong K, Yacoub M. Acute effects of pulmonary artery banding in sheep on right ventricle pressure-volume relations: relevance to the arterial switch operation. *Acta Physiol Scand* 2001;172(2):97–106.
- Lopes Cardozo RH, Steendijk P, Baan J et al. Right ventricular function in respiratory distress syndrome and subsequent partial liquid ventilation. Homeometric autoregulation in the right ventricle of the newborn animal. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162(2 Pt 1):374–379.
- Cunningham RE, Schaer GL, Parker MM, Natanson C, Parrillo JE. The coronary circulation in human septic shock. *Circulation* 1986;73(4):637–644.
- Sibelius U, Grandel U, Buerke M et al. Staphylococcal alpha-toxin provokes coronary vasoconstriction and loss in myocardial contractility in perfused rat hearts: role of thromboxane generation. *Circulation* 2000;101(1):78–85.
- Bloos FM, Morisaki HM, Neal AM et al. Sepsis depresses the metabolic oxygen reserve of the coronary circulation in mature sheep. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153(5):1577–1584.
- Court O, Kumar A, Parrillo JE, Kumar A. Clinical review: myocardial depression in sepsis and septic shock. *Crit Care* 2002;6(6):500–508.
- Michie HR, Manogue KR, Spriggs DR et al. Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *New Engl J Med* 1988;318(23):1481–1486.
- Kumar A, Brar R, Wang P et al. Role of nitric oxide and cGMP in human septic serum-induced depression of cardiac myocyte contractility. *Am J Physiol* 1999;276(1 Pt 2):R265–R276.
- Brady AJ, Poole-Wilson PA, Harding SE, Warren JB. Nitric oxide production within cardiac myocytes reduces their contractility in endotoxemia. *Am J Physiol* 1992;263(1 Pt 2):H1963–H1966.
- Miyanaga H, Shishido T, Kawada T et al. Acute effect of tumor necrosis factor-alpha is minimal on mechanics but significant on energetics in blood-perfused canine left ventricles. *Crit Care Med* 1999;27(1):168–176.
- Silverman HJ, Penaranda R, Orens JB, Lee NH. Impaired beta-adrenergic receptor stimulation of cyclic adenosine monophosphate in human septic shock: association with myocardial hyporesponsiveness to catecholamines. *Crit Care Med* 1993;21(1):31–39.
- Khadour FH, Panas D, Ferdinand P et al. Enhanced NO and superoxide generation in dysfunctional hearts from endotoxic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283(3):H1108–H1115.
- Michie HR. The value of animal models in the development of new drugs for the treatment of the sepsis syndrome. *J Antimicrob Chemother* 1998;41(Suppl A):47–49.

Annexe 5

Effect of hemodiafiltration on pulmonary hemodynamics in endotoxic shock.

**Lambermont B, Kolh P, Ghuysen A, Moonen M, Morimont P,
Gerard P, Tchana-Sato V, Rorive G, D'Orio V.**

Artif Organs. 2003 Dec;27(12):1128-33

Effect of Hemodiafiltration on Pulmonary Hemodynamics in Endotoxic Shock

*B. Lambermont, *P. Kohl, *A. Ghuyse, †M. Moonen, *P. Morimont, *‡P. Gérard,
*V. Tchana-Sato, †G. Rorive, and *V. D'orio

*Hemodynamics Research Laboratory (HemoLiege); †Nephrology, Department of Medicine; and ‡Department of Statistics,
University of Liege, Liege, Belgium

Abstract: Hemofiltration can improve pulmonary hemodynamics during septic shock. The main objective of the study was to determine whether hemodiafiltration (HDF) would also have beneficial effects on pulmonary hemodynamics during septic shock. In the Endo group, six anesthetized pigs received a 0.5 mg/kg endotoxin infusion over 30 min. In the HDF group ($n = 6$), HDF was started 30 min after the end of the endotoxin infusion, while in the Control group ($n = 4$) they received HDF but no endotoxin infusion. Pulmonary hemodynamics were analyzed in

detail with a four-element windkessel model. Although in the Control group, HDF did not alter pulmonary hemodynamic parameters, in the HDF group, it was responsible for an amplification of the deleterious pulmonary vascular response to endotoxin insult. Our results show that HDF must be used cautiously in septic shock since it can precipitate right heart failure by increasing pulmonary vascular resistance. **Key Words:** Endotoxins—Hemodiafiltration—Hemodynamics—Pulmonary circulation—Swine.

During septic shock, acute pulmonary artery hypertension can lead to several deleterious cardiovascular effects including right heart failure, while, on the other hand, decreased systemic arterial pressure can lead to refractory shock and death. As it remains one of the leading causes of death in ICU, numerous interventions have been tested in order to improve these well-known deleterious hemodynamic effects of septic shock (1,2).

In this setting, continuous renal replacement therapy emerged as a promising new approach. It was first used in patients with multisystem organ dysfunction and acute renal failure since intermittent hemodialysis may be undesirable in such hemodynamically unstable patients. Because hemodynamics improvement was observed in patients suffering from both septic shock and renal failure who received hemofiltration, it was suggested that extrarenal epuration technique could also improve hemodynamics in patients with septic shock alone (3).

The rationale for such interest derives from the knowledge that part of the systemic effects of sepsis may be mediated by endogenous, water-soluble, small (<500 Da) and middle size (>500 but $<60,000$ Da) molecules, and that their removal from the bloodstream may be of significant benefit. Accordingly, some experimental and clinical evidence suggests that hemofiltration is able to remove sepsis mediators (4). In septic shock, beneficial effects are clinically modest when low ultrafiltrate rates are used (10–15 ml/kg/h) and it has been suggested that the use of ultrafiltration rates as high as 200 ml/kg/h is required to improve hemodynamics in experimental models (5,6). Unfortunately, the application of high filtration rates greater than 100 ml/kg/h is practically impossible to sustain in humans.

As such high ultrafiltration rates during hemofiltration are difficult to reach in humans, it was interesting to test whether less aggressive hemofiltration combined with dialysis would also have beneficial effects during endotoxemia. This technique, called hemodiafiltration (HDF), is already frequently used as an intermittent renal therapy and might improve the overall quality of treatment in end-stage renal failure patients. Combining diffusive and convective mechanisms should increase the clearance of small

Received November 2002; revised February 2003.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Bernard Lambermont, Medical Intensive Care Unit (-2C), Department of Medicine, University Hospital of Liege, CHU Sart Tilman B35, 4000 Liege, Belgium. E-mail: b.lambermont@chu.ulg.ac.be

molecules while improving the control of azotemia in septic patients with renal failure (7).

The purpose of this study was to test whether HDF might affect pulmonary hemodynamics in a beneficial way, similar to the reported effects of hemofiltration during septic shock.

Specifically, the changes in pulmonary vascular mechanical properties induced by endotoxin insult were assessed and ultimately the specific actions of HDF in this setting were analyzed. The four-element windkessel model of the pulmonary circulation was used to determine the contribution of segmental resistance across large artery vessels (characteristic resistance), small vascular vessels (peripheral resistance), and compliant vessels to the pulmonary pressure gradient and its changes (8).

The effects on tumor necrosis factor- α (TNF) concentration were also analyzed since this cytokine is a key mediator in sepsis and is directly related to the severity of septic shock (9).

MATERIALS AND METHODS

All experimental procedures and protocols used in this investigation were reviewed and approved by the Ethics Committee of the Medical Faculty of the University of Liege. They were performed in accordance with the Guiding Principles for the Care and Use of Laboratory Animals approved by the Council of the American Physiological Society.

Experiments were performed on 16 healthy pure Pietrain pigs of either sex, weighing from 20 to 30 kg. The animals were premedicated with intramuscular administration of ketamine (20 mg/kg) and diazepam (1 mg/kg). Anesthesia was then induced and maintained by a continuous infusion of sufentanil (0.5 μ g/kg/h) and pentobarbital (5 mg/kg/h). Spontaneous movements were prevented by pancuronium bromide (0.2 mg/kg). After endotracheal intubation through a cervical tracheostomy, the pigs were connected to a volume cycled ventilator (Evita 2, Dräger, Lübeck, Germany) set to deliver a tidal volume of 10 ml/kg at a respiratory rate of 20 breaths/min. End-tidal CO_2 measurements (Capnomac, Datex, Helsinki, Finland) were used to monitor the adequacy of ventilation. Respiratory settings were adjusted to maintain end-tidal CO_2 between 30 and 35 mm Hg. Arterial oxygen saturation was monitored closely and maintained at more than 95% by adjusting the FiO_2 as necessary.

The pulmonary trunk was exposed by means of medial sternotomy. A micromanometer-tipped catheter (Sentron pressure-measuring catheter, Cordis, Miami, FL, U.S.A.) was inserted into the main pul-

monary artery through a puncture in the right ventricular outflow tract. A 14-mm diameter perivascular flow probe (Transonic Systems, Ithaca, NY, U.S.A.) was closely adjusted around the main pulmonary artery 2 cm downstream of the pulmonary valve. The micromanometer-tipped catheter was manipulated so that the pressure sensor was finally positioned very close to the flow probe.

Left atrial pressure was measured with a micromanometer-tipped catheter inserted into the cavity through the left atrial appendage. Finally, systemic blood pressure was monitored with a micromanometer-tipped catheter inserted into the descending thoracic aorta through the left femoral artery.

Experimental protocol

After a 60-min stabilization period, baseline hemodynamics data were acquired (T0). These included pulmonary artery pressure wave (PAP), pulmonary blood flow wave, left atrial pressure, systemic arterial pressure (BP), and heart rate. The animals were then divided into three groups.

The first group ($n = 6$) received at T0 a freshly prepared endotoxin solution (lipopolysaccharide from *Escherichia coli* serotype O 127 B8; Sigma Chemical, St. Louis, MO, U.S.A.) set at 0.5 mg/kg over 30 min (Endo group).

The second group ($n = 6$) received endotoxin infusion following the same protocol as in the Endo group (from T0 to T30) and was treated with HDF from T60 during 150 min (HDF group). Zero-balanced on-line hemodiafiltration was performed with monitor AK100 Ultra (Gambro, Lund, Sweden). Blood flow through the dialyzer (Gambro) was set at 4 ml/kg/min, and filtrate volumes were exchanged at a rate of 40 ml/kg/h. A bicarbonate-buffered dialysate was used (Na^+ : 140 mM, K^+ : 3 mM, Ca^{2+} : 1.75 mM, Mg^{2+} : 0.5 mM, glucose: 1 g/L and bicarbonate: 32 mM) at a flow of 500 ml/min and at a temperature of 36.5°C. Postdilutional replacement fluid was produced on-line by the dialysis monitor and infused to obtain a zero-balance fluid loss. Priming was first made with 5000 IU heparin in one liter of physiological solution (NaCl 0.9%) followed by one liter without heparin. An initial bolus of 2000 IU heparin followed by a perfusion of 1000 IU/h was used for systemic anticoagulation. The hollow filters were F40 polysulfone with an effective surface area of 0.7 m² (high-flux polysulfone, Fresenius, St. Wendel, Germany).

The third group ($n = 4$) served as the control, undergoing HDF from T60 for 150 min (Control group).

In all the three groups, hemodynamic data were acquired every 30 min over the study interval.

Plasma TNF concentrations were measured by the ELISA technique for swine TNF (BioSource International, Inc., Camarillo, CA, U.S.A.) every 60 min.

Data collection

All analog signals were continuously converted to digital form with an appropriate system (Cadas, DataQ Instruments Inc., Akron, OH, U.S.A.). The pressure and flow waves were sampled at 200 Hz and stored on files. Cardiac cycles were delimited by R wave detection provided by a permanent recording of a one lead electrocardiogram. Ten consecutive cycles were recorded during the apneic phase and numerically averaged to obtain representative diagrams of pressure and flow waves corresponding to specific experimental conditions.

Data analysis

A lumped parameter model, namely the four-element windkessel model (WK4), was used to analyze the flow conditions in the pulmonary circulation throughout the experimental protocol. An electrical representation of the WK4 is displayed in Fig. 1.

The resistor R_2 represents the resistive properties of the pulmonary vasculature which are considered to reside primarily in the arteriolar system. The capacitor C , placed in parallel with R_2 , represents the compliant properties of the pulmonary arterial tree (10). The resistor R_1 is used to reflect characteristic resistance, which level depends prominently on the resistance and compliance of the main pulmonary artery. Finally, an inductance L is added to allow positive phases angles between flow and pressure waves and to account for inertial properties of the blood and viscous resistive properties of the vessel walls (10). The four elements of the model were simultaneously identified using an original analytic procedure described previously (8).

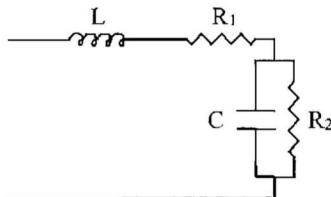


FIG. 1. Electrical representation of the four-element windkessel model of the pulmonary circulation. It is composed of a pulmonary characteristic resistance (R_1), a pulmonary peripheral resistance (R_2), a pulmonary vascular compliance (C), and an inductance (L).

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm standard deviation (SD). For comparisons within each group, a repeated measures analysis of variance (ANOVA) was used and the Scheffe test was used for multiple comparisons (Statistica[®]; Statsoft Inc., Tulsa, OK, U.S.A.). Differences between groups were determined with between-group ANOVA (Statistica[®]). Here, $P < 0.05$ was considered to be statistically significant.

RESULTS

Effects of hemodiafiltration alone

(Control group)

The evolution of conventional hemodynamic variables during HDF alone is presented in Fig. 2. HDF did not significantly alter conventional hemodynamic parameters and TNF remained untraceable throughout the experiment. Computed pulmonary hemodynamic variables, as assessed by the WK4 of the pulmonary circulation, are depicted in Fig. 3. R_1 and R_2 remained unchanged from T0 to T210. C slightly decreased from 3.3 ± 1.7 ml/mm Hg (T0) to 2.6 ± 0.5 mm Hg (T210) (NS).

Effects of endotoxin infusion

The time course of endotoxin insult on conventional hemodynamic variables is presented in Fig. 2. PAP showed a biphasic response after endotoxin challenge, reaching its maximum at the end of endotoxin infusion. Arterial hypotension occurred from T90. Cardiac output (CO) decreased significantly at T30 and, after a transient improvement, decreased continuously from T150 until the end of the experiment.

Computed pulmonary hemodynamic variables, as assessed by the WK4 of the pulmonary circulation, are depicted in Fig. 3. R_1 increased rapidly after the onset of endotoxin insult, returned to the baseline values at T90 and then showed a secondary rise. R_2 expressed a profile similar to the changes in PAP. Vascular compliance decreased rapidly after starting endotoxin infusion. It remained at an intermediate level between T60 and T120 and then decreased significantly until T210.

TNF concentration reached a peak one hour after the start of endotoxin infusion and decreased progressively during the next two hours (Fig. 4).

Effects of hemodiafiltration after endotoxin infusion

Figure 2 depicts the time course of conventional hemodynamic parameters which remains similar in

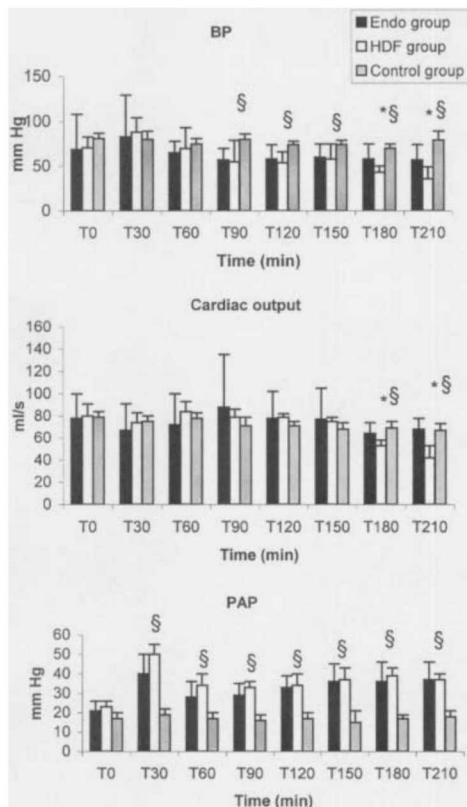


FIG. 2. Evolution of conventional hemodynamic variables in the Control group, the Endo group, and the HDF group. BP, mean systemic arterial blood pressure; PAP, mean pulmonary arterial pressure. * $P < 0.05$ Endo group vs. HDF group. $\$P < 0.05$ vs. T0 in the Endo and HDF groups.

both groups until T150. Beyond this point, BP became significantly lower in the HDF group than in the Endo group.

PAP was similar in the Endo and HDF groups throughout the experimental period. However, CO decreased progressively during the experiment and was lower in the HDF group than in the Endo group at T180 and T210. R_1 was significantly higher in the

Figure 3 shows that the evolution of pulmonary vascular compliance was identical in both groups during all the experimental procedure. In contrast, R_2 increased abruptly in the HDF group and reached significantly higher values than R_2 in the Endo group at T180 and T210. R_1 was significantly higher in the

HDF group after the start of hemodiafiltration (T90) and at T210.

TNF concentration followed exactly the same pattern as in the Endo group. It peaked one hour after the start of endotoxin infusion and decreased progressively during the next two hours (Fig. 4). There was no significant difference between the Endo and HDF groups.

In the HDF group, two animals died before the end of the experimental period (T90 and T120).

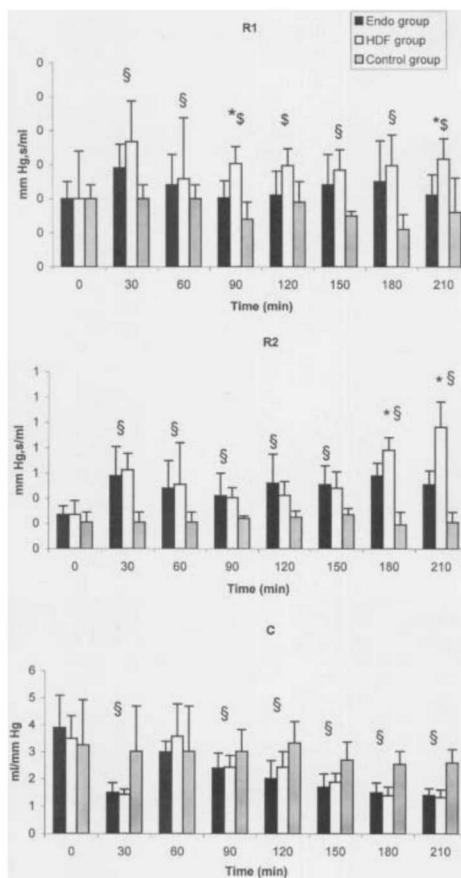


FIG. 3. Evolution of parameter values obtained by the four-element windkessel model of the pulmonary circulation. R1, pulmonary characteristic resistance; R2, pulmonary peripheral resistance; C, pulmonary vascular compliance. * $P < 0.05$ Endo group vs. HDF group. $\$P < 0.05$ vs. T0 in the Endo and HDF groups. $\$P < 0.05$ vs. T0 in the HDF group.

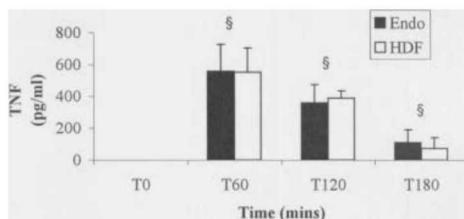


FIG. 4. Evolution of TNF concentrations in the Endo and HDF groups. $\S P < 0.05$ vs. T0 in the Endo and HDF groups.

DISCUSSION

Few studies have tested the effect of hemodialysis in septic shock and, to our knowledge, no previous study has reported the effects of HDF in septic shock. Therefore, comparison of our results with those of other workers is fraught with difficulty.

Among previous trials testing hemofiltration in septic shock, only those using high volume hemofiltration suggested hemodynamic improvement (5,6,11).

In our model, endotoxin insult led to a complex pulmonary vascular response involving a dynamic, time-dependent interplay between R_1 , R_2 , and C (12). According to our results, this sequential effect on resistive and compliance properties of the pulmonary vasculature seemed to be affected by HDF. In the HDF group, R_1 increased from the start of HDF and R_2 increased abruptly 90 min later, while vascular compliance was not affected by HDF.

Such an increase in R_1 can be interpreted as a reduction in the compliance of the main pulmonary artery and/or as a decrease of the vessel's lumen radius, suggesting that selective stiffening was produced by an increase in smooth muscle tone of the main pulmonary artery. R_2 represents resistance of the pulmonary distal vasculature (12,13).

From T90 to T150, BP decreased while CO remained unchanged in the Endo and HDF groups. This resulted from the decrease in systemic vascular resistance usually observed during endotoxemia. However, the decrease in CO and BP was more severe at T180 in the HDF group than in the Endo group. This can be related to the abrupt increase in pulmonary vascular resistance observed in the HDF group, which decreased venous return to the left ventricle.

This increase in pulmonary vascular resistance in the HDF group could be explained by several mechanisms.

Dialysis exchange can lead to a temporary sequestration of activated leukocytes in the pulmonary circulation (14). However, this mechanism would not affect R_1 and should result in an isolated increase in R_2 , which represents the resistance of the distal pulmonary vasculature. Furthermore, this process is known to occur more frequently and more severely in patients with end-stage renal failure when cuprophane membranes are used (15).

Pulmonary embolism could also be responsible for a similar pattern. In this setting, R_1 and R_2 would be increased not only by vascular obstruction, but also because of the release of humoral mediators such as catecholamines, thromboxane A₂, or serotonin (16). However, because our animals were correctly anticoagulated throughout the experiment, this mechanism appears unlikely.

Although the animals were anesthetized by intravenous anesthetics, removal of these substances cannot be implicated in the mechanism of altered hemodynamics since it is not altered in the Control group where HDF is also used but without endotoxin infusion.

Hemodialysis could remove a suppressing factor of proinflammatory cytokines production in septic patients, as previously suggested by Lonnemann et al. (17), or lead to the elimination of a small weight molecule of beneficial effect on hemodynamics which would not be eliminated by hemofiltration alone.

As the application of HDF to anesthetized pigs which received no endotoxin (Control group) did not alter hemodynamic parameters, it is suggested that the membrane was not toxic and dialysate contamination with pyrogens and TNF-inducing substances seemed unlikely.

The literature contains, however, some evidence that cytokine production might be triggered by biocompatible artificial surfaces (18). The first step in this process is the adhesion of monocytes to synthetic membranes, which leads to a more enhanced secretion of IL-1 production and lymphocyte IL-2 production by dialysis membrane particles. Although synthetic polysulfone and polyacrylonitrile membranes alone represent only a mild stimulus and induce the production of modest quantities of IL-1, more important is the simultaneous stimulation of these adherent monocytes by circulating components of bacterial cell wall (especially endotoxin fragments). Thus, artificial membranes could act as the inducer, and subsequent endotoxemia may act as the promotor of cytokines production (19). According to this hypothesis, dialysis could act as a trigger to the production of a molecule with deleterious effect on hemodynamics.

So, HDF could be a supplemental trigger to the endotoxin insult by a mechanism independent of TNF production since there was no difference in TNF concentrations between the Endo and HDF groups.

These results underline the difference between hemofiltration and HDF; although there is some evidence in the literature that high volume hemofiltration can be beneficial in septic shock, such results cannot be transposed to HDF. It is supported by the results of Kellum et al. (20) who compared diffusive and convective therapy in patients with SIRS and renal failure and showed that convection decreased plasma TNF concentration while diffusion increased it.

CONCLUSIONS

Our results show that HDF during septic shock increases the pulmonary vascular response to the endotoxin insult by a mechanism independent of TNF concentrations, and must be used cautiously since it can precipitate right heart failure by increasing right ventricular afterload.

Acknowledgments: This work was supported by a Grant of the Fondation Léon Frédéricq of the University of Liege (Belgium). Philippe Kohl and Vincent Tchana-Sato are, respectively, funded by a postdoctoral grant and a doctoral grant from the National Fund of Scientific Research.

REFERENCES

1. Eichacker PQ, Parent C, Kalil A, Esposito C, Cui X, Banks SM, Gerstenberger EP, Fitz Y, Danner RL, Natanson C. Risk and the efficacy of antiinflammatory agents: retrospective and confirmatory studies of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:1197-205.
2. Natanson C, Esposito CJ, Banks SM. The sirens' songs of confirmatory sepsis trials: selection bias and sampling error. *Crit Care Med* 1998;26:1927-31.
3. Grootendorst AF. The potential role of hemofiltration in the treatment of patients with septic shock and multiple organ dysfunction syndrome. *Adv Ren Replace Ther* 1994;1:176-84.
4. De Vriese AS, Vanholder RC, Pascual M, Lameire NH, Colardyn FA. Can inflammatory cytokines be removed efficiently by continuous renal replacement therapies? *Intensive Care Med* 1999;25:903-10.
5. Rogiers P, Zhang H, Smail N, Pauwels D, Vincent JL. Continuous venovenous hemofiltration improves cardiac performance by mechanisms other than tumor necrosis factor-alpha attenuation during endotoxic shock. *Crit Care Med* 1999;27:1848-55.
6. Grootendorst AF, van Bommel EF, van der HB, van Leengoed LA, van Osta AL. High Volume hemofiltration improves right ventricular function in endotoxin-induced shock in the pig. *Intensive Care Med* 1992;18:235-40.
7. Canaud B, Bosc JY, Leray H, Stec F, Argiles A, Leblanc M, Mion C. On-line haemodiafiltration: state of the art. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13(Suppl 5):3-11.
8. Lambermont B, Gérard P, Kohl P, Detry O, Marcelle R, D'orio V. Time domain method to identify simultaneously parameters of the windkessel model applied to the pulmonary circulation. *Arch Physiol Biochem* 1998;106:245-52.
9. Cannon JG, Tompkins RG, Gelfand JA, Michie HR, Stanford GG, van der Meer JW, Endres S, Lonnemann G, Corsetti J, Chernow B. Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever. *J Infect Dis* 1990;161:79-84.
10. Grant BJB, Paradowski LJ. Characterization of pulmonary arterial input impedance with lumped parameters models. *Am J Physiol* 1987;252:H585-93.
11. Heering P, Morgera S, Schmitz FJ, Schmitz G, Willers R, Schultheiss HP, Strauer BE, Grabensee B. Cytokine removal and cardiovascular hemodynamics in septic patients with continuous venovenous hemofiltration. *Intensive Care Med* 1997;23:288-96.
12. Lambermont B, Kohl P, Detry O, Gérard P, Marcelle R, D'orio V. Analysis of endotoxin effects on the intact pulmonary circulation. *Cardiovasc Res* 1999;41:275-81.
13. Lambermont B, D'orio V, Kohl P, Gérard P, Marcelle R. Effects of inhaled nitric oxide on pulmonary hemodynamics in a porcine model of endotoxin shock. *Crit Care Med* 1999;27:1953-7.
14. Kaupe CJ, Zhang J, Cesario T, Yousefi S, Akeel N, Vaziri ND. Effect of hemodialysis on leukocyte adhesion receptor expression. *Am J Kidney Dis* 1996;27:244-52.
15. Chollet-Martin S, Stamatakis G, Baily S, Mery JP, Gougerot-Pocidalo MA. Induction of tumour necrosis factor-alpha during haemodialysis. Influence of the membrane type. *Clin Exp Immunol* 1991;83:329-32.
16. Maggiorini M, Brimiouille S, De Canniere D, Delcroix M, Naeije R. Effects of pulmonary embolism on pulmonary vascular impedance in dogs and minipigs. *J Appl Physiol* 1998;84:815-21.
17. Lonnemann G, Bechstein M, Linnenweber S, Burg M, Koch KM. Tumor necrosis factor-alpha during continuous high-flux hemodialysis in sepsis with acute renal failure. *Kidney Int Suppl* 1999;72:S84-7.
18. Kamijo Y, Soma K, Sugimoto K, Tsuruta H, Ohwada T. The effect of a hemofilter during extracorporeal circulation on hemodynamics in patients with SIRS. *Intensive Care Med* 2000;26:1355-9.
19. Kraft P, Felfernig M, Popousek A, Weinstabl C, Steltzer H, Hammerle AF. Removal of cytokines in septic patients using continuous veno-venous hemodiafiltration. *Crit Care Med* 1994; 22:716-21.
20. Kellum JA, Johnson JP, Kramer D, Palevsky P, Brady JJ, Pinsky MR. Diffusive vs. convective therapy: effects on mediators of inflammation in patient with severe systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med* 1998;26:1995-2000.

Annexe 6

Large pore membrane hemofiltration increases cytokine clearance and improves right ventricular-vascular coupling during endotoxic shock in pigs

Bernard Lambermont, Pierre Delanaye, Jean-Michel Dogné, Alexandre Ghuysen, Nathalie Janssen, Bernard Dubois, Thomas Desaive, Philippe Kohl, Vincent D'orio, Jean-Marie Krzesinski.

Artificial Organs (*in press*)

Large pore membrane hemofiltration increases cytokine clearance and improves right ventricular-vascular coupling during endotoxic shock in pigs

Bernard Lambermont ^{1,2}, Pierre Delanaye ³, Jean-Michel Dogné ^{2,4}, Alexandre Ghuysen ^{1,2}, Nathalie Janssen ⁵, Bernard Dubois ³, Thomas Desaive², Philippe Kolh ^{2,5}, Vincent D'Orio ^{1,2}, Jean-Marie Krzesinski ³.

¹ *Department of medicine, University of Liege, Belgium*

²*Hemodynamic Research Laboratory, HemoLiege, University of Liege, Belgium*

³*Department of nephrology, University of Liege, Belgium*

⁴*Department of pharmacy, University of Namur, Belgium*

⁵*Department of surgery, University of Liege, Belgium*

Corresponding author:

Bernard LAMBERMONT

Medical Intensive Care Unit (-2C), Department of Medicine, CHU Sart Tilman, 4000 Liege, Belgium

Phone: +3243667191

Fax: +3243667723

Email: b.lambermont@chu.ulg.ac.be

Short title: Large pore membrane hemofiltration in sepsis

Abstract

Hemodynamic improvement in patients suffering from both septic shock and renal failure who received hemofiltration, suggested that an extra-renal epuration technique could be of interest in patients with septic shock alone. However, most of the studies using continuous veno-venous hemofiltration in this setting, evidenced neither cytokine clearance nor significant reduction in their plasmatic level. The lack of significant clearance was explained in part by the small size of the membrane pores. Therefore, we investigated the effects of large pore membrane hemofiltration during endotoxic shock in pigs on interleukine 6 (IL-6), and interleukine 10 (IL-10) clearance and on right ventricular-vascular coupling.

Thirteen anesthetised healthy pigs weighing from 20 to 30 kg were divided into two groups. In the Endo group ($n = 6$), they received a 0.5 mg/kg endotoxin infusion over a period of 30 mins, from T0 to T30. In the EndoHF group ($n = 7$), hemofiltration with a large pore membrane (cut off = 80kDa) and an ultrafiltration rate of 45 ml/kg/h was started 30 mins after the end of the endotoxin infusion, from T60 to T240.

In this model of porcine endotoxic shock, large pore membrane hemofiltration was responsible for a significant clearance of IL-6 (20 ml/min), and IL-10 (14 ml/min), and an improvement in right ventricular-vascular coupling.

Key words: cytokine, endotoxin, hemofiltration, pulmonary circulation, septic shock.

INTRODUCTION

Hemodynamic improvement in patients suffering from both septic shock and renal failure who received hemofiltration, suggested that an extra-renal epuration technique could be of interest in patients with septic shock alone (1). The rationale for such interest derives from the knowledge that part of the systemic effects of sepsis may be mediated by endogenous, water-soluble, small (< 0.5 kDa) and medium-sized (>0.5 kDa but < 60 kDa) molecules and that their removal from the bloodstream may be of significant benefit.

However, most of the studies using continuous veno-venous hemofiltration in this setting, even with a high ultrafiltration rate, evidenced neither cytokine clearance nor significant reduction in their plasmatic level. In the best cases, clearance was limited and transient (2-4). The lack of significant clearance was explained in part by the small size of the membrane pores. Indeed, the membrane cut-off in most of these studies was around 30 kDa, while the molecular weight of the trimeric biologically active form of TNF α is more than 50 kDa, for example.

Large pore membrane hemofiltration (LPHF) leads, in ex vivo studies, to a cytokine clearance greater than in classic membranes. Membranes with a cut-off of 60 kDa, for example, resulted in a significant clearance of interleukine 6 (IL-6), interleukine 8, and interleukine 1 (5).

According to this better cytokine clearance opportunity, we designed this study to investigate in vivo the effects of LPHF with an 80 kDa cut-off membrane on IL-6 and interleukine 10 (IL-10) clearance and on right ventricular-vascular coupling.

MATERIALS AND METHODS

All experimental procedures and protocols used in this investigation were reviewed and approved by the Ethics Committee of the Medical Faculty of the University of Liège. The investigation conforms to the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996).

Experiments were performed on 13 healthy pure pietran pigs of either sex weighing from 20 to 30 kg. The animals were premedicated and anesthetised as described elsewhere (6). Systemic arterial pressure, pulmonary artery pressure (PAP) and flow and right ventricular (RV) pressure-volume loops were recorded and analysed as described previously (6). To assess right ventricular-vascular coupling, we examined the Ees/Ea ratio. Ees represents the end-systolic RV elastance and Ea pulmonary arterial elastance.

In both groups, the animals received a 0.5 mg/kg endotoxin infusion (Lipopolysaccharide from Escherichia Coli serotype 0127:B8; Sigma Chemical, St Louis, MO) over 30 mins (from T0 to T30). They were then randomised into two groups. In the Endo group (n = 6), they received no further intervention while in the EndoHF group (n = 7), they underwent, from T60 onwards, a zero-balance continuous veno-venous hemofiltration at a rate of 45 ml/kg/h (7). A 0.7 m² large pore (78 Å) membrane with a cut-off of 80 kDa (Sureflux FH 70, Nipro, Osaka, Japan) and a Baxter BM 25-BM 14 hemofiltration device (Baxter Health Care, Munich, Germany) were used. Ultrafiltrate was replaced in the post-dilution mode by a bicarbonate-buffered hemofiltration fluid (Na⁺: 150 mmol/l, K⁺: 3 mmol/l, bicarbonate: 30 mmol/l) at a temperature of 37°C. Anticoagulation of the extra-corporeal circuit was achieved using a loading dose of 5000 IU heparin followed by an anticoagulation regimen based on the activated clotting time (100-200 s). Rectal temperature was monitored every 30 minutes.

Blood (before and after the membrane) and ultrafiltrate samples were taken at T0, T60, T120 and T240 to measure IL-6 (28 kDa), and IL-10 (19 kDa) concentrations using an ELISA test (Biosource, Paris, France). Clearance and sieving coefficients were calculated at T120 and T240 using the following formula:

$$\text{Sieving coefficient} = 2. \cdot [\text{UF}] / ([\text{A}] + [\text{V}])$$

$$\text{Clearance (ml/min)} = \text{Sieving Coefficient} \cdot \text{Ultrafiltration rate (ml/min)}$$

where $[UF]$ is the concentration in ultrafiltrate, $[A]$ the concentration in inlet supernatant and $[V]$ the concentration in outlet supernatant.

Plasmatic albumin concentration was measured at T60 and T240.

Statistical analysis.

The data is presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). A two-way ANOVA for repeated measurements before (from T0 to T60) and after (from T90 to T240) the start of LPHF gives p values for time and group effects (Statistica[°], Statsoft Inc, Tulsa, OK). $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

The mean systemic arterial pressure, heart rate and cardiac output did not differ between Endo and EndoHF groups from T0 to T240. The mean PAP reached its first maximum at T30 in the Endo and EndoHF groups. After the start of LPHF, from T90 to T240, the mean PAP in the EndoHF group remained lower than the mean PAP in the Endo group ($P < 0.05$) (Figure 1).

After the start of LPHF, from T90 to T240, pulmonary Ea values in EndoHF group remained lower than Endo group values ($P < 0.05$) while the time evolution of Ees remained similar in the two groups (Figure 2). Consequently, the Ees/Ea ratio decreased slightly from T0 to T30 in both groups. From T90 to T240, Ees/Ea in the EndoHF group remained greater than 2, while in the Endo group, the Ees/Ea decreased progressively (Figure 2). This difference between the two groups was statistically significant ($P < 0.05$).

No significant differences in rectal temperature occurred between groups from T0 to T240.

At T120 and T240, the IL-6 clearance was 22 ± 7 and 15 ± 3 ml/min, respectively. The IL-6 sieving coefficient was 0.84. At T120 and T240, the IL-10 clearance was 14 ± 4 and 10 ± 7

ml/min, respectively. The sieving coefficient was 0.55. At T60 and T240, the plasmatic albumin concentration was 24 ± 4 g/l and 23 ± 4 g/l, respectively ($p = 0.13$).

DISCUSSION

The major findings of our study are that LPHF is responsible for a significant clearance of IL-6, and IL-10, and prevents the right ventricular-vascular uncoupling which habitually occurs during the late phase of endotoxic shock. The difference between the two groups during the second phase of endotoxic shock resulted from a difference in pulmonary vascular resistance since all the other factors contributing to the Ea value remained similar.

The effects of LPHF on right ventricular-vascular coupling have never been tested previously. At the best, Grootendorst et al tested the effects of continuous veno-venous hemofiltration with an ultrafiltration rate of 6 L/hr on RV ejection fraction in pigs with endotoxin induced shock. In their model, the authors concluded that high volume hemofiltration improved RV ejection fraction and cardiac performance by the removal of vasoactive mediators, responsible for myocardial depression (8). LPHF did not improve mean systemic arterial pressure and cardiac output which remained similar in both groups. These results are in accordance with those of Stein et al (9), but they are in opposition with those of Grootendorst who showed an increase in mean arterial pressure and cardiac output in endotoxic pigs receiving continuous high volume hemofiltration (8,10). Lee et al. found no significant increase in mean arterial pressure in endotoxic pigs receiving hemofiltration with a large pore membrane (100 kDa pore size membrane), although it increased survival rate (11).

Clearance values and sieving coefficients obtained in the present study are largely superior to those obtained with standard hemofiltration membranes. Heering et al measured an IL-6 sieving coefficient of 0.04 and IL-10 was undetectable in the ultrafiltrate (4). In the study of

Kellum et al, the IL-10 concentration in ultrafiltrate was very low and the IL-6 clearance was 3.3 ml/min (3).

Cytokines are considered to be important mediators in the pathophysiology of septic shock and, it has been suggested that the non-specific and continuous removal of pro and anti-inflammatory soluble mediators may be the most logical and adequate approach to a complex and long running process like sepsis (12). Several studies have demonstrated significant removal rates of inflammatory cytokines from the circulation of septic patients by CVVH (4,13,14). As one of the mechanisms of cytokine removal is convective clearance (3), increasing convective clearance should increase blood purification effectiveness. One of the ways to achieve this goal is the use of larger pore membranes (15). In vitro, large pore membranes can lead to cytokine clearance comparable to that currently achieved for urea during standard continuous renal replacement therapy (5). In vivo, Morgera et al found that a 60 kDa cut-off membrane can lead to IL-6 clearance similar to that of our study (16). In the present work, an 80 kDa cut-off membrane leads to significant cytokine clearance for IL6 and IL-10, without significant protein loss as demonstrated by albumin concentration values at T60 and T240.

In conclusion, use of LPHF in this model of porcine endotoxic shock was responsible for a significant clearance of IL-6, and IL-10, and an improvement in right ventricular-vascular coupling by preventing increase in pulmonary Ea.

Grants: This work is supported by a Grant of Nipro Europe, Zaventem, Belgium. Philippe Kolh is a recipient of a postdoctoral grant from the Fonds National de la Recherche Scientifique.

Acknowledgements: The authors would like to thank Philippe Devel, Michèle Focan and Marie-Antoinette Graceffa for their technical assistance.

References

1. Grootendorst AF. The potential role of hemofiltration in the treatment of patients with septic shock and multiple organ dysfunction syndrome. *Adv Ren Replace Ther* 1994;1:176-184.
2. De Vriese AS, Vanholder RC, Pascual M, Lameire NH, Colardyn FA. Can inflammatory cytokines be removed efficiently by continuous renal replacement therapies? *Intensive Care Med* 1999;25:903-910.
3. Kellum JA, Johnson JP, Kramer D, Palevsky P, Brady JJ, Pinsky MR. Diffusive vs. convective therapy: effects on mediators of inflammation in patient with severe systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med* 1998;26:1995-2000.
4. Heering P, Morgera S, Schmitz FJ, Schmitz G, Willers R, Schultheiss HP, Strauer BE, Grabensee B. Cytokine removal and cardiovascular hemodynamics in septic patients with continuous venovenous hemofiltration. *Intensive Care Med* 1997;23:288-296.
5. Uchino S, Bellomo R, Goldsmith D, Davenport P, Cole L, Baldwin I, Panagiotopoulos S, Tipping P. Super high flux hemofiltration: a new technique for cytokine removal. *Intensive Care Med* 2002;28:651-655.
6. Lambermont B, Ghysen A, Kolh P, Tchana-Sato V, Segers P, Gerard P, Morimont P, Magis D, Dogne JM, Masereel B, D'orio V. Effects of endotoxic shock on right ventricular systolic function and mechanical efficiency. *Cardiovasc Res* 2003;59:412-418.
7. Ronco C, Bellomo R, Homel P, Brendolan A, Dan M, Piccinni P, La Greca G. Effects of different doses in continuous veno-venous haemofiltration on outcomes of acute renal failure: a prospective randomised trial. *Lancet* 2000;356:26-30.
8. Grootendorst AF, van Bommel EF, van der HB, van Leengoed LA, van Osta AL. High volume hemofiltration improves right ventricular function in endotoxin-induced shock in the pig. *Intensive Care Med* 1992;18:235-240.
9. Stein B, Pfenninger E, Grunert A, Schmitz JE, Hudde M. Influence of continuous haemofiltration on haemodynamics and central blood volume in experimental endotoxic shock. *Intensive Care Med* 1990;16:494-499.
10. Grootendorst AF, van Bommel EF, van Leengoed LA, Nabuurs M, Bouman CS, Groeneveld AB. High volume hemofiltration improves hemodynamics and survival of pigs exposed to gut ischemia and reperfusion. *Shock* 1994;2:72-78.
11. Lee PA, Weger GW, Pryor RW, Matson JR. Effects of filter pore size on efficacy of continuous arteriovenous hemofiltration therapy for *Staphylococcus aureus*-induced septicemia in immature swine. *Crit Care Med* 1998;26:730-737.
12. Ratanarat R, Brendolan A, Piccinni P, Dan M, Salvatori G, Ricci Z, Ronco C. Pulse high-volume haemofiltration for treatment of severe sepsis: effects on hemodynamics and survival. *Crit Care* 2005;9:R294-R302.

13. Bellomo R, Tipping P, Boyce N. Continuous veno-venous hemofiltration with dialysis removes cytokines from the circulation of septic patients. *Crit Care Med* 1993;21:522-526.
14. Sander A, Armbruster W, Sander B, Daul AE, Lange R, Peters J. Hemofiltration increases IL-6 clearance in early systemic inflammatory response syndrome but does not alter IL-6 and TNF alpha plasma concentrations. *Intensive Care Med* 1997;23:878-884.
15. van Deuren M, van der Meer JW. Hemofiltration in septic patients is not able to alter the plasma concentration of cytokines therapeutically. *Intensive Care Med* 2000;26:1176-1178.
16. Morgera S, Slowinski T, Melzer C, Sobottke V, Vargas-Hein O, Volk T, Zuckermann-Becker H, Wegner B, Muller JM, Baumann G, Kox WJ, Bellomo R, Neumayer HH. Renal replacement therapy with high-cutoff hemofilters: Impact of convection and diffusion on cytokine clearances and protein status. *Am J Kidney Dis* 2004;43:444-453.

Figure legends

Figure 1: Evolution of mean systemic arterial pressure, pulmonary artery pressure, heart rate and mean cardiac output during endotoxic shock in Endo and EndoHF groups. The Endo group received an endotoxin infusion (LPS) over 30 minutes from T0 to T30. The EndoHF group received an endotoxin infusion over 30 minutes from T0 to T30 and a large pore membrane hemofiltration (LPHF) from T60 to T240.

* $p < 0.05$ for time effect

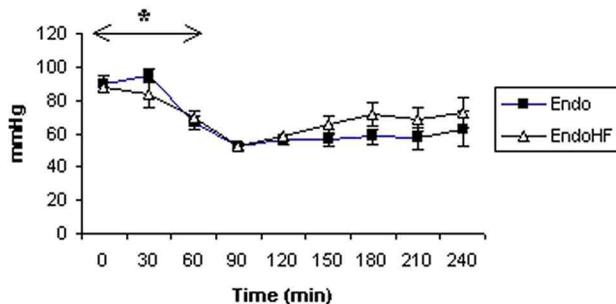
§ $p < 0.05$ for group effect

Figure 2: Evolution of pulmonary arterial elastance (Ea), right ventricular end-systolic elastance (Ees), and right ventricular-vascular coupling (Ees/Ea) during endotoxic shock in Endo and EndoHF groups. The Endo group received an endotoxin infusion (LPS) over 30 minutes from T0 to T30. The EndoHF group received an endotoxin infusion over 30 minutes from T0 to T30 and a large pore membrane hemofiltration (LPHF) from T60 to T240.

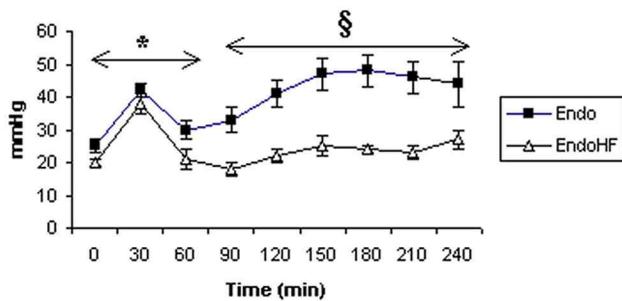
* $p < 0.05$ for time effect

§ $p < 0.05$ for group effect

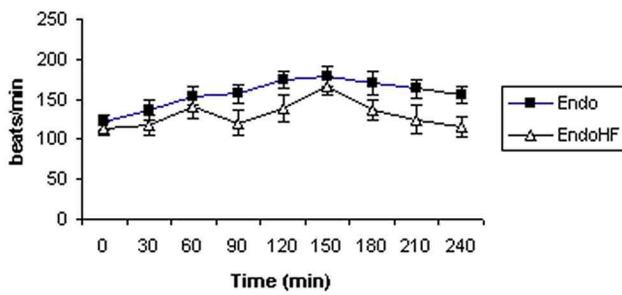
Mean systemic arterial pressure



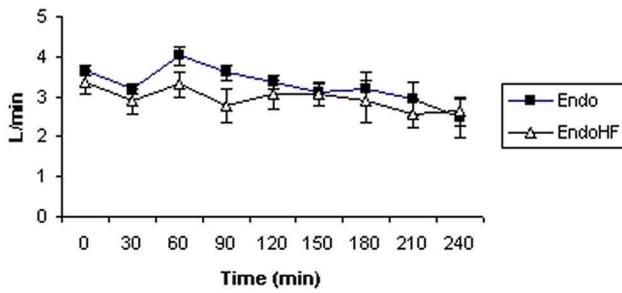
Mean pulmonary artery pressure



Heart rate



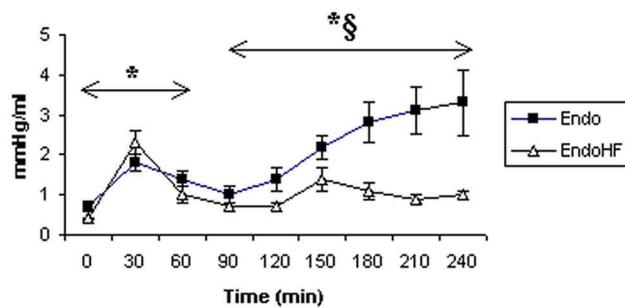
Mean cardiac output



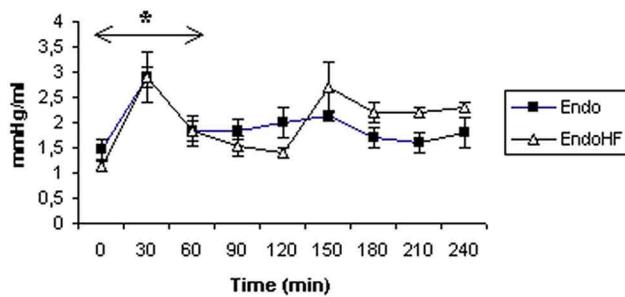
LPS

LPHF

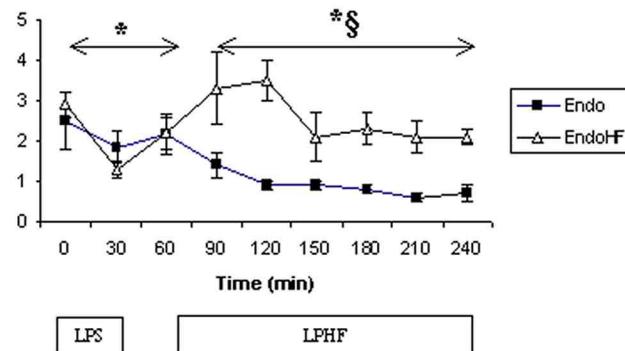
Ea



Ees



Ees/Ea



Annexe 7

Effects of inhaled nitric oxide on pulmonary hemodynamics in a porcine model of endotoxin shock.

Lambermont B, D'Orio V, Kolh P, Gerard P, Marcelle R.

Critical Care Medicine 1999 Sep;27(9):1953-7.

Effects of inhaled nitric oxide on pulmonary hemodynamics in a porcine model of endotoxin shock

Bernard Lambermont, MD; Vincent D'Orio, PhD; Philippe Kolh, MD; Paul Gérard, PhD; Roland Marcelle, PhD

Objective: To evaluate the effects of inhaled nitric oxide (NO) on pulmonary circulation in a porcine endotoxin shock model.

Design: Prospective, randomized trial.

Setting: Laboratory at a large university medical center.

Subjects: Twelve pathogen-free pigs weighing 15 to 31 kg.

Interventions: After surgical preparation, all pigs received a 0.5 mg/kg endotoxin infusion over 30 mins. One hour after the start of endotoxin, NO inhalation (40 ppm) was initiated in six pigs, whereas the six remaining pigs served to control the progression of shock in this model. Consecutive changes in systemic and pulmonary hemodynamics, including characteristic resistance, vascular compliance, peripheral vascular resistance, and inductance, were continuously assessed during the experimental protocol using a four-element Windkessel model of the pulmonary circulation.

Gram-negative sepsis is one of the most common settings associated with the development of acute pulmonary artery hypertension believed to be caused by vasoconstriction, compression, and intravascular thrombosis (1-4). This constellation of pulmonary vascular abnormalities leads to several deleterious cardiopulmonary effects, including right heart failure and ventilation-perfusion mismatch with hypoxemia. As a consequence, vasodilator treatment to reduce pulmonary hypertension has been extensively tested in animal models as well as in patients suffering from septic shock with adult respiratory distress syndrome (2, 5, 6). Inhaled nitric oxide (NO) has received particular attention because it has been shown to cause a selective reduction in pulmonary vascular resistance and intrapulmonary shunting by working

on the regional pulmonary vascular bed of ventilated lung areas (7, 8). This finding is in contrast to the results with intravenously infused vasodilators, which usually worsen ventilation-perfusion mismatch and frequently cause systemic hypotension, which in turn may precipitate right heart failure (9). However, the current literature is relatively scarce of data concerning the detailed analysis of endotoxin effects on pulmonary vasculature and thereby fails to explain the pulmonary arterial pressor response in terms of vascular resistance and vascular compliance changes in intact animals. To our knowledge, no previous study was specifically aimed at distinguishing between the potential mechanisms responsible for the success or failure of NO therapy to decrease abnormal vascular opposition to blood flow (10). Indeed, it would be of particular interest to assess the respective contribution of vasoconstriction and reduced compliance to the onset of pulmonary hypertension associated with sepsis in intact animals.

Therefore, we performed the present study to investigate the changes in pulmonary vascular mechanical properties induced by endotoxin insult and ultimately to analyze the specific actions of NO therapy in this setting. The four-

Measurements and Main Results: Endotoxin insult resulted in a biphasic pulmonary artery pressure increase from 14 ± 2 to 32 ± 4 mm Hg. Inhaled NO reversed the resistance to blood flow in small pulmonary arteries from 596 ± 69 to 424 ± 36 dyne-sec/cm⁵. In contrast, the vascular capacitance of the entire pulmonary circuit, which decreased from 2.4 ± 0.2 to 0.8 ± 0.1 mL/mm Hg throughout endotoxin challenge, remained insensitive to NO administration.

Conclusion: In endotoxin-induced pulmonary hypertension, inhaled NO may function as a modulator of distal pulmonary arterial tone but fails to act as a regulator of larger capacitance pulmonary vessels. (Crit Care Med 1999; 27:1953-1957)

KEY WORDS: nitric oxide; septic shock; endotoxin; vascular resistance; hypertension; pulmonary; blood pressure

element Windkessel model of the pulmonary circulation was used to divide the decrease in pulmonary pressure gradient into segmental resistance across large artery vessels (characteristic resistance), small vascular vessels (peripheral resistance), and compliant vessels.

MATERIALS AND METHODS

All experimental procedures and protocols used in this investigation were reviewed and approved by the Ethics Committee of the Medical Faculty of the University of Liege. They were performed in accordance with the Guiding Principles for the Care and Use of Laboratory Animals approved by the Council of the American Physiological Society.

Experiments were performed on 12 healthy pure Pietrain pigs of either sex weighing from 15 to 31 kg. The animals were premedicated with intramuscular administration of ketamine (20 mg/kg) and diazepam (1 mg/kg). Anesthesia was then induced and maintained by a continuous infusion of sufentanil (0.5 μ g/kg/hr) and propofol (7.5 mg/kg/hr). Spontaneous movements were prevented by pancuronium bromide (0.2 mg/kg/hr). After endotracheal intubation through a cervical tracheostomy, the pigs were connected to a volume-cycled ventilator (Evita 2, Dräger, Lübeck, Germany) set to deliver a tidal volume of 15 mL/kg at a respiratory rate of 20

From the Hemodynamics Research Laboratory (HemoLiege), University of Liege, Belgium.

Supported, in part, by grant ARC 94/99-177 from the Communauté Française de Belgique.

Address requests for reprints to: Bernard Lambermont, MD, Intensive Care Unit, Department of Internal Medicine, University Hospital of Liege, CHU Sart Tilman Batiment B35, 4000 Liege, Belgium. E-mail: b.lambermont@chu.ulg.ac.be.

Copyright © 1999 by Lippincott Williams & Wilkins

breaths/min. End-tidal CO_2 measurements (Capnomac, Datex, Helsinki) were used to monitor the adequacy of ventilation. Respiratory settings were adjusted to maintain end-tidal CO_2 between 30 and 35 mm Hg. Arterial oxygen saturation was monitored closely and maintained at >95% by adjusting the FiO_2 as necessary.

The pulmonary trunk was exposed by means of medial sternotomy. A micromanometer-tipped catheter (Sentron pressure-measuring catheter, Cordis, Miami) was inserted into the main pulmonary artery through a stab wound on the right ventricular outflow tract. A 14-mm-diameter perivascular flow probe (Transonic Systems, Ithaca, NY) was closely adjusted around the main pulmonary 2 cm downstream of the pulmonary valve. The micromanometer-tipped catheter was manipulated so that the pressure sensor was finally positioned very close to the flow probe.

Left atrial pressure was measured with a micromanometer-tipped catheter inserted into the cavity through the left atrial appendage. Finally, systemic blood pressure was monitored with a micromanometer-tipped catheter inserted into the abdominal aorta through the left femoral artery.

Experimental Protocol. After a 60-min stabilization period, baseline hemodynamics data were acquired (T0). These included pulmonary artery pressure wave (PAP), pulmonary blood flow wave, left atrial pressure, systemic arterial pressure, and heart rate. The animals were then infused with a freshly prepared endotoxin solution (lipopolysaccharide from *Escherichia coli* serotype 0127:B8; Sigma Chemical, St. Louis, MO) set at 0.5 mg/kg over 30 mins. After a 30-min interval at the end of the endotoxin infusion period (T60), inhaled NO was instituted during 60 mins (from T60 to T120) in six animals that had been randomly chosen previously (NO group). NO was delivered through a catheter inserted into the tracheal tube with the flow adjusted to produce an inspired concentration of 40 ppm. This concentration was selected as the median of a range previously reported to be well tolerated in intact animals without hemodynamic effects (9). NO was supplied from a 800-ppm NO source tank (Air Liquide, Haren, Belgium). The inspired concentration of NO was verified by a chemiluminescence analyzer after calibration against standard NO concentrations (NOX 4000, Seres, Aix-en-Provence, France). Inspired or expired NO_2 always remained <1 ppm. Thereafter, inhaled NO was stopped (T120) and a last set of data was acquired at T150.

The remaining six animals constituted the time course group (control group); these animals were observed for 150 mins after the induction of endotoxin infusion. In both groups of animals, hemodynamics data were acquired every 30 mins during the study interval.

Data Collection. All analog signals were continuously converted to digital form with an appropriate system (Cadas, DataQ Instruments, Akron, OH). The pressure and flow waves were sampled at 200 Hz and stored on files. Cardiac cycles were delimited by R wave detection provided by a permanent recording of a one-lead electrocardiogram. Ten consecutive cycles were recorded during the apneic phase and numerically averaged to obtain representative diagrams of pressure and flow waves corresponding to specific experimental conditions.

Data Analysis. We used a lumped variable model, namely the four-element Windkessel model (WK4), to analyze the flow conditions in the pulmonary circulation throughout the experimental protocol. An electrical representation of the WK4 is displayed in Figure 1.

The resistor R_2 represents the resistive properties of the pulmonary vasculature, which are considered to reside primarily in the arteriolar system. The capacitor C , placed in parallel with R_2 , represents the compliant properties of the pulmonary arterial tree (11).

The resistor R_1 represents characteristic resistance, the level of which depends predominantly on the inertance and compliance of the main pulmonary artery. Finally, the inductance L is used to permit positive phase angles between the flow and pressure waves and accounts for the viscous resistive properties of the vessel's wall (11).

The four elements of the model were simultaneously identified by using an original analytic procedure as described previously (12). Details of this analysis are provided in the "Appendix."

Statistical Analysis. Data are presented as mean \pm SEM. For comparisons within each group, a two-way analysis of variance was used and, when necessary, Scheffé's test was performed. For evaluation of differences between groups, Student's *t*-test was applied. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Time Course Group. The time course of endotoxin insult on conventional hemodynamic variables is presented in Figure 2. PAP showed a biphasic, roughly M-shaped response after endotoxin challenge. PAP reached its maximum at T90, then immediately returned to post-endotoxin infusion values, then increased again at T150. In contrast, systemic arterial pressure decreased gradually from 82 ± 4 to 67 ± 2 mm Hg during the entire experimental period. Cardiac output began to decrease at T30 and remained at this decreased level for the rest of the experimental period. Calculated pulmonary vascular resistance (PVR) showed a time course that paralleled the change in PAP.

Computed pulmonary hemodynamic variables, as assessed by the WK4 of the pulmonary circulation, are depicted in Figure 3. Resistance R_1 increased rapidly after the onset of endotoxin insult, then turned back to baseline values and thereafter increased again between T90 and T120. Global vascular compliance decreased rapidly after the start of endotoxin infusion, remained at this level between T60 and T120, and then decreased again to reach the nadir at the end of the observation period. Resistance R_2 expressed a profile that was similar to the changes in PAP. In contrast, inductance remained almost unchanged at 0.001 ± 0.0002 mm Hg/sec/mL throughout the experiment.

Effect of Inhaled NO. As shown in Figure 2, NO inhalation had no effect on systemic blood pressure. Cardiac output was moderately increased by NO, but the change reached statistical significance only at the end of experiment. Compared with the control group, in the experimental group NO reduced slightly the PAP level previously increased by endotoxin insult, but this effect failed to reach significance. PVR was significantly reduced by NO inhalation, and this change was persistent as long as NO was administered.

Figure 3 shows that neither compliance nor characteristic resistance represented vascular targets to NO therapy. In contrast, resistance R_2 was significantly reduced during the period of NO inhalation, but it returned to control group values immediately after NO inhalation was stopped.

DISCUSSION

The effects of continuous endotoxin infusion have been investigated previously in our laboratory because this pro-

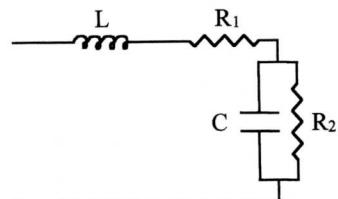


Figure 1. Electrical representation of the four-element Windkessel model. It is composed of a characteristic resistance (R_1), a peripheral resistance (R_2), a compliance (C), and an inductance (L).

Control Group

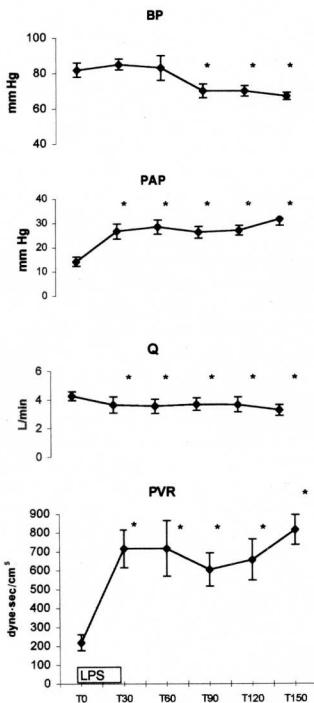
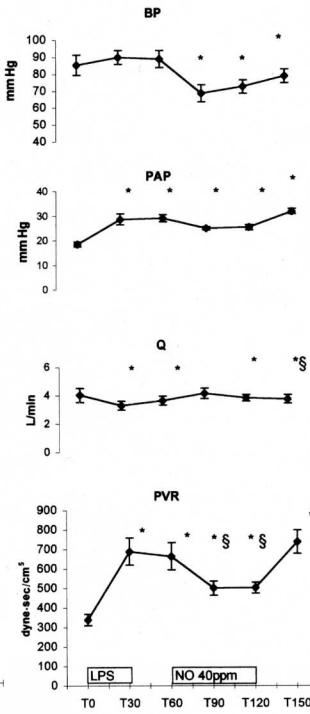


Figure 2. Evolution of hemodynamic variables in the control group and the nitric oxide (NO) group. Both groups received an endotoxin (lipopolysaccharide [LPS]) infusion from T0 to T30. The NO group received inhaled NO (40 ppm) from T60 to T120. BP, mean systemic arterial blood pressure; PAP, mean pulmonary arterial blood pressure; Q, cardiac output; PVR, pulmonary vascular resistance (PAP minus left atrial pressure divided by Q). * $p < .05$ vs. T0; § $p < .05$, NO group vs. control group.

cedure is more likely to reflect human sepsis (1, 13, 14). The biphasic course of PAP as well as the pattern decrease in blood flow are quite similar to the observations reported by other authors (6, 15–17). In intact dogs, we have also found that the site of pulmonary vascular obstruction induced by endotoxin was partially the small arteries and predominantly the small veins (14). This latter effect was responsible for increasing the microvascular capillary hydrostatic pressure, which in turn could promote interstitial edema accumulation, regardless of any change in vascular permeability (14). Possible mechanisms for increased opposition to blood flow in the setting of endotoxin shock are active vasoconstriction, lumen compression by interstitial edema, alterations of the vascular wall, and intravascular thrombosis (4). It has been suggested that these vascular abnor-

malities could appear sequentially according to different stages of the endotoxin insult process. The very early phase of endotoxin-induced pulmonary hypertension is believed to be mediated by the metabolites of arachidonic acid, leading to vasoconstriction. In contrast, the later phase is associated with a cascade activation of mediators that provoke vascular wall injuries and lung structural alterations (2–4). Theoretically, pulmonary edema, whether lesional or hydrostatic, may be sufficient to increase PAP at a given level of blood flow. Active vasoconstriction has been suggested by a partial reversibility of sepsis-induced pulmonary hypertension in pigs caused by the administration of prostaglandin E₁ (18). Although interesting, this latter work was limited because it was a hemodynamic investigation based on PVR computations, and therefore it did not provide any

NO Group



Because alterations in characteristic resistance and compliance were persistent, pulmonary arterial pressure was not significantly reduced by NO therapy.

information on the nature of prostaglandin E₁ effects or on the site of its activity. We have shown (1) that in the setting of endotoxin-induced pulmonary hypertension, PVR calculations are misleading because the PAP/flow relationship does not cross the origin of axis. Consequently, PVR overestimates the real vascular resistance of the circuit because its computation is based on the measurement of PAP at a given flow and neglects that portion of PAP that is required to recruit or distend the pulmonary vasculature. Further analysis of pulmonary vascular effects, therefore, requires other methods of investigation.

The choice of the WK4 of the pulmonary circulation is discussed elsewhere (11, 12). Based on this model, the present work clearly shows that the increase in PAP during endotoxin insult results from the association of various effects on the pulmonary vasculature. Accordingly, endotoxin was responsible for increases in characteristic resistance and peripheral resistance, as well as for a decrease in vascular compliance. The lack of data in the literature limits any comparative evaluation. Nevertheless, our results are in agreement with other studies showing that inhaled NO attenuated the pulmonary vascular response to endotoxin without systemic effects (2, 5, 6, 17, 19). Our analysis demonstrates that inhaled NO was active on the pulmonary peripheral vascular resistor while both characteristic resistance and vascular compliance remained unaffected. This observation may be explained by two types of arguments. First, characteristic resistance depicts the input resistance in the absence of wave reflection and is essentially dependent on the propensity of the main pulmonary artery to distend (11, 20). On the other hand, compliance describes the global elasticity properties of the pulmonary cir-

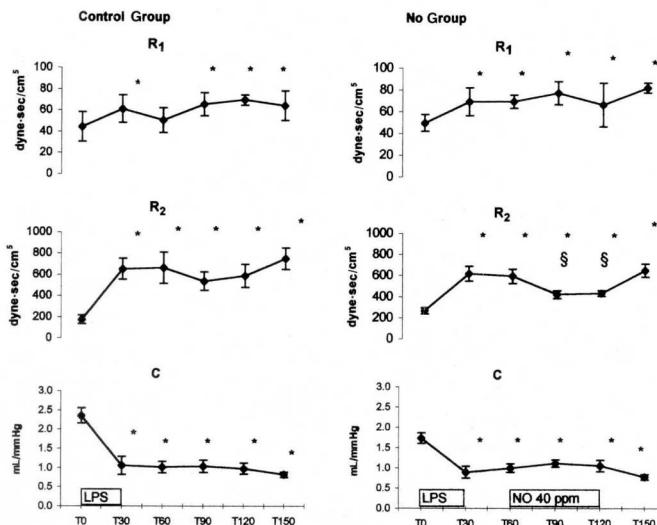


Figure 3. Evolution of variable values of the Windkessel model of the pulmonary circulation in the control group and the nitric oxide (NO) group. Both groups received an endotoxin (lipopolysaccharide [LPS]) infusion from T0 to T30. The NO group received inhaled NO (40 ppm) from T60 to T120. R_1 , characteristic resistance; R_2 , peripheral resistance; C , vascular compliance. * p < .05 vs. T0. § p < .05, NO group vs. control group.

cuit and is likely independent of the vascular tone (11). Second, inhaled NO is considered to act, in intact animals, at a short distance from the alveoli because it is rapidly inactivated by circulating hemoglobin (8, 21). Consequently, inhaled NO produced its action on the small vessels, the tone of which was previously increased by endotoxin. Because alterations in characteristic resistance and compliance were persistent, PAP was not significantly reduced by NO therapy.

This feature is in opposition to the findings of other authors, who have reported, in the face of unchanged cardiac output, decreases in PAP in the setting of lung injury induced by glass beads in a dog model (22) and by bilateral lavage in an ovine model (23). In the dog model, NO therapy at 80 ppm decreased PAP from 35 to 31 mm Hg; in the ovine model, inhaled NO at 60 ppm decreased PAP from 20 to 16 mm Hg. In these studies, pulmonary hemodynamics were evaluated using linear pulmonary/flow relationships in which slope and extrapolated pressure intercept at zero flow and represent incremental resistance to flow and critical closing pressure, respectively. However, only the dog model indicated that NO inhalation decreased incremental resistance upstream of both small ar-

teries and small veins but had no effect on the closing pressure of the pulmonary vasculature. The lack of significant effects of inhaled NO in the ovine model was interpreted as indicating the minor level of induced vascular injury, suggesting that NO cannot relax vessels without an increased tone. Our results not only confirm that inhaled NO acts on small resistive vessels with increased tone at a short distance from the alveoli but also suggest that the resistor and capacitor properties are not located at the same site. Independence between compliance and the resistive mechanical properties of the pulmonary circuit has also been shown by others (24). These investigators developed a canine model of monocrotaline pyrrole-induced chronic pulmonary hypertension. Using a hemodynamic approach based on input pulmonary vascular impedance, they demonstrated that inhaled NO could offset abnormal arterial resistance in this model but was inactive against alterations in vascular compliance. One would intuitively expect the pulmonary circulation to respond to NO inhalation according to the pathophysiological mechanisms that underlie vascular mechanical abnormalities.

Endotoxin challenge gives rise to a biphasic increase in PVR. The first phase

is believed to be caused by thromboxane A_2 release, leading to augmented pulmonary vascular tone, whereas in the second phase edema partly contributes to the pulmonary hypertension (6). To further complicate matters, increased interstitial fluid and pulmonary air trapping would both tend to increase perivascular pressure in distal vessels, adding to the effects of increased vascular wall tone. Thus, the occurrence of perivascular cuffing as well as bronchoconstriction could lead to exaggerated estimates of either the increase in vascular resistance or the decrease in vascular compliance. This hypothesis was tested using the same experimental model in a previous work (25). It could rule out the occurrence of both significant edema and bronchoconstriction as explanations of hemodynamic changes. Our results, therefore, are consistent with the suggestion that later hemodynamic changes associated with endotoxin insult are related to injury of the vascular wall itself, which is responsible for stiffening and compliance decrease. One may reasonably assume that inhaled NO tends to restore the basal tone of small vessels, as suggested by the reduction in resistance R_2 . In contrast, as soon as structural damage of the vascular wall is induced by endotoxin, as suggested by decreased vascular compliance and increased resistance R_1 , NO therapy may become ineffective.

Our study has some limitations. First, estimation of changes in the efficiency of gas exchange during endotoxin administration and after NO inhalation was beyond the scope of the present study. Therefore, hypoxemia was prevented by the adjustment of FiO_2 to avoid any occurrence of additional hypoxic pulmonary vasoconstriction. Second, by using the WK4, the predominant objective of the present study was to further explore the deleterious changes in the mechanical determinants of the pulmonary vasculature during endotoxin insult and to evaluate their potential offset by NO inhalation delivered at a constant concentration. However, the results could have been changed by administering a very high concentration of NO or, alternatively, by administering NO before endotoxin insult. Accordingly, the lack of prevention in the late phase of pulmonary hypertension could have been a matter of NO concentration rather than of functional disability. Our protocol was determined based on data in the literature. On the one hand, Goldstein et al. (26)

showed that in a porcine model of pulmonary hypertension inhalation of NO at different concentrations (20, 40, and 80 ppm) had similar effects on pulmonary vasculature. On the other hand, Weitzberg et al. (6) showed that NO delivered before or after the start of endotoxin insult in pigs resulted in similar effects on pulmonary circulation.

In summary, our study demonstrates that endotoxin insult induces significant increases in PAP associated with increased tone of small vascular vessels and decreased vascular compliance of larger vessels. Inhaled NO relaxes the small vessels but has no significant effect on the compliant property of the pulmonary vascular circuit. As a result, if vascular compliance changes are prominent during the pulmonary injury process, then NO inhalation may fail as a therapy directed to lower pulmonary arterial pressure.

REFERENCES

- D'orio V, Fatemi M, Marnette JM, et al: Analysis of endotoxin effects on pulmonary circulation in terms of pressure-flow characteristics. *Circ Shock* 1993; 39:285-292
- Berger JJ, Gibson RL, Redding GJ, et al: Effect of inhaled nitric oxide during group B streptococcal sepsis in piglets. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147:1080-1086
- McCuskey RS, Urbaschek R, Urbaschek B: The microcirculation during endotoxemia. *Cardiovasc Res* 1996; 32:752-763
- Brigham KL, Meyrick B: Endotoxin and lung injury. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133:913-927
- Weitzberg E, Rudehill A, Alving K, et al: Nitric oxide inhalation selectively attenuates pulmonary hypertension and arterial hypoxia in porcine endotoxin shock. *Acta Physiol Scand* 1991; 143:451-452
- Weitzberg E, Rudehill A, Lundberg JM: Nitric oxide inhalation attenuates pulmonary hypertension and improves gas exchange in endotoxin shock. *Eur J Pharmacol* 1993; 233: 85-94
- Rossant R, Falke KJ, Lopez F, et al: Inhaled nitric oxide for the adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1993; 328:399-405
- Zapol WM, Rimar S, Gillis N, et al: Nitric oxide and the lung. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149:1375-1380
- Frostell C, Fratacci MD, Wain JC, et al: Inhaled nitric oxide: A selective pulmonary vasodilator reversing hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Circulation* 1991; 83: 2038-2047
- Matthy MA, Pittet JF, Jay C: Just say NO to inhaled nitric oxide for the acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 1998; 26: 1-2
- Grant BJB, Paradowski LJ: Characterization of pulmonary arterial input impedance with

lumped parameters models. *Am J Physiol* 1987; 252:H585-H593

- Lambert B, Gerard P, Detry O, et al: Comparison between three and four-element Windkessel models to characterize vascular properties of pulmonary circulation. *Arch Physiol Biochem* 1997; 105:625-632
- D'orio V, Rodriguez LM, Wahler C, et al: A comparison of single bolus endotoxin injection with low dose endotoxin infusion on pulmonary and systemic vascular changes in intact anesthetized dogs. *Circ Shock* 1987; 21:207-216
- D'orio V, Halleux J, Rodriguez LM, et al: Effects of *Escherichia coli* endotoxin on pulmonary vascular resistance in intact dogs. *Crit Care Med* 1986; 14:802-806
- Fang K, Krahmer RL, Rypins EB, et al: Starling resistor effects on pulmonary artery occlusion pressure in endotoxin shock provide inaccuracies in left ventricular compliance assessments. *Crit Care Med* 1996; 24: 1618-1625
- Olson NC, Kruse-Elliott KT, Dodam JR: Systemic and pulmonary reactions in swine with endotoxemia and Gram-negative bacteremia. *J Am Vet Med Assoc* 1992; 200:1870-1884
- Dahm P, Blomquist S, Martensson L, et al: Circulatory and ventilatory effects of intermittent nitric oxide inhalation during porcine endotoxemia. *J Trauma* 1994; 37: 769-777
- Marini CP, Woloszyn T, Coons M, et al: Efficacy of right atrial infusion of PGE1 in sepsis-induced pulmonary hypertension. *J Surg Res* 1990; 49:476-482
- Offner PJ, Ogura H, Jordan BS, et al: Effects of inhaled nitric oxide on right ventricular function in endotoxin shock. *J Trauma* 1995; 39:179-186
- Bergel DH, Milnor WR: Pulmonary vascular impedance in the dog. *Circ Res* 1965; 16: 401-415
- Roos CM, Rich GF, Uncles DR, et al: Sites of vasodilation by inhaled nitric oxide vs. sodium nitroprusside in endothelin-constricted isolated rat lungs. *J Appl Physiol* 1994; 77:51-57
- Melot C, Vermeulen F, Maggiorini M, et al: Site of pulmonary vasodilation by inhaled nitric oxide in microembolic lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:75-85
- Rovira I, Chen T, Winkler M, et al: Effects of inhaled nitric oxide on pulmonary hemodynamics and gas exchange in an ovine model of ARDS. *J Appl Physiol* 1994; 76:345-355
- Chen EP, Bittner HB, Davis RD, et al: Hemodynamic and inotropic effects of nitric oxide in pulmonary hypertension. *J Surg Res* 1997; 69:288-294
- Lambert B, Kolh P, Detry O, et al: Analysis of endotoxin effects on the intact pulmonary circulation. *Cardiovasc Res* 1999; 41: 275-281
- Goldstein DJ, Dean DA, Smerling A, et al: Inhaled nitric oxide is not a negative inotropic agent in a porcine model of pulmonary hypertension. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997; 114:461-466

APPENDIX

Calculation of WK4 Variables. The relationship between pressure and flow in standard models is described by a second-order linear differential equation:

$$a_0 Q + a_1 \frac{dQ}{dt} + a_2 \frac{d^2Q}{dt^2} = b_0 P + b_1 \frac{dP}{dt} + b_2 \frac{d^2P}{dt^2} \quad (1)$$

where Q = pulmonary flow, P = pulmonary pressure. To avoid the use of a second derivative, which decreases signal-to-noise ratio, Equation 1 is integrated and becomes:

$$\int_{t_0}^t Q(\tau) d\tau = k_1 \int_{t_0}^t P(\tau) d\tau + k_2 (P(t) - P(t_0)) + k_3 (Q(t) - Q(t_0)) + k_4 \left(\frac{dQ}{dt}(t) - \frac{dQ}{dt}(t_0) \right) \quad (2)$$

where Q = pulmonary flow, dQ/dt = the first derivative of Q , d^2Q/dt^2 = the second derivative of Q , P = pulmonary pressure, dP/dt = the first derivative of P , d^2P/dt^2 = the second derivative of P , and a_0 , a_1 , a_2 , b_0 , b_1 , b_2 are constants, and t_0 = the beginning of the cardiac cycle defined as the R wave on the electrocardiogram.

The multiple regression technique estimates the constants k_1 , k_2 , k_3 , and k_4 to minimize the residual sum of squares (RSS), i.e., the sum of the squared differences between the observed values of both parts of this equation:

$$\text{RSS} = \sum_t \left[\int_{t_0}^t Q(\tau) d\tau - k_1 \int_{t_0}^t P(\tau) d\tau - k_2 (P(t) - P(t_0)) - k_3 (Q(t) - Q(t_0)) - k_4 \left(\frac{dQ}{dt}(t) - \frac{dQ}{dt}(t_0) \right) \right]^2 \quad (3)$$

The variables k_1 , k_2 , k_3 , and k_4 are the following respective functions of L , R_1 , C , and R_2 :

$$k_1 = \frac{1}{R_1 + R_2} \quad k_2 = \frac{C R_2}{R_1 + R_2}$$

$$k_3 = -\frac{L + C R_1 R_2}{R_1 + R_2} \quad k_4 = -\frac{L C R_2}{R_1 + R_2} \quad (4)$$

L , R_1 , R_2 , and C values were then derived by solving Equation 4.

- and thromboxane A2 formation (1). *N Engl J Med* 319: 689-698.
- Ogletree ML, Brigham KL (1982): Effects of cyclooxygenase inhibitors on pulmonary vascular responses to endotoxin in unanesthetized sheep. *Prostaglandins Leukot Med* 8: 489-502.
- Rolin S, Dogne JM, Michaux C, Delarge J, Masereel B (2001): Activity of a novel dual thromboxane A(2)receptor antagonist and thromboxane synthase inhibitor (BM-573) on platelet function and isolated smooth muscles. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 65: 67-72.
- Schuster DP, Kozlowski JK, Brimioule S (2001): Effects of thromboxane receptor blockade on pulmonary capillary hypertension in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 163: A820.
- Sjoberg T, Steen S (1989): The strong contractile effect of the thromboxane receptor agonist U-46619 in isolated human pulmonary arteries and its competitive antagonism by BM-13.505. *Acta Physiol Scand* 136: 161-165.
- Smulders YM (2000): Pathophysiology and treatment of haemodynamic instability in acute pulmonary embolism: the pivotal role of pulmonary vasoconstriction. *Cardiovasc Res* 48: 23-33.
- Vandeplassche G, Hemans C, Van de Water A, Xhonneux R, Wouters L, Van Ammel K, de Clerck F (1991): Differential effects of thromboxane A2 synthase inhibition, singly or combined with thromboxane A2/prostaglandin endoperoxide receptor antagonism, on occlusive thrombosis elicited by endothelial cell injury or by deep vascular damage in canine coronary arteries. *Circ Res* 69: 313-324.
- Vandeplassche G, Hermans C, Somers Y, Van de Werf F, de Clerck F (1993): Combined thromboxane A2 synthase inhibition and prostaglandin endoperoxide receptor antagonism limits myocardial infarct size after mechanical coronary occlusion and reperfusion at doses enhancing coronary thrombolysis by streptokinase. *J Am Coll Cardiol* 21: 1269-1279.
- Wise WC, Cook JA, Halushka PV (1981): Implications for thromboxane A2 in the pathogenesis of endotoxic shock. *Adv Shock Res* 6: 83-91.

Annexe 8

**Effects of U-46619 on pulmonary hemodynamics
before and after administration of BM-573, a novel
thromboxane A2 inhibitor.**

**Lambermont B, Kolh P, Dogne JM, Ghuysen A, Tchana-Sato
V, Morimont P, Benoit P, Gerard P, Masereel B, Limet R,
D'Orio V**

Archives of Physiology and Biochemistry 2003
Jul;111(3):217-23

Effects of U-46619 on Pulmonary Hemodynamics Before and After Administration of BM-573, a Novel Thromboxane A₂ Inhibitor

B. Lambermont¹, P. Kolh¹, J.-M. Dogné², A. Ghuyse¹, V. Tchana-Sato¹, P. Morimont¹, P. Benoit², P. Gérard¹, B. Masereel³, R. Limet¹ and V. D'Orio¹

¹Hemodynamics Research Laboratory (HemoLiege); ²Laboratory of Medicinal Chemistry, University of Liège, Belgium; and ³Department of Pharmacy, University of Namur, FUNDP, Belgium

Abstract

We studied the effects on pulmonary hemodynamics of U-46619, a thromboxane A₂ (TXA₂) agonist, before and after administration of a novel TXA₂ receptor antagonist and synthase inhibitor (BM-573). Six anesthetized pigs (Ago group) received 6 consecutive injections of U-46619 at 30-min interval and were compared with six anesthetized pigs (Anta group) which received an increasing dosage regimen of BM-573 10 min before each U-46619 injection. Consecutive changes in pulmonary hemodynamics, including characteristic resistance, vascular compliance, and peripheral vascular resistance, were continuously assessed during the experimental protocol using a four-element Windkessel model. At 2 mg/kg, BM-573 completely blocked pulmonary hypertensive effects of U-46619 but pulmonary vascular compliance still decreased. This residual effect can probably be explained by a persistent increase in the tonus of the pulmonary vascular wall smooth muscles sufficient to decrease vascular compliance but not vessel lumen diameter. Such molecule could be a promising therapeutic approach in TXA₂ mediated pulmonary hypertension as it is the case in pulmonary embolism, hyperacute lung rejection and endotoxic shock.

Keywords: Models, pulmonary circulation, swine, thromboxane, vascular compliance, vascular resistance.

Introduction

Thromboxane A₂ (TXA₂) is a potent vasoconstrictor and aggregating agent produced by platelets, leukocytes and endothelial cells (Hamberg et al., 1975; Oates et al., 1988).

It is a very labile molecule, with a half-life of approximately 30 secs in aqueous media, and it is hydrolyzed to form a stable but inactive metabolite, thromboxane B₂ (TXB₂) (Oates et al., 1988).

TXA₂ has been implicated as a pro-inflammatory mediator during the pulmonary hypertensive phase of Gram-negative sepsis (Wise et al., 1981) and of hyperacute lung rejection (Collins et al., 2001; Ogletree & Brigham, 1982). It is also an agent responsible for pulmonary vasoconstriction in pulmonary embolism (Smulders, 2000) and a pathophysiological mediator in thrombosis, vasospasm, arrhythmias and progression of ischemic damage after coronary occlusion (Oates et al., 1988).

In such pathological conditions, potential benefits of blocking TXA₂ effects were investigated by testing inhibitors of TXA₂ biosynthesis. These inhibitors were rapidly found ineffective because of an incomplete blockage of thromboxane synthase at the dosage used and because TXA₂ synthase inhibition induces the accumulation of a TXA₂ precursor called endoperoxide H₂ (PGH₂) which is chemically more stable and exerts similar biological effects by acting at common receptors. However, specific inhibitors of TXA₂ synthase are also responsible for increasing generation of prostanoids such as prostaglandin I₂, which can be beneficial by attenuating platelet activation and decreasing vascular resistance. Therefore, efforts to modulate the actions of TXA₂ focused on agents able to block biosynthesis of TXA₂ and to antagonize both PGH₂ and TXA₂ at their common receptor (Oates et al., 1988; Vandeplassche et al., 1991; Vandeplassche et al., 1993).

Accepted: 11 December, 2002

Address correspondence to: Bernard Lambermont, Medical Intensive Care Unit (-2C), Department of Medicine, University Hospital of Liege, CHU Sart Tilman B35, 4000 Liege, Belgium. Tel.: +3243667191; Fax: +3243667723; E-mail: b.lambermont@chu.ulg.ac.be

BM-573 is a molecule derived from the pyridine sulfonylurea torasemide, a loop diuretic. It is obtained by the replacement of the pyridine ring of torasemide with a nitrobenzene and the presence of a tert-butyl group on the distal nitrogen of the sulfonylurea function which improved the TXA₂ antagonism and revealed TXA₂ synthase inhibitory potency (Fig. 1) (Rolin et al., 2001). This novel TXA₂ receptor antagonist and synthase inhibitor has a powerful antiplatelet potency and was shown to relax the rat aorta artery precontracted with U-46619 (Rolin et al., 2001).

As current evidence suggests that TXA₂ plays a role in pathophysiological processes in the lung, we tested whether this new dual TXA₂ synthase inhibitor and TXA₂ receptor antagonist was able to antagonise pulmonary hemodynamic effects of U-46619, a stable TXA₂ agonist. Therefore, we studied the effects of U-46619 on pulmonary hemodynamics after administration of BM-573 using a four-element windkessel model (Grant & Paradowski, 1987; Lambermont et al., 1999).

Materials and methods

All experimental procedures and protocols used in this investigation were reviewed and approved by the Ethics Committee of the Medical Faculty of the University of Liege. They were performed in accordance with the European Community Guidelines for the use of experimental animals.

Experiments were performed on 12 healthy pure pietran pigs of either sex weighing from 20 to 30 kg. The animals were premedicated with intramuscular administration of ketamine (20 mg/kg) and diazepam (1 mg/kg). Anesthesia was then induced and maintained by a continuous infusion of sufentanil (0.5 µg/kg/h) and pentobarbital (5 mg/kg/h). Spontaneous movements were prevented by pancuronium bromide

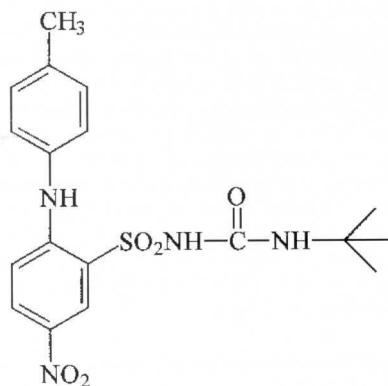


Fig. 1. Chemical structure of the TXA₂ receptor antagonist and synthase inhibitor BM-573.

(0.2 mg/kg/h). After endotracheal intubation through a cervical tracheostomy, the pigs were connected to a volume cycled ventilator (Evita 2, Dräger, Lübeck, Germany) set to deliver a tidal volume of 15 mL/kg at a respiratory rate of 20 breaths/min. End-tidal CO₂ measurements (Capnomac, Datex, Helsinki, Finland) were used to monitor the adequacy of ventilation. Respiratory settings were adjusted to maintain end-tidal CO₂ between 30 and 35 mmHg. Arterial oxygen saturation was monitored closely and maintained at >95% by adjusting the FiO₂ as necessary.

The pulmonary trunk was exposed by means of medial sternotomy. A micromanometer-tipped catheter (Sentron pressure-measuring catheter, Cordis, Miami, FL) was inserted into the main pulmonary artery through a stab wound in the right ventricular outflow tract. A 14 mm diameter perivascular flow probe (Transonic Systems, Ithaca, NY) was closely adjusted around the main pulmonary artery 2 cm downstream of the pulmonary valve. The micromanometer-tipped catheter was manipulated so that the pressure sensor was finally positioned very close to the flow probe.

Left atrial pressure was measured with a micromanometer-tipped catheter inserted into the cavity through the left atrial appendage. Finally, systemic blood pressure was monitored with a micromanometer-tipped catheter inserted into the descending thoracic aorta through the left femoral artery.

Chemicals

U-46619 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) supplied in ethanolic solution was diluted in NaCl 0.9% solution to a final concentration of 10 µg/ml. BM-573 was obtained from the laboratory of Medicinal Chemistry of the University of Liège. It was dissolved in propylene glycol and water to achieve a drug solution of 20 mg/ml.

Experimental protocol

After a 30 min stabilization period, animals were randomly divided in two groups. In the first group (n = 6) (Ago group) the animals received six consecutive injections of the same dose of U-46619 (1.25 µg/kg) at a 30 min interval. Hemodynamic data were recorded before each injection of U-46619 (T0) and 2 (T2), and 15 (T15) mins after each injection of U-46619. Hemodynamic data included pulmonary artery pressure wave (PAP), pulmonary blood flow wave (CO), left atrial pressure, systemic arterial pressure (BP), and heart rate (HR).

In the second group (n = 6) (Anta group), an increasing dosage regimen of BM-573 was administrated intravenously 10 min before each U-46619 injection, with the exception of the first U-46619 injection which was not preceded by an antagonist injection. The animals received 0.125 mg/kg of BM-573 before the second, 0.250 mg/kg before the third, 0.500 mg/kg before the fourth, 1 mg/kg before the fifth and 2 mg/kg before the sixth agonist injection. In the Anta group, hemodynamic data were recorded before each

antagonist injection (Anta 0, Anta 0.125, Anta 0.25, Anta 0.5, Anta 1, Anta2), 10 min later (i.e., just before agonist injection) (T0), and 2 (T2) and 15 (T15) min after each injection of U-46619.

In both groups, each sequence of agonist injection and the corresponding recordings of data (T0, T2, T15) were called Run 0, Run 0.125, Run 0.250, Run 0.500, Run 1, Run 2, respectively, according to the dose of antagonist injected in the Anta group.

Data collection

All analog signals were continuously converted to digital form with an appropriate system (Cadas, DataQ instruments inc., Akron, OH). The pressure and flow waves were sampled at 200 Hz and stored on files. Cardiac cycles were delimited by R wave detection provided by a permanent recording of a one lead electrocardiogram. Ten consecutive cycles were recorded during apneic phase and numerically averaged to obtain representative diagrams of pressure and flow waves corresponding to specific experimental conditions.

Data analysis

A lumped parameter model, namely the four-element windkessel model (WK4) (Fig. 2), was used to analyze the flow conditions in the pulmonary circulation throughout the experimental protocol. The resistor R_2 represents the resistive properties of the pulmonary vasculature which are considered to reside primarily in the arteriolar system. The capacitor C , placed in parallel with R_2 , represents the compliant properties of the pulmonary arterial tree (Grant & Paradowski, 1987). The resistor R_1 is used to reflect characteristic resistance which level depends prominently on the resistance and compliance of the main pulmonary artery. Finally, an inductance L is added to allow positive phases angles between flow and pressure waves and accounts for the inertial properties of the blood and for the viscous resistive properties of the vessels wall (Grant & Paradowski, 1987). The four elements of the model were simultaneously identified by using an original analytic procedure previously described (Lambermont et al., 1998).

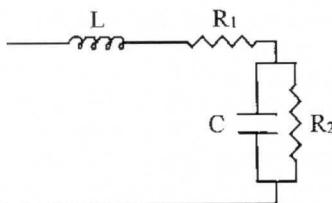


Fig. 2. Electrical representation of the four-element windkessel model. It is composed of a characteristic resistance (R_1), a peripheral resistance (R_2), a compliance (C), and an inductance (L).

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM).

A factorial design with 3 fixed effects (time, run, pig) of order 2 was used to determine the effects of time and run on the different parameters values (Statistica '99 edition, Statsoft Inc, Tulsa, OK, USA).

For evaluation of differences between groups, Student's *t*-test was applied.

$P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Conventional hemodynamic variables

Time course of conventional hemodynamic variables for both groups is presented in Figure 3.

Ago group

In Ago group, PAP increased from a mean value of 22.8 ± 0.8 mmHg at T0 to 47.2 ± 1.7 mmHg ($p < 0.05$) 2 min after injection of U-46619 (T2) and returned to baseline values (25 ± 0.8 mmHg) 15 min later (T15). A progressive increase in PAP values at T0, T2 and T15 was observed between Runs (Fig. 3).

CO decreased from 91.3 ± 2.9 ml/s (T0) to 63 ± 4.2 ml/s (T2) ($p < 0.05$) after administration of U-46619. This decrease in CO following administration of U-46619 at T2 worsened over time. It decreased from 110 ± 2.8 to 96 ± 3.2 ml/s ($p < 0.05$) during the first Run (Run 0) and from 81 ± 3.1 to 47 ± 7.4 ml/s ($p < 0.05$) during the last Run (Run 2), while HR increased from 123 ± 3.4 beats/min (T0) to 137 ± 4.7 beats/min (T2) ($p < 0.05$) and returned to baseline values at T15 (122 ± 3.5 beats/min).

BP slightly increased following the injection of U-46619 in the first Runs (Run 0, Run 0.125, Run 0.250, Run 0.500, respectively) while in both Run 1 and Run 2 BP decreased slightly after U-46619 injection.

Anta group

There is no difference between Ago and Anta groups during Run 0. From Run 0.125, PAP showed an increase which was less important in Anta group than in Ago group ($p < 0.05$) while in Run 2, PAP remained constant after administration of U-46619. HR and CO were not influenced by the injection of U-46619 which followed a 0.125 mg/kg BM-573 injection (Run 0.125).

Pulmonary hemodynamics

Time course of calculated pulmonary vascular parameters as provided by the WK4 model is presented in Figure 4.

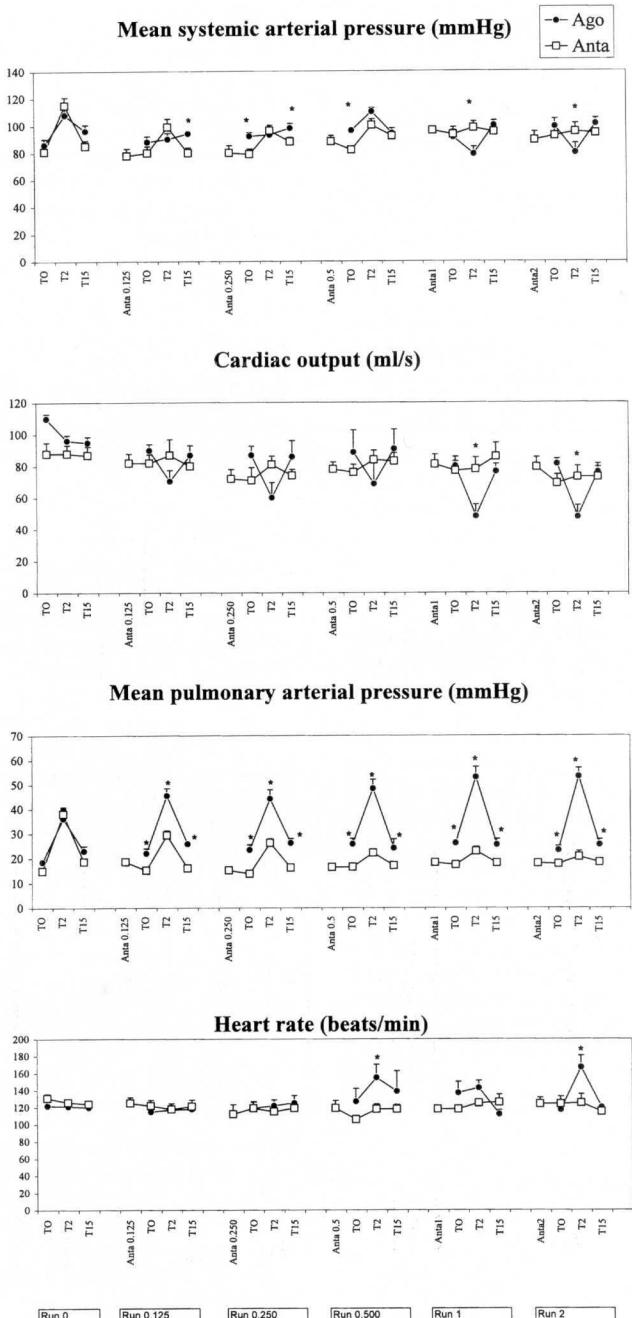


Fig. 3. Time course of conventional hemodynamic variables in the Ago group (Closed circle) and the Anta group (Open square) before U-46619 injection (T0), 2 min after U-46619 injection (T2) and 15 min after U-46619 injection (T15) in both Ago and Anta group and, in Anta group, before BM-573 injection (Anta 0.125, Anta 0.250, Anta 0.500, Anta 1, Anta 2, Anta 2).

* p < 0.05 Ago group vs. Anta group.

Ago group

R_1 and R_2 followed exactly the same pattern (Fig. 4). They increased at T2 and returned to baseline values at T15. Values at T0 were remarkably stable between Runs. C decreased largely at T2 during each Run and returned almost at the previous value of T0 with a slight decrease over time of T0 values.

Anta group

There was no difference between Ago and Anta groups during Run 0. From Run 0.125 and Run 0.250, R_1 and R_2 , respectively, did not increase after administration of U-46619 and remained remarkably stable over time. However, U-46619 decreased C values at T2 in all Runs in both groups

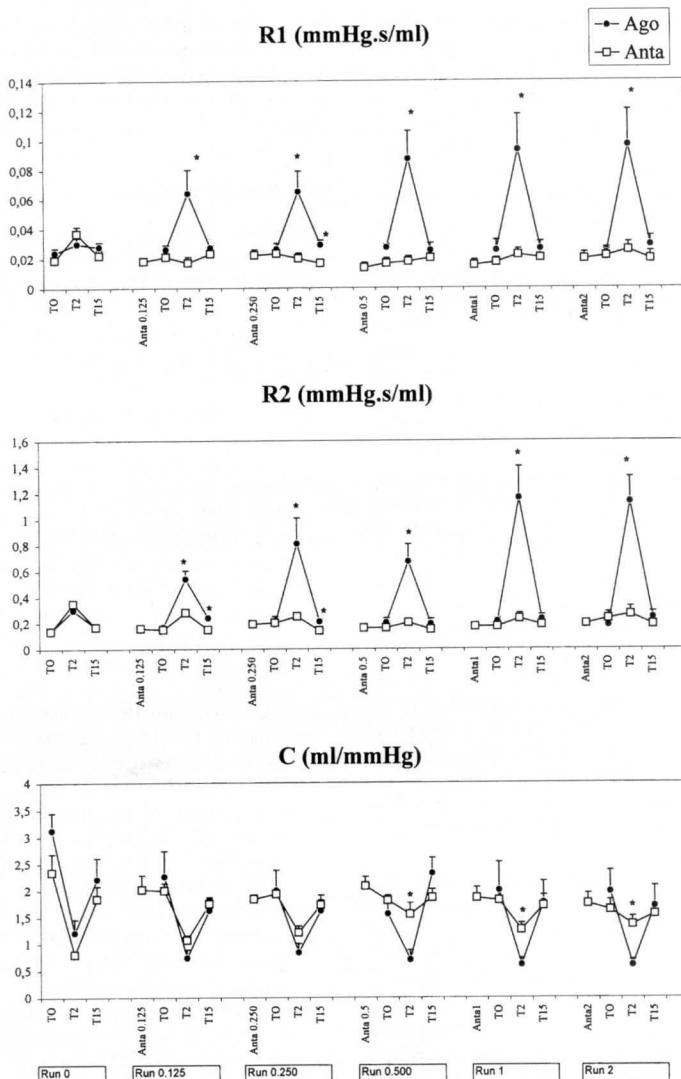


Fig. 4. Time course of calculated pulmonary vascular parameters as obtained by the four-element windkessel model of the pulmonary circulation in the Ago group (Closed circle) and the Anta group (Open square) before U-46619 injection (T0), 2 min after U-46619 injection (T2) and 15 min after U-46619 injection (T15) in both Ago and Anta group and, in Anta group, before BM-573 injection (Anta 0.125, Anta 0.250, Anta 1, Anta 2, according to the dose of BM-573 injected (mg/kg)). R_1 , characteristic vascular resistance; R_2 , peripheral vascular resistance; C, vascular compliance.

*p < 0.05 Ago group vs. Anta group.

but C was significantly higher in Anta group than in Ago group at T2 from Run 0.5 ($p < 0.05$).

Discussion

Pulmonary vasoconstriction caused by the release of predominantly vasoconstrictive mediators, is an important contributor to the increase in pulmonary vascular resistance in patients with acute pulmonary embolism, hyperacute lung rejection or during the early phase of septic shock (Collins et al., 2001; Lambermont et al., 1999; Smulders, 2000). In septic shock, right heart failure can lead to death (Kimchi et al., 1984) and, in pulmonary embolism, most patients who succumb do so within minutes to few hours after onset of symptoms. Therefore drugs that antagonise vasoconstrictive mediators could be effective overall if given in the initial phase of hemodynamic instability.

When pulmonary cyclooxygenase activity is inhibited, the importance of endothelial prostacyclin synthesis to preservation of transpulmonary blood flow is apparent. In contrast to selective antithromboxane strategy which results in preserved transpulmonary blood flow, inhibition of both prostacyclin and thromboxane in dogs with oleic acid lung injury is associated with significantly elevated pulmonary vascular resistance (Leeman et al., 1988). Whether TXA₂ directly affects pulmonary microvascular integrity is controversial. Nevertheless, TXA₂ has postvenular vasoconstrictive effects (Schuster et al., 2001) and therefore increases microvascular fluid transudation by causing increased hydrostatic pressure in pulmonary capillary beds (Collins et al., 2001).

TXA₂ has also proinflammatory effects and reduced TXA₂ effects generally correlate with a blunted inflammatory response (Collins et al., 2001).

In previous *in vitro* and *in vivo* studies, it has been demonstrated that BM-573 was a potent dual compound able to reduce TXA₂ production by thromboxane synthase inhibition and to prevent the action of TXA₂ (or PGH₂) by blocking the TXA₂ receptors (Rolin et al., 2001). The results of the present study evidence that the pulmonary vascular responses to the TXA₂ stable agonist, U-46619, were markedly reduced by a 2 mg/kg injection of BM-573.

As expected, in Ago group, U-46619 increased pulmonary artery pressure in response to increases in pulmonary vascular resistances (Kaye et al., 1995; Sjoberg & Steen, 1989). In Runs 1 and 2, PAP increased to a level high enough to provoke a fall in CO associated to a paradoxical decrease in BP.

Our data showed that BM-573 completely blocked pulmonary hypertensive effects of U-46619. However, at the regimen of 2 mg/kg and, in spite of the lack of effects on resistance, pulmonary vascular compliance still decreased after administration of the TXA₂ agonist. This residual effect can probably be explained by a persistent increase in the tonus of the pulmonary vascular wall smooth muscles sufficient to decrease vascular compliance but not vessel

lumen diameter. The inhibition of TXA₂ synthase by BM-573 was not investigated in the present study but, as previously demonstrated, BM-573 completely reduced the platelet production of TXB₂ induced by arachidonic acid (Rolin et al., 2001).

In essence, our data suggest that the present antagonist could be a promising therapeutic approach in the field of blocking TXA₂ in pulmonary hypertension secondary to pulmonary embolism, hyperacute lung rejection or septic shock not only because BM-573 administration blocks TXA₂ induced pulmonary vasoconstriction but also because it can prevent platelet aggregation and decrease inflammatory response.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Belgian Fonds National de la Recherche Scientifique (n° 3.4505.01) and by the Communauté Française de Belgique (ARC n° 99/04-249).

References

- Collins BJ, Blum MG, Parker RE, Chang AC, Blair KS, Zorn GL, III, Christman BW, Pierson RN, III (2001): Thromboxane mediates pulmonary hypertension and lung inflammation during hyperacute lung rejection. *J Appl Physiol* 90: 2257-2268.
- Grant BJB, Paradowski LJ (1987): Characterization of pulmonary arterial input impedance with lumped parameters models. *Am J Physiol* 252: H585-H593.
- Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B (1975): Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72: 2994-2998.
- Kaye AD, Nossaman BD, Ibrahim IN, DeWitt BJ, Feng CJ, Kadowitz PJ (1995): Analysis of thromboxane receptor-mediated responses in the feline pulmonary vascular bed. *Crit Care Med* 23: 164-170.
- Kimchi A, Ellrodt AG, Berman DS, Riedinger MS, Swan HJ, Murata GH (1984): Right ventricular performance in septic shock: a combined radionuclide and hemodynamic study. *J Am Coll Cardiol* 4: 945-951.
- Lambermont B, Gérard P, Kolh P, Detry O, Marcelle R, D'orio V (1998): Time domain method to identify simultaneously parameters of the windkessel model applied to the pulmonary circulation. *Arch Physiol Biochem* 106: 245-252.
- Lambermont B, Kolh P, Detry O, Gérard P, Marcelle R, D'orio V (1999): Analysis of endotoxin effects on the intact pulmonary circulation. *Cardiovasc Res* 41: 275-281.
- Leeman M, Lejeune P, Hallemand R, Melot C, Naeije R (1988): Effects of increased pulmonary vascular tone on gas-exchange in canine oleic-acid pulmonary-edema. *J Appl Physiol* 65: 662-668.
- Oates JA, Fitzgerald GA, Branch RA, Jackson EK, Knapp HR, Roberts LJ (1988): Clinical implications of prostaglandin

- and thromboxane A2 formation (1). *N Engl J Med* 319: 689-698.
- Ogletree ML, Brigham KL (1982): Effects of cyclooxygenase inhibitors on pulmonary vascular responses to endotoxin in unanesthetized sheep. *Prostaglandins Leukot Med* 8: 489-502.
- Rolin S, Dogne JM, Michaux C, Delarge J, Masereel B (2001): Activity of a novel dual thromboxane A(2)receptor antagonist and thromboxane synthase inhibitor (BM-573) on platelet function and isolated smooth muscles. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 65: 67-72.
- Schuster DP, Kozlowski JK, Brimioule S (2001): Effects of thromboxane receptor blockade on pulmonary capillary hypertension in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 163: A820.
- Sjoberg T, Steen S (1989): The strong contractile effect of the thromboxane receptor agonist U-46619 in isolated human pulmonary arteries and its competitive antagonism by BM-13.505. *Acta Physiol Scand* 136: 161-165.
- Smulders YM (2000): Pathophysiology and treatment of haemodynamic instability in acute pulmonary embolism: the pivotal role of pulmonary vasoconstriction. *Cardiovasc Res* 48: 23-33.
- Vandeplassche G, Hemans C, Van de Water A, Xhonneux R, Wouters L, Van Ammel K, de Clerck F (1991): Differential effects of thromboxane A2 synthase inhibition, singly or combined with thromboxane A2/prostaglandin endoperoxide receptor antagonism, on occlusive thrombosis elicited by endothelial cell injury or by deep vascular damage in canine coronary arteries. *Circ Res* 69: 313-324.
- Vandeplassche G, Hermans C, Somers Y, Van de Werf F, de Clerck F (1993): Combined thromboxane A2 synthase inhibition and prostaglandin endoperoxide receptor antagonism limits myocardial infarct size after mechanical coronary occlusion and reperfusion at doses enhancing coronary thrombolysis by streptokinase. *J Am Coll Cardiol* 21: 1269-1279.
- Wise WC, Cook JA, Halushka PV (1981): Implications for thromboxane A2 in the pathogenesis of endotoxic shock. *Adv Shock Res* 6: 83-91.

Annexe 9

Effects of BM-573, a novel thromboxane A2 inhibitor, on pulmonary hemodynamics in endotoxic shock.

Lambermont B, Ghuysen A, Dogne JM, Kolh P, Tchana-Sato V, Morimont P, Benoit P, Gerard P, Masereel B, D'Orio V.

Archives of Physiology and Biochemistry 2003
Jul;111(3):224-31

Effects of BM-573, a Novel Thromboxane A₂ Inhibitor, on Pulmonary Hemodynamics in Endotoxic Shock

B. Lambermont¹, A. Ghysen¹, J-M. Dogné⁵, P. Kohl¹, V. Tchana-Sato^{1,3}, P. Morimont¹, P. Benoit⁵, P. Gérard^{1,4}, B. Masereel² and V. D'orio¹

¹Hemodynamics Research Laboratory (HemoLiege), University of Liege, Belgium; ²Department of Pharmacy, University of Namur, Belgium; ³Aspirant FNRS; ⁴Department of Statistics, University of Liege, Belgium; ⁵Department of Pharmacy, University of Liege, Belgium

Abstract

Thromboxane A₂ is considered to be partially responsible for the increase in pulmonary vascular resistance observed after endotoxin administration and to participate in proinflammatory reactions. The effects of a novel dual TXA₂ synthase inhibitor and TXA₂ receptor antagonist (BM-573) on pulmonary hemodynamics were investigated in endotoxic shock. 30 mins before the start of a 0.5 mg/kg endotoxin infusion, 6 pigs (Endo group) received a placebo infusion and 6 other pigs (Anta group) received a BM-573 infusion.

In Endo group, pulmonary artery pressure increased from 25 ± 1.8 (T0) to 42 ± 2.3 mmHg (T60) ($p < 0.05$) after endotoxin infusion while, in Anta group, it increased from 23 ± 1.6 (T0) to 25 ± 1.5 mmHg (T60). This difference is due to a reduction in pulmonary vascular resistance in Anta group while pulmonary arterial compliance changes in Endo group remained comparable with the evolution in Anta group. In Endo group, PaO_2 decreased from 131 ± 21 (T0) to 74 ± 12 mmHg (T300) ($p < 0.05$), while in Anta group, PaO_2 was 241 ± 31 mmHg at the end of the experimental period (T300).

These results demonstrate that TXA₂ plays a major role in pulmonary vascular changes during endotoxin insult. Concomitant inhibition of TXA₂ synthesis and of TXA₂ receptors by BM-573 inhibited the pulmonary vasoconstrictive response during the early phase of endotoxin shock as well as the deterioration in arterial oxygenation.

Keywords: Antagonists, endotoxins, hemodynamics, models, pulmonary circulation, septic shock, swine, thromboxane.

Introduction

Thromboxane A₂ (TXA₂) is considered to be partially responsible for the increase in pulmonary vascular resistance observed after endotoxin administration and to participate in proinflammatory reactions (Ogletree & Brigham, 1982; Redl et al., 1991; Wise et al., 1981). Tumor necrosis factor alpha activity, platelet and neutrophil degranulation and margination, as well as increased vascular permeability are central to the pathophysiology of endotoxin-mediated acute lung injury. In this setting, hypoxemia results from a combination of non-cardiogenic pulmonary edema, atelectasis, pulmonary microthrombi, inhibition of hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar cellular infiltration and debris. Therefore, it has been suggested that inhibition of thromboxane, either by cyclooxygenase inhibition or by TXA₂ receptor antagonist could improve oxygenation in acute lung injury by a mechanism which remains unclear (Balk et al., 1988; Brimioule et al., 2002; Iglesias et al., 1994; Ogletree & Brigham, 1982; Schuster et al., 2001).

Up to now, most studies testing thromboxane inhibitors in endotoxic shock used either TXA₂ synthase inhibitors (Mikashima & Muramoto, 1990; Redl et al., 1991) or TXA₂ receptor antagonists (Altavilla et al., 1994; Jesmok & Gundel, 1995). Effects of TXA₂ synthase inhibitors were less than expected because of an incomplete blockage of TXA₂ synthase, at the dosage used, but also because TXA₂ synthase inhibition induced an accumulation of endoperoxide H₂ (PGH₂), a precursor of TXA₂, which is chemically more stable and exerts similar biological effects than TXA₂ itself (FitzGerald et al., 1985). However, specific inhibitors of

Accepted: 2 June, 2003

Address correspondence to: Bernard Lambermont, Medical Intensive Care Unit (-2C), Department of Medicine, University Hospital of Liege, CHU Sart Tilman B35, 4000 Liege, Belgium. Tel.: +32 43 667191; Fax: +32 43 667723; E-mail: b.lambermont@chu.ulg.ac.be

TXA₂ synthase are also responsible for increased generation of prostanoids such as prostaglandin I₂ which may attenuate platelet activation, decrease vascular resistance (Altavilla et al., 1994; FitzGerald et al., 1985; Redl et al., 1991), and blunt leukotriene release (Tran et al., 2001). Therefore, efforts to modulate the action of TXA₂ in septic shock should focus on agents able not only to block biosynthesis of TXA₂ but also to antagonize both PGH₂ and TXA₂ at the level of their common receptors.

In this investigation, we studied the effects of BM-573, a compound with both TXA₂ synthase inhibition and TXA₂ receptor antagonist properties, on pulmonary hemodynamics and arterial oxygenation during endotoxic shock. Pulmonary vascular hemodynamics was studied in details by a four-element windkessel model (Lambermont et al., 1998).

Materials and methods

All experimental procedures and protocols used in this investigation were reviewed and approved by the Ethics Committee of the Medical Faculty of the University of Liege. They were performed in accordance with the European Community Guidelines for the use of experimental animals.

Experiments were performed on 12 healthy pure pietran pigs of either sex weighing from 25 to 30 kg. The animals were premedicated with intramuscular administration of ketamine (20 mg/kg) and diazepam (1 mg/kg). Anesthesia was then induced and maintained by a continuous infusion of sufentanil (0.5 µg/kg/h) and pentobarbital (5 mg/kg/h). Spontaneous movements were prevented by pancuronium bromide (0.2 mg/kg/h). After endotracheal intubation through a cervical tracheostomy, the pigs were connected to a volume cycled ventilator (Evita 2, Dräger, Lübeck, Germany) set to deliver a tidal volume of 15 ml/kg with an FiO₂ of 0.4 and at a respiratory rate of 20 breaths/min. End-tidal CO₂ (PETCO₂) measurements (Capnomac, Datex, Helsinki, Finland) were used to monitor the adequacy of ventilation. Respiratory settings were adjusted to maintain PETCO₂ between 30 and 35 mmHg. The pulmonary trunk was exposed through a median sternotomy. A micromanometer-tipped catheter (Sentron pressure-measuring catheter, Cordis, Miami, FL) was inserted into the main pulmonary artery through a stab wound in the right ventricular outflow tract. A 14 mm diameter perivascular flow probe (Transonic Systems, Ithaca, NY) was closely adjusted around the main pulmonary artery 2 cm downstream of the pulmonary valve. The micromanometer-tipped catheter was manipulated so that the pressure sensor was positioned closely to the flow probe.

Left atrial pressure (LAP) was measured with a micromanometer-tipped catheter (Sentron pressure-measuring catheter, Cordis, Miami, FL) inserted into the cavity through the left atrial appendage. Finally, systemic blood pressure (BP) was monitored with a micromanometer-tipped catheter

(Sentron pressure-measuring catheter, Cordis, Miami, FL) inserted into the descending thoracic aorta through the left femoral artery.

The antiplatelet potency of BM-573 was determined according to a previously described method (Dogne et al., 2000). The platelet-rich plasma (PRP) was obtained from the supernatant fraction after centrifugation for 20 min at 90 g (25°C). The remaining blood was centrifuged at 2000 g for 5 min (25°C) and the supernatant gave the platelet-poor plasma (PPP). The platelet concentration of PRP was adjusted to 3.10⁸ cells·mL⁻¹ by dilution with PPP. Aggregation tests were performed according to Born's turbidimetric method by means of two-channel aggregometer (Chrono-log, Cordis, Leiden, The Netherlands). PPP was used to adjust the photometric measurement to the minimum optical density. PRP (225 µL) was added in a silanised cuvette and stirred (1100 rpm). Platelet aggregation was initiated by addition of (5 µL) arachidonic acid (600 µM final). To evaluate platelet aggregation, the maximum increase in light transmission was determined from the aggregation curve 6 min after addition of the inducer.

Experimental protocol

After a 30-min stabilization period (T0), 12 animals were randomly divided in two groups. Both groups received a 0.5 mg/kg endotoxin (Lipopolysaccharide from Escherichia Coli serotype 0127:B8; Sigma Chemical, St Louis, MO) infusion over 30 min (from T30 to T60). While in the first group (Endo group) the animals were infused with placebo, in the second group (Anta group), the animals received from T0 to T300 a 10 mg/kg/h infusion of BM-573 to achieve a steady-state concentration of 14.11 ± 3.34 µg/ml. This compound (Fig. 1) was obtained from the laboratory of Medicinal Chemistry of the University of Liege. It was dissolved in

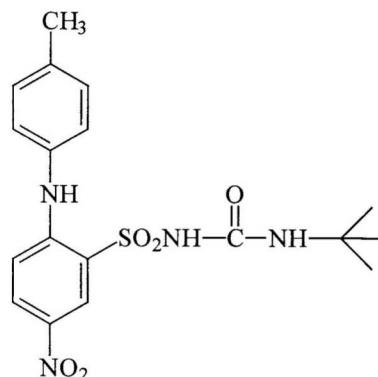


Fig. 1. Chemical structure of the TXA₂ receptor antagonist and synthase inhibitor BM-573.

propylene glycol and water to achieve a drug mother solution of 20 mg/ml.

Hemodynamic data included pulmonary artery pressure wave (PAP), pulmonary blood flow wave (Q), LAP, BP, heart rate (HR). These parameters were recorded every 30 min from T0 to T300 during a short apneic phase and stored for subsequent analysis. All analog signals were continuously converted to digital form with an appropriate system (Cadas, DataQ instruments inc., Akron, OH, USA). PAP, Q, LAP, BP, HR, were also monitored on-line throughout the experiment. LAP was maintained stable throughout all the experiment by Ringer-lactate infusion as needed.

Arterial blood samples were collected every 60 min to measure blood gases (PO₂ and PCO₂), pH, ionogram and hematocrit by using a 288 Blood Gas System analyser (CIBA-Corning, CA, USA). Blood sample was also collected at T0, T30, T60, T180 and T300 with trisodium citrate (3.8% w/w) in a polypropylene tube to determine antiplatelet potency. Thromboxane B₂ (TXB₂) was measured as the stable metabolite of TXA₂ in blood samples at T30, T60, T120, T180, T240 and T300 by a specific enzyme immunoassay (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA) according to the manufacturer's instructions.

Data analysis

A lumped parameter model, namely the four-element windkessel model (WK4), was used to analyze the flow conditions in the pulmonary circulation throughout the experimental protocol. An electrical representation of the WK4 is displayed in Figure 2.

The resistor R₂ represents the resistive properties of the pulmonary vasculature which are considered to reside primarily in the arteriolar system. The capacitor C, placed in parallel with R₂, represents the compliant properties of the pulmonary arterial tree (Grant & Paradowski, 1987). The resistor R₁ is used to reflect characteristic resistance which level depends prominently on the resistance and compliance of the main pulmonary artery. Finally, an inductance L is added to allow positive phases angles between flow and pressure waves and accounts for the inertial properties of the blood and the viscous resistive properties of the

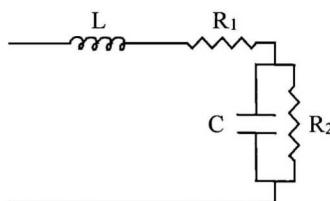


Fig. 2. Electrical representation of the four-element windkessel model. It is composed of a characteristic resistance (R₁), a peripheral resistance (R₂), a compliance (C), and an inductance (L).

vessels wall (Grant & Paradowski, 1987). All elements of the model were simultaneously identified by using an original analytic procedure previously described (Lambertmont et al., 1998).

Arterial elastance (E_a), which reflects right ventricular afterload, was calculated using the following equation (Fourie et al., 1992):

$$E_a = (R_1 + R_2) / (Ts + [R_2 C (1 - e^{-RC/Td})])$$

where Ts and Td are the systolic and diastolic time intervals, respectively.

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm standard error of the mean (S.E.M.).

For comparisons within each group, a repeated measures analysis of variance (ANOVA) was used and, when necessary ($p < 0.05$), a Scheffe test was used for multiple comparisons (Statistica[®]; Statsoft Inc., Tulsa, OK). Differences between groups were determined with between-group ANOVA (Statistica[®]; Statsoft Inc., Tulsa, OK). $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Effects of endotoxin infusion

The time course of endotoxin insult on conventional hemodynamic variables is presented in Figure 3. Mean PAP showed a biphasic response after endotoxin challenge. It reached a first maximum at T60 (i.e., 30 min after the start of endotoxin infusion), then immediately returned to lower values, then increased progressively until T300. In contrast, mean BP significantly ($p < 0.05$) decreased from 95 ± 4 (T60) to 67 ± 4 mmHg (T90) and remained inferior to 60 mmHg from T120 until T240. At T270 and T300, mean BP returned to values greater than 60 mmHg, 63 ± 11 and 73 ± 11 mmHg, respectively. Mean Q decreased immediately following the beginning of endotoxin infusion, and decreased progressively until the end of the experiment.

Computed pulmonary hemodynamic variables, as assessed by the WK4 of the pulmonary circulation, are depicted in Figure 4. R₁ increased rapidly after the onset of endotoxin insult and reached a maximum at T90. It decreased slightly at T120 and T150 and then remained at an intermediate level from T180 to T300. R₂ expressed a profile that was similar to the changes in PAP. C decreased rapidly after the start of endotoxin infusion, transiently returned to a pre-endotoxin value at T90 and then decreased progressively until T210 and then remained stable until the end of the experimental period. E_a expressed a profile that was similar to the changes observed in PAP and R₂.

As shown in Figure 5, PO₂ in Endo group decreased from 131 ± 21 mmHg (T0) to 74 ± 12 mmHg (T300) ($p < 0.05$).

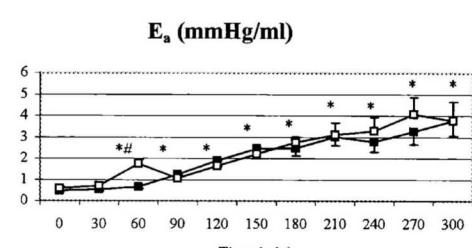
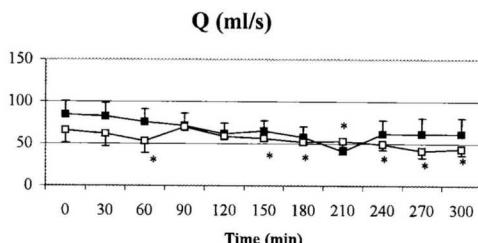
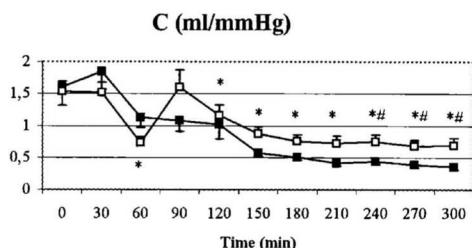
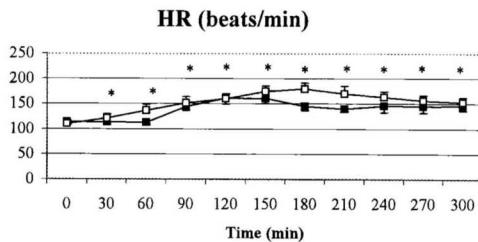
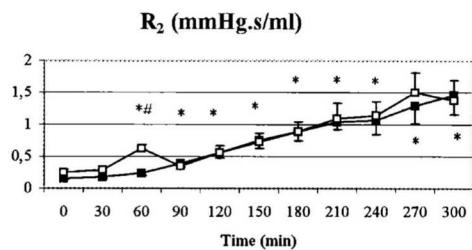
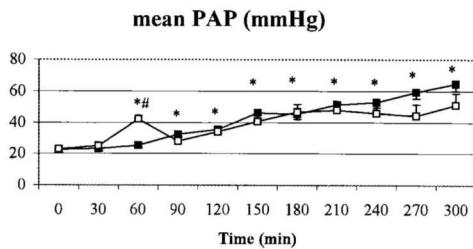
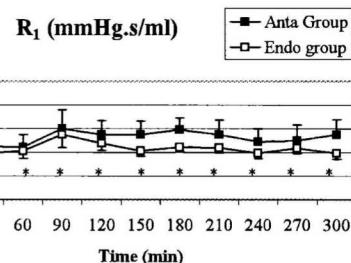
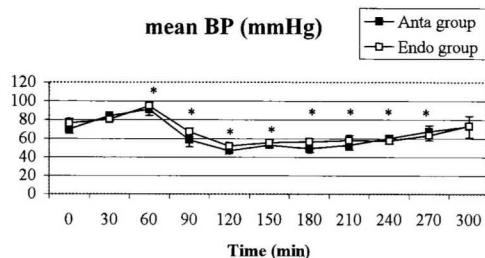


Fig. 3. Time course of conventional hemodynamic variables in Endo group and Anta group.

* $p < 0.05$ vs. T0 in Endo group.

$p < 0.05$ Endo group vs. Anta group.

BP, systemic arterial blood pressure; PAP, pulmonary arterial blood pressure; HR, heart rate; Q, cardiac output.

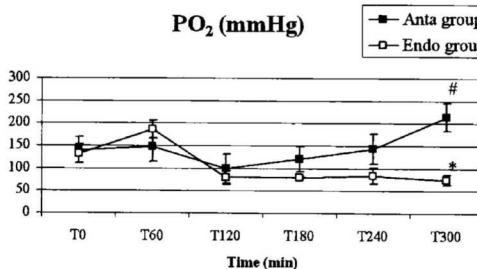
Fig. 4. Time course of calculated pulmonary vascular parameters as obtained by the four element windkessel model of the pulmonary circulation in Endo group and Anta group.

* $p < 0.05$ vs. T0 in Endo group.

$p < 0.05$ Endo group vs. Anta group.

R_1 , characteristic vascular resistance; R_2 , peripheral vascular resistance; C, vascular compliance; E_a , arterial elastance.

Effects of BM-573 in Endotoxic Shock

Fig. 5. Time course of PO_2 in Endo group and Anta group.* $p < 0.05$ vs. T0 in Endo group.# $p < 0.05$ Endo group vs. Anta group.

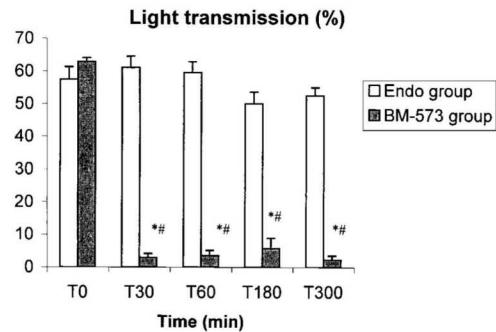
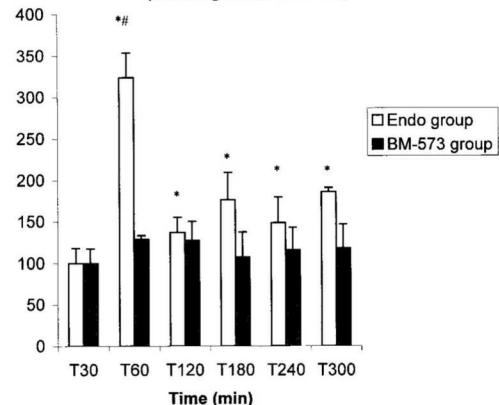
Effects of endotoxin infusion during BM573 infusion

As shown in Figure 3, BM573 infusion had no effect on BP, Q and HR evolution after endotoxin infusion. In contrast, compared with the Endo group where mean PAP increased from $25 \pm 2 \text{ mmHg}$ at T30 to $42 \pm 2 \text{ mmHg}$ at T60, in Anta group, mean PAP only increased from 23 ± 2 to $25 \pm 2 \text{ mmHg}$ after endotoxin infusion. Such a difference in the time course of mean PAP T60 between the two groups was significant ($p = 0.0001$). From T90 to T300, however, mean PAP values evidenced similar evolution in both groups.

As depicted in Figure 4, evolution of R_1 in Anta group paralleled that observed in Endo group. There were no statistically significant differences in R_1 values at any time between the two groups. In contrast, evolution of R_2 differed between the two groups during the early phase of endotoxin shock. Indeed, in Anta group, R_2 did not increase significantly from T30 to T60 (0.18 ± 0.02 to $0.23 \pm 0.03 \text{ mmHg/s/ml}$), then began to increase at T90 and, later, followed exactly the same evolution as did R_2 in Endo group. Evolution of C was parallel in the two groups but C values in Anta group were lower than Endo group C values from T150 until the end of the experiment. However, such differences in C values were too low to be hemodynamically significant as reflected by Ea values. Like for PAP and R_2 evolution, Ea increased only from 0.53 ± 0.07 at T30 to $0.66 \pm 0.08 \text{ mmHg/ml}$ at T60. This difference was not statistically significant. However, immediately after the end of endotoxin infusion (T60), Ea in Anta group ($0.66 \pm 0.08 \text{ mmHg/ml}$) was strongly different ($p = 0.0001$) from Ea calculated in the Endo group ($1.76 \pm 0.2 \text{ mmHg/ml}$). From T90 until the end of the experimental protocol, there were no differences between Ea values calculated in the two groups.

In contrast to Endo group, in Anta group, PO_2 increased from $140 \pm 88 \text{ mmHg}$ (T0) to $241 \pm 31 \text{ mmHg}$ (T300) during the experiment ($p = 0.5$). Difference between Endo group and Anta at T300 was statistically significant ($p = 0.02$) (Fig. 5).

Arterial pH, arterial PCO_2 , ionogram, and hematocrit remained in the normal range in both groups throughout the experimental period.

Fig. 6. Ex vivo platelet aggregation induced by arachidonic acid ($600 \mu\text{M}$) in Endo group and Anta group.* $p < 0.05$ vs. T0 in Endo group.# $p < 0.05$ Endo group vs. Anta group.TXB₂ production (% change from baseline)Fig. 7. TXB₂ production in Endo group and Anta group.* $p < 0.05$ vs. T0 in Endo group.# $p < 0.05$ Endo group vs. Anta group.Effects of BM573 on platelet aggregation and TXB₂ production

As depicted in Figure 6, BM573 infusion induced a significant inhibition of *ex vivo* platelet aggregation activated by $600 \mu\text{M}$ of arachidonic acid. This inhibitory effect was observed from T30 to T360. In contrast, in the Endo group, the faculty of platelet aggregation by arachidonic acid was maintained until the end of the experiment.

As described in Figure 7, the production of TXB₂ remained stable in Anta group throughout the experiment. In contrast, in Endo group, TXB₂ production showed a 3-fold increase 30 minutes after the start of endotoxin infusion (from 1528.73 pg/ml to 4949.18 pg/ml). In the same group, a

weaker increase in TXB₂ production was maintained from T120 to T300.

Discussion

The effects of a low-dose endotoxin infusion on pulmonary hemodynamics have been previously tested in our laboratory. In essence, endotoxin insult was responsible for a complex pulmonary vascular response involving a dynamic, time-dependent interplay between R₁, R₂, and C (Lambermont et al., 1999). During early endotoxemia, the increase in PAP may be related to pulmonary vasoconstriction generated by the release of TXA₂, whereas later changes could be related to vascular wall injury and a more multifactorial pathophysiology (Lambermont et al., 1999).

Inhibition of arachidonic acid metabolites production (principally TXA₂ and prostaglandins) by nonsteroidal anti-inflammatory drugs in septic shock has been extensively tested in animal models and in humans (Bernard et al., 1997). Three studies have been conducted in patients with septic shock using ibuprofen, a nonsteroidal antiinflammatory drug which prevents TXA₂ and prostacycline production by inhibiting the cyclooxygenase enzyme. These studies showed a small but beneficial therapeutic effect on mortality, although statistically not significant (Bernard et al., 1991; Bernard et al., 1997; Haupt et al., 1991). Increases in systemic mean arterial blood pressure observed in patients with sepsis treated with ibuprofen may likely be explained by decreases in prostaglandin synthesis (Wanecek et al., 1997). However, because prostaglandin inhibition raises cytokine levels during endotoxemia, it could also be partially responsible for the lack of beneficial effects of ibuprofen (Spinas et al., 1991). In other words, although the cyclooxygenase inhibitor, ibuprofen, blunts the clinical response to endotoxin, it augments circulating cytokine levels and leukocyte degranulation (Spinas et al., 1991). Theoretically, blocking the action of TXA₂ can be achieved by two different types of molecules: TXA₂ synthase inhibitors and TXA₂ receptor antagonists.

In a sheep model, inhibition of TXA₂ synthase led to an increase in PAP 30 min after endotoxin infusion (Redl et al., 1991). These authors showed that PAP values during the first 2 h of experiment were significantly lower as compared to the data obtained from the group only submitted to endotoxin insult. However, pulmonary vascular resistance showed similar increase in the two groups during the 3- to 6-h period.

Using a TXA₂ receptor antagonist during *Escherichia coli* challenge, Jesmok et al. (1995) showed that the acute pulmonary hypertensive phase could be inhibited, although the drug did not affect the development of septic shock and subsequent death (Jesmok & Gundel, 1995).

Accordingly, TXA₂ receptor antagonists could seem more effective than TXA₂ synthase inhibitors in attenuating the early pulmonary response to endotoxin insult. However these results were not confirmed by the study of Iglesias et al.

(1994). These authors compared TXA₂ synthase inhibition and TXA₂ receptor antagonism in a porcine burn sepsis model and did not find any significant difference in preventing occurrence of pulmonary hypertension, between the two drugs (Iglesias et al., 1994). Moreover, TXA₂ receptor antagonist is associated with cardiac index decrease and pulmonary vasoconstriction in response to PGI₂ blockade. As a matter of fact, TXA₂ synthase inhibitors in single use increase PGH₂ blood levels which can stimulate the population of TXA₂ receptors, while TXA₂ receptor antagonists in single use reduce PGI₂ blood levels.

Therefore, we tested a new dual TXA₂ synthase inhibitor and receptor antagonist called BM-573, derived from the pyridine sulfonylurea torasemide. This drug is obtained by the replacement of the pyridine ring of torasemide with a nitrobenzene. The presence of a tert-butyl group on the distal nitrogen of the sulfonylurea function improves the TXA₂ antagonism effect and increase TXA₂ synthase inhibitory potency (Rolin et al., 2001). In addition, this drug was found to be a potent inhibitor of human platelet aggregation induced by arachidonic acid or by U-46619, a TXA₂ agonist (Rolin et al., 2001).

Our results confirmed the antiplatelet activity of BM-573 since the administration of this drug prevented platelet aggregation induced by arachidonic acid *ex vivo*. Moreover, we showed that BM-573 was able to block completely the early phase of pulmonary hypertensive response during endotoxin challenge. The overproduction of TXB₂, which is expected to appear 30 min after the endotoxin insult, was prevented in the Anta group, thus confirming the TXA₂ synthase inhibitory activity of BM-573. In this group TXB₂ production remains at a basal level which is not affected by TXA₂ synthase inhibitors (Uematsu et al., 1994). Accordingly, the drug prevented the deterioration of Ea, a marker of right ventricular afterload, as it occurred in the Endo group at T60. Together with the lack of changes in pulmonary vascular resistance, our work confirms that TXA₂ is a key mediator of the early pulmonary vasopressor response in endotoxin shock.

Our results also demonstrated that the use of BM-573 improves arterial oxygenation during endotoxin infusion. In Endo group, PO₂ decreased throughout the experiment while, in contrast, PO₂ in Anta group did not decrease. This difference in PO₂ between groups was significant at T300 ($p = 0.02$). Although elevated plasma levels of TXA₂ have been clinically observed in patients with acute lung injury, suggesting that TXA₂ is an important mediator of acute lung injury (Deby-Dupont et al., 1987), these results could seem in contradiction with those of Suchner et al. (2001) who found that, in ARDS, TXA₂ may benefit oxygenation by amplifying efficacy of hypoxic pulmonary vasoconstriction (Suchner et al., 2001). However, TXA₂ is also a simulator of platelet activation, promoting the adherence of platelets to damaged vascular endothelium. Platelet adherence and degranulation lead to a release of mediators, helping to perpetuate a vicious cycle as granulocyte-endothelial cell adherence and granulocyte-induced cytotoxicity become

enhanced. In turn, activated leukocytes through release of oxygen free-radical species and proteolytic enzymes, play an important role in acute lung injury (Suchner et al., 2002). Moreover, Schuster et al. (2001) found that inhibition of TXA₂ could decrease venous resistance of pulmonary vascular bed and, hence, pulmonary capillary pressure. Imidazole, a TXA₂ inhibitor, has also been suggested to reduce capillary permeability and alveolo-arterial oxygen difference in a model of endotoxic shock in dogs (VanWylen et al., 1986). By this way, TXA₂ receptor inhibitors could decrease the generation of pulmonary edema (Brimioulle et al., 2002; Schuster et al., 2001).

In conclusion, these results demonstrate that TXA₂ plays a major role in pulmonary vascular changes during endotoxin insult. Concomitant inhibition of TXA₂ synthesis and of TXA₂ receptors by BM-573 inhibited the pulmonary vasoconstrictive response during the early phase of endotoxin shock. Administration of BM-573 in endotoxic shock is also responsible for an improvement in oxygenation probably by reducing pulmonary inflammatory process and pulmonary edema.

Acknowledgements

This work is supported by FRSM (Fonds de la Recherche Scientifique Médicale) Grant No. 3.4.505.01.F.

References

- Altavilla D, Canale P, Squadrato F, Sardella A, Ammendolia L, Urna G, Ioculano M, Squadrato G, Caputi AP (1994): Protective effects of BAY U 3405, a thromboxane A2 receptor antagonist, in endotoxin shock. *Pharmacol Res* 30: 137–151.
- Balk RA, Jacobs RF, Tryka AF, Townsend JW, Walls RC, Bone RC (1988): Effects of ibuprofen on neutrophil function and acute lung injury in canine endotoxin shock. *Crit Care Med* 16: 1121–1127.
- Bernard GR, Reines HD, Halushka PV, Higgins SB, Metz CA, Swindell BB, Wright PE, Watts FL, Vrbanac JJ (1991): Prostacyclin and thromboxane A2 formation is increased in human sepsis syndrome. Effects of cyclooxygenase inhibition. *Am Rev Resp Dis* 144: 1095–1101.
- Bernard GR, Wheeler AP, Russell JA, Schein R, Summer WR, Steinberg KP, Fulkerson WJ, Wright PE, Christman BW, Dupont WD, Higgins SB, Swindell BB (1997): The effects of ibuprofen on the physiology and survival of patients with sepsis. The Ibuprofen in Sepsis Study Group. *N Engl J Med* 336: 912–918.
- Brimioulle S, Julien V, Gust R, Kozlowski JK, Naeije R, Schuster DP (2002): Importance of hypoxic vasoconstriction in maintaining oxygenation during acute lung injury. *Crit Care Med* 30: 874–880.
- Deby-Dupont G, Braun M, Lamy M, Deby C, Pincemail J, Faymonville ME, Damas P, Bodson L, Lecart MP, Goutier R (1987): Thromboxane and prostacyclin release in adult respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med* 13: 167–174.
- Dogne JM, de Leval X, Neven P, Rolin S, Wauters J, David JL, Delarge J, Massereel B (2000): Effects of a novel non-carboxylic thromboxane A2 receptor antagonist (BM-531) derived from torasemide on platelet function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 62: 311–317.
- FitzGerald GA, Reilly IA, Pedersen AK (1985): The biochemical pharmacology of thromboxane synthase inhibition in man. *Circulation* 72: 1194–1201.
- Fourie PR, Coetze AR, Bolliger CT (1992): Pulmonary artery compliance: its role in right ventricular-arterial coupling. *Cardiovasc Res* 26: 839–844.
- Grant BJB, Paradowski LJ (1987): Characterization of pulmonary arterial input impedance with lumped parameters models. *Am J Physiol* 252: H585–H593.
- Haupt MT, Jastrzemski MS, Clemmer TP, Metz CA, Goris GB (1991): Effect of ibuprofen in patients with severe sepsis: a randomized, double-blind, multicenter study. The Ibuprofen Study Group. *Crit Care Med* 19: 1339–1347.
- Iglesias G, Zeigler ST, Lentz CW, Traber DL, Herndon DN (1994): Thromboxane synthetase inhibition and thromboxane receptor blockade preserve pulmonary and circulatory function in a porcine burn sepsis model. *J Am Coll Surg* 179: 187–192.
- Jesmok G, Gundel R (1995): Thromboxane-blocked swine as an experimental model of severe intravascular inflammation and septic shock. *Shock* 4: 379–383.
- Lambertmont B, Gérard P, Kolb P, Detry O, Marcelle R, D'Orio V (1998): Time domain method to identify simultaneously parameters of the windkessel model applied to the pulmonary circulation. *Arch Physiol Biochem* 106: 245–252.
- Lambertmont B, Kolb P, Detry O, Gérard P, Marcelle R, D'Orio V (1999): Analysis of endotoxin effects on the intact pulmonary circulation. *Cardiovasc Res* 41: 275–281.
- Mikashima H, Muramoto Y (1990): Protective effect of Y-20811, a long-lasting thromboxane synthetase inhibitor, on endotoxin shock in rabbits. *Thromb Res* 57: 499–505.
- Ogletree ML, Brigham KL (1982): Effects of cyclooxygenase inhibitors on pulmonary vascular responses to endotoxin in unanesthetized sheep. *Prostaglandins Leukot Med* 8: 489–502.
- Redl G, Abdi S, Traber LD, Nichols RJ, Flynn JT, Herndon DN, Traber DL (1991): Inhibition of thromboxane synthesis reduces endotoxin-induced right ventricular failure in sheep. *Crit Care Med* 19: 1294–1302.
- Rolin S, Dogne JM, Michaux C, Delarge J, Massereel B (2001): Activity of a novel dual thromboxane A2 receptor antagonist and thromboxane synthase inhibitor (BM-573) on platelet function and isolated smooth muscles. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 65: 67–72.
- Schuster DP, Kozlowski JK, Brimioulle S (2001): Effects of thromboxane receptor blockade on pulmonary capillary hypertension in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 163: A820.
- Spinas GA, Bloesch D, Keller U, Zimmerli W, Cammisuli S (1991): Pretreatment with ibuprofen augments circulating

- tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, and elastase during acute endotoxinemia. *J Infect Dis* 163: 89–95.
- Suchner U, Katz DP, Furst P, Beck K, Felbinger TW, Senftleben U, Thiel M, Goetz AE, Peter K (2001): Effects of intravenous fat emulsions on lung function in patients with acute respiratory distress syndrome or sepsis. *Crit Care Med* 29: 1569–1574.
- Suchner U, Katz P, Furst P, Beck K, Felbinger W, Thiel M, Senftleben U, Goetz E, Peter K (2002): Impact of sepsis, lung injury, and the role of lipid infusion on circulating prostacyclin and thromboxane A2. *Intensive Care Med* 28: 122–129.
- Tran HS, Quinn JV, Pue MM, Woolley DS, Puglisi RN, Slotman GJ (2001): Prostacyclin is neither sufficient alone nor necessary to cause pulmonary dysfunction: Results from infusions of prostacyclin and antiprostacyclin antibody in porcine septic shock. *Crit Care Med* 29: 1445–1451.
- Uematsu T, Nagashima S, Inaba H, Mizuno A, Kosuge K, Nakashima M (1994): Pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles of CS-518, a selective, long-lasting thromboxane synthase inhibitor, after single and multiple oral administration to healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 34: 41–47.
- VanWynen SJ, Browning DP, Villalba M (1986): The effect of imidazole in endotoxin shock in dogs. *Am Surg* 52: 413–417.
- Wanecek M, Rudehill A, Hemsen A, Lundberg JM, Weitzberg E (1997): The endothelin receptor antagonist, bosentan, in combination with the cyclooxygenase inhibitor, diclofenac, counteracts pulmonary hypertension in porcine endotoxin shock. *Crit Care Med* 25: 848–857.
- Wise WC, Cook JA, Halushka PV (1981): Implications for thromboxane A2 in the pathogenesis of endotoxic shock. *Adv Shock Res* 6: 83–91.

Annexe 10

Effect of a novel thromboxane A2 inhibitor on right ventricular-arterial coupling in endotoxic shock.

Lambermont B, Kohl P, Ghuysen A, Segers P, Dogne JM, Tchana-Sato V, Morimont P, Benoit P, Gerard P, Masereel B, D'Orio V.

Shock. 2004 Jan;21(1):45-51

EFFECT OF A NOVEL THROMBOXANE A₂ INHIBITOR ON RIGHT VENTRICULAR-ARTERIAL COUPLING IN ENDOTOXIC SHOCK

Bernard Lambermont,* Philippe Kolh,* Alexandre Ghysen,* Patrick Segers,†
Jean-Michel Dogné,‡ Vincent Tchana-Sato,* Philippe Morimont,* Patricia Benoit,‡
Paul Gérard,*§ Bernard Masereel,|| and Vincent D’Orio*

*Hemodynamics Research Laboratory (HemoLiege), Liege University, Belgium; †Hydraulics Laboratory, Institute of Biomedical Technology, Ghent University, Belgium; ‡Department of Pharmacy, Liege University, Belgium; §Department of Statistics, Liege University, Belgium; and ||Department of Pharmacy, Namur University, Belgium

Received 11 Nov 2002; first review completed 24 Jan 2003; accepted in final form 27 Aug 2003

ABSTRACT—We investigated the effects of a dual thromboxane (TXA)₂ synthase inhibitor and TXA₂ receptor antagonist (BM-573) on right ventricular-arterial coupling in a porcine model of endotoxic shock. Thirty minutes before the onset of 0.5 mg/kg endotoxin infusion, six pigs (Endo group) received an infusion with a placebo solution, and six other pigs (Anta group) with BM-573. Right ventricular pressure–volume loops were obtained by the conductance catheter technique. The slope (E_{es}) of the end-systolic pressure–volume relationship and its volume intercept at 25 mmHg were calculated as measures of right ventricular systolic function. RV afterload was quantified by pulmonary arterial elastance (E_a), and E_{es}/E_a ratio represented right ventricular-arterial coupling. Mechanical efficiency was defined as the ratio of stroke work and pressure-volume area. In this model of endotoxic shock, BM-573 blunted the early phase of pulmonary hypertension, improved arterial oxygenation, and prevented a decrease in right ventricular myocardial efficiency and right ventricular dilatation. However, the drug could not prevent the loss of homeostatic regulation and alterations in right ventricular-arterial coupling. In conclusion, dual TXA₂ synthase inhibitor and receptor antagonists such as BM-573 have potential therapeutic applications, improving right ventricular efficiency and arterial oxygenation in endotoxic shock.

KEYWORDS—Hemodynamics, pigs, pulmonary circulation, right ventricular dysfunction, septic shock

INTRODUCTION

Despite tremendous advances in supportive care, septic shock remains one of the leading causes of death in critically ill patients. Among the numerous complications, right heart failure is certainly of the most life-threatening ones (1). In septic shock, impaired right ventricular (RV) function results from an inappropriate matching between the ventricular inotropic state and pulmonary vascular impedance, with secondary altered ventricular–vascular coupling (2).

Thromboxane A₂ (TXA₂) has been reported to be partially responsible for the increase in pulmonary vascular resistance after endotoxin administration (3, 4) leading to ventricular–vascular coupling mismatch (5, 6). To restore coupling, one may aim to increase RV contractility. However, inhibition of TXA₂ in an attempt to blunt the increase in pulmonary vascular resistance seems a more appropriate approach.

Up to now, most studies focused on testing either inhibitors of TXA₂ synthase (6, 7) or receptor antagonists of TXA₂ independently (8, 9). In those studies, TXA₂ synthase inhibitors appeared less effective than anticipated not only because of an

incomplete blockage of TXA₂ synthase at the dosage used but also because TXA₂ synthase inhibition induces an accumulation of endoperoxide H₂ (PGH₂), which is a TXA₂ precursor, chemically more stable than TXA₂ itself and with similar biological effects (10). On the other hand, specific inhibitors of TXA₂ synthase are also responsible for increased generation of prostanoids such as prostaglandin I₂ (PGI₂), which is known to possibly exert beneficial effects such as attenuation of platelet activation and decrease in vascular resistance and leukotriene release (6, 8, 10). Nevertheless, it has become clear from these studies that efforts to modulate the actions of TXA₂ should focus on agents able to (a) block the biosynthesis of TXA₂ and (b) to simultaneously antagonize both PGH₂ and TXA₂ at their common receptor.

Torsemide, a loop diuretic, has been shown to have a weak TXA₂ antagonist activity on dog coronary artery (11). Since then, several molecules, chemically related to torsemide, have been designed and studied for their TXA₂ antagonism. Recently, it was demonstrated that BM-573 {*N*-tertbutyl-*N'*-(2-(4'-methylphenylamino)-5-nitro-benzenesulfonyl)urea}, a torsemide-related molecule, has a high affinity for the human platelet TXA₂ receptor. It was shown that BM-573 was able to relax a rat aorta that was precontracted with U-46619, a TXA₂ agonist. Moreover, BM-573 prevented human platelet aggregation induced by arachidonic acid and completely inhibited TXA₂ synthase (12). As such, it appears that BM-573 combines both the TXA₂ synthase inhibition and TXA₂ receptor antagonism properties.

The primary aim of this study was to evaluate the effects of this novel TXA₂ antagonist, BM-573, on RV performance in a porcine model of endotoxic shock. In addition, however, our

Address reprint requests to Bernard Lambermont, Intensive Care Unit, Department of Medicine, University Hospital of Liege, CHU Sart Tilman B35, 4000 Liege, Belgium. E-mail: b.lambermont@chu.ulg.ac.be.

This work is supported by FRSM (Fonds de la Recherche Scientifique Médicale) Grant N° 3.4505.01.F. Patrick Segers is recipient of a postdoctoral grant from the Fund for Scientific Research, Flanders (FWO-Vlaanderen). Philippe Kolh and Vincent Tchana-Sato are funded by a postdoctoral grant and a doctoral grant, respectively, from the National Fund for Scientific Research.

DOI: 10.1097/01.shk.000009535.86703.ca

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

study may also yield new insights in RV ventricular-arterial coupling in septic shock because only few studies have correctly evaluated RV function in these conditions. In most of these studies, RV systolic function was quantified by RV ejection fraction (1, 6) or RV pressure-length relationship (13–16). In the present work, we make use of the robust and highly sensitive indices of ventricular function described earlier: the slope of the end-systolic pressure–volume (PV) relationship (ESPVR) and its intercept with the volume axis (17, 18). Pulmonary arterial elastance (E_a) was used to describe the load that the RV chamber is facing (13).

MATERIALS AND METHODS

All experimental procedures and protocols used in this investigation were reviewed and approved by the Ethics Committee of the Medical Faculty of the University of Liege. They were performed in accordance with the principles of laboratory animal care (NIH publication No. 86–23, revised 1985).

Surgical preparation

Experiments were performed on 12 healthy pure pietran pigs of either sex weighing from 20 to 30 kg. The animals were premedicated with intramuscular administration of ketamine (20 mg/kg) and diazepam (1 mg/kg). Anesthesia was then induced and maintained by a continuous infusion of sufentanil (0.5 μ g/kg/h) and pentobarbital (5 mg/kg/h). Spontaneous movements were prevented by pancuronium bromide (0.2 mg/kg). After endotracheal intubation through a cervical tracheostomy, the pigs were connected to a volume-cycled ventilator (Evita 2, Dräger, Lübeck, Germany) set to deliver a tidal volume of 10 mL/kg with a FiO_2 of 0.4 and at a respiratory rate of 20 breaths/min. End-tidal CO_2 measurements (Capnomac, Datex, Helsinki, Finland) were used to monitor the adequacy of ventilation. Respiratory settings were adjusted to maintain end-tidal CO_2 between 30 and 35 mmHg.

The pulmonary trunk was exposed by means of medial sternotomy. A micromanometer-tipped catheter (Sentron pressure-measuring catheter, Cordis, Miami, FL) was inserted into the main pulmonary artery through a stab wound in the RV outflow tract. A 14-mm diameter perivascular flow probe (Transonic Systems, Ithaca, NY) was closely adjusted around the main pulmonary artery 2 cm downstream of the pulmonary valve. The micromanometer-tipped catheter was manipulated so that the pressure sensor was positioned closely to the flow probe.

Left atrial pressure was measured with a micromanometer-tipped catheter inserted into the cavity through the left atrial appendage. Systemic blood pressure (BP) was monitored with a micromanometer-tipped catheter inserted into the descending thoracic aorta through the right femoral artery.

A 7F, 12-electrode (8-mm interelectrode distance) conductance micromanometer-tipped catheter (CD Leycom, Zoetermeer, The Netherlands) was inserted through the RV infundibulum into the right ventricle and positioned so that all electrodes were in the RV cavity.

A 6F Fogarty balloon catheter (Baxter Healthcare Corp., Oakland, CA) was advanced into the inferior vena cava through a right femoral venotomy. Inflation of this balloon produced a gradual preload reduction.

Experimental protocol

After a 30-min stabilization period (T_0), 12 animals were randomly divided in two groups. Both groups received a 0.5 mg/kg endotoxin (lipopolysaccharide from *Escherichia coli* serotype 0127:B8; Sigma Chemical, St Louis, MO) infusion over 30 min (from T_{30} to T_{60}). In the first group (Endo group, $n = 6$), the animals were infused with placebo, and in the second group (Anta group, $n = 6$), they received a 10 mg/kg/h infusion of BM-573 from T_0 to T_{300} to achieve a steady-state concentration of $14.11 \pm 3.34 \mu$ g/mL. At this concentration, BM-573 completely blocked TXA₂ receptor activation by U-46619, a TXA₂ agonist (unpublished data).

This compound was obtained from the Laboratory of Medicinal Chemistry of our University. It was dissolved in propylene glycol and water to achieve a drug stock solution of 20 mg/mL.

Haemodynamic data included pulmonary artery pressure (PAP) wave, pulmonary blood flow (Q) wave, left atrial pressure, BP, heart rate (HR), RV pressure, RV volume, and RV PV loops. These parameters were recorded every 30 min from T_0 to T_{300} during a short apneic phase and stored for subsequent analysis. All analog signals were continuously converted to digital form with an appropriate system (Cadas, DataQ Instruments Inc., Akron, OH). PAP, Q, left atrial pressure, BP, HR, RV volume, RV pressure, and RV PV loops were also monitored on line throughout the experiment. Left atrial pressure was maintained stable throughout the experiment by Ringer-lactate infusion as needed.

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

RV PV loops were also recorded every 30 min from T_0 to T_{300} during a transient occlusion of the inferior vena cava using the Fogarty balloon (Fig. 1).

Arterial blood was collected every 60 min to measure pH, PO_2 , PCO_2 , base excess, and bicarbonate standard (288 Blood Gas System, CIBA-Corning, CA).

Data analysis

Pulmonary circulation— E_a , which reflects RV afterload, was calculated using the following equation (13):

$$E_a = (R_1 + R_2) / [T_s + R_2 C (1 - e^{-R_2 C/T_d})]$$

where T_s and T_d are the systolic and diastolic time intervals, respectively.

A lumped parameter model, namely the four-element windkessel model, was used to calculate R_1 , R_2 , and C using an original analytic procedure described previously (19). In this model, R_1 represents the characteristic impedance of the pulmonary circulation, R_2 pulmonary vascular resistance, and C pulmonary artery compliance (20).

Right ventricular function—RV PV loops were obtained using the conductance catheter method as previously described (18).

Before each measurement, parallel conductance was determined with the saline method by injecting 3 mL of NaCl 10% into inferior vena cava (18).

During a rapid inferior vena cava occlusion maneuver, the slope of the ESPVR curve (end-systolic elastance, E_{es}) was determined (18). A volume intercept at a fixed pressure of 25 mmHg (V_{p25}) to quantify the position of the ESPVR was also used. E_{es} and V_{p25} represent load-independent measures of RV contractile performance. An increased E_{es} , a leftward shift indicated by a decreased V_{p25} , or both represent an improved systolic function (17, 18).

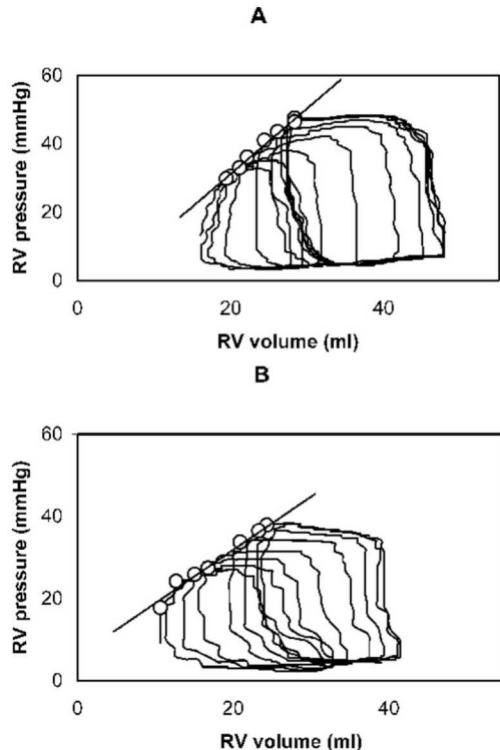


Fig. 1. Typical example of right ventricular (RV) pressure–volume loops and end-systolic pressure–volume relationship during inferior vena cava occlusion in one animal at T_{60} in the Endo (A) and in the Anta group (B). Open circles are end-systolic points.

Stroke work was calculated as the integrated area of each PV loop.

The specific area in the PV plane bounded by the end-systolic and end-diastolic pressure-volume lines and the systolic segment of the PV loop (pressure-volume area, PVA) serves as a reliable predictor of myocardial oxygen consumption (13, 21).

RV efficiency was calculated as the ratio of stroke work to PVA (13, 22).

Ejection fraction was calculated as the ratio of stroke volume to end-diastolic volume (EDV).

Additionally, to assess right ventricular-vascular coupling, we examined the E_{es}/E_a ratio. Under normal operating conditions, the right ventricle operates at a maximum efficiency and a submaximal stroke work ($E_{es}/E_a > 1$). The maximal stroke work is obtained when $E_{es}/E_a = 1$, and uncoupling occurs when E_{es}/E_a is lower than 1 (13).

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM).

A two-way ANOVA for repeated measures during early ($T_{30}-T_{60}$) and late (from T_{90}) phases of endotoxic shock gives P value for time, group, and time-group interaction (Statistica[®], Statsoft Inc, Tulsa, OK).

$P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Conventional hemodynamic data

As shown in Figure 2, the time evolution of BP, Q, and HR values did not differ between Endo and Anta groups.

Mean PAP in the Endo group reached a first maximum at T_{60} ($P < 0.05$) (i.e., 30 min after the onset of endotoxin infusion). In the Anta group, in contrast, mean PAP values at T_{60} were not different from their basal values. The difference in mean PAP values between the two groups was statistically significant at T_{60} ($P < 0.05$). After T_{90} , mean PAP increased progressively ($P < 0.05$) and similarly in the two groups.

Right ventricular volumes

The evolution in time of RV EDV is depicted in Figure 3. In the Endo group, EDV increased from 53 ± 6 mL (T_0) to 64 ± 11 mL ($P < 0.05$) at the end of endotoxin infusion (T_{60}) and further remained unchanged throughout the experiment. In the Anta group, EDV was lower than in the Endo group at T_{90} and thereafter ($P < 0.05$). Ejection fraction progressively decreased in both groups throughout the experiment ($P < 0.05$). However, ejection fraction remained higher in the Anta than in the Endo group ($P < 0.05$) (Fig. 3).

Derived hemodynamic data

E_a and R_2 in the Endo group expressed a profile similar to the time evolution of PAP (Fig. 4). As was found for PAP, E_a and R_2 did not significantly increase between T_{30} and T_{60} in the Anta group. From T_{90} until the end of the experimental protocol, there was no difference in E_a and R_2 values between the two groups (Fig. 4).

R_1 increased rapidly from 0.033 ± 0.006 to 0.055 ± 0.010 mmHg \cdot s \cdot mL $^{-1}$ after the onset of endotoxin infusion and remained unchanged during the late phase of endotoxic shock. C decreased rapidly from 1.5 ± 0.2 to 0.7 ± 0.1 mL/mmHg after the start of endotoxin infusion and then remained unchanged until the end of the experimental period. The evolution of R_1 and C in the Anta group paralleled that observed in the Endo group. There were no statistically significant differences in the evolution of R_1 and C between the two groups.

During the early phase of endotoxic shock, E_{es} increased from 1.0 ± 0.1 mmHg/mL (T_0) to 2.9 ± 0.4 mmHg/mL (T_{60}) ($P < 0.05$) in the Endo group and was significantly higher than

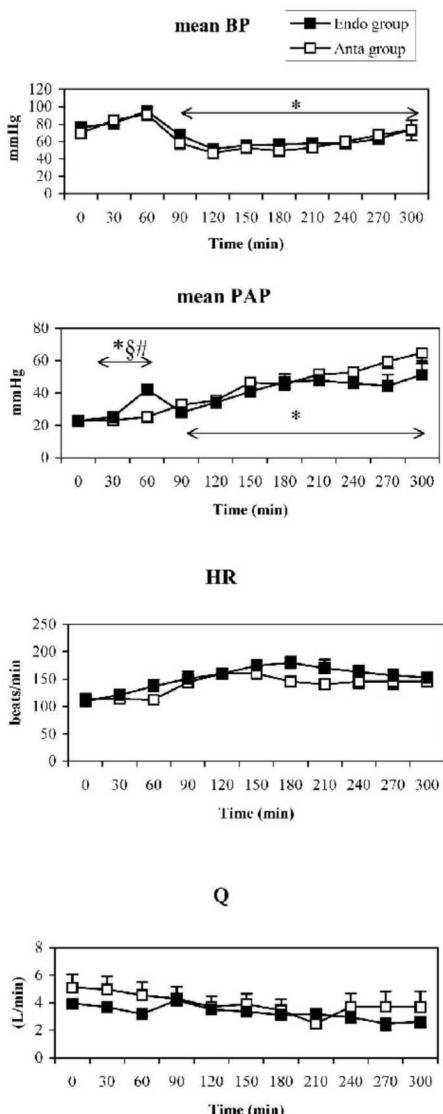


Fig. 2. Time course of mean systemic arterial pressure (BP), mean pulmonary arterial pressure (PAP), heart rate (HR), and cardiac output (Q) in the Endo (■) and Anta groups (□). Data are presented as mean \pm SEM. P values for time, group, and time-group interaction are given by a two-way ANOVA for repeated measures: * $P < 0.05$ for time effect. $^{\#}P < 0.05$ for group effect. $^{\circ}P < 0.05$ for time-group interaction.

E_{es} in the Anta group ($P < 0.05$). During the late endotoxic phase, E_{es} remained unchanged and similar in both groups (Fig. 5).

V_{p25} decreased from a basal value of 20 ± 8 mL to 2 ± 2 mL at T_{60} ($P < 0.05$) in the Endo group, but it remained unchanged

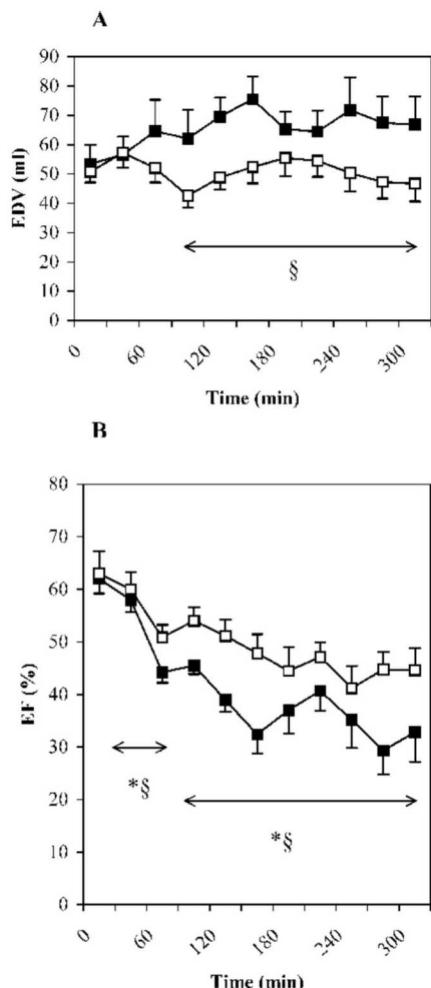


Fig. 3. Time course of end-diastolic volume (EDV) (A) and right ventricular ejection fraction (EF) (B) in the Endo (■) and Anta groups (□). Data are presented as mean \pm SEM. P values for time, group, and time-group interaction are given by a two-way ANOVA for repeated measures: * $P < 0.05$ for time effect. § $P < 0.05$ for group effect.

in the Anta group. During the late phase of endotoxic shock, V_{p25} remained constant in both groups.

During the early phase of endotoxic shock, E_{es}/E_a remained at an optimal level of 2 from T_0 to T_{90} in both groups. During the late phase of endotoxic shock, right ventricular-arterial coupling deteriorated progressively in both groups ($P < 0.05$) (Fig. 5).

RV efficiency remained unchanged in both groups during the early phase of endotoxic shock. In contrast, during the late phase of endotoxic shock, RV efficiency in the Endo group

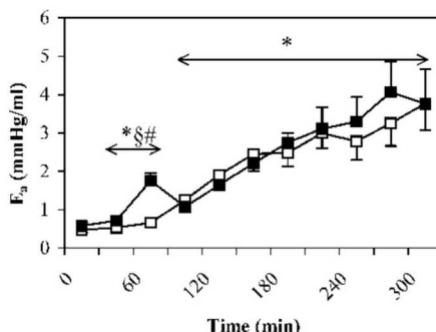


Fig. 4. Time course of pulmonary arterial elastance (E_a) in the Endo (■) and Anta groups (□). Data are presented as mean \pm SEM. P values for time, group, and time-group interaction are given by a two-way ANOVA for repeated measures: * $P < 0.05$ for time effect. § $P < 0.05$ for group effect. * $P < 0.05$ for time-group interaction.

decreased significantly ($P < 0.05$) and differed from the value calculated in the Anta group (Fig. 6).

PO_2 decreased from 131 ± 21 mmHg (T_0) to 74 ± 12 mmHg (T_{300}) ($P < 0.05$) in the Endo group (Fig. 7), while PO_2 progressively increased from 140 ± 88 mmHg (T_0) to 241 ± 31 mmHg (T_{300}) in the Anta group. The difference between the Endo and Anta groups reached statistical significance ($P < 0.05$) during the late phase of endotoxic shock.

Arterial pH, arterial PCO_2 , ionogram, and hematocrit remained within the normal range in both groups throughout the experimental period.

DISCUSSION

Our data show that, in a porcine model of endotoxic shock, administration of BM-573 blunts the early phase of pulmonary hypertension, improves arterial oxygenation, and preserves right ventricular efficiency. During the early phase of endotoxic shock, beneficial effects are obtained by a decrease in right ventricular afterload, and in the later phase BM-573 mainly results in an improved arterial oxygenation.

The effects of endotoxin infusion on pulmonary hemodynamics and right ventricular-vascular coupling have been previously studied in our laboratory (2, 19). It has been suggested that the early changes in PAP resulting from endotoxin insult are associated with the release of TXA₂, whereas later changes could be related to injury of the vascular wall and subsequent decrease in NO production (2, 3, 23, 24). Our present study confirms that TXA₂ is indeed responsible for the early vasoconstrictive response of the pulmonary circulation during endotoxin infusion, as evidenced by the prevention of the abrupt increase in R_2 by BM-573 infusion.

Theoretically, blocking the action of TXA₂ can be achieved by two different types of molecules: TXA₂ synthase inhibitors (blocking the production of TXA₂) and TXA₂ receptor antagonists (preventing its action). It was earlier demonstrated in a sheep model that inhibition of TXA₂ synthase still led to an increase in PAP 30 min after endotoxin infusion, although PAP values during the first 2 h of the experiment were significantly

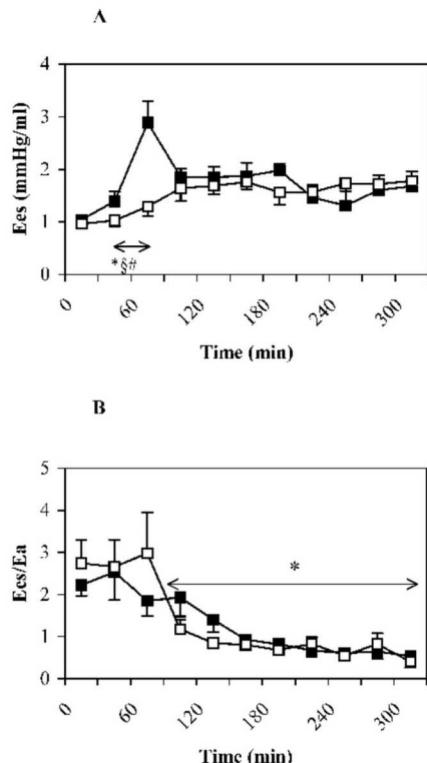


Fig. 5. Time course of end-systolic elastance of the right ventricle (E_{es}) (A) and right ventricular-vascular coupling (E_{es}/E_a) (B) in the Endo (■) and Anta groups (□). Data are presented as mean \pm SEM. P values for time, group, and time-group interaction are given by a two-way ANOVA for repeated measures: * $P < 0.05$ for time effect. § $P < 0.05$ for group effect. # $P < 0.05$ for time-group interaction.

lower than in a control group subjected only to endotoxin insult (6). However, pulmonary vascular resistance showed a similar increase in both groups during the following 3- to 6-h period. Using a TXA₂ receptor antagonist during *Escherichia coli* challenge, Jesmok et al. showed that the acute pulmonary hypertensive phase could indeed be inhibited, although the drug did not affect the development of septic shock and subsequent death (9). Accordingly, TXA₂ receptor antagonists could seem more effective than TXA₂ synthase inhibitors in attenuating the early pulmonary response to endotoxin insult. However, these results were not confirmed by the study of Iglesias et al. (25). These authors compared TXA₂ synthase inhibition and TXA₂ receptor antagonism in a porcine burn-injury sepsis model and did not find a significant difference between the two drugs in preventing the occurrence of pulmonary hypertension (25). Moreover, TXA₂ receptor antagonist is associated with cardiac index decrease and pulmonary vasoconstriction in response to PGI₂ blockade. In fact, using only TXA₂ synthase inhibitors increases plasma PGH₂ to levels high enough to stimulate the TXA₂ receptors, whereas using

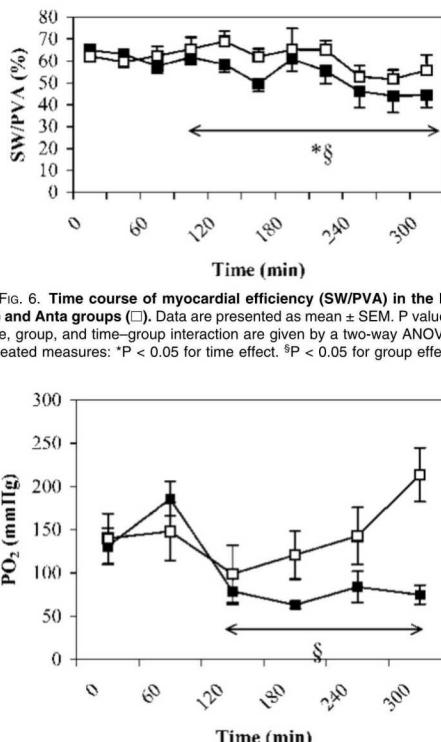


Fig. 6. Time course of myocardial efficiency (SW/PVA) in the Endo (■) and Anta groups (□). Data are presented as mean \pm SEM. P values for time, group, and time-group interaction are given by a two-way ANOVA for repeated measures: * $P < 0.05$ for time effect. § $P < 0.05$ for group effect.

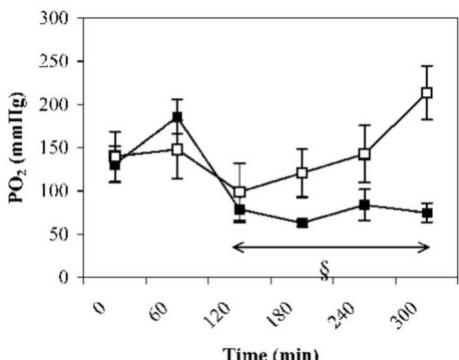


Fig. 7. Time course of PO₂ in the Endo (■) and Anta groups (□). Data are presented as mean \pm SEM. P values for time, group, and time-group interaction are given by a two-way ANOVA for repeated measures: § $P < 0.05$ for group effect.

TXA₂ receptor antagonists reduces PGI₂ blood levels. As such, drugs should aim to combine both TXA₂ synthase inhibition and TXA₂ receptor antagonism.

RV adaptation to an increase in its afterload can be obtained by two different, but complementary, mechanisms: heterometric and homeometric regulation. During heterometric regulation, stroke volume is maintained because of changes in RV preload (i.e., EDV), while contractility, as such, remains unchanged (the Frank-Starling mechanism). In contrast, during homeometric regulation, RV contractility (i.e., E_{es}) increases to maintain stroke volume, while EDV remains unchanged. It has been suggested in previous studies in a sheep model of sepsis that the RV response to acute pressure overload consists of both enhanced contractility and the Frank-Starling mechanism (26). In newborn lambs, however, RV output in the face of increased afterload, is regulated only through homeometric regulation (17, 27). In the present study, RV adaptation during the early phase of endotoxin-induced pulmonary hypertension (T_{60}) was obtained by both homeometric and heterometric regulation. Indeed, both E_{es} and EDV increased, and right ventricular-vascular coupling was maintained at a maximum efficiency. Surprisingly, 1 h later (T_{120}), facing the same

increased afterload (E_a), the right ventricle failed to maintain its contractility to such an elevated level. As a consequence, right ventricular-vascular coupling decreased from values higher than 2 to values below 1. This confirms earlier findings of D'Orio et al. in endotoxic dogs, which found that the deficit in cardiovascular performance is caused by inappropriate matching between ventricular inotropic state and RV afterload, with secondary altered ventricular-vascular coupling (2).

In the animals of the Anta group, E_{es} did not increase at T_{60} and right ventricular-vascular coupling remained intact because the early pulmonary vasopressive response of the pulmonary circulation was offset by BM-573. However, later in the experiment (T_{120}), E_{es} could not increase enough to maintain right ventricular-vascular coupling at an optimal level, similar to what happened in the Endo group. These results suggest that, 1 h after the end of the endotoxin infusion (T_{120}), homeometric regulation is impaired. This impairment is not prevented by TXA₂ inhibitors because the evolution of right ventricular-vascular coupling is similar in both groups. However, although EDV increased progressively in the Endo group, it remained near basal values in the Anta group. Such an increase in RV EDV and decrease in ejection fraction are hemodynamic signs indicating a decrease in RV mechanical efficiency.

When left ventricular afterload is increased, homeometric regulation can partially be explained by an augmentation in coronary perfusion secondary to the increased aortic pressure. However, in our study, because of systemic hypotension, RV homeometric regulation cannot be induced by increased coronary perfusion. It could rather be explained by mechanisms such as mechanical stretch-activated channels, release of endogenous catecholamines, or release of stimulating factors from the endocardial endothelium (27). The precise mechanism by which homeometric regulation appears to be reduced during endotoxin infusion needs further investigation. There is, however, growing evidence that coronary circulation in sepsis is susceptible to maldistribution of regional blood flow (28) and that myocardial blood flow could be unable to augment in response to higher oxygen demands (29). These abnormalities in cardiac performance are largely attributed to TXA₂ formation (28). It is probable that by inhibiting these deleterious effects of TXA₂ on myocardial perfusion, but also by improving arterial oxygenation, the decrease in RV efficiency during endotoxin shock is prevented by BM-573. Nevertheless, because the loss of homeometric regulation was similar in both control (Endo) and treated (Anta) groups, the progressive myocardial depression is not attributable only to the effects of TXA₂.

We estimated ventricular performance by the slope and intercept of the ESPVR, which is obtained by fitting a straight line through the end-systolic PV points. However, these points could show some nonlinearity, and ESPVR is calculated by linear regression. The intercept of ESPVR with the volume axis at zero pressure is thus the result of extrapolating a line far beyond the actual pressure range where the ESPVR could be considered as quasilinear. We therefore used a volume intercept at a fixed pressure, within the pressure range encountered, to quantify the position of ESPVR. Then, the slope of ESPVR,

E_{es} , and its volume position, V_{p25} , represent relatively load-independent indices of ventricular contractility. An increase in E_{es} , a decrease in V_{p25} , or both suggest an improved contractile state (27).

Our results also demonstrated that the use of BM-573 improves arterial oxygenation during endotoxin infusion. In the Endo group, PO₂ decreased throughout the experiment, whereas it increased slightly in the Anta group with a significant difference between the two groups during the late phase of endotoxic shock. These results appear in contradiction with those of Suchner et al., who found that in acute respiratory deficiency syndrome (ARDS), TXA₂ may improve oxygenation by amplifying the efficacy of hypoxic pulmonary vasoconstriction (30). Elevated plasma levels of TXA₂ have been clinically observed in patients with acute lung injury, suggesting that TXA₂ is an important mediator in acute lung injury (31). TXA₂ stimulates platelet activation, promoting the adhesion of platelets to damaged vascular endothelium. Platelet adhesion and degranulation lead to a release of mediators, helping to perpetuate a vicious cycle as granulocyte-endothelial cell adhesion and granulocyte-induced cytotoxicity become enhanced. In turn, activated leukocytes play an important role in acute lung injury through the release of oxygen free-radical species and proteolytic enzymes (32). Our results suggest that inhibition of TXA₂ improves oxygenation by reducing pulmonary vascular inflammatory reactions. Schuster et al. found that inhibition of TXA₂ decreased venous resistance of the pulmonary vascular bed and, hence, pulmonary capillary pressure (33). Imidazole, a TXA₂ inhibitor, has also been suggested to reduce capillary permeability and alveolo-arterial oxygen difference in a model of endotoxic shock in dogs (34). In this way, TXA₂ receptor inhibitors could also diminish the generation of pulmonary edema (33, 35).

In conclusion, BM-573 blunts the early phase of pulmonary hypertension, improves arterial oxygenation, and prevents decrease in RV myocardial efficiency and RV dilatation in a porcine model of endotoxic shock. However, further studies are needed to understand the true mechanism of oxygenation improvement and to test the potential therapeutic benefit of this molecule in septic shock.

REFERENCES

1. Kimchi A, Ellrodt AG, Berman DS, Riedinger MS, Swan HJ, Murata GH: Right ventricular performance in septic shock: a combined radionuclide and hemodynamic study. *J Am Coll Cardiol* 4:945-951, 1984.
2. D'Orio V, Lamberton B, Detry O, Kohl P, Potty P, Gérard P, Marcelle R: Pulmonary impedance and right ventricular-vascular coupling in endotoxic shock. *Cardiovasc Res* 38:375-382, 1998.
3. Noda H, Noshima S, Nakazawa H, Meyer J, Herndon DN, Redl H, Flynn J, Traber LD, Traber DL: Left ventricular dysfunction and acute lung injury induced by continuous administration of endotoxin in sheep. *Shock* 1:291-298, 1994.
4. Darien BJ, Fareed J, Centgraf KS, Hart AP, MacWilliams PS, Clayton MK, Wolf H, Kruse-Elliott KT: Low molecular weight heparin prevents the pulmonary hemodynamic and pathophysiologic effects of endotoxin in a porcine acute lung injury model. *Shock* 9:274-281, 1998.
5. Wise WC, Cook JA, Halushka PV: Implications for thromboxane A₂ in the pathogenesis of endotoxic shock. *Adv Shock Res* 6:83-91, 1981.
6. Redl G, Abdi S, Traber LD, Nichols RJ, Flynn JT, Herndon DN, Traber DL: Inhibition of thromboxane synthesis reduces endotoxin-induced right ventricular failure in sheep. *Crit Care Med* 19:1294-1302, 1991.
7. Mikashima H, Muramoto Y: Protective effect of Y-20811, a long-lasting throm-

- boxane synthetase inhibitor, on endotoxin shock in rabbits. *Thromb Res* 57:499-505, 1990.
- Altavilla D, Canale P, Squadrato F, Sardella A, Ammendolia L, Urna G, Ioculano M, Squadrato G, Caputi AP: Protective effects of BAY U 3405, a thromboxane A₂ receptor antagonist, in endotoxin shock. *Pharmacol Res* 30:137-151, 1994.
 - Jesmok G, Gundel R: Thromboxane-blocked swine as an experimental model of severe intravascular inflammation and septic shock. *Shock* 4:379-383, 1995.
 - FitzGerald GA, Reilly IA, Pedersen AK: The biochemical pharmacology of thromboxane synthase inhibition in man. *Circulation* 72:1194-1201, 1985.
 - Uchida T, Kido H, Yamanka K, Okita M, Watanabe M: A novel loop diuretic, torasemide, inhibits thromboxane A₂-induced contraction in the isolated canine coronary artery. *Prostaglandins Leukotrienes Essent Fatty Acids* 45:121-124, 1992.
 - Rolin S, Dogne JM, Michaux C, Delarge J, Maserel B: Activity of a novel dual thromboxane A₂ receptor antagonist and thromboxane synthase inhibitor (BM-573) on platelet function and isolated smooth muscles. *Prostaglandins Leukotrienes Essent Fatty Acids* 65:67-72, 2001.
 - Fourie PR, Coetzee AR, Bolliger CT: Pulmonary artery compliance: its role in right ventricular-arterial coupling. *Cardiovasc Res* 26:839-844, 1992.
 - Karunamithi MK, Michniewicz J, Copeland SE, Fenley MP: Right ventricular preload recruitable stroke work, end-systolic pressure-volume, and dP/d'_{max}-end-diastolic volume relations compared as indexes of right ventricular contractile performance in conscious dogs. *Circ Res* 70:1169-1179, 1992.
 - Szabo G, Sebening C, Hagl C, Tochtermann U, Vahl CF, Hagl S: Right ventricular function after brain death: response to an increased afterload. *Eur J Cardiothorac Surg* 13:449-458, 1998.
 - Wolfard A, Kaszaki J, Szabo C, Szalay L, Nagy S, Boros M: Prevention of early myocardial depression in hyperdynamic endotoxemia in dogs. *Shock* 13:46-51, 2000.
 - De Vroomen M, Steendijk P, Lopes Cardozo RH, Brouwers HH, Van Bel F, Baan J: Enhanced systolic function of the right ventricle during respiratory distress syndrome in newborn lambs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280:H392-H400, 2001.
 - Dickstein ML, Yano O, Spotnitz HM, Burkhoff D: Assessment of right ventricular contractile state with the conductance catheter technique in the pig. *Cardiovasc Res* 29:820-826, 1995.
 - Lambermont B, Kohl P, Detry O, Gérard P, Marcelle R, D'Orion V: Analysis of endotoxin effects on the intact pulmonary circulation. *Cardiovasc Res* 41:275-281, 1999.
 - Grant BJB, Paradowski LJ: Characterization of pulmonary arterial input impedance with lumped parameters models. *Am J Physiol* 252:H585-H593, 1987.
 - Suga H, Hayashi T, Shirahata M: Ventricular systolic pressure-volume area as predictor of cardiac oxygen consumption. *Am J Physiol* 240:H39-H44, 1981.
 - Burkhoff D, Sagawa K: Ventricular efficiency predicted by an analytical model. *Am J Physiol* 250:R1021-R1027, 1986.
 - Myers PR, Wright TF, Tanner MA, Adams HR: EDRF and nitric oxide production in cultured endothelial cells: direct inhibition by E.Coli endotoxin. *Am J Physiol* 262:H710-H718, 1992.
 - Lambermont B, D'Orion V, Kohl P, Gerard P, Marcelle R: Effects of inhaled nitric oxide on pulmonary hemodynamics in a porcine model of endotoxin shock. *Crit Care Med* 27:1953-1957, 1999.
 - Iglesias G, Zeigler ST, Lenz CW, Traber DL, Herndon DN: Thromboxane synthetase inhibition and thromboxane receptor blockade preserve pulmonary and circulatory function in a porcine burn sepsis model. *J Am Coll Surg* 179:187-192, 1994.
 - Hon JK, Steendijk P, Khan H, Wong K, Yacoub M: Acute effects of pulmonary artery banding in sheep on right ventricle pressure-volume relations: relevance to the arterial switch operation. *Acta Physiol Scand* 172:97-106, 2001.
 - De Vroomen M, Cardozo RH, Steendijk P, Van Bel F, Baan J: Improved contractile performance of right ventricle in response to increased RV afterload in newborn lamb. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278:H100-H105, 2000.
 - Sibelius U, Grandel U, Buerke M, Mueller D, Kiss L, Kraemer HJ, Braund-Dulacius R, Haberboch W, Seeger W, Grimminger F: Staphylococcal alpha-toxin provokes coronary vasoconstriction and loss in myocardial contractility in perfused rat hearts: role of thromboxane generation. *Circulation* 101:78-85, 2000.
 - Bloos FM, Morisaki HM, Neal AM, Martin CM, Ellis CG, Sibbald WI, Pitt ML: Sepsis depresses the metabolic oxygen reserve of the coronary circulation in mature sheep. *Am J Respir Crit Care Med* 153:1577-1584, 1996.
 - Suchner U, Katz DP, Furst P, Beck K, Felbinger TW, Senftleben U, Thiel M, Goetz AE, Peter K: Effects of intravenous fat emulsions on lung function in patients with acute respiratory distress syndrome or sepsis. *Crit Care Med* 29:1569-1574, 2001.
 - Deby-Dupont G, Braun M, Lamy M, Deby C, Pincemail J, Faymonville ME, Damas P, Bodson L, Lecart MP, Goutier R: Thromboxane and prostacyclin release in adult respiratory distress syndrome. *Intens Care Med* 13:167-174, 1987.
 - Suchner U, Katz P, Furst P, Beck K, Felbinger W, Thiel M, Senftleben U, Goetz E, Peter K: Impact of sepsis, lung injury, and the role of lipid infusion on circulating prostacyclin and thromboxane A₂. *Intens Care Med* 28:122-129, 2002.
 - Schuster DP, Kozlowski JK, Brimioule S: Effects of thromboxane receptor blockade on pulmonary capillary hypertension in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 163:A820, 2001.
 - VanWylen SJ, Browning DP, Villalba M: The effect of imidazole in endotoxin shock in dogs. *Am Surg* 52:413-417, 1986.
 - Brimioule S, Julien V, Guer R, Kozlowski JK, Naeije R, Schuster DP: Importance of hypoxic vasoconstriction in maintaining oxygenation during acute lung injury. *Crit Care Med* 30:874-880, 2002.



Annexe 11

**New developments on thromboxane and
prostacyclin modulators part I: thromboxane
modulators.**

**Dogne JM, de Leval X, Hanson J, Frederich M, Lambermont
B, Ghysen A, Casini A, Masereel B, Ruan KH, Pirotte B,
Kohl P.**

Current Medicinal Chemistry 2004 May;11(10):1223-41

New Developments on Thromboxane and Prostacyclin Modulators

Part I: Thromboxane Modulators

Jean-Michel Dogné^{1*}, Xavier de Leval¹, Julien Hanson¹, Michel Frederich¹, Bernard Lamberton², Alexandre Ghysen², Angela Casini³, Bernard Masereel⁴, Ke-He Ruan⁵, Bernard Pirotte¹ and Philippe Kolh²

¹*Natural and Synthetic Drug Research Center, Medicinal Chemistry, University of Liège, 1, av. de l'Hôpital, B-4000 Liège, Belgium*

²*Hemodynamic Research Center, University of Liège, 1, av. de l'Hôpital, B-4000 Liège, Belgium*

³*Università degli Studi di Firenze, Dipartimento di Chimica, Laboratorio di Chimica Bioinorganica, Via della Lastruccia, 3, Rm. 188, I-50019 Sesto Fiorentino (Florence), Italy*

⁴*Department of Pharmacy, University of Namur, 61, rue de Bruxelles, B-5000 Namur, Belgium*

⁵*The Vascular Biology Research Centre and Division of Hematology, Department of Internal Medicine, The University of Texas Health Science Center, Houston, TX 77030, USA*

Abstract: The pathogenesis of numerous cardiovascular, pulmonary, inflammatory, and thromboembolic diseases can be related to arachidonic acid (AA) metabolites. One of these bioactive metabolites of particular importance is thromboxane A₂ (TXA₂). It is produced by the action of thromboxane synthase on the prostaglandin endoperoxide H₂ (PGH₂), which results from the enzymatic degradation of AA by the cyclooxygenases. TXA₂ is a potent inducer of platelet aggregation, vasoconstriction and bronchoconstriction. It is involved in a series of major pathophysiological states such as asthma, myocardial ischemia, pulmonary hypertension, and thromboembolic disorders. Therefore, TXA₂ receptor antagonists, thromboxane synthase inhibitors and drugs combining both properties have been developed by several pharmaceutical companies since the early 1980s. Several compounds have been launched on the market and others are under clinical evaluation. Moreover, the recent literature reported the interest of thromboxane modulators, which combine another pharmacological activity such as, platelet activating factor antagonism, angiotensin II antagonism, or 5-lipoxygenase inhibition. In this review, we will propose a description of the recently described thromboxane modulators of major interest from both a pharmacological and a chemical point of view.

Keywords: Thromboxane A₂, Arachidonic acid, Thromboxane synthase, Prostanoids, Thromboxane receptor antagonist, Thromboxane synthase inhibitor.

INTRODUCTION

Arachidonic acid (AA) (**1**) metabolites play a fundamental role in a large number of physiological processes that take place in many cells, tissues, and organs by exerting important and opposing actions. In particular, thromboxane A₂ (TXA₂) (**5**) is a potent inducer of platelet aggregation, vasoconstriction and bronchoconstriction [1-4]. Furthermore, recent studies have pointed out a significant stimulatory role of TXA₂ in the proliferation of vascular smooth muscle cells and mitogenesis [5-8]. From a biosynthetic point of view, TXA₂ is formed by the action of thromboxane synthase on the prostaglandin endoperoxide H₂ (PGH₂) (**3**) [9, 10] mainly in activated platelets [11] and macrophages [12] where this enzyme is highly expressed (Fig. 1 & Fig. 2) [13]. In platelets, PGH₂ is the result of the

enzymatic action of the constitutive form of the cyclooxygenase (COX-1) on AA released from the cell membrane phospholipids by phospholipase A₂. In endothelial cells, prostacyclin synthase can convert PGH₂ into prostacyclin or prostaglandin I₂ (PGI₂) (**4**) (Fig. 2). Blood cells and vessel blood cells cooperate in the biosynthesis of these eicosanoids. Indeed, prostaglandin endoperoxide G₂ (PGG₂) (**2**) and PGH₂ can be transferred from platelets to endothelial cells where they are converted into prostacyclin. A new synthetic pathway of TXA₂ and PGI₂ via the inducible form of the cyclooxygenase (COX-2) has also been reported [13, 14-16]. Moreover, it seems that platelet-derived TXA₂ can act in a paracrine manner to up-regulate endothelial COX-2 expression and PGI₂ synthesis [17, 18]. Because of its unstable epoxy bond, TXA₂ rapidly breaks down non-enzymatically (half-life of 30 seconds at 37°C) to its more stable but biologically inactive blood metabolite thromboxane B₂ (TXB₂) [**1**]. The major urinary metabolite of circulating TXB₂ was identified as 2,3-dinor-TXB₂ [19]. The release of both metabolites is commonly measured (by enzyme immunoassay) in a large number of

*Address correspondence to this author at the Natural and Synthetic Drug Research Centre, Medicinal Chemistry, University of Liège, 1, av. de l'Hôpital, B-4000 Liège, Belgium; Tel: 32-4-3664382; Fax: 32-4-3664362; E-mail: Jean-Michel.Dogne@ulg.ac.be

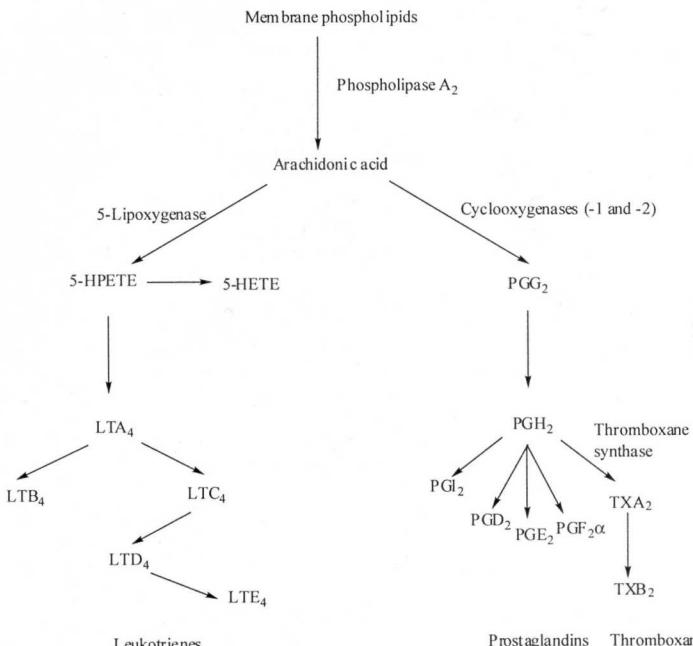


Fig. (1). Two major ways of metabolism of arachidonic acid: 5-lipoxygenase pathway leads to 5-hydroperoxyeicosatetraenoic acid (5-HPETE) and subsequent leukotrienes (A₄, B₄, C₄, D₄, E₄), whereas cyclooxygenase pathway leads to cyclic endoperoxides (PGG₂ and PGH₂) and the subsequent metabolic products: prostaglandins (D₂, E₂, F₂ α), prostacyclin (PGI₂) and thromboxane A₂ (TXA₂) and its main blood metabolite, thromboxane B₂ (TXB₂).

pharmacological studies performed with thromboxane modulators. Moreover, an overproduction of TXA₂ has also been revealed by an increase of these metabolites in patients with various disease states whereby this eicosanoid is assumed to contribute to the underlying pathomechanisms by its potent stimulation of platelet aggregation and smooth muscle contraction [20]. Indeed, it is well recognized that TXA₂ plays an important role in pathophysiological states such as myocardial infarction [21, 22], unstable angina [23], pregnancy-induced hypertension and preeclampsia [24-26], thrombosis and thrombotic disorders [27-29], pulmonary hypertension [30], asthma [31], septic shock [32], atherosclerosis [33-35], lupus nephritis [36, 37] and Raynaud's phenomenon [38]. Therefore, TXA₂ receptor antagonists, thromboxane synthase inhibitors, and drugs combining both properties have been developed by several pharmaceutical companies. Several compounds have been launched on the market and others are under clinical evaluation. This article aims at presenting the recent chemical and pharmacological developments of the latest published and/or patented TXA₂ modulators. This part of the paper is an up-to-date of a past review published in *Current Medicinal Chemistry*, 2000, 7, 609. Moreover, since TXA₂ is not the only mediator implicated in the disease states cited above, original thromboxane modulators, which combine another pharmacological activity such as platelet activating factor antagonism, angiotensin II antagonism, or 5-lipoxygenase inhibition have been recently developed. These drugs will also be presented at the end of this article.

THROMBOXANE SYNTHASE MODULATORS

The Enzyme

Thromboxane synthase uses prostaglandin H₂ to catalyze either an isomerization reaction to form thromboxane A₂ or a fragmentation reaction to form 12-L-hydroxy-5,8,10-heptadecatrienoic acid (HHT) and malondialdehyde (MDA) at a ratio of 1:1:1 (TXA₂:HHT:MDA) [39]. The biological functions of MDA and HHT are unclear. However, MDA can form adducts with lysine residues of proteins or with amine head groups of phospholipids and its adducts have been detected in atherosclerotic lesions of human aorta [40]. It was also shown to participate in the formation of an important endogenous DNA adduct, which may contribute to the etiology of human genetic diseases or cancer [41]. Thromboxane synthase is a member of the cytochrome P450 superfamily and is associated with endoplasmic reticulum [39, 42]. Human thromboxane synthase was assigned as CYP 5A1. Unlike other microsomal P450s that require the ubiquitous P450 reductase to shuttle electrons for the monooxygenation reaction, thromboxane synthase undergoes an isomerization reaction without reductase or molecular oxygen. For the chemically interested reader, Hecker and Ullrich [43, 44] proposed a mechanistic model for both thromboxane and prostacyclin synthases. The gene encoding human thromboxane synthase (TBXAS1) was isolated from a human EMBL3 genomic library using human platelet thromboxane synthase cDNA as a probe. The gene contains

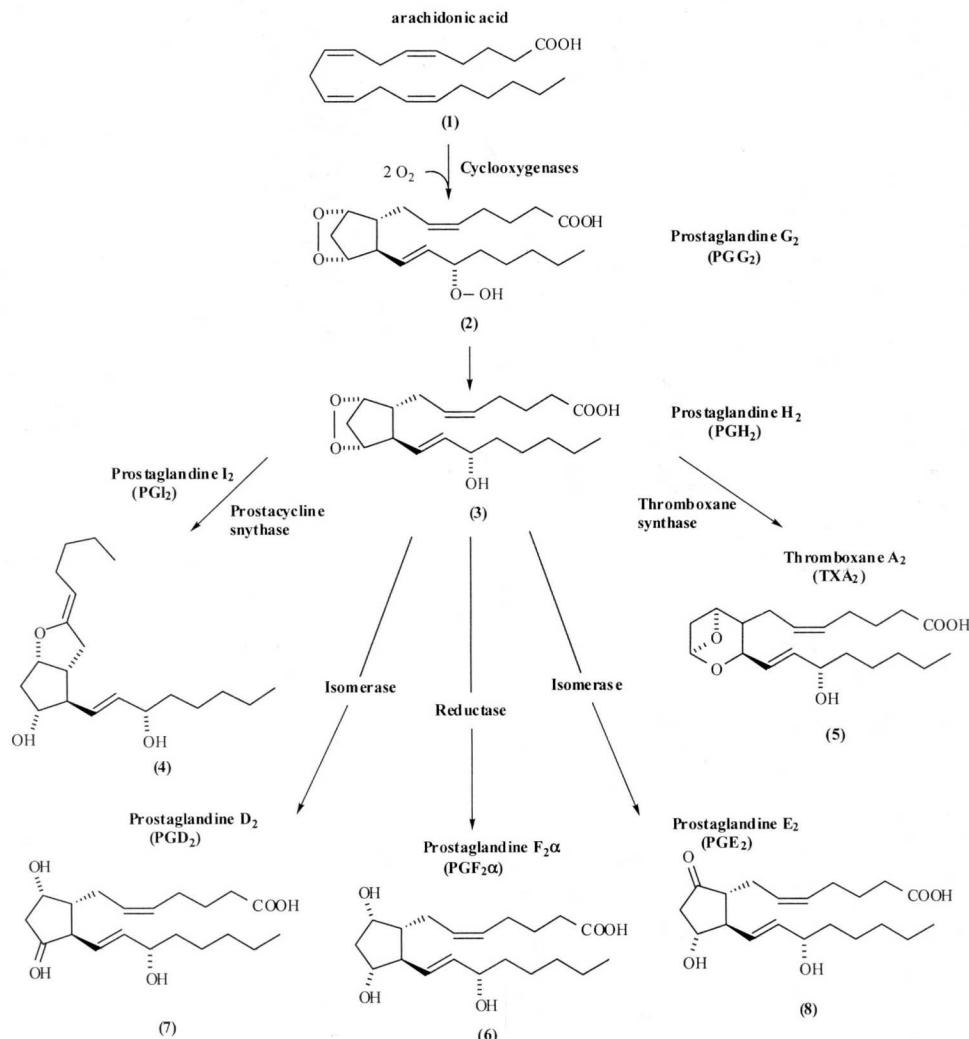


Fig. (2). Cyclooxygenase pathway and chemical structures of arachidonic acid, prostaglandins endoperoxides (PGG₂ and PGH₂), prostaglandins (PGE₂, PGD₂, PGF₂_α), prostacyclin (PGI₂) and thromboxane A₂ (TXA₂).

13 exons and is 193 kb long, the largest P450 gene ever isolated. A tissue-distribution study demonstrated that thromboxane synthase mRNA is widely expressed in human tissues and is particularly abundant in peripheral blood leukocytes, spleen, lung and liver. The low but significant levels of mRNA were observed in kidney, placenta and thymus [45, 46].

THE THROMBOXANE SYNTHASE INHIBITORS (TXSIS)

The selective inhibition of thromboxane synthase prevents the conversion of PGH₂ to TXA₂ [3, 21]. This has

the advantage that other arachidonic acid metabolites can still be produced. This is of particular interest in the prevention of platelet aggregation. Indeed, in the setting of platelet activation, as would occur locally at a vascular injury site, the platelet-produced endoperoxides can be taken by other cells such as smooth muscle cells and endothelial cells. In these cells, PGH₂ can be metabolized by the prostacyclin synthase in PGI₂, which is the most effective inhibitor of platelet aggregation and a potent vasodilator. Therefore, with a thromboxane synthase inhibitor, the antithrombotic effect due to the presence of locally-produced prostacyclin could exceed that expected by blocking the cyclooxygenase as does aspirin. Moreover, the conversion of

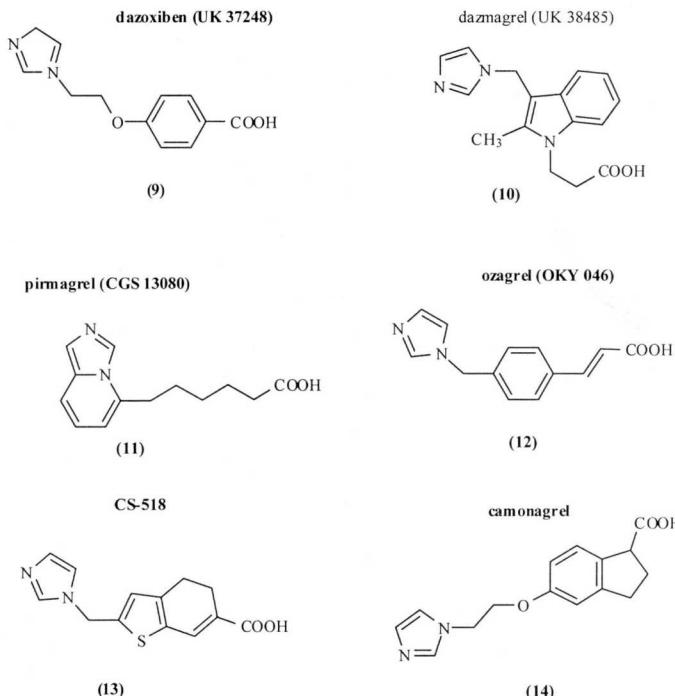


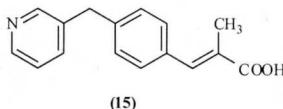
Fig. (3). Chemical structures of TXSIs characterized by an imidazol ring: dazoxiben, dazmagrel, pirmagrel, ozagrel, CS-518, and camonagrel.

PGH₂ to E-type prostaglandins could help to reduce thrombus formation due to their vasodilatory action [47].

On the basis of this hypothesis, a series of TXSIs have been developed. Several compounds such as dazoxiben (UK 37248) (9), dazmagrel (UK 38485) (10), pirmagrel (CGS 13080) (11), ozagrel (OKY 046) (12), CS-518 (13), OKY 1581 (15), isbogrel (CV 4151) (16), and furegrelate (U63557A) (17) have undergone clinical testing. Others, such as camonagrel (14), are still under preclinical development (Fig. 3 & Fig. 4). Unfortunately, these compounds were found less active than expected or sometimes ineffective, although reducing the biosynthesis of TXA₂. Indeed, they failed to produce consistent effects in clinical conditions where an overproduction of TXA₂ has been detected [20]. The disappointing clinical results with this class of drugs can be explained by an incomplete blockage of thromboxane synthase with the dosage used and mainly by the fact that TXSIs provoke an accumulation of the TXA₂ precursor, PGH₂, which is chemically more stable and exerts similar biological effects by acting at common receptors [48-53]. As a consequence, few pharmaceutical companies have continued the clinical development of TXSIs as single drugs (only one patent has been deposited since January 1998, describing the synthesis and the use of a novel TXSI). It is nonetheless important to note that ozagrel hydrochloride was the first thromboxane modulator released onto the market (in Japan, 1992) for the treatment of adult bronchial asthma. It was described as a selective

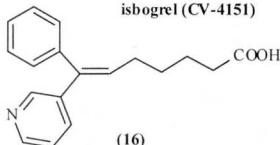
thromboxane synthase inhibitor in different pharmacological models [54]. It was also suggested that ozagrel inhibited leukotriene-, platelet-activating factor-, endothelin- and antigen-induced bronchoconstriction in guinea pigs [55-59] and prevented the induction of airway hyperresponsiveness provoked by various stimuli in several animal species [60-62]. In humans, the oral and inhaled administration of ozagrel hydrochloride reduced bronchial hyperresponsiveness to acetylcholine and leukotriene D₄ (LTD₄) in asthmatic subjects [63, 64]. Clinical efficacy of ozagrel hydrochloride in bronchial asthma was reported by two different multicenter double-blind clinical studies. In the first study, 4 weeks of administration of ozagrel hydrochloride showed significant effect on clinical symptoms of asthma when compared with placebo. In the second study, 8 weeks of administration of ozagrel hydrochloride showed significantly higher effect in ameliorating the asthma symptoms and reduced the dose of concomitant steroid therapy compared to azelastine hydrochloride [31]. This thromboxane synthase inhibitor has also been evaluated in clinical trials in patients suffering from other pathologies such as preeclampsia [65], cerebral vasospasm associated with subarachnoid hemorrhage [66] or cerebral infarction [67]. Nevertheless, some TXSIs cited above are mainly used as pharmacological tools in a series of recent *in vitro* and *in vivo* studies with the aim of evaluating the influence of TXA₂ in physiologic or pathophysiologic states. Some of the most relevant references are cited in Table 1.

OKY 1581



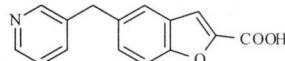
(15)

isbogrel (CV-4151)



(16)

furegrelate (U 63557 A)



(17)

Fig. (4). Chemical structures of TXSIs characterized by a pyridine ring: OKY 1581, isbogrel and furegrelate.

From a chemical point of view, all the TXSIs are characterized by a 1-imidazolyl or a 3-pyridinyl ring. Thereby, two structurally different classes of TXSIs have been described: TXSIs derived from imidazole and TXSIs derived from pyridine [20]. The structural and energetic prerequisites for high binding affinities of TXSIs to thromboxane synthase have been reported by Hecker. These are a basic nitrogen atom of a 3-substituted pyridine or an N-substituted imidazole ring, and a carboxylic acid group separated by a distance of 0.85-1 nm [85]. It was postulated that the nitrogen atom of the heterocycle forms a complex with the iron atom of the heme group of the catalytic site of TXA₂ synthase [86]. In addition, the side chain seemed to be oriented almost parallel to the plane of the heme. If this geometry is changed, a decrease in affinity is observed. From these data, it can be concluded that the inhibitors mimic the binding of PGH₂ with its carboxylic group at the carboxyl side chain and the endoperoxide oxygen atom at C9. The methyl side chain of PGH₂ does not seem to play a role in the formation of the enzyme-substrate complex.

THROMBOXANE RECEPTORS MODULATORS

The Receptors

Thromboxane A₂ receptor, officially called TP receptor [87] or sometimes still named TXA₂/PGH₂ receptor,

belongs to the G protein-coupled receptors superfamily, which is characterized by 7 transmembrane domains [88]. The endogenous ligands for this receptor are TXA₂ and PGH₂. Several synthetic agonists, including (with growing order of affinity) STA2 (18), I-BOP (19), U-46619 (20), are used as pharmacological tools, because of the instability of TXA₂ (Fig. 5) [89]. The human TP is a cell surface receptor, whose stimulation leads to an increase in intracellular free calcium, activation of phospholipase C, generation of inositol-triphosphate (IP₃) and diacylglycerol (DAG), activation of protein kinase C, phosphorylation of a 47 kDa protein, intracellular alkalinization, stimulation of myosin light chain kinase, and exposure of IIb/IIIa binding sites [90]. Thromboxane receptors are classically characterized by signaling via G_q, but as well via G₁₁, G₁₂, G₁₃ and the novel G-protein transglutaminase G₁ [91-94]. It is present in many cell types and tissues, with particular abundance in platelets, endothelial cells, vascular smooth muscle, kidney, brain, spleen, monocytes, thymus, uterus, and placenta [88, 95-101]. Early pharmacological studies in the eighties have shown that some compounds can discriminate between endothelial and platelet receptors, suggesting the existence of at least two different subtypes [102, 103]. Moreover, in platelets, it was demonstrated that some agonists bind to platelet TP with different affinity states: one that induces shape change and the other aggregation [104-106], giving strong evidence that heterogeneity existed among those platelet receptors.

Table 1. Thromboxane Synthase Inhibitors and Some of the Latest Relevant References of Studies Wherein they are Used as Pharmacological Tools

Compound	Number	Heterocycle	Reference(s)
Dazoxiben	(9)	imidazole	[68-70]
Dazmagrel or Dazmegel	(10)	imidazole	[71]
Pirmagrel	(11)	imidazole	[72]
Ozagrel	(12)	imidazole	[73, 74]
CS-518	(13)	imidazole	[75]
Camonagrel	(14)	imidazole	[76]
OKY 1581	(15)	pyridine	[77]
Isbogrel	(16)	pyridine	[78]
Furegrelate	(17)	pyridine	[79-84]

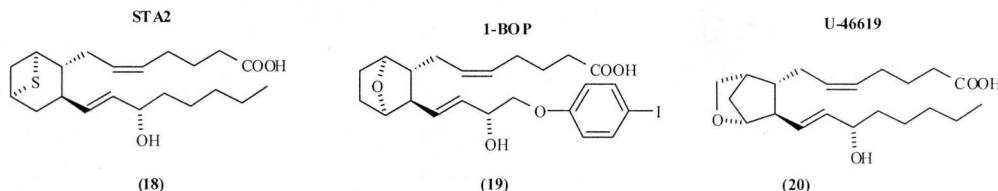


Fig. (5). Chemical structures of TXA₂ receptor ligands STA2, I-BOP, and U-46619.

Since the discovery in 1991 by Hirata *et al.* of a cDNA coding for the human TP [88], active researches were conducted to find a molecular explanation for the apparent heterogeneity of this receptor. It was then shown that one gene was coding for the receptor [107], although two isoforms could be generated by alternative splicing [108]. The first isoform to be cloned, originally found in placenta, was called TP α and the second, first discovered in endothelial cells, TP β . They strictly differ by their cytoplasmic carboxy-terminal tails, the first 328 amino acids being the same for the two receptors with the terminal 15 amino acids of the α isoform replaced by 79 amino acids in the β isoform. Nevertheless, the two isoforms do not seem to be implicated in these apparent subtypes because no pharmacological ligands can discriminate between the two isoforms at this time [109-110]. Although the presence of both mRNA can be confirmed in platelets, specific antibodies could only detect TP α , leading to the suggestion that it may be the predominant isoform in platelets [111]. Walsh *et al.* [112] recently proposed that TP α might be the isoform physiologically relevant to vascular homeostasis,

because only TP α undergoes prostacyclin desensitization. It has also been described that TP β is internalized to a much greater extent than TP α in response to agonist exposure [113]. Indeed, the exact reason for the existence of two isoforms is not completely understood at this time, although these data propose some answers.

Although many compounds with high affinity for the receptor have been synthesized, the knowledge about the configuration of TP receptor and the mechanism of interaction with ligands is still actively studied. Collective results from different studies have implicated transmembrane domains I, III, IV, V, VI, and VII as well as extracellular domains II and III for the binding of ligands [88, 114-120]. In 1993, Yamamoto *et al.* [115] proposed a model of the receptor where the ligand-binding pocket of the TXA₂ receptor includes a serine residue from segment V, an arginine residue from segment VII, and a large hydrophobic pocket between these two residues. More recently, Turek *et al.* [121], using SQBAzide (a newly synthesized biotinylated photoaffinity probe [122]) determined that

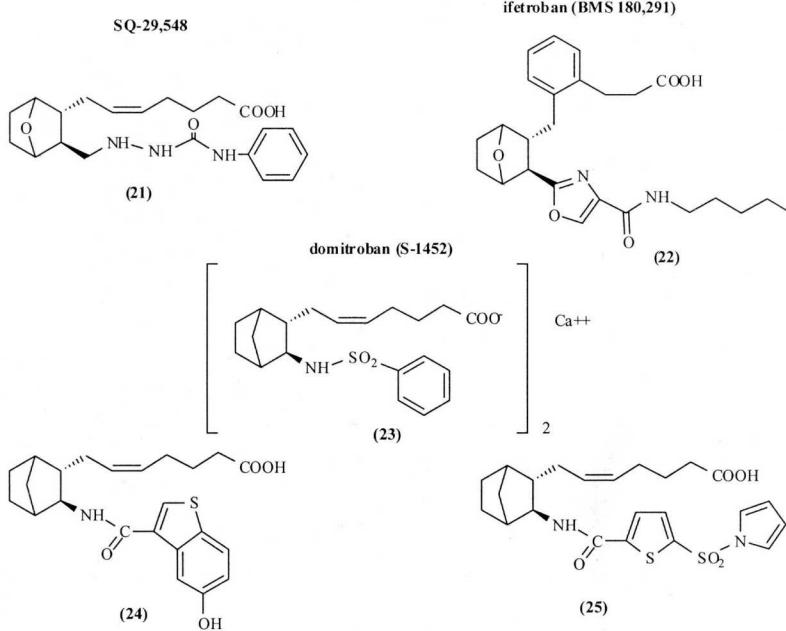


Fig. (6). Chemical structures of prostanoid TXRAs SQ-29548, ifetroban, domitroban, (24), and (25).

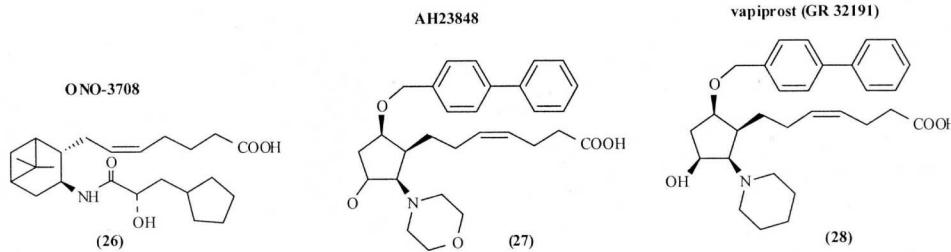


Fig. (7). Chemical structures of prostanoid TXRAs ONO-3708, AH23848, and vapiprost.

extracellular domain III is critical for ligand binding. A quantitative structure-activity relationships (QSAR) study has also been conducted concerning the binding site and provided structural requirement and restrictions for TP receptor antagonist of the 7-oxabicyclo[2.2.1]heptane oxazole structural type [123].

Thus, regarding all these informations, it can be stated that that a lot of work still has to be done to elucidate the exact role of the two receptor isoforms, to explain the results about the apparent pharmacological subtypes and to determine the exact configuration of the active binding site of the receptor.

THE THROMBOXANE RECEPTORS MODULATORS

Thromboxane receptor antagonists (TXRAs) block the action of TXA₂ and PGH₂ at a receptor level. Consequently, in contrast to TXSIs, TXRAs do not affect the synthesis of prostacyclin and other prostaglandins. The development of this class of thromboxane modulators continues to be an active area of research. Thus, TXRAs are becoming an established method for treating asthma and various cardiovascular diseases in the clinic. Indeed, since the development of sulotroban (29) in 1980 [124-128], a large variety of prostanoid and non-prostanoid TXA₂ receptor

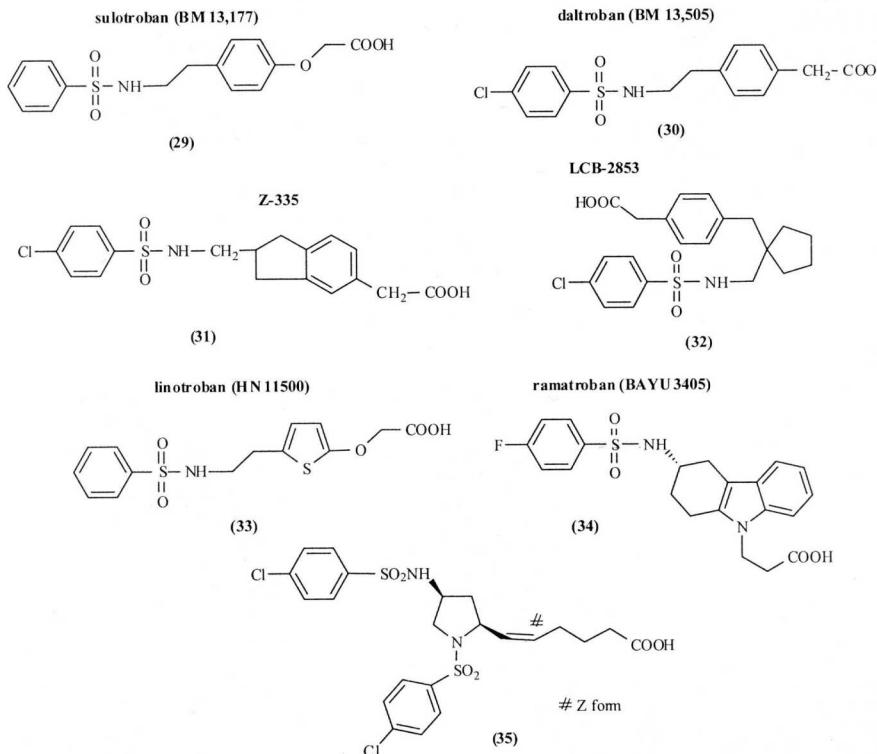


Fig. (8). Chemical structures of non-prostanoid TXRAs sulotroban, daltroban, Z-335, LCB-2853, linotroban, ramatroban, and [35].

antagonists have been patented. Some of these compounds are still being clinically evaluated and, one of them, seratrodast (36), a TXRA developed by Takeda Company® has been approved in Japan for the treatment of asthma (Bronica® 80 mg/day per os).

From a chemical point of view, TXRAs can be classified in two groups: the prostanoid TXRAs structurally related to the bicyclic physiological TP receptors ligands: PGH₂ and TXA₂ (Fig. 6 & Fig. 7) and the non-prostanoid TXRAs of which the majority is characterized by a phenylsulfonamido moiety (Fig. 8) [20].

Prostanoid Thromboxane A₂ Receptor Antagonists

All these compounds bear a carboxylic and a lipophilic side. The carboxylic and the ω -side chains of the PGH₂ ligands are fixed on a 5-atom ring (cyclopentyl or tetrahydrofuran) in contrast to the TXA₂ related compounds characterized by a 3,3-dimethyltetrahydropyren.

SQ-29548 (21), ifetroban (22), and domitroban (23) are the most studied TXRAs derived from endoperoxide PGH₂. Semicarbazide SQ-29548 is considered as one of the most potent ligand and antagonist of the TXA₂ receptors [20, 129-132]. Thereby, it remains the major TXRA used as pharmacological tool in *in vitro* studies and *in vivo* experiments performed only in animals [133-136]. Indeed, its development as potential clinical candidate has been stopped because of its mutagenic potential revealed in the Ames screen when incubated with a rat liver microsome fraction [137]. Its labelled derivative [5,6-³H]SQ-29548 is frequently used as a tracer in TXA₂ receptors binding studies [138, 139].

Another carboxamide derivative, ifetroban (BMS 180,291) (22), a proprietary Bristol-Myers Squibb, is a potent, long-acting, orally active TXA₂/PGH₂ receptor antagonist [140]. It was studied for treating leg ulcers in a prospective, randomized, double blind, placebo-controlled multicenter study in which 165 patients were randomized to ifetroban (n = 83, 250 mg daily) versus placebo (n = 82) for a period of 12 weeks. The results obtained were disappointing since complete ulcer healing was achieved after 12 weeks in 55% of patients receiving ifetroban and in 54% of those taking a placebo, with no significant difference [141, 142]. Nevertheless, other applications have been claimed for this TXRA. Thus, in 1997, Bristol-Myers Squibb patented a method for treatment of dysmenorrhea utilizing ifetroban alone or in conjunction with a non-steroidal anti-inflammatory drug [143].

Since Narisada opened the way to norbornane derivatives bearing a sulfonamide moiety [144], S-1452 (domitroban) (23) emerged as an original highly potent TXRA characterized by a long-lasting antiplatelet activity [145]. Its antagonism profile appeared to be non competitive, and in some isolated preparations, S-1452 produced transient contractions indicative of a TXA₂/PGH₂ partial agonistic activity [146]. Although this compound exhibited anti-thrombotic effects, it has not been investigated for cardiovascular indications. Currently, S-1452 is still being studied as an anti-asthma agent [147-149]. Therefore, domitroban calcium hydrate (S-1452) is under development

as an antiallergic agent for allergic rhinitis. Shinogi & Co® deposited two patents (1999 and 2000) of novel compounds comprising [2.2.1] or [3.1.1] bicycloskeleton. (24) is one of seven compounds specifically claimed in the patent 1999 and (25) represents one among the several hundreds exemplified in the patent 2000. These drugs are characterized by a carboxamide moiety (of the ω -chain) replacing the sulfonamide of S-1452. In both patents, compounds are claimed for the treatment of asthma and nasal blockage. Indeed, (24), (25), and derivatives are described as dual PGD₂ and TXA₂ receptor antagonists [150, 151].

ONO-3708 (26) is a bicyclic TXRA derived from TXA₂. It is characterized by a pinane skeleton and a carboxamide moiety. ONO-3708 is frequently used in a number of pharmacological studies [152-154].

AH23848 (27) and vapiprost (GR32191) (28) are two monocyclic prostanoid TXRAs characterized by a central ring similar to that of the prostaglandin D₂ (PGD₂) (7) and the prostaglandin F_{2 α} (PGF_{2 α}) (6), respectively. AH23848 is a potent, specific thromboxane receptor-blocking drug that is orally active and has a long duration of action [155]. This drug showed pronounced antiplatelet and antithrombotic effects in man in several clinical studies [156, 157]. Nevertheless, oral administration to pregnant rats during days 7-16 of pregnancy, at doses of 0, 10, 45, or 200 mg/kg twice daily, resulted in dose-related maternal, embryonic, and foetal toxicity. The teratogenicity of AH23848 was unrelated to its TXA₂-receptor blocker properties but was related to a chemical breakdown product, 4-biphenylmethanol [158]. Consequently, its development as a potential antithrombotic agent was discontinued. AH23848 was later demonstrated to be a potent receptor antagonist of the prostaglandin E₂ (PGE₂) (8) receptor subtype 4 (EP₄). It is currently useful as pharmacological tool in studies on EP receptors [159-162]. Vapiprost is a close analog of AH23848 developed by the Glaxo group. It is a selective long-lasting TXRA after single and multiple oral administrations in healthy volunteers. In atopic asthmatic patients in whom bronchoconstriction was provoked by inhaled PGD₂, GR 32191 produced a significant improvement in airway resistance following a single 80 mg oral dose [163]. However, the limited number of clinical studies reported to date do not allow to conclude a real therapeutic efficiency. Nevertheless, vapiprost is still being used as a pharmacological tool in a large number of studies [164, 166]. In 1999, Pozen Inc® patented a new method comprising the administration of thromboxane receptor antagonists and/or thromboxane synthase inhibitors in prophylaxis and treatment of migraine headaches. Vapiprost was chosen as TXRA. In one example, a patient received vapiprost 20 mg twice daily. After 3 months, migraine attacks had diminished from four to six per month down to one or two mild headaches per month [167].

Non-Prostanoid Thromboxane A₂ Receptor Antagonists of the Phenylsulfonamide Type

Sulotroban (29) is the prototype of the "phenylsulfonamide" derivatives. Indeed, it was the first TXRA studied in clinical trials [124-128]. Its development was discontinued because of its moderate effects in several

clinical situations such as angina. This lack of activity could be explained by an agonist activity revealed on vascular smooth muscle preparation [168, 169]. Moreover, sulotroban is a weak TXRA [139]. Consequently, a series of sulotroban derivatives have been developed with the aim of improving the antagonistic activity on TP receptors (Fig. 8). Thus, daltroban (BM 13,505) (30), Z-335 (31), LCB-2853 (32), linotroban (HN-11500) (33), and ramatroban (BAY U 3405) (34) emerged as the most promising compounds of this class. From a chemical point of view, these compounds are characterized by a carboxylic acid, a phenylsulfonamide, and a "spacer" of these functional groups. The presence of a halogen atom on the benzene ring in the *para*-position of the sulfonamide moiety also characterized the majority of these compounds [20]. The structure of daltroban (30), which has a phenylethyl group as a spacer, is the simplest of these molecules. It has been shown to be ten times more potent than sulotroban in *in vitro* experiments and in healthy volunteers. Nevertheless, as observed for sulotroban, evidence for partial agonist properties at TP-receptors on vascular smooth muscle have also been reported [170]. Both sulotroban and daltroban are currently used as pharmacological tool [164, 171, 172].

In 1999, Shinozaki and collaborators proposed the introduction of an indane ring as part of the structural rigid spacer in place of the phenylethyl group of daltroban. This modification led to Z-335 (31), which was found to be a potent TXRA in oral administration [173]. It was studied as an antiplatelet and antithrombotic agent in rat and proved to be more active than cilostazol, a selective phosphodiesterase type III inhibitor [174, 175]. The pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of Z-335 after single and multiple oral administrations to healthy volunteers were also reported. Z-335 was concluded to be safe and to provide long-lasting blockade of TP receptors on the basis of a once-daily regimen [176]. It is currently under clinical evaluation for its antithrombotic properties.

LCB-2853 (32) is another TXRA derived from daltroban and is under clinical evaluation for its antithrombotic properties. It is characterized by a cyclopentane ring as a spacer between the 4-chlorophenylsulfonamide group and the carboxylic acid. It was demonstrated to be a potent TXRA in *in vitro*, *ex vivo*, and *in vivo* experiments [177, 178].

Linotroban (33), developed by Nycomed company, is characterized by a thiophen ring as spacer in place of the benzene ring of sulotroban. It was early characterized as a potent antithrombotic agent [179]. Thus, its antiplatelet and anticoagulant effect has been studied in a placebo-controlled double-blind phase I study performed in sixteen healthy male volunteers who received different single oral doses (1, 10, 100, 200, and 400 mg). All doses of linotroban were well tolerated and this drug confirmed to be a potent TXRA with a strong antiplatelet profile.

Ramatroban (Bay-U-3405) (34) combines in its structure a 1,2,3,4-tetrahydrocarbazole ring as spacer and a 4-fluorophenylsulfonamide group. It is a TXA₂/PGD₂ antagonist that has been launched in Japan for rhinitis in mid-2000 by Bayer Yakuhin (Baynas®, tablets of 75 and 150 mg). Indeed, clinical trials demonstrated that ramatroban decreased sneezing, rhinorrhea, and rhinostenosis in patients. No serious adverse reaction of ramatroban was observed in

patients throughout the trials. The treatment with ramatroban was safe and improved nasal symptoms [180]. Other indications known to have been investigated for this product include thrombosis [181-183] and mainly asthma. Thus, ramatroban is active on a wide range of airway smooth muscles, including human [184-187]. It is highly effective in attenuating antigen-, leukotriene C₄ (LTC₄)- and leukotriene D₄-induced bronchoconstriction in guinea pigs [188-189], and PGD₂-, exercise-, bradykinin-, and histamine-induced bronchoconstriction in man [190, 191]. Moreover, Aizawa demonstrated that ramatroban (75 mg/day, orally) reduced bronchial hyperresponsiveness to methacholine in asthmatics [192]. Thereby, ramatroban is currently under phase III clinical evaluation as anti-asthmatic agent. It has also been patented for the treatment of allergy, atopic dermatitis and allergic dermatitis. Indeed, the effects of ramatroban on oedema formation in mice have been measured and compared to a control substance. In this study, ramatroban showed 41% suppression of oedema formation when given to animals at a dose of 10 mg/kg [193]. Moreover, ramatroban is one of eighteen compounds specifically claimed for use in the prevention and/or treatment of central neurological and neurodegenerative diseases. Indeed, in a 2000 patent, this compound (and others) are stated to inhibit neuronal degradation and beta-amyloid-induced neuronal injury and, therefore, to be use in the treatment of Alzheimer's disease [194].

The phenylsulfonamide class continues to be an active template for the design of original TXRAs. Thus, between 1997 and 2001, six patents concerning novel TXRAs of this class have been deposited and some compounds are described in preclinical studies. A review of these molecules is described in a recent paper [196].

In a recent study, Marusawa and co-authors described the synthesis and the pharmacological evaluation of a new chemical skeleton with a non-prostanoid structure and focused on the conformational similarities of TXA₂ and daltroban. In an accurate 3-D molecular model, the authors suggested that the sulfonamide moiety of daltroban might tentatively play a role as mimics of both the nuclear oxygen atoms and the allylic alcohol of TXA₂. On the basis of this prediction, they designed a new scaffold with two sulfonamide groups in the same molecules assuming that these two moieties might mimic both the nuclear oxygen atoms and the allylic alcohol of TXA₂. This original approach led to a series of 1-phenylsulfonyl-4-phenylsulfonylaminopyrrolidines as potent TXRA, of which compound (35) emerged as the most effective as an antiplatelet and antithrombotic agent [196].

Miscellaneous Compounds

Seratrodast (AA-2414) (36) (Fig. 9) is a orally active quinone derivative characterized by a potent thromboxane A₂ receptors antagonism [197-200]. Indeed, the lack of any carboxylic acid terminal group makes it original. Its crystal structure has been determined and served as starting point to docking studies with the modeled human TXA₂ receptor [201]. It is the first TXRA that is being developed as an anti-asthmatic drug. Indeed, it has also received marketing approval in Japan (1997) and is currently under phase III

clinical trials in the United States. Seratrodast was shown to inhibit bronchoconstriction induced by the TXA₂ agonist U-46619 in guinea pigs [197]. Seratrodast was also reported to inhibit both immediate and late asthmatic responses in guinea pig [200, 201], and to reduce airway hyperresponsiveness to various stimuli in dogs [200, 203, 204]. In human clinical studies, seratrodast showed a marked effect to improve clinical parameters in bronchial asthma. Moreover, the oral administration of this TXRA reduced bronchial hyperresponsiveness to methacholine in asthmatic subjects. It is also reported that seratrodast is free from harmful after-effects [200]. From a clinical point of view, four relevant clinical studies have been described with seratrodast after 1999. First, Hoshino and collaborators [205] tested the hypothesis that beneficial effects of seratrodast in asthma resulted from reduction in the number of inflammatory cells infiltrating the airway associated, through a mechanism of chemokine release inhibition. They studied bronchial biopsy specimens from 31 asthmatic subjects before and after oral treatment with seratrodast (80 mg/day) or placebo administrated during 4 months in a double-blind manner. Each subject recorded symptom score and peak expiratory flow (PEF). Lung function and bronchial responsiveness to methacholine were measured before and after treatment. As results, after treatment, significant improvements in symptoms score, PEF, diurnal variation of PEF and bronchial responsiveness were observed in the seratrodast group compared with the placebo group. Interestingly, these improvements were accompanied by a significant reduction in the number of activated eosinophils in bronchial mucosa. This finding suggests that seratrodast may affect asthma by modulating activated eosinophil infiltration into airways and release of proinflammatory chemokines.

seratrodast (AA-2414)

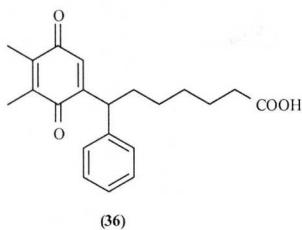


Fig. (9). Chemical structure of seratrodast, a non-prostanoid TXRA.

The clinical trial realized by Tamaoki and his team aimed at determining the effects of seratrodast on asthma control and secretion [206]. The study was performed as a multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. After an initial 2-week run-in (baseline) period, patients were divided into two groups and given either seratrodast (40 mg/day) or placebo orally during a 6-week period. During the treatment period, the changes in PEF were not different between the two patient groups, but there were significant reductions in diurnal variation of PEF (suggesting an improvement in airway responsiveness), frequency of daytime asthma symptoms, and daytime supplemental use of β_2 -agonist in the seratrodast group.

Moreover, seratrodast treatment decreased the amount of sputum (with alterations in its physicochemical properties) and caused an improvement in nasal mucociliary clearance. This finding confirms that blockage of TXA₂ receptors seems effective for asthma control and that addition of seratrodast to a conventional anti-asthmatic medication may be considered in the management of patients with mild to moderate asthma having increased airway secretion. In the third study, Horiguchi *et al.* evaluated the effects of seratrodast when administered for 8 weeks to 14 patients with chronic pulmonary emphysema in the stable phase [208]. The results revealed a significant improvement of respiratory distress suggesting that seratrodast could be useful in patients with chronic pulmonary emphysema in the stable phase. Finally, a novel method of treating chronic obstructive pulmonary disease (COPD) by the administration of seratrodast has been recently patented by Tap Holdings®. Data are presented from a 14-week double-blind, placebo-controlled study in 498 COPD patients who received 80, 160 or 240 mg/day of seratrodast. The highest dose produced a significant improvement of 60 ml in the lung function parameters and it was the only dose to significantly enhance expectoration. There was no significant effect on other symptoms but all doses produced some improvement in quality of life [208].

COMBINED THROMBOXANE MODULATORS AND OTHER PHARMACOLOGICAL PROPERTIES

Combined Thromboxane Synthase Inhibitors and Thromboxane Receptor Antagonists

As reported above in this paper, both thromboxane receptor antagonists and thromboxane synthase inhibitors present interesting pharmacological characteristics. Thus, TXSIs can result in an increase of the synthesis of the antiaggregatory and vasodilatory prostacyclin and TXRAs can block the action of both TXA₂ and PGH₂ at a receptor level. Thereby, a solution to optimize the therapeutic benefit of both types of agents used alone is to combine their properties in the same molecule. Indeed, to support this concept, a series of double-blind, placebo-controlled, crossover studies in healthy volunteers were carried out using a co-administration of the TXRA sulotroban and the TXSI dazoxibenz. Results obtained confirmed the greater interest for co-administration of both thromboxane modulators than their independent use [209]. Therefore, a large variety of compounds associating both principles of action have been developed (Fig. 10). Most of these drugs retain the pyridinic ring of the TXSI isobogrel. Thus, ridogrel (37), picotamide (38), and terbogrel (40) have been studied in clinical trials.

Ridogrel (37), a pyridinic derivative, was the first dual inhibitor of thromboxane A₂ to be studied in clinic but it yielded disappointing results. Indeed, in the Ridogrel versus Aspirin Patency Trial (RAPT study), ridogrel did not significantly affect the primary endpoint of infarct-related artery patency at 2 weeks following streptokinase-induced lysis in acute myocardial infarction patients [210, 211]. Evaluation of the pharmacological characteristics of ridogrel would suggest that the receptor affinity of the compound is indeed too weak to adequately qualify as a thromboxane

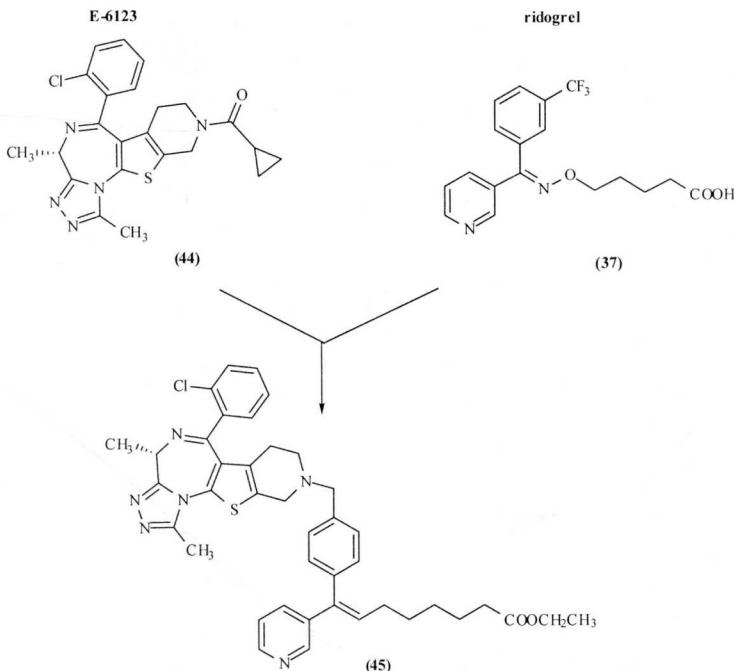


Fig. (11). Chemical structure of E-6123, ridogrel and (45), a combined TXSI and PAF receptor antagonist.

modulator with a dual mode of action [47]. This potent TXSI and weak TXRA is currently under clinical evaluation in the treatment of ulcerative colitis and in inflammatory bowel disease [212, 213].

Picotamide (38) is another combined TXRA and TXSI. It is characterized by two pyridine rings each fixed to a benzene by a carboxamide moiety. It was studied in man for the first time in 1978 [214] and evaluated in a series of clinical conditions in patients suffering from chronic vascular pathology [215], peripheral arterial disease [216], claudication [217, 218], diabetic vasculopathies [219], myeloproliferative disorders [220], deep venous thrombosis [221], cerebral infarction [222], thrombocytosis [223], inflammatory bowel disease [224], primary Raynaud's phenomenon [225], myocardial infarction [226], and carotid atherosclerosis [227]. It is currently marketed as antiplatelet and antithrombotic agent.

Terbogrel (40) is a close derivative of samixogrel (DTTX30) (39). Both were designed and synthesized as combined thromboxane A₂ receptor antagonists and thromboxane A₂ synthase inhibitors. Nevertheless, samixogrel, which reflects structural elements of the synthase inhibitor isbogrel and the receptor antagonist daltroban, showed only moderate plasma levels combined with an unexpected high variability after oral administration in human volunteers presumably due to its very low solubility in aqueous solution under physiological conditions. Thereby, the modification of the phenylsulfonamide of samixogrel led to the cyanoguanidine

terbogrel. This drug showed a better pharmacokinetic profile [47]. It is currently under clinical evaluation as antithrombotic agent. Nevertheless, a recent study performed in patients suffering from primary pulmonary hypertension had to be halted because of the unforeseen side effect of leg pain, which occurred almost exclusively in patients with terbogrel treatment [228, 229].

Finally, a series of non-carboxylic combined TXRAs and TXSIs has been described. They derive from the high ceiling loop diuretic sulfonylurea torasemide (53), which revealed a weak thromboxane receptor antagonistic activity. They are characterized by a nitrobenzenic ring bearing a N-alkylsulfonylurea moiety. These are represented by BM-531 (41), BM-567 (42) and BM-573 (43). Each compound was evaluated in preclinical development and presented a well-balanced effect on thromboxane synthase and TXA₂ receptors [230-234]. BM-573 is currently studied in pigs in prevention of a series of induced pathophysiological conditions, such as coronary thrombosis, septic shock, and pulmonary thromboembolism.

Combined Thromboxane Synthase Inhibitors and Platelet Activating Factor Antagonists

In 2002, Fujita and collaborators published three papers on combined thromboxane modulators and platelet activating factor (PAF) antagonists. PAF is a mediator of inflammation and plays important roles in the pathology of ischemia/thrombosis, septic shock and asthma as does TXA₂

LASSBio341

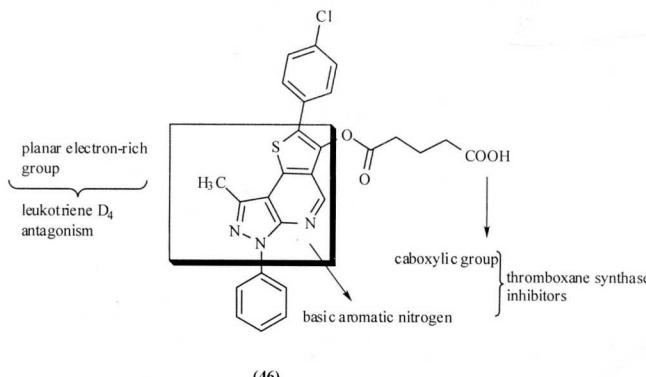


Fig. (12). Chemical structure of LASSBio341, a combined TXSI and leukotriene D₄ receptor antagonist. A planar electron-rich group is a typical feature of LTD₄ receptor antagonists such as montelukast and zafirlukast, while a combination of a basic aromatic nitrogen and a carboxylic group is typical of the TXSIs.

[235]. Therefore, it has been suggested that agents which combined PAF antagonism and thromboxane synthase inhibition would be more beneficial than either agent used alone in the treatment of these disorders. To avoid the complications associated with the administration of two separate drugs, the authors have engaged in a program to synthesize agents that possess both the above pharmacological profiles in the same molecule. Thereby, they synthesized a series of derivatives by linking potent well-known PAF antagonists such as RP-66681, YM-461, and E-6123 (44) to ridogrel (37) (Fig. 11). Several potent dual acting PAF antagonists and thromboxane synthase inhibitors emerged from this chemical hybridization. Among these compounds, (45) showed an excellent *ex vivo* and *in vivo* activity against PAF-induced platelet aggregation and TXB₂ production [236-238].

Combined Thromboxane Synthase Inhibitors and Leukotriene D₄ Receptor Antagonists

Leukotriene D₄ (LTD₄) is an arachidonic acid metabolite derived from the 5-lipoxygenase pathway. It is a potent constrictor of airway smooth muscle and acts on the vasculature to produce vasodilation and increase vascular permeability, processes that are likely relevant to the recruitment of leukocytes to an inflammatory response. These changes promoted by LTD₄ induce mucous secretion and decrease of the airway calibre [239]. Consequently, both TXA₂ and LTD₄ are autacoids derived from arachidonic acid metabolism implicated in the pathogenesis of asthma. Therefore, considerable efforts have been devoted to modulate the actions of these mediators through the design of above described TXA₂ modulators and leukotriene antagonists, such as pranlukast, zafirlukast and montelukast. With the aim of combining both properties, Cardoso *et al.* described the synthesis of new compounds representing a structural hybridization of pharmacologically active moieties

of ozagrel and the quinolinic montelukast (Fig. 12). The glutaric acid derivative LASSBio341 (46) was shown to be active in arachidonic acid-induced platelet aggregation. In this test, this compound showed an inhibition comparable to that of ozagrel. Moreover, LASSBio341 presented a strong inhibition of the contraction of guinea pig trachea strips induced with LTD₄. Finally, (46) was not effective against tracheal contraction induced by U-46619 and did not inhibit significantly U-46619-induced aggregation, suggesting that this drug did not act at the TXA₂ receptor level. Consequently, the combined LTD₄ antagonist and thromboxane synthase inhibitor LASSBio341 presents a useful pharmacological profile for asthma treatment [240].

Combined Thromboxane Receptor Antagonists and Leukotriene D₄ Receptor Antagonists

YM158 (47) (Fig. 13) was discovered by focusing on the synthesis of high-affinity, orally effective dual LTD₄- and

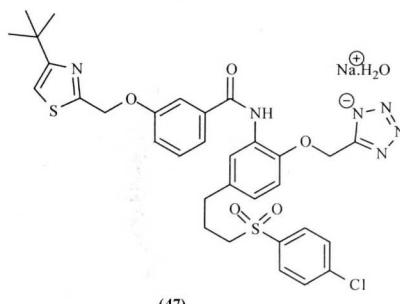


Fig. (13). Chemical structure of YM158, a combined TXRA and leukotriene D₄ receptor antagonist.

TXA₂-receptor antagonists. Indeed, oral YM158 causes dose-dependent inhibition of LTD₄-induced increases in plasma leakage and LTD₄- or U46619-induced increases in airway resistance [241, 242]. Furthermore, YM158 inhibits antigen-induced bronchoconstriction in guinea pigs [243]. Although the potency of pranlukast for LTD₄ receptor antagonism is greater than that of YM158, the doses of both pranlukast and YM158 for significant inhibition of the antigen-evoked airway response are the same, indicating that the TXA₂ receptor antagonism of YM158 plays an important role in its anti-asthmatic effects [244]. In conclusion, TXA₂ modulators used alone or in combination with leukotriene antagonists remain an active area of research for the treatment of asthma.

Combined Thromboxane Synthase Inhibitors and 5-Lipoxygenase Inhibitors

The pharmacological profile of E-3040 (**48**) (Fig. 14) was recently reported by Oketani and co-workers. From a chemical point of view, this drug is characterized by a combination of a benzothiazole ring and a pyridine ring [245]. It could be related to the TXSI furegrelate. E-3040 potently inhibits cell-free 5-lipoxygenase and TXA₂ synthase, but not cyclooxygenase. Indeed, the compound inhibits both LTB₄ and TXB₂ production in a well-balanced manner in rat peritoneal leukocytes, human neutrophils, and platelets. Moreover, E-3040 prevents the damage to the large intestine induced by lipopolysaccharide [246-248]. Thereby, the properties of E-3040 make it a potentially new therapeutic drug for asthma and inflammatory bowel diseases. Finally, in the initial phase of clinical studies, it was shown that E3040 reduced plasma uric acid levels. It was postulated that E3040 may exert its uricosuric action by reducing the presecretory reabsorption of uric acid rather than by increasing its secretion [249].

E3040

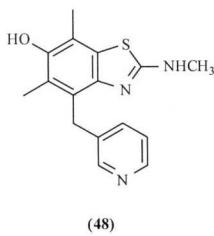


Fig. (14). Chemical structure of E3040, a combined TXSI and 5-lipoxygenase inhibitor.

Combined Thromboxane Receptor Antagonist and Angiotensin II Receptor Antagonist

The renin-angiotensin system (RAS) plays an important role in the control of cardiovascular function and is well recognized as an important contributor to the pathogenesis of hypertension, cardiac hypertrophy, and vascular disease. Angiotensin II is the biologically active peptide of the RAS. Inhibitors of angiotensin II receptors, such as the non-

peptide losartan (**49**) and irbesartan (**50**) (Fig. 15), have become the most common targets in the development of new treatments for hypertension [250]. Recently, many studies indicated an interaction between angiotensin II and TXA₂ in the cardiovascular function. For example, the proliferative effect of angiotensin II on rat aortic smooth muscle cells is enhanced by concomitant treatment with TXA₂ mimetic carboxyclic TXA₂ [251]. Moreover, TXA₂ and PGH₂ are involved in angiotensin II-dependent hypertension by stimulating contraction of vascular smooth muscle [252]. Different studies have shown that losartan and irbesartan, two angiotensin II receptor (subtype 1: AT1) antagonists, were also TP receptors antagonists. Thus, losartan can interact with the TP receptors in human platelets, inhibit the U-46619-induced platelet aggregation [253, 254] and pulmonary hypertension in rats [255], and prevent TXA₂-induced contractions in canine coronary arteries [256]. Irbesartan can also prevent TXA₂-induced vasoconstriction in canine coronary arteries and human platelet aggregation [257]. Consequently, the dual antagonistic actions of losartan and irbesartan, acting at both AT1 and TXA₂ receptors in blood vessels, may overall enhance their therapeutic profile in the treatment of hypertension. For this reason, Hwang *et al.* have developed a series of compounds that are designed to possess both properties. The benzothiadiazine-1,1-dioxide EK112 (**51**) is a representative compound. Indeed, EK112 was found to be an angiotensin II receptor antagonist, as revealed by its competitive antagonism of angiotensin II-induced smooth muscle contraction in rabbit aorta and in guinea pig ileum. Additionally, EK112 is also a TXRA, since it competitively antagonizes aortic contractile responses elicited by U-46619 in rat [258].

Combined Thromboxane Synthase Inhibitors and Aromatase Inhibitors

Aromatase is a microsomal enzyme complex consisting of a cytochrome P450 hemoprotein and a NADPH cytochrome reductase. It catalyses the conversion of androgens into estrogens, a process involving three enzymatic hydroxylations. Recently, highly active inhibitors of aromatase have been developed, some of which turned out to be effective therapeutics for estrogen-dependent breast cancer [259, 260]. There is some homology between aromatase and thromboxane synthase. The region homology is the heme binding region which is closely located to the active site [261]. Since TXA₂ can induce tumor proliferation [262, 263] and that several tumor tissues contain elevated concentration of this eicosanoid [264], inhibition of both thromboxane synthase and aromatase could be a novel strategy for the treatment of mammary tumors and the prophylaxis of metastasis. On the basis of this hypothesis, Jacobs and collaborators have described the synthesis and the pharmacological evaluation of a series of 1-imidazolyl-substituted di- and tetrahydroquinolines. Very important for the inhibition of both enzymes is a heterocyclic nitrogen capable of complexing the heme iron, since it plays a pivotal role in the catalytic enzymatic mechanism. In this paper, the most potent dual inhibitor, (**52**) (Fig. 16), showed a stronger inhibition of both target enzymes than the reference compounds dazoxiben and aminoglutethimide [265].

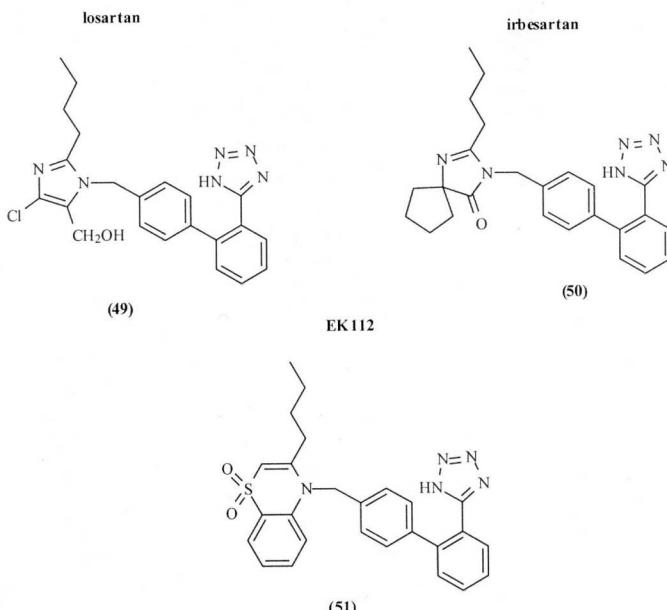
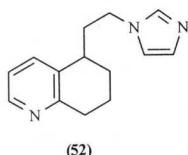


Fig. (15). Chemical structures of losartan, irbesartan and the combined TXRA and angiotensin II receptor antagonist EK112.

46619 [267, 268]. It is currently used as pharmacological tool of TP receptors [269].



(52)

Fig. (16). Chemical structure of (52), a dual TXSI and aromatase inhibitor.

Combined Weak Thromboxane Modulators and Other Pharmacological Properties

Two sulfonylureas derivatives were also characterized by a weak TXA₂ receptor antagonism (Fig. 17). Thus, torasemide (53), a loop diuretic which acts by inhibiting the co-transport Na⁺/K⁺/2Cl⁻, was demonstrated to dose-dependently prevent the canine coronary artery contraction induced by carboxylic TXA₂ [266]. Torasemide was later demonstrated to be a weak TP receptors antagonist. Although this effect does not occur at therapeutic dosage, this observation led to the design of a series of potent dual thromboxane receptors antagonists and thromboxane synthase inhibitors such as BM-531, BM-567 and BM-573 [231-234].

The oral hypoglycaemic glibenclamide (54), a specific blocker of the ATP-sensitive K⁺ channel, is the other sulfonylurea derivative that emerged as original TXRA. Indeed, in isolated ring segments of dog coronary artery, glibenclamide has been shown to cause a reduction of both spontaneous isometric force and contractions induced by U-

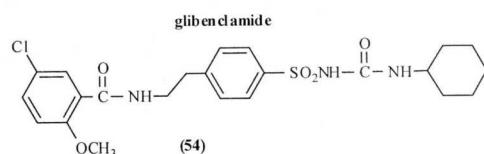
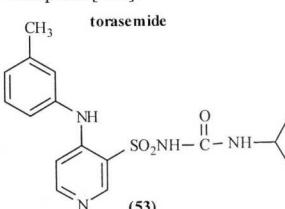


Fig. (17). Chemical structures of torasemide and glibenclamide, two weak TXRAs characterized by a sulfonylurea moiety.

CONCLUSIONS

Thromboxane A₂ is a potent inducer of platelet aggregation and smooth muscle contraction. It is implicated in many pathological processes, most notably in thrombosis, pulmonary hypertension, and asthma. Thromboxane synthase inhibitors suppress TXA₂ formation and increase the synthesis of the antithrombotic and

vasodilator prostacyclin by endothelial cells. However, clinical trials with these agents resulted in disappointing results because of the accumulation of endoperoxide prostaglandin H₂, which also binds to TP-receptors. As a consequence, few pharmaceutical companies continued the clinical development of thromboxane synthase inhibitors as single drugs. This is evidenced by the weak number of TXSIs evaluated in clinical trials and patents filed in recent years with drugs of this class. Nevertheless, ozagrel hydrochloride was the first thromboxane modulator released onto the market (in Japan, 1992) for the treatment of adult bronchial asthma. Moreover, this imidazole derivative is of particular interest in the treatment of pathologies such as cerebral thrombosis, preeclampsia, and dry cough. Finally, TXSIs are currently used as pharmacological tools in a series of recent *in vitro* and *in vivo* studies with the aim of evaluating the influence of TXA₂ in physiologic or pathophysiologic states. In contrast to TXSIs, thromboxane A₂ receptor antagonists do not affect the synthesis of prostacyclin and other prostaglandins, but prevent TXA₂ and PGH₂ from activating platelets and inducing vaso- and bronchoconstriction. TXRAs are currently recognized as an established method for treating asthma and various cardiovascular diseases in the clinic. Non-prostanoid TXRAs characterized by a phenylsulfonamido moiety (derived from sultroban) appear to be of great interest as proved by the number of compounds recently patented and studied in clinical trials. Moreover, Bayer Yakuhin has launched ramatroban in Japan for the treatment of rhinitis in mid-2000. This TXRA is also evaluated in clinical trials for the treatment of asthma. TXRAs of other chemical classes are also of great interest. For example, seratrodast, a quinone derivative, is the only TXRA marketed so far in Japan as anti-asthmatic agent. Moreover, it is currently in clinical evaluation in the United States for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease, asthma, and cardiovascular disorders. Consequently, development of novel TXRAs is still an active area of research. Another approach in thromboxane A₂ pharmacology is a combination of thromboxane synthase inhibition with thromboxane receptor antagonism in one drug, such as picotamide, ridogrel and terbogrel. Indeed, the rationale behind the design of these compounds was to combine the advantages of both classes in a single molecule. Picotamide, which is marketed as antiplatelet and antithrombotic agent, is commonly used successfully in a series of pathophysiologic conditions in humans. Thereby, the development of such compounds continues to be a priority of different pharmaceutical companies.

Since TXA₂ is not the only mediator implicated in the disease states such as thrombosis, asthma and hypertension, original thromboxane modulators, which combine another pharmacological activity, have recently been developed. Thus, thromboxane modulators, which inhibit 5-lipoxygenase (such as E-3040) or antagonize LTD₄ receptors (such as YM158) would be of great interest in the treatment of immunologic and/or inflammatory diseases and asthma. Moreover, the development of combined TXRAs and angiotensin II receptor antagonists such as EK112 and combined TXRAs and PAF antagonists offer new horizons in the treatment of hypertension and thrombosis, respectively. Finally, a novel strategy for the treatment of

mammary tumors has also been proposed with the design of combined TXSIs and aromatase inhibitors. Clinical studies are needed to evaluate the real interest of such compounds as new therapeutic agents.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank « la Communauté Française de Belgique » and the National Fund for Scientific Research for their financial support. Philippe Kolh is a post-doctoral fellow funded by the National Fund for Scientific Research.

ABBREVIATIONS

ADEP	= Atherosclerotic Disease Evolution by Picotamide
AT	= Angiotensin receptor
cAMP	= Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate
COPD	= Chronic obstructive pulmonary disease
DAG	= Diacylglycerol
EP	= Prostaglandin E ₂ receptor
HHT	= 12-L-hydroxy-5,8,10-heptadecatrienoic acid
IP3	= Inositol-1,4,5-triphosphate
IP-receptor	= Prostacyclin receptor
LTC ₄	= Leukotriene C ₄
LTD ₄	= Leukotriene D ₄
MDA	= Malondialdehyde
PAF	= Platelet activating factor
PEF	= Peak expiratory flow
PGD ₂	= Prostaglandin D ₂
PGE ₂	= Prostaglandin E ₂
PGF _{2α}	= Prostaglandin F _{2α}
PGG ₂	= Prostaglandin G ₂
PGH ₂	= Prostaglandin H ₂
PGI ₂	= Prostacyclin, Prostaglandin I ₂
QSAR	= Quantitative structure-activity relationships
RAPT	= Ridogrel versus Aspirin Patency Trial
RAS	= Renin-angiotensin system
T _{1/2}	= Half-life time
TP receptor	= Thromboxane A ₂ and prostaglandin H ₂ receptor
TXA ₂	= Thromboxane A ₂
TXB ₂	= Thromboxane B ₂
TXRAs	= Thromboxane receptor antagonists
TXSIs	= Thromboxane synthase inhibitors

REFERENCES

- [1] Hamberg, M.; Svensson, J.; Samuelsson, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1975, 72, 2994.

- [2] Svensson, J.; Hamberg, M.; Samuelsson, B. *Acta Physiol. Scand.* **1976**, *98*, 285.
- [3] Fiddler, G.L.; Lumley, P. *Circulation*, **1990**, *81*, 169.
- [4] Moncada, S.; Vane, J.R. *Pharmacol. Rev.*, **1978**, *30*, 293.
- [5] Koba, S.; Pakala, R.; Watanabe, T.; Katagiri, T.; Benedict, C.R. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **2000**, *63*, 329.
- [6] Pakala, R.; Benedict, C.R. *J. Lab. Clin. Med.*, **1998**, *131*, 527.
- [7] Grosser, T.; Tzuker, T.P.; Weber, A.A.; Schulte, K.; Sachinidis, A.; Vetter, H.; Schror, K. *Eur. J. Pharmacol.*, **1997**, *319*, 327.
- [8] Dorn, G.W. 2nd. *Agents Actions Suppl.*, **1997**, *48*, 42.
- [9] Needlemen, P.; Moncada, S.; Bunting, S.; Vane, J.R.; Hamberg, M.; Samuelsson, B. *Nature*, **1976**, *261*, 558.
- [10] Needlemen, P.; Minkes, M.; Raz, A. *Science*, **1976**, *193*, 163.
- [11] Ellis, E.F.; Oelz, O.; Roberts, L.J., 2nd; Payne, N.A.; Sweetman, B.J.; Nies, A.S.; Oates, J.A. *Science*, **1976**, *193*, 1135.
- [12] Pawlowski, N.A.; Kaplan, G.; Hamill, A.L.; Cohn, Z.A.; Scott, W.A. *J. Exp. Med.*, **1983**, *158*, 393.
- [13] Ullrich, V.; Zou, M.H.; Bachschmid, M. *Biochim. Biophys. Acta*, **2001**, *1532*, 1.
- [14] Wise, H.; Wong, Y.H.; Jones, R.L. *Neurosignals*, **2002**, *11*, 20.
- [15] Davidge, S.T. *Circ. Res.*, **2001**, *89*, 650.
- [16] Cheng, Y.; Austin, S.C.; Rocca, B.; Koller, B.H.; Coffman, T.M.; Grosser, T.; Lawson, J.A.; FitzGerald, G.A. *Science*, **2002**, *296*, 539.
- [17] Caughey, G.E.; Cleland, L.G.; Gamble, J.R.; James, M.J. *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, 37839.
- [18] Caughey, G.E.; Cleland, L.G.; Penglis, P.S.; Gamble, J.R.; James, M.J. *J. Immunol.*, **2001**, *167*, 2831.
- [19] Roberts, L.J., 2nd; Sweetman, B.J.; Oates, J.A. *J. Biol. Chem.*, **1981**, *256*, 8384.
- [20] Dogné, J.M.; de Leval, X.; Delarge, J.; David, J.L.; Masereel, B. *Curr. Med. Chem.*, **2000**, *7*, 609.
- [21] Fitzgerald, D.J.; Roy, L.; Catella, F.; FitzGerald, G.A. *N. Engl. J. Med.*, **1986**, *315*, 983.
- [22] Eikelboom, J.W.; Hirsh, J.; Weitz, J.I.; Johnston, M.; Yi, Q.; Yusuf, S. *Circulation*, **2002**, *105*, 1650.
- [23] Hamm, C.W.; Lorenz, R.L.; Bleifeld, W.; Kupper, W.; Wober, W.; Weber, P.C. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **1987**, *10*, 998.
- [24] Granger, J.P.; Alexander, B.T.; Bennett, W.A.; Khalil, R.A. *Am. J. Hypertens.*, **2001**, *14*, 178S.
- [25] Friedman, S.A. *J. Obstet. Gynecol.*, **1988**, *71*, 122-37.
- [26] Walsh, S.W. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **1985**, *152*, 335.
- [27] Saldeen, T.G.; Saldeen, P.; Nichols, W.W.; Lawson, D.L.; Nicolini, F.A.; Mehta, J.L. *Am. Heart J.*, **1993**, *125*, 277.
- [28] Saldeen, P.; Nilsson, I.M.; Saldeen, T. *Thromb. Res.*, **1983**, *32*, 461.
- [29] Fitzgerald, D.J.; Wright, F.; FitzGerald, G.A. *Circ. Res.*, **1989**, *65*, 83.
- [30] Jankov, R.P.; Belcastro, R.; Ovcina, E.; Lee, J.; Massaeli, H.; Lye, S.J.; Tanswell, A.K. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **2002**, *166*, 208.
- [31] Dogné, J.M.; de Leval, X.; Benoit, P.; Rolin, S.; Pirotte, B.; Masereel, B. *Expert Opin. Investig. Drugs*, **2002**, *11*, 275.
- [32] Matejovic, M.; Rademacher, P.; Zulke, C.; Vlatten, A.; Altherr, J.; Brinkmann, A.; Bruckner, U.B.; Jauch, K.W.; Georgieff, M.; Trager, K. *Shock*, **2000**, *13*, 307.
- [33] Mehta, J.L.; Lawson, D.; Mehta, P.; Saldeen, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1988**, *85*, 4511.
- [34] Pratico, D.; Cyrus, T.; Li, H.; FitzGerald, G.A. *Blood*, **2000**, *96*, 3823.
- [35] FitzGerald, G.A.; Austin, S.; Egan, K.; Cheng, Y.; Pratico, D. *Ann. Med.*, **2000**, *32 Suppl 1*, 21.
- [36] Kaneko, N.; Masuyama, J.; Nara, H.; Hirata, D.; Iwamoto, M.; Okazaki, H.; Minota, S.; Yoshio, T. *J. Rheumatol.*, **2002**, *29*, 2106.
- [37] Patrono, C.; Ciabattoni, G.; Remuzzi, G.; Gott, E.; Bombardieri, S.; Di Munno, O.; Tartarelli, G.; Cinotti, G.A.; Simonetti, B.M.; Pierucci, A. *J. Clin. Invest.*, **1985**, *76*, 1011.
- [38] Reilly, I.A.; Roy, L.; FitzGerald, G.A. *Br. Med. J.*, **1986**, *292*, 1037-9.
- [39] Haurand, M.; Ullrich, V. *J. Biol. Chem.*, **1985**, *260*, 15059.
- [40] Uchida, K. *Trends Cardiovasc. Med.*, **1999**, *9*, 109.
- [41] Chaudhary, A.K.; Nobuko, M.; Reddy, G.R.; Yeola, S.N.; Morrow, J.D.; Blair, I.A.; Marnett, L.J. *Science*, **1994**, *265*, 1580.
- [42] Ruan, K.H.; Wang, L.H.; Wu, K.K.; Kulmacz, R.J. *J. Biol. Chem.*, **1993**, *268*, 19483.
- [43] Hecker, M.; Ullrich, V. *J. Biol. Chem.*, **1989**, *264*, 141.
- [44] Wang, L.H.; Tsai, A.L.; Hsu, P.Y. *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, 14737.
- [45] Miyata, A.; Yokoyama, C.; Ihara, H.; Bandoh, S.; Takeda, O.; Takahashi, E.; Tanabe, T. *Eur. J. Biochem.*, **1994**, *224*, 273.
- [46] Tazawa, R.; Green, E.D.; Ohashi, K.; Wu, K.K.; Wang, L.H. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1996**, *334*, 349.
- [47] Soysa, R.; Guth, B.D.; Weisenberger, H.M.; Luger, P.; Müller, T.H. *J. Med. Chem.*, **1999**, *42*, 1235.
- [48] Coleman, R.A.; Humphrey, P.P.; Kennedy, I.; Levy, G.P.; Lumley, P. *Br. J. Pharmacol.*, **1981**, *73*, 773.
- [49] Hamberg, M.; Svensson, J.; Wakabayashi, T.; Samuelsson, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1974**, *71*, 345.
- [50] Vermilye, J.; Deckmyn, H. *Cardiovasc Drugs Ther.*, **1992**, *6*, 29.
- [51] Minoguchi, K.; Adachi, M. *Nippon Rinsho*, **2001**, *59*, 1986.
- [52] Patschke, H.; Hornberger, W.; Zehender, H. *Z Kardiol.*, **1990**, *79*, 151.
- [53] Patrono, C. *Circulation*, **1990**, *81*, 12.
- [54] Nakazawa, M.; Iizuka, K.; Ujiie, A. *Yakugaku Zasshi*, **1994**, *114*, 911.
- [55] Ueno, A.; Tanaka, K.; Katori, M. *Prostaglandins*, **1982**, *23*, 865.
- [56] Fujimura, M.; Miyake, Y.; Uotani, K.; Kanamori, K.; Matsuda, T. *Prostaglandins*, **1988**, *35*, 427.
- [57] Nambu, F.; Shiraiji, T.; Motoishi, M.; Sawada, M.; Omawari, N.; Terashima, H.; Okegawa, T.; Kawasaki, A.; Ikeda, S. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res.*, **1989**, *19*, 528.
- [58] Nambu, F.; Yube, N.; Omawari, N.; Sawada, M.; Okegawa, T.; Kawasaki, A.; Ikeda, S. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res.*, **1991**, *21*, 453.
- [59] Sakurai, T.; Yamaguchi, S.; Iwama, T.; Nagai, H. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **1994**, *51*, 95.
- [60] Saito, M.; Fujimura, M.; Sakamoto, S.; Miyake, Y.; Shintani, H.; Yasui, M.; Matsuda, T. *Allergy*, **1992**, *47*, 181.
- [61] Chung, K.F.; Aizawa, H.; Becker, A.B.; Frick, O.; Gold, W.M.; Nadel, J.A. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **1986**, *134*, 258.
- [62] Komatsu, H.; Takehana, Y.; Kikuchi, S.; Kojima, M.; Hamano, S.; Kusama, H.; Okegawa, T.; Ikeda, S. *Eur. J. Pharmacol.*, **1990**, *184*, 87.
- [63] Fujimura, M.; Sakamoto, S.; Matsuda, T. *Chest*, **1990**, *98*, 656.
- [64] Fujimura, M.; Nishioka, S.; Kumabayashi, I.; Matsuda, T.; Mifune, J. *Chest*, **1990**, *98*, 276.
- [65] Seki, H.; Kuromaki, K.; Takeda, S.; Kinoshita, K.; Satoh, K. *Hypertens. Pregnancy*, **1999**, *18*, 157.
- [66] Tokiyoshi, K.; Ohnishi, T.; Nishi, Y. *Surg. Neurol.*, **1991**, *36*, 112.
- [67] Itoh, H.; Yamatani, K.; Ohshima, N.; Shioi, M.; Takaba, M.; Kamiyama, H.; Itoh, M. *No To Shinkai*, **1998**, *50*, 147.
- [68] El Sayah, M.; Calixto, J.B. *Eur. J. Pharmacol.*, **2003**, *458*, 175.
- [69] De La Cruz, J.P.; Villalobos, M.A.; Escalante, R.; Guerrero, A.; Arrebol, M.M.; Sanchez De La Cuesta, F. *Br. J. Pharmacol.*, **2002**, *137*, 1082.
- [70] Pfister, S.L.; Hughes, M.J.; Rosolowsky, M.; Campbell, W.B. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, **2002**, *70*, 39.
- [71] Galipeau, D.; Arikawa, E.; Sekirov, I.; McNeill, J.H. *Hypertension*, **2001**, *38*, 872.
- [72] Ding, Z.Q.; Rowe, J.; Neg, B.; Sinosich, M.J.; Gallery, E.D. *Placenta*, **2002**, *23*, 594.
- [73] Arii, K.; Igashiri, H.; Arii, T.; Katayama, Y. *Life Sci.*, **2002**, *71*, 2983.
- [74] Sueda, S.; Kohno, H.; Inoue, K.; Fukuda, H.; Suzuki, J.; Watanabe, K.; Ochi, N.; Kawada, H.; Uraoka, T. *Circ. J.*, **2002**, *66*, 826.
- [75] Ishiura, Y.; Fujimura, M.; Myou, S.; Amemiya, T.; Nobata, K.; Liu, Q.; Yamamoto, C.; Matsuda, T. *Drugs Exp. Clin. Res.*, **2000**, *26*, 33.
- [76] Chlopicki, S.; Bartus, J.B.; Gryglewski, R.J. *J. Physiol. Pharmacol.*, **1999**, *50*, 551.
- [77] Shindo, M.; Majima, M.; Ohno, T.; Sugimoto, K.; Ohwada, T. *Surg. Today*, **1996**, *26*, 610.
- [78] Miyatake, T.; Kubota, S.; Miyazaki, K.; Watanabe, S.; Mafune, N.; Murashita, T.; Yasuda, K. *Transplant Proc.*, **2000**, *32*, 999.
- [79] McCarthy, E.T.; Sharma, M. *Kidney Int.*, **2002**, *61*, 534.
- [80] Yoshizato, K.; Zapf, S.; Westphal, M.; Berens, M.E.; Giese, A. *Neurosurgery*, **2002**, *50*, 343.
- [81] Gao, Y.J.; Lee, R.M. *Br. J. Pharmacol.*, **2001**, *134*, 1639.
- [82] Hennan, J.K.; Huang, J.; Barrett, T.D.; Driscoll, E.M.; Willens, D.E.; Park, A.M.; Crofford, L.J.; Lucchesi, B.R. *Circulation*, **2001**, *104*, 820.

- [83] Yokotani, K.; Murakami, Y.; Okada, S.; Hirata, M. *Eur. J. Pharmacol.*, **2001**, *419*, 183.
- [84] Vila, J.M.; Medina, P.; Segarra, G.; Aldasoro, M.; Noguera, I.; Lluch, S. *Eur. J. Pharmacol.*, **2001**, *413*, 247.
- [85] Kato, K.; Ohkawa, S.; Terao, S.; Terashita, Z.; Nishikawa, K. *J. Med. Chem.*, **1985**, *28*, 287.
- [86] Hecker, M.; Haurand, M.; Ullrich, V.; Terao, S. *Eur. J. Biochem.*, **1986**, *157*, 217.
- [87] Coleman, R.A.; Smith, W.L.; Narumiya, S. *Pharmacol. Rev.*, **1994**, *46*, 205.
- [88] Hirata, M.; Hayashi, Y.; Ushikubi, F.; Yokota, Y.; Kageyama, R.; Nakanishi, S.; Narumiya, S. *Nature*, **1991**, *349*, 617.
- [89] Tsuboi, K.; Sugimoto, Y.; Ichikawa, A. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, **2002**, *68*, 535.
- [90] Halushka, P.V. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, **2000**, *60*, 175.
- [91] Offermanns, S.; Laugwitz, K.L.; Spicher, K.; Schultz, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, *91*, 504.
- [92] Knezevic, I.; Borg, C.; Le Breton, G.C. *J. Biol. Chem.*, **1993**, *268*, 26011.
- [93] Kinsella, B.T.; O'Mahony, D.J.; Fitzgerald, G.A. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1997**, *281*, 957.
- [94] Vezza, R.; Habib, A.; Fitzgerald, G.A. *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*, 12774.
- [95] Namba, T.; Sugimoto, Y.; Hirata, M.; Hayashi, Y.; Honda, A.; Watabe, A.; Negishi, M.; Ichikawa, A.; Narumiya, S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1992**, *184*, 1197.
- [96] Blackman, S.C.; Dawson, G.; Antonakis, K.; Le Breton, G.C. *J. Biol. Chem.*, **1998**, *273*, 475.
- [97] D'Angelo, D.D.; Terasawa, T.; Carlisle, S.J.; Dorn, G.W. 2nd.; Lynch, K.R. *Prostaglandins*, **1996**, *52*, 303.
- [98] Swanson, M.L.; Lei, Z.M.; Swanson, P.H.; Rao, C.V.; Narumiya, S.; Hirata, M. *Biol. Reprod.*, **1992**, *47*, 105.
- [99] Batschke, B.; Nilsson, C.; Sundelin, J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1999**, *256*, 391.
- [100] Ushikubi, F.; Aiba, Y.; Nakamura, K.; Namba, T.; Hirata, M.; Mazda, O.; Katsura, Y.; Narumiya, S. *J. Exp. Med.*, **1993**, *178*, 1825.
- [101] Allan, C.J.; Halushka, P.V. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1994**, *270*, 446.
- [102] Mais, D.E.; Saussy, D.L. Jr.; Chaikhouni, A.; Kochel, P.J.; Knapp, D.R.; Hamanaka, N.; Halushka, P.V. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1985**, *233*, 418.
- [103] Mais, D.E.; DeHoll, D.; Sightler, H.; Halushka, P.V. *Eur. J. Pharmacol.*, **1988**, *148*, 309.
- [104] Morinelli, T.A.; Niewiarowski, S.; Daniel, J.L.; Smith, J.B. *Am. J. Physiol.*, **1987**, *253*, 1035.
- [105] Dorn, G.W. 2nd. *J. Clin. Invest.*, **1989**, *84*, 1883.
- [106] Dorn, G.W. 2nd.; DeJesus, A. *Am. J. Physiol.*, **1991**, *260*, 327.
- [107] Nusing, R.M.; Hirata, M.; Kakizuka, A.; Eki, T.; Ozawa, K.; Narumiya, S. *J. Biol. Chem.*, **1993**, *268*, 25253.
- [108] Raychowdhury, M.K.; Yukawa, M.; Collins, L.J.; McGrail, S.H.; Kent, K.C.; Ware, J.A. *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*, 19256.
- [109] Yukawa, M.; Yokota, R.; Eberhardt, R.T.; von Andrian, L.; Ware, J.A. *Circ. Res.*, **1997**, *80*, 551-6.
- [110] Becker, K.P.; Garnovskaya, M.; Gettys, T.; Halushka, P.V. *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, *1450*, 288.
- [111] Habib, A.; Fitzgerald, G.A.; Maclouf, J. *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*, 2645.
- [112] Walsh, M.T.; Foley, J.F.; Kinsella, B.T. *J. Biol. Chem.*, **2000**, *275*, 20412.
- [113] Parent, J.L.; Labrecque, P.; Orsini, M.J.; Benovic, J.L. *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*, 8941.
- [114] Funk, C.D.; Furci, L.; Moran, N.; Fitzgerald, G.A. *Mol. Pharmacol.*, **1993**, *44*, 934.
- [115] Yamamoto, Y.; Kamiya, K.; Terao, S. *J. Med. Chem.*, **1993**, *36*, 820.
- [116] Narumiya, S.; Hirata, N.; Namba, T.; Hayashi, Y.; Ushikubi, F.; Sugimoto, Y.; Negishi, M.; Ichikawa, A. *J. Lipid Mediat.*, **1993**, *6*, 155.
- [117] Chiang, N.; Kan, W.M.; Tai, H.H. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1996**, *334*, 9.
- [118] D'Angelo, D.D.; Eubank, J.J.; Davis, M.G.; Dorn, G.W. 2nd. *J. Biol. Chem.*, **1996**, *271*, 6233.
- [119] Dorn, G.W. 2nd.; Davis, M.G.; D'Angelo, D.D. *J. Biol. Chem.*, **1997**, *272*, 12399.
- [120] Ruan, K.H.; So, S.P.; Wu, J.; Li, D.; Huang, A.; Kung, J. *Biochemistry*, **2001**, *40*, 275.
- [121] Turek, J.W.; Halmos, T.; Sullivan, N.L.; Antonakis, K.; Le Breton, G.C. *J. Biol. Chem.*, **2002**, *277*, 16791.
- [122] Halmos, T.; Turek, J.W.; Le Breton, G.C.; Antonakis, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1999**, *9*, 2963.
- [123] Albuquerque, M.G.; Hopfinger, A.J.; Barreiro, E.J.; de Alencastro, R.B. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **1998**, *38*, 925.
- [124] Patschke, H.; Stegmeier, K.; Müller-Beckmann, B.; Sponer, G.; Staiger, C.; Neugebauer, G. *Biomed. Biochim. Acta*, **1984**, *43*, 312.
- [125] Stegmeier, K.; Pill, J.; Müller-Beckmann, B.; Schmidt, F.H.; Witte, E.C.; Wolff, H.P.; Patschke, H. *Thromb. Res.*, **1984**, *35*, 379.
- [126] Gresele, P.; Deckmyn, H.; Arnout, J.; Lemmens, J.; Janssens, W.; Vermeylen, J. *Lancet*, **1984**, *i(8384)*, 991.
- [127] Patschke, H.; Stegmeier, K. *Thromb. Res.*, **1984**, *33*, 277.
- [128] Riess, H.; Hiller, E.; Reinhardt, B.; Bräuning, C. *Thromb. Res.*, **1984**, *35*, 371.
- [129] Harris, D.N.; Hedberg, A.; Phillips, M.B.; Michel, I.M.; Goldenberg, H.J.; Liu, E.C. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res.*, **1987**, *17*, 482.
- [130] Monshizadegan, H.; Hedberg, A.; Webb, M.L. *Life Sci.*, **1992**, *51*, 431.
- [131] Ogletree, M.L.; Harris, D.N.; Greenberg, R.; Haslanger, M.F.; Nakane, M. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1985**, *234*, 435.
- [132] Singh, J.; Seth, S.D.; Manchanda, S.C.; Seth, S. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **1997**, *56*, 105.
- [133] Abeywardena, M.Y.; Jablonskis, L.T.; Head, R.J. *J. Cardiovasc Pharmacol.*, **2002**, *40*, 930.
- [134] Okon, E.B.; Golbabaei, A.; Van Breemen, C. *Br. J. Pharmacol.*, **2002**, *137*, 545.
- [135] Moore, F.; Asboth, G.; Lopez, B.A. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, **2002**, *67*, 31.
- [136] Zou, M.H.; Shi, C.; Cohen, R.A. *Diabetes*, **2002**, *51*, 198.
- [137] Nakane, M.; Reid, J.A.; Han, W.C.; Das, J.; True, V.C.; Haslanger, M.F.; Garber, D.; Harris, D.N.; Hedberg, A.; Ogletree, M.L. *J. Med. Chem.*, **1990**, *33*, 2465.
- [138] Honma, S.; Nakahata, N.; Kobayashi, H.; Ikeda, S.; Takeda, N.; Ohizumi, Y. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, **1999**, *58*, 51.
- [139] Maserel, B.; Damas, J.; Fontaine, J.; Lembège, M.; Lacan, F.; Nuhrich, A.; Delarge, J.; Pochet, L.; Dogné, J.M. *J. Pharm. Pharmacol.*, **1999**, *51*, 695.
- [140] Ogletree, M.L.; Harris, D.N.; Schumacher, W.A.; Webb, M.L.; Misra, R.N. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1993**, *264*, 570.
- [141] Lyon, R.T.; Veith, F.J.; Bolton, L.; Machado, F. *Am. J. Surg.*, **1998**, *176*, 172.
- [142] Phillips, T.J.; Machado, E.; Trout, R.; Porter, J.; Olin, J.; Falanga, V. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **2000**, *43*, 627.
- [143] BRISTOL-MYERS SQUIBB CO.: US5605917 (1997).
- [144] Narisada, M.; Ohtani, M.; Watanabe, F.; Uchida, K.; Arita, H.; Doteuchi, M.; Hanasaki, K.; Kakushi, H.; Otani, K.; Hara, S. *J. Med. Chem.*, **1988**, *31*, 1847.
- [145] Fujimura, A.; Shiga, T.; Kumagai, Y.; Ohashi, K.; Ebihara, A.; Kotegawa, T. *J. Clin. Pharmacol.*, **1996**, *36*, 409.
- [146] Dubé, G.P.; Jakubowski, J.A.; Brune, K.A.; Bemis, K.G.; Kurtz, W.L. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1995**, *272*, 799.
- [147] Yoshimi, Y.; Fujimura, M.; Myou, S.; Tachibana, H.; Hirose, T. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, **2001**, *65*, 1.
- [148] Tohda, Y.; Muraki, M.; Kubo, H.; Itoh, M.; Haraguchi, R.; Nakajima, S.; Fukuoka M. *Respiration*, **2001**, *68*, 73.
- [149] Shi, H.; Yokoyama, A.; Kohno, N.; Hirasawa, Y.; Kondo, K.; Sakai, K.; Hiwada, K. *Eur. Respir. J.*, **1998**, *11*, 624.
- [150] shionogi & co. ltd.: WO9915502-A (1999).
- [151] shionogi & co. ltd.: WO0053573-A (2000).
- [152] Matz, R.L.; Van Overloop, B.; Gaubert, E.; Gairard, A. *Life Sci.*, **2001**, *69*, 1791.
- [153] Inoue, Y.; Tokuyama, K.; Nishimura, H.; Arakawa, H.; Kato, M.; Mochizuki, H.; Morikawa, A. *Pharmacology*, **2002**, *65*, 62.
- [154] Sakai, H.; Suzuki, T.; Murota, M.; Takahashi, Y.; Takeguchi, N. *J. Physiol.*, **2002**, *543*, 261.
- [155] Brittain, R.T.; Boutil, L.; Carter, M.C.; Coleman, R.A.; Collington, E.W.; Geisow, H.P.; Hallett, P.; Hornby, E.J.; Humphrey, P.P.; Jack, D. *Circulation*, **1985**, *72*, 1208.
- [156] Lane, I.F.; Lumley, P.; Michael, M.F.; Peters, A.M.; McCollum, C.N. *Thromb. Haemost.*, **1990**, *64*, 369.
- [157] De Boni, D.P.; Lumley, P.; Been, M.; Keery, R.; Ince, S.E.; Woodings, D.F. *Br. Heart. J.*, **1986**, *56*, 509.
- [158] Sutherland, M.F.; Parkinson, M.M.; Hallett, P. *Teratology*, **1989**, *39*, 537.

- [159] Nishigaki, N.; Negishi, M.; Honda, A.; Sugimoto, Y.; Namba, T.; Narumiya, S.; Ichikawa, A. *FEBS Lett.*, **1995**, *364*, 339.
- [160] Schmitz, T.; Dallot, E.; Leroy, M.J.; Breuiller-Fouche, M.; Ferre, F.; Cabrol, D. *Mol. Hum. Reprod.*, **2001**, *7*, 397.
- [161] Jones, R.L.; Chan, K. *Br. J. Pharmacol.*, **2001**, *134*, 313.
- [162] Sanchez, T.; Moreno, J.J. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **2002**, *282*, 280.
- [163] Beasley, R.C.; Featherstone, R.L.; Church, M.K.; Rafferty, P.; Varley, J.G.; Harris, A.; Robinson, C.; Holgate, S.T. *J. Appl. Physiol.*, **1989**, *66*, 1685.
- [164] Vezza, R.; Mezzasoma, A.M.; Venditti, G.; Gresele, P. *Thromb. Haemost.*, **2002**, *87*, 114.
- [165] Cracowski, J.L.; Camus, L.; Durand, T.; Devillier, P.; Guy, A.; Hardy, G.; Stanke-Labesque, F.; Rossi, J.C.; Bessard, G. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **2002**, *39*, 396.
- [166] Kan, K.K.; Jones, R.L.; Ngan, M.P.; Rudd, J.A. *Eur. J. Pharmacol.*, **2002**, *453*, 299.
- [167] pozen inc.: WO9945905-A (1999).
- [168] Karasawa, A.; Shirakura, S.; Higo, K.; Kubo, K. *Arzneimittelforschung*, **1991**, *41*, 1237.
- [169] Miki, I.; Kase, H.; Ishii, A. *Eur. J. Pharmacol.*, **1992**, *227*, 199.
- [170] Bertolini, F.; Valentini, J.P.; Patoineau, J.F.; Rieu, J.P.; Colpaert, F.C.; John, G.W. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **1997**, *356*, 462.
- [171] Dogné, J.M.; Neven, P.; Damas, J.; Fontaine, J.; Rolin, S.; De Leval, X.; Delarge, J.; Maserel, B. *J. Pharm. Belg.*, **1999**, *54*, 57.
- [172] Grandel, U.; Fink, L.; Blum, A.; Heep, M.; Buerke, M.; Kraemer, H.J.; Mayer, K.; Bohle, R.M.; Seeger, W.; Grimmering, F.; Sibelius, U. *Circulation*, **2000**, *102*, 2758.
- [173] Shinozaki, K.; Sato, H.; Iwakuma, T.; Sato, R.; Kurimoto, T.; Yoshida, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1999**, *9*, 401.
- [174] Tanaka, T.; Ito, S.; Higashino, R.; Fukuta, Y.; Fukuda, Y.; Takei, M.; Kurimoto, T.; Tamaki, H. *Thromb. Res.*, **1998**, *91*, 229.
- [175] Tanaka, T.; Sato, R.; Kurimoto, T. *Eur. J. Pharmacol.*, **2000**, *401*, 413.
- [176] Matsuno, H.; Uematsu, T.; Niwa, M.; Kozawa, O.; Nagashima, S.; Kohno, K.; Kato, H.; Kawabata, Y.; Yoshida, Y.; Kanamaru, M. *J. Clin. Pharmacol.*, **2002**, *42*, 782.
- [177] Depin, J.C.; Vigié, A.; Chavernac, G.; Rousselot, C.; Lardy, C.; Guerrier, D. *Arzneimittelforschung*, **1994**, *44*, 1203.
- [178] Lardy, C.; Rousselot, C.; Chavernac, G.; Depin, J.C.; Guerrier, D. *Arzneimittelforschung*, **1994**, *44*, 1196.
- [179] Roald, H.E.; Barstad, R.M.; Engen, A.; Kierulff, P.; Skjorten, F.; Sakariassen, K.S. *Thromb. Haemost.*, **1994**, *71*, 103.
- [180] Motobayashi, Y.; Imagawa, W.; Saida, K. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **2001**, *118*, 397.
- [181] Cisse-Thiam, M.; Drouet, L. *Dakar Med.*, **1999**, *44*, 25.
- [182] Kotze, H.F.; Lamprecht, S.; Badenhorst, P.N.; van Wyk, V.; Roodt, J.P.; Alexander, K. *Thromb. Haemost.*, **1993**, *70*, 672.
- [183] Rote, W.E.; Mu, D.X.; Lucchesi, B.R. *Stroke*, **1993**, *24*, 820.
- [184] Norel, X.; Labat, C.; Gardiner, P.; Brink, C. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot Res.*, **1991**, *21A*, 473.
- [185] Norel, X.; Labat, C.; Gardiner, P.; Brink, C. *Br. J. Pharmacol.*, **1991**, *104*, 591.
- [186] McKenniff, M.G.; Norman, P.; Cuthbert, N.J.; Gardiner, P.J. *Br. J. Pharmacol.*, **1991**, *104*, 585.
- [187] Norman, P.; Cuthbert, N.J.; Gardiner, P.J.; McKenniff, M.G. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1991**, *629*, 396.
- [188] Francis, H.P.; Morris, T.G.; Thompson, A.M.; Patel, U.P.; Gardiner, P.J. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1991**, *629*, 399.
- [189] Iwamoto, I.; Umebe, T.; Nakajima, H.; Yoshida, S. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **1995**, *108*, 68.
- [190] Magnussen, H.; Boerger, S.; Templin, K.; Baunack, A.R. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **1992**, *89*, 1119.
- [191] Rajakulasingam, K.; Johnston, S.L.; Ducey, J.; Ritter, W.; Howarth, P.H.; Holgate, S.T. *J. Appl. Physiol.*, **1996**, *80*, 1973.
- [192] Aizawa, H.; Shigyo, M.; Nogami, H.; Hirose, T.; Hara, N. *Chest*, **1996**, *109*, 338.
- [193] bayer yakuhin ltd.: WO9744031-A (1997).
- [194] Shionogi & co. ltd.: WO00030683-A (2000).
- [195] Dogné, J.M.; de Leval, X.; Delarge, J.; Maserel, B. *Expert Opin. Therapeutic Patents*, **2001**, 11.
- [196] Marusawa, H.; Setoi, H.; Sawada, A.; Kuroda, A.; Seki, J.; Motoyama, Y.; Tanaka, H. *Bioorg. Med. Chem.*, **2002**, *10*, 1399.
- [197] Kanao, M.; Watanabe, Y.; Kimura, Y.; Saegusa, J.; Yamamoto, K.; Kanno, H.; Kanaya, N.; Kubo, H.; Ashida, S.; Ishikawa, F. *J. Med. Chem.*, **1989**, *32*, 1326.
- [198] Fukumoto, S.; Shiraishi, M.; Terashita, Z.; Ashida, Y.; Inada, Y. *J. Med. Chem.*, **1992**, *35*, 2202.
- [199] Kurokawa, T.; Matsumoto, T.; Ashida, Y.; Sasada, R.; Iwasa, S. *Biol. Pharm. Bull.*, **1994**, *17*, 383.
- [200] Terao, S.; Shiraishi, M.; Matsumoto, T.; Ashida, Y. *Yakugaku Zasshi*, **1999**, *119*, 377.
- [201] Wouters, J.; Durant, F.; Maserel, B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1999**, *9*, 2867.
- [202] Matsumoto, T.; Ashida, Y.; Tsukuda, R. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1994**, *269*, 1236.
- [203] Imai, T.; Adachi, M.; Idaira, K.; Suganuma, T.; Takahashi, T.; Yamaguchi, H.; Saito, C.; Maeda, M.; Tsuji, A. *Arerugi*, **1991**, *40*, 28.
- [204] Matsumoto, T.; Ashida, Y. *Prostaglandins*, **1993**, *46*, 301.
- [205] Hoshino, M.; Sim, J.; Shimizu, K.; Nakayama, H.; Koya, A. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **1999**, *103*, 1054.
- [206] Tamaoki, J.; Kondo, M.; Nakata, K.; Nagano, Y.; Isono, K.; Nagai, A. *Chest*, **2000**, *118*, 73.
- [207] Horiguchi, T.; Tachikawa, S.; Kondo, R.; Shiga, M.; Hirose, M.; Fukumoto, K. *Arzneimittelforschung*, **2002**, *52*, 764.
- [208] tap holdings inc.: US6020380 (2000).
- [209] Gresele, P.; Arnout, J.; Deckmyn, H.; Huybrechts, E.; Pieters, G.; Vermeylen, J. *Clin. Invest.*, **1987**, *80*, 1435.
- [210] Hoet, B.; Falcon, C.; De Reys, S.; Arnout, J.; Deckmyn, H.; Vermeylen, J. *Blood*, **1990**, *75*, 646.
- [211] Tytgat, G.N.; Van Nueten, L.; Van De Velde, I.; Joslyn, A.; Hanauer, S.B. *Aliment Pharmacol. Ther.*, **2002**, *16*, 87.
- [212] Carty, E.; Nickols, C.; Feakins, R.M.; Rampton, D.S. *J. Clin. Pathol.*, **2002**, *55*, 367.
- [213] Schmutzler, R.; Hartmann, H.; Casale, G.; Magliano, A. *Age Ageing*, **1978**, *7*, 246.
- [214] Coto, V.; Carrieri, P.; Cocozza, M.; Oliviero, U.; Picano, T.; Spinoli, G.; Cacciato, L. *Minerva Cardioangiolog.*, **1986**, *34*, 601.
- [215] Danese, C.; Sergio, G.; Giunta, G.; Landi, M.T.; Renzulli, C.; Panciocco, M.G.; De Rossi, M.G.; Perego, M.A. *Curr. Med. Res. Opin.*, **1988**, *11*, 221.
- [216] Coto, V.; Cocozza, M.; Oliviero, U.; Lucarelli, A.; Picano, T.; Coto, F.; Cacciato, L. *Angiology*, **1989**, *40*, 880.
- [217] Girolami, B.; Bernardi, E.; Prins, M.H.; ten Cate, J.W.; Prandoni, P.; Hettiarachchi, R.; Marras, E.; Stefani, P.M.; Girolami, A.; Buller, H.R. *Thromb. Haemost.*, **1999**, *81*, 715.
- [218] Pipiri, L.; Petruzzo, P.; De Giudici, A.; Brotzu, G. *Clin. Ter.*, **1990**, *133*, 233.
- [219] Rafanelli, D.; Grossi, A.; Vannucchi, A.M.; Cinotti, S.; Morfini, M.; Ferrini, P.R. *Thromb. Haemost.*, **1990**, *63*, 525.
- [220] Gilberto, M.; Canova, G.; Masini, R.; Damerio, M.A.; Filippi, M. *Clin. Ter.*, **1991**, *137*, 339.
- [221] D'Andrea, G.; Perini, F.; Hasselmark, L.; Alecci, M.; Cananzi, A.R. *Funct. Neurol.*, **1995**, *10*, 91.
- [222] Pogliani, E.; Milani, M. *J. Int. Med. Res.*, **1996**, *24*, 311.
- [223] Collins, C.E.; Benson, M.J.; Burnham, W.R.; Rampton, D.S. *Aliment Pharmacol. Ther.*, **1996**, *10*, 315.
- [224] Pancera, P.; Sansone, S.; Seccchi, S.; Covi, G.; Lechi, A. *J. Intern. Med.*, **1997**, *242*, 373.
- [225] Vetrano, A.; Milani, M.; Corsini, G. *G. Ital. Cardiol.*, **1999**, *29*, 524.
- [226] Coto, V.; Oliviero, U.; Cocozza, M.; Milani, M. *J. Int. Med. Res.*, **1998**, *26*, 200.
- [227] Langleben, D.; Christman, B.W.; Barst, R.J.; Dias, V.C.; Galie, N.; Higenbottam, T.W.; Kneussl, M.; Korducki, L.; Naeije, R.; Riedel, A.; Simonneau, G.; Hirsch, A.M.; Rich, S.; Robbins, I.M.; Oudiz, R.; McGoon, M.D.; Badescu, D.B.; Levy, R.D.; Mehta, S.; Seeger, W.; Soler, M. *Am. Heart J.*, **2002**, *143*, E4.
- [228] Galie, N.; Manes, A.; Branzi, A. *Eur. Respir. J.*, **2002**, *20*, 1037.
- [229] Michaux, C.; Dogné, J.M.; Norberg, B.; Durant, F.; Maserel, B. *Acta Crystallogr. C*, **2002**, *58*, 621.
- [230] Dogné, J.M.; de Leval, X.; Neven, P.; Rolin, S.; Wauters, J.; David, J.L.; Delarge, J.; Maserel, B. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **2000**, *62*, 311.
- [231] Dogné, J.M.; de Leval, X.; Neven, P.; Rolin, S.; Wauters, J.; David, J.L.; Delarge, J.; Maserel, B. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **2001**, *64*, 19.
- [232] Dogné, J.M.; de Leval, X.; Neven, P.; Rolin, S.; Wauters, J.; Delarge, J.; Kohl, P.; Damas, J.; David, J.L.; Maserel, B. *Cardiovasc. Drugs Rev.*, **2001**, *19*, 87.
- [233] Michaux, C.; Rolin, S.; Dogné, J.M.; Durant, F.; Maserel, B.; Delarge, J.; Wauters, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, *11*, 1019.
- [234] Rolin, S.; Dogné, J.M.; Michaux, C.; Delarge, J.; Maserel, B. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **2001**, *65*, 67.

- [235] Christie, P.E.; Henderson, W.R. Jr. *Clin. Allergy Immunol.*, **2002**, *16*, 233.
- [236] Fujita, M.; Seki, T.; Inada, H.; Shimizu, K.; Takahama, A.; Sano, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2002**, *12*, 341.
- [237] Fujita, M.; Seki, T.; Inada, H.; Shimizu, K.; Takahama, A.; Sano, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2002**, *12*, 771.
- [238] Fujita, M.; Seki, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2002**, *12*, 1383.
- [239] James, A.J.; Sampson, A.P. *Clin. Exp. Allergy*, **2001**, *31*, 1660.
- [240] Cardoso, C.R.; de Brito, F.C.; da Silva, K.C.; de Miranda, A.L.; Fraga, C.A.; Barreiro, E.J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2002**, *12*, 9.
- [241] Arakida, Y.; Suwa, K.; Ohga, K.; Yokota, M.; Miyata, K.; Yamada, T.; Honda, K. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1998**, *287*, 633.
- [242] Arakida, Y.; Ohga, K.; Kobayashi, S.; Yokota, M.; Miyata, K.; Yamada, T.; Honda, K. *Eur. J. Pharmacol.*, **1998**, *362*, 229.
- [243] Arakida, Y.; Ohga, K.; Suwa, K.; Okada, Y.; Morio, H.; Yokota, M.; Miyata, K.; Yamada, T.; Honda, K. *Jpn. J. Pharmacol.*, **2000**, *82*, 287.
- [244] Arakida, Y.; Ohga, K.; Suwa, K.; Okada, Y.; Morio, H.; Yokota, M.; Miyata, K.; Yamada, T.; Honda, K. *Jpn. J. Pharmacol.*, **2000**, *83*, 63.
- [245] Komatsu, Y.; Minami, N. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **1995**, *43*, 1614.
- [246] Oketani, K.; Nagakura, N.; Harada, K.; Inoue, T. *Eur. J. Pharmacol.*, **2001**, *422*, 209.
- [247] Oketani, K.; Inoue, T.; Murakami, M. *Eur. J. Pharmacol.*, **2001**, *427*, 159.
- [248] Sakai, H.; Suzuki, T.; Murota, M.; Oketani, K.; Uchiimi, T.; Murakami, M.; Takeguchi, N. *Br. J. Pharmacol.*, **2002**, *136*, 383.
- [249] Yamada, H.; Kotaki, H.; Furitsu, H.; Sawada, Y.; Iga, T. *Biopharm. Drug Dispos.*, **1999**, *20*, 271.
- [250] Zaman, M.A.; Oparil, S.; Calhoun, D.A. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2002**, *1*, 621.
- [251] Sachinidis, A.; el-Haschimi, K.; Ko, Y.; Seul, C.; Epping, P.; Vetter, H. *Eur. J. Pharmacol.*, **1996**, *307*, 121.
- [252] Lin, L.; Mistry, M.; Stier, C.T. Jr.; Nasjletti, A. *Hypertension*, **1991**, *17*, 517.
- [253] Schwemmer, M.; Sommer, O.; Bassenge, E. *Cardiovasc Drugs Ther.*, **2001**, *15*, 301.
- [254] Chlopicki, S.; Koda, M.; Chabielksa, E.; Buczko, W.; Gryglewski, R.J. *J. Physiol. Pharmacol.*, **2000**, *51*, 715.
- [255] Bertolino, F.; Valentini, J.P.; Maffre, M.; Jover, B.; Bessac, A.M.; John, G.W. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1994**, *268*, 747.
- [256] Li, P.; Ferrario, C.M.; Brosnihan, K.B. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1997**, *281*, 1065.
- [257] Li, P.; Fukuhara, M.; Diz, D.I.; Ferrario, C.M.; Brosnihan, K.B. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2000**, *292*, 238.
- [258] Hwang, T.L.; Yeh, Y.A.; Chern, J.W.; Teng, C.M. *Gen. Pharmacol.*, **2000**, *34*, 25.
- [259] Brodie, A. *Trends Endocrinol Metab.*, **2002**, *13*, 61.
- [260] Brodie, A.M.; Njar, V.C. *Steroids*, **2000**, *65*, 171.
- [261] Wachter, G.A.; Hartmann, R.W.; Sergejew, T.; Grun, G.L.; Ledergerber, D. *J. Med. Chem.*, **1996**, *39*, 834.
- [262] Nigam, S.; Zakrzewicz, A. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot Res.*, **1991**, *21*, 925.
- [263] Nigam, S.; Eskafi, S.; Roscher, A.; Weitzel, H. *FEBS Lett.*, **1993**, *316*, 99.
- [264] Aitokallio-Tallberg, A.M.; Viinikka, L.U.; Ylikorkala, R.O. *Cancer Res.*, **1988**, *48*, 2396.
- [265] Jacobs, C.; Frotscher, M.; Dannhardt, G.; Hartmann, R.W. *J. Med. Chem.*, **2000**, *43*, 1841.
- [266] Uchida, T.; Kido, H.; Yamanaga, K.; Okita, M.; Watanabe, M. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **1992**, *45*, 121.
- [267] Cocks, T.M.; King, S.J.; Angus, J.A. *Br. J. Pharmacol.*, **1990**, *100*, 375.
- [268] Stanke, F.; Cracowski, J.L.; Chavanon, O.; Magne, J.L.; Blin, D.; Bessard, G.; Devillier, P. *Eur. J. Pharmacol.*, **1998**, *341*, 65.
- [269] Kemp, B.K.; McPherson, G.A. *Eur. J. Pharmacol.*, **1998**, *354*, 173.

Annexe 12

**Pharmacological profile and therapeutic potential
of BM-573, a combined thromboxane receptor
antagonist and synthase inhibitor.**

**Ghuysen A, Dogne JM, Chiap P, Rolin S, Masereel B,
Lambermont B, Kolh P, Tchana-Sato V, Hanson J, D'Orio V.**

Cardiovascular Drug Reviews 2005 Spring;23(1):1-14.

Pharmacological Profile and Therapeutic Potential of BM-573, a Combined Thromboxane Receptor Antagonist and Synthase Inhibitor

Alexandre Ghuysen¹, Jean-Michel Dogné², Patrice Chiap³,
Stéphanie Rolin⁴, Bernard Masereel⁴, Bernard Lambermont¹,
Philippe Kolh¹, Vincent Tchana-Sato¹, Julien Hanson²,
and Vincent D’Orio¹

¹Hemodynamics Research Laboratory (Hemoliège),

²Laboratory of Medicinal Chemistry,

³Department of Analytical Pharmaceutical Chemistry,

University of Liège, Belgium; ⁴Department of Pharmacy, University of Namur, Belgium

Keywords: Antiplatelet agents — BM-573 — Thromboxane antagonists — Thromboxane synthase inhibitors.

ABSTRACT

BM-573 (N-terbutyl-N’-[2-(4’-methylphenylamino)-5-nitro-benzenesulfonyl]urea), a torsemide derivative, is a novel non-carboxylic dual TXA₂ synthase inhibitor and receptor antagonist. The pharmacological profile of the drug is characterized by a higher affinity for the thromboxane receptor than that of SQ-29548, one of the most powerful antagonists described to date, by a complete prevention of human platelet aggregation induced by arachidonic acid at a lower dose than either torsemide or sulotroban, and by a significantly prolonged closure time measured by the platelet function analyser (PFA-100®). Moreover, at the concentrations of 1 and 10 µM, BM-573 completely prevented production of TXB₂ by human platelets activated by 0.6 mM of arachidonic acid. BM-573 prevents rat fundus contraction induced by U-46619 but not by prostacyclin or other prostaglandins. Despite possessing a chemical structure very similar to that of a diuretic torsemide, BM-573 has no diuretic activity. BM-573 does not prolong bleeding time and, unlike some of the other sulfonylureas, has no effect on blood glucose levels. *In vivo*, BM-573 appears to have antiplatelet and antithrombotic activities since it reduced thrombus weight and prolonged

Address correspondence and reprint requests to: Dr. Alexandre Ghuysen, Emergency Care, Department of Medicine, University Hospital of Liège, CHU Sart Tilman — B35. B-4000 Liège, Belgium.
Tel.: +32 (4) 366-7729; Fax: +32 (4) 366-7723, E-mail: a.ghuysen@chu.ulg.ac.be

the time to abdominal aorta occlusion induced by ferric chloride. BM-573 also relaxed rat aorta and guinea pig trachea precontracted with U-46619. In pigs, BM-573 completely antagonized pulmonary hypertensive effects of U-46619 and reduced the early phase of pulmonary hypertension in models of endotoxic shock and pulmonary embolism. Finally, BM-573 protected pigs from myocardial infarction induced by coronary thrombosis.

These results suggest that BM-573 should be viewed as a promising therapeutic agent in the treatment of pulmonary hypertension and syndromes associated with platelet activation.

INTRODUCTION

Thromboxane A₂ (TXA₂) is a biologically active arachidonic acid (AA) metabolite derived from the cyclooxygenase (COX) pathway (19). TXA₂ is formed by the action of thromboxane synthase on the prostaglandin endoperoxide H₂ (PGH₂), mainly in activated platelets (13) and macrophages (39). TXA₂ causes vasoconstriction, bronchoconstriction, and irreversible platelet aggregation (1,14,19,46). TXA₂ biosynthesis is increased in syndromes associated with platelet activation, such as myocardial infarction (12), unstable angina (21), thrombosis and thrombotic disorders (42), as well as in other pathological states, such as pulmonary hypertension, asthma, pulmonary embolism, and septic shock (8). In these pathological states TXA₂ is assumed to contribute to the underlying pathogenesis by stimulating platelet aggregation and causing smooth muscle contraction (18,19). Therefore, first efforts to modulate the actions of eicosanoids focused on agents able to inhibit the biosynthesis of TXA₂ (thromboxane synthase inhibitors: TXSIs) or to block the action of TXA₂ at the receptor level (thromboxane receptor antagonists: TXRAs). A potential advantage of thromboxane synthase inhibition as a therapeutic approach is that accumulated PGH₂ substrate may be utilized by prostacyclin synthase in vascular endothelium to produce increased amounts of the potent vasodilator and platelet aggregation inhibitory agent, prostacyclin (PGI₂) (36,37). However, despite extensive clinical evaluation, TXSIs have failed to fulfill their promise (14). Possible reasons for the disappointing clinical performance of this class of drugs include an incomplete blockade of thromboxane synthase at the doses used and the fact that TXSIs cause accumulation of PGH₂, thromboxane precursor, which is chemically more stable and exerts its biological effects by acting at the same receptors (4,19,20). The TXRAs antagonize the action of TXA₂ (and PGH₂) at its receptors without accumulation of PGH₂. The therapeutic benefits of TXSIs and TXRAs can be optimized by combining their properties in the same molecule. Indeed, this concept is supported by a study involving co-administration of sultoban, a TXRA, and dazoxiben, a TXSI. By combined administration these drugs prolonged bleeding time in humans to a greater extent than either drug alone (50). Therefore, many compounds with both properties have been developed. One such compound, ridogrel, the first putative dual inhibitor of TXA₂, has been tested clinically (7,22,48).

BM-573 is a novel dual thromboxane receptor antagonist and thromboxane synthase inhibitor. This article reviews chemical and pharmacological properties of this promising agent and suggests its therapeutic potential.

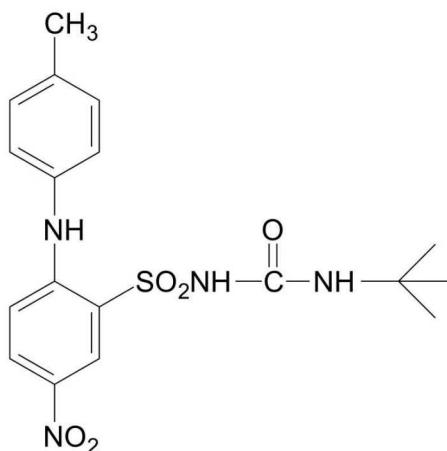


FIG. 1. Chemical structure of BM-573.

CHEMISTRY

BM-573 was originally synthesized in the Laboratory of Medicinal Chemistry of the University of Liège by Dogné. Its synthesis was prompted by observation that torsemide, a related sulfonylurea derivative and a high ceiling loop diuretic, was found to relax, concentration-dependently, canine coronary artery pre-contracted with carboxylic TXA₂ (49). On the basis of this finding we designed and synthesized original molecules chemically related to torsemide. Indeed, replacement of its pyridine ring with a nitrobenzene improves TXA₂ antagonism and reveals TXA₂ synthase inhibitory activity (11), while the presence of a tert-butyl chain on the distal nitrogen of the sulfonylurea function is propitious for a high TXA₂ antagonistic activity (9). These pharmacomodulations led to the development of BM-573 (N-tertbutyl-N'-[2-(4'-methylphenylamino)-5-nitro-benzenesulfonyl] urea), a novel non-carboxylic combined TXA₂ synthase inhibitor and receptor antagonist (Fig. 1). This drug is soluble in methanol, ethanol and dimethylsulfoxide. The compound is available in the form of yellow crystalline powder. The melting point is 147°C, the molecular formula is C₁₈H₂₂N₄O₅S and the molecular weight is 406.46 Da.

PHARMACOLOGY

Thromboxane Receptor Antagonism

Radioligand binding

The affinity of BM-573 for the thromboxane receptors (TXRs) was determined by its ability to displace [5,6-³H]SQ-29548, a competitive ligand for TX at the TXA₂ receptors, from its binding site on human washed platelets. BM-573 emerged as a powerful TXR ligand with an IC₅₀ of 1.3 ± 0.1 nM. It has a higher affinity for the human TXA₂ receptor

than torsemide ($IC_{50} = 2693 \pm 174$ nM), sulotroban ($IC_{50} = 931 \pm 85$ nM) and SQ-29548 ($IC_{50} = 21 \pm 2$ nM). Moreover, in a recent binding study, we demonstrated that BM-573 had the same affinity for the two receptor isoforms, TR α or TR β , individually expressed in COS-7 cells (unpublished).

Aggregometry

To confirm the TXA $_2$ antagonist potency of this novel molecule, we investigated its capacity to prevent human platelet aggregation induced by arachidonic acid, U-46619, ADP and collagen according to a previously described method (9). BM-573 drug concentration required to completely prevent platelet aggregation induced by 600 μ M of arachidonic acid (ED_{100}) was 0.125 ± 0.015 μ M. The ED_{100} for torsemide was >100 μ M and for sulotroban 10.2 ± 2.1 μ M. Similar results were obtained when U-46619 (1 μ M), a stable TXA $_2$ agonist, was used as the aggregating agent. When ADP was used as the inducer, none of the tested drugs prevented the initial aggregation phase. On the other hand, at 10 μ M BM-573 completely inhibited the secondary phase of ADP aggregation. Moreover, this drug partly prevented the aggregation induced by collagen (1 μ g/mL). In the same study, torsemide (100 μ M) was inactive, irrespective of the inducer used.

Effect of BM-573 on platelet aggregation: PFA-100 $^{\circledR}$ study

The anti-aggregating potency of BM-573 has been confirmed on human whole blood by using the platelet function analyzer (PFA-100 $^{\circledR}$, Dade Behring International $^{\circledR}$) (28). This analyzer consists of an instrument and a disposable test cartridge where primary hemostasis is simulated. It monitors platelet aggregation on a collagen-epinephrine coated membrane as a whole blood sample (incubated for five minutes with the drug at a concentration of 10 μ M) is aspirated under controlled flow conditions through a microscopic aperture cut into the membrane (150 μ m, diameter). The time required for the platelet plug to occlude the aperture (CT) is indicative of the platelet function in the sample. At 10 μ M, BM-573 (CT: 195 ± 19 sec) significantly prolonged the control CT (110 ± 10 sec), while torsemide (CT: 108 ± 9 sec) did not modify this parameter.

TXA $_2$ Synthase Inhibition

At 1 and 10 μ M, BM-573 completely prevented the production of TXB $_2$ by human platelets activated by 600 μ M of arachidonic acid (391 ± 37.9 ng of TXB $_2$ per mL vs. TXB $_2$ production <10 ng/mL). At 10 μ M furegrelate, a TXSI, reduced the production of TXB $_2$ by 67.5% while torsemide had no effect. At a lower concentration (0.1 μ M), BM-573 failed to inhibit the production of TXB $_2$. This activity cannot be attributed to a COX inhibition since we also demonstrated that BM-573 did not prevent prostaglandin E $_2$ (PGE $_2$) production induced by either ovine COX-1 or COX-2, separately incubated with arachidonic acid. These results confirmed the ability of BM-573 to inhibit thromboxane synthase without affecting the formation of other arachidonic acid metabolites.

Selectivity

With the aim of assessing the selectivity of BM-573 for other prostaglandin receptors, we evaluated its effects on rat fundus contractions induced by U-46619, PGE $_2$, PGF $_{2\alpha}$, or

PGI₂. This study has been conducted in accordance with a previously described method (35). BM-573 prevented the rat fundus contraction induced by U-46619 (30 nM) with an ED₅₀ of $4.2 \pm 0.3 \mu\text{M}$. This result confirmed the TXA₂ receptor antagonist potency of BM-573 in smooth muscle. Moreover, at concentrations up to 100 μM , BM-573 failed to relax rat fundus contracted by PGE₂ (0.05 μM), PGF_{2 α} (0.1 μM), or PGI₂ (0.5 μM). Consequently, BM-573 can be viewed as a specific TXA₂ receptor antagonist. Finally, BM-573 alone failed to contract rat fundus, suggesting a lack of TX receptor agonist activity in this model.

Diuretic Properties in Rats

Since BM-573 is chemically related to a loop diuretic, torsemide, we investigated its diuretic activity by a previously described method (9,35). Briefly, Wistar rats (200–250 g body weight) received a single oral dose of BM-573 or torsemide (30 mg/kg) suspended in 40 mL/kg of 0.9% NaCl. Control animals received 0.9% NaCl only. The rats were allowed free access to food and water until the beginning of the experiment. Urine was collected for 4 h after drug administration. In this test, BM-573 failed to increase urine volume, while torsemide was a potent diuretic. Also by i.p. administration BMS-573, 10 mg/kg, did not significantly increase diuresis, while it completely prevented platelet aggregation induced by arachidonic acid (600 μM) *ex vivo*. These results demonstrated that despite the similarity of its chemical structure to that of the diuretic torsemide, BM-573 has no diuretic activity.

Effects on Blood Glucose Levels

The oral hypoglycemic glibenclamide, a specific blocker of the ATP-sensitive K⁺ channel, is another sulfonylurea derivative that emerged as TXRA. Indeed, in isolated ring segments of dog coronary artery, glibenclamide has been shown to reduce isometric force of spontaneous contractions as well as of contractions induced by U-46619 (3,44). Thus, we tested the hypoglycemic properties of BM-573, in comparison with glibenclamide using the methodology of Lebrun (33). BM-573 or glibenclamide were administered i.p. at a dose of 20 mg/kg. Control animals received equivalent volumes of water or propylene glycol. In control rats blood glucose levels were stable during 180 minutes. BM-573, at 20 mg/kg i.p., had no hypoglycemic effect, while the hypoglycemic effect of glibenclamide, 20 mg/kg i.p., was rapid and pronounced, the blood glucose averaged $67.4 \pm 7.8 \text{ mg/100 mL}$ at 60 min after treatment.

Effect on Bleeding Time in Mice

Bleeding time (BT) was assessed according to Ma et al. (34). Briefly, BM-573, furegrelate, seratrodast, ticlopidine, or acetylsalicylic acid were administered at 5 mg/kg i.p. each to mice at one hour prior to the tail section. Control animals received vehicle. Each drug was tested in 6 mice. BM-573, furegrelate, seratrodast and acetylsalicylic acid had no effect on the BT. Aspirin tended to prolong BT although its effect failed to reach statistical significance. At the same experimental conditions, ticlopidine significantly prolonged BT for up to 247 sec. In this test, all thromboxane modulators failed to prolong bleeding time.

These results confirm that TXA₂/PGI₂ balance is not the major factor in the regulation of bleeding time in this acute model (47). The causes of the separation of the antithrombotic and bleeding time effects of BM-573 remain unknown.

THERAPEUTIC PERSPECTIVES

Antiplatelet and Antithrombotic Activity in a Rat Model of Arterial Thrombosis

The promising *in vitro* pharmacological properties of BM-573 led us to study its pharmacological profile *in vivo* as an antiplatelet and antithrombotic agent (10). We measured, therefore, blood levels of BM-573 at different time intervals after its i.p. administration to rats, and evaluated its effects on *ex vivo* platelet aggregation. Finally, we determined the antithrombotic activity of this drug in a ferric chloride abdominal arterial thrombosis model in rats. A single 5 mg/kg i.p. dose of BM-573 inhibited U-46619-induced washed platelet aggregation at 30 min, one, two and four hours after drug administration. The maximal antiplatelet effect was observed at one and 2 h after administration of BM-573. Blood levels of BM-573 measured by HPLC reached a maximum at one hour after injection of the drug and decreased gradually thereafter. Topical application of ferric chloride (50% w/v) for 10 min to the abdominal aorta induced marked thrombi in vehicle-treated rats (8.39 ± 0.37 mg/kg). In this group of animals mixed thrombi were composed of fibrin and platelets. They adhered to vessel wall at the site of ferric chloride application, as revealed by light micrographs of abdominal rat aorta sections stained with hematoxylin-eosin. BM-573 at doses of 5, 2, 0.5, and 0.2 mg/kg i.p. at one hour prior to ferric chloride application resulted in a significant reduction of thrombus weight (by 93, 80, 65, and 18%, respectively (Fig. 2). When BM-573 was administered at 2 or 5 mg/kg i.p. at 2 h prior to ferric chloride treatment, thrombus weight was reduced by 61 and 45%, respectively (Fig. 2). No significant effects on thrombus formation were observed with torsemide, furegrelate or seratrodast, each at 5 mg/kg i.p. at one or 2 h before thrombus induction. Moreover, in vehicle-treated rats, the time to occlusion (TTO) of abdominal aorta after application of a filter paper soaked in 50% solution of FeCl₃ averaged 16.16 ± 0.79 min. After injection of BM-573, 5 mg/kg i.p., at one hour prior to ferric chloride application, the average TTO measured was 41.5 ± 5.21 min. At the same experimental conditions, torsemide, seratrodast and furegrelate failed to prolong TTO.

Effect in Isolated Smooth Muscles Preparations (40)

TXA₂ release in several diseases such as myocardial infarction or bronchial asthma not only induces platelet activation, but also contraction of vascular and respiratory smooth muscles (19). Thus, the blockade of TXA₂ receptors on platelet and smooth muscles cells with TXRA and the inhibition of TXA₂ synthase may reduce the severity of myocardial ischemia (2,25,27) and bronchial asthma (26). Therefore, we evaluated the relaxing activity of BM-573 on the rat aorta and on the guinea pig trachea precontracted with U-46619 (10 nM). Cumulatively increasing concentrations of BM-573 caused a concentration-dependent relaxation of the contracted isolated trachea. The drug concentration

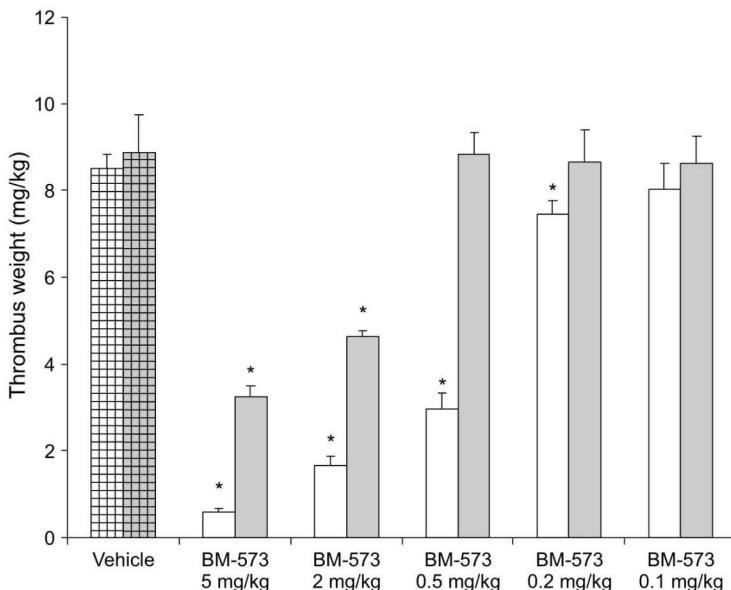


FIG. 2. Dose-dependent effects of BM-573 on the weight of thrombus induced by application of ferric chloride to rat abdominal aorta. White columns at 1 h and gray columns at 2 h prior to application of ferric chloride. Each column represents the mean \pm S.E.M. of 6 to 7 rats. * $P < 0.05$ compared with the vehicle-treated group.

required to decrease muscular tonus induced by U-46619 by 50% (ED_{50}) revealed that BM-573 (ED_{50} : 17.7 ± 2.9 nM) was much more potent than sulotroban (ED_{50} : 465 ± 39 nM), but less potent than seratrodast (ED_{50} : 5.7 ± 0.9 nM) or SQ-29548 (ED_{50} : 3.8 ± 0.5 nM). Torsemide had the lowest potency (ED_{50} : 4020 ± 380 nM). Similar results were found with contracted isolated rat aorta. These results demonstrated high potency of BM-573 on isolated aorta and tracheal smooth muscle and suggested its therapeutic usefulness in the treatment of cardiovascular disease and asthma.

Hemodynamic Effects (17)

In order to assess the hemodynamic effects of BM-573, we measured hemodynamic parameters in five pigs, before and every 30 min after BM-573 infusion at a rate of 10 mg/kg/h during 240 min, and in five sham-operated control animals during the same time interval. In accordance with previous studies by our group (32,41), comparison of time course evolution between these groups revealed no effect of BM-573 on most of the hemodynamic parameters (mean blood flow, heart rate, aortic blood pressure, pulmonary vascular resistances, pulmonary arterial elastance, right ventricular end-diastolic volume, right ventricular-vascular coupling and efficiency). The only difference noticed was that the increase in mean pulmonary arterial pressure with time was slightly greater in the sham-operated control animals than in the group receiving BM-573. This mild effect was secondary to a decrease in vascular compliance in the sham-operated control group only.

Effect of U-46619 on Pulmonary Hemodynamics Before and After Administration of BM-573 (31)

Currently available evidence suggests that, because of its potent vasoconstrictor and platelet aggregating properties, TXA₂ may be implicated in several pulmonary pathophysiological processes, including pulmonary hypertensive phase of Gram-negative sepsis (51), hyperacute lung rejection (5,38) or pulmonary vasoconstriction associated with pulmonary embolism (43). Consequently, drugs capable of antagonizing vasoconstrictor effects of thromboxane or other agonists at TXRs could conceivably prevent hemodynamic impairment. In a study performed in anesthetized pigs, we evaluated the effects on pulmonary hemodynamic effect of i.v. U-46619, a stable TXA₂ agonist, before and after the administration of increasing doses of BM-573. Six animals received six consecutive injections of the same dose of U-46619 (1.25 µg/kg) at 30-min intervals and were compared with six animals receiving an increasing regimen (0.125, 0.25, 0.5, 1, and 2 mg/kg) of BM-573 at 10 min before each U-46619 injection. Changes in pulmonary hemodynamics, including pulmonary resistance, vascular compliance, and peripheral vascular resistance were continuously assessed during the experiment, using a four-element windkessel model. Our data showed that BM-573 at 2 mg/kg completely blocked the pulmonary hypertensive effect of U-46619. However, at that dose of BM-573, pulmonary vascular compliance still decreased after the administration of the TXA₂ agonist. This residual effect may probably be explained by a persistent increase in the tonus of the smooth muscles in pulmonary vascular wall that was sufficient to decrease vascular compliance but not lumen diameter of the pulmonary blood vessels. In essence, these data suggest that BM-573 could have a promising therapeutic effect by blocking TXA₂ effects in pulmonary hypertension secondary to pulmonary embolism, hyperacute lung reaction or septic shock.

Effect on Pulmonary Hemodynamics and Ventricular-Arterial Coupling in Endotoxic Shock (29,32)

Despite tremendous advances in supportive care, septic shock remains one of the leading causes of death in critically ill patients. Among numerous complications, right heart failure is certainly one of the most life-threatening. Impaired right ventricular function results from an inappropriate matching between the ventricular inotropic state and pulmonary vascular impedance, with secondary altered ventricular-vascular coupling (6,30,51). TXA₂ is partially involved in the pro-inflammatory reactions leading to endotoxin-mediated acute lung injury and in the increase of pulmonary vascular resistance after endotoxin administration, inducing ventricular-vascular coupling mismatch. Inhibition of TXA₂ may not only improve oxygenation, but also attenuate the increase in pulmonary vascular resistance and restore coupling. We evaluated, therefore, the effects of BM-573 on pulmonary hemodynamics and arterial oxygenation in a porcine model of endotoxic shock. Thirty minutes before the onset of endotoxin, 0.5 mg/kg, infusion, six pigs (Endo group) received an infusion with a placebo solution, and six other pigs (Anta group) with solution containing BM-573 at the rate of 10 mg/kg/h. In this study, BM-573 completely blocked the early phase of pulmonary hypertensive response during endotoxin challenge. As revealed by a four-element windkessel analysis of the pulmonary vasculature, this effect was due to a reduction in pulmonary vascular resistance, while arterial

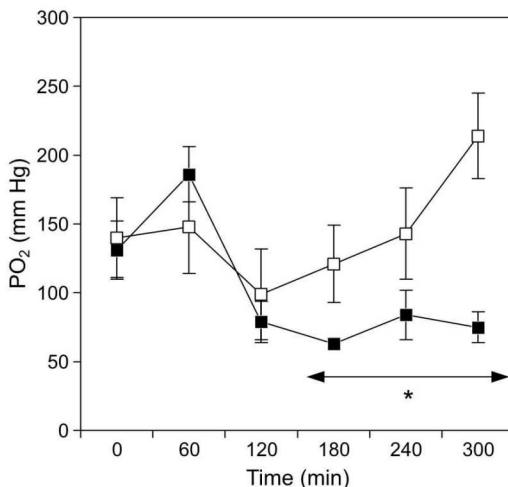


FIG. 3. Prevention of deterioration of arterial oxygenation by BM-573 in pigs subjected to endotoxin shock. Time course of PO_2 in the control animals (Endo group, closed squares) and in BM-573-treated animals (Anta group, open squares). Data are presented as means for 6 animals \pm S.E.M. P values for time, group, and time-group interaction is given by a two way ANOVA for repeated measures: $*P < 0.05$ for the group effect.

compliance changes were comparable in both groups. Moreover, arterial oxygen tension in the Anta group remained significantly higher than in the Endo group ($\text{PaO}_2 241 \pm 31$ mm Hg vs. 74 ± 12 mm Hg at the end of the experimental protocol) (Fig. 3). Overexpression of TXB_2 , expected to appear 30 min after the endotoxin insult, was prevented in the treated group confirming the TXSI activity. Finally, our results confirmed BM-573 anti-platelet activity, since the administration of the drug also prevented *ex vivo* platelet aggregation induced by arachidonic acid. We used a similar experimental protocol to investigate BM-573 effects on right ventricular-arterial coupling and mechanical efficiency. For that purpose, right ventricular pressure-volume loops were recorded using a conductance catheter and end-systolic ventricular elastance was periodically assessed by varying right ventricular preload. Our results demonstrated that BM-573 prevented the decrease in right ventricular myocardial efficiency and right ventricular dilatation. However, the drug could not prevent the loss of homeometric regulation and the alterations in right ventricular-arterial coupling. We concluded that during the early phase of endotoxic shock, concomitant inhibition of TXA_2 synthesis and TXA_2 receptors by BM-573 inhibited pulmonary vasoconstrictor response, prevented deterioration in arterial oxygenation (Fig. 3), decrease in right ventricular mechanical efficiency and right ventricular dilation. Drugs with this type of activity should have a potential therapeutic use in the treatment of endotoxic shock.

Effect in a Porcine Model of Acute Pulmonary Embolism (17)

Acute pulmonary embolism with hemodynamic instability carries a high mortality rate and is associated with sudden death. Up to 90% of the non-survivors of pulmonary embolism succumb within 2 h after the onset of symptoms (45). Abrupt increase in pulmonary vascular resistance involving mechanical obstruction is worsened by acute release

of vasoconstrictor mediators, leading to acute right heart failure and ventricular-vascular uncoupling (43). Given the potential role of TXA₂ in the pathogenesis of pulmonary vascular abnormalities in the acute phase of pulmonary embolism, the following experiment was undertaken to investigate the effects of BM-573 in an animal model of acute pulmonary embolism. Six anesthetized pigs were infused with placebo (Placebo group). The results were compared with those obtained in 6 other pigs receiving a continuous infusion of BM-573 at a rate of 10 mg/kg/h (BM-573 group). Pulmonary embolization with 0.3 g/kg autologous blood clots was carried out 30 min after the start of the infusion. Pulmonary vascular properties were studied with a four-element windkessel model, while right ventricular pressure-volume loops were recorded using a conductance catheter and end-systolic ventricular elastance was periodically assessed by varying right ventricular preload. Hemodynamic data included assessment of right ventricular-arterial coupling and efficiency. The measurements were collected at the baseline and during the experiment, at every 30 min for 4 h. Blood samples were collected to assess gas exchange, TXA₂ and prostacyclin plasma levels, and to evaluate platelet aggregation. Mean pulmonary arterial pressure in the Placebo group increased significantly more than in the BM-573 group, mainly because of an additional increase in pulmonary vascular resistance. In the BM-573 group, the homeometric adjustment was sufficient to regulate RV output, whereas in the Placebo group further regulation by the Frank-Starling mechanism was necessary. In other words, increment in afterload in this group was coupled with preload recruitment to maintain RV performance. Moreover, animals pretreated with BM-573 experienced no significant alteration in RV mechanical efficiency, whereas in the Placebo group, mechanical efficiency was significantly reduced. This study indicated that infusion of BM-573 resulted in a complete prevention of *ex vivo* platelet aggregation induced by arachidonic acid or U-46619. This finding confirmed the efficacy of BM-573 as a potent TXA₂ receptor antagonist (10,41). Plasma levels of TXB₂ and 6-keto-PGF_{1 α} , the respective stable metabolites of TXA₂ and prostacyclin, confirmed that massive release of TXA₂ preceded prostacyclin release. Regarding the TXA₂/prostacyclin balance, our results demonstrated that BM-573 blocked TXA₂ synthesis but preserved prostacyclin release (Fig. 4). Finally, hypoxemia induced by blood clots embolization was not prevented by BM-573 pretreatment. In conclusion, in this animal model of acute pulmonary embolism, infusion of BM-573 reduced pulmonary vasoconstriction. As a result, right ventricular-vascular coupling values were maintained at a maximal efficiency level.

Prevention of Myocardial Infarction Induced by Coronary Thrombosis in Pigs (41)

Cardiovascular pathologies that remain the leading cause of mortality in Western countries, include several diseases, such as ischemic cardiopathy of which myocardial infarction represents the most severe form. In myocardial ischemia due to plaque rupture or thrombosis, it has been shown that TXA₂ and other platelet vasoactive mediators are released to promote platelet aggregation and vasoconstriction (16,23,24). Therefore, we evaluated the activity of BM-573 in a porcine model of myocardial infarction induced by topical ferric chloride (FeCl₃) application to the left anterior descending (LAD) coronary artery. In this study, all control animals ($n = 6$) developed an occlusive thrombus of the LAD coronary artery. The mean infarct size, revealed by triphenyltetrazolium chloride (15), and the area at risk, evidenced by Evans blue, corresponded to 35.3 ± 2.2 and

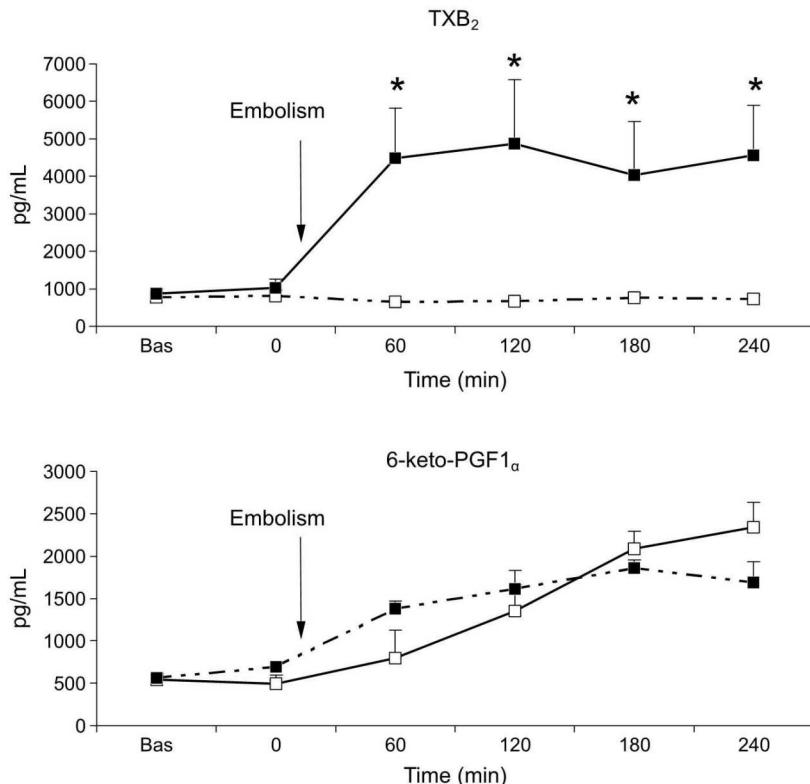


FIG. 4. Time course of TXB₂ and 6-keto-PGF₁α plasma levels in pigs subjected to pulmonary embolization. Placebo group (closed squares) and BM-573-treated group (open squares). Data are presented as means for 6 animals per group \pm S.E.M. * Indicates significant ($P < 0.01$) difference between groups at the given time (Wilcoxon test).

36.9 \pm 2.1% of the left ventricular mass, respectively. In the BM-573 group ($n = 6$), a drug infusion (at 10 mg/kg/h) started 30 min before FeCl₃ application and was continuously infused until 6 h after strip application. Four of these animals did not develop coronary thrombus and their myocardium remained healthy. Histopathological examination of FeCl₃-injured coronary artery revealed an occlusive and adherent thrombus in the control group, while pretreatment with BM-573 prevented thrombus formation (Fig. 5). In infarcted zones desmin staining was lacking and muscle disorganization was obvious. Depletion of myocardial ATP content was observed in the myocardial necrotic region of the control group, but not in the myocardial samples of BM-573-treated pigs that did not develop myocardial infarction. When BM-573 prevented LAD artery occlusion, the area under the curve of plasmatic troponin T was reduced by 77% over 6 h. In this investigation, we demonstrated that BM-573 prevented the formation of an occlusive thrombus in the LAD coronary artery of the treated pigs. These data suggest that BM-573 could be useful in acute coronary syndrome and during coronary angioplasty.

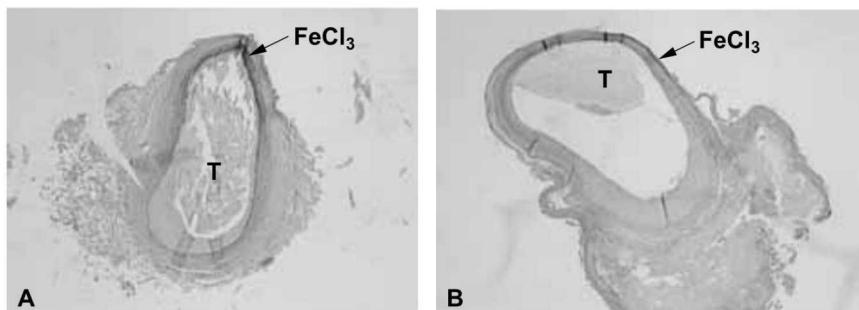


FIG. 5. Light micrographs of ferric chloride-induced thrombi from vehicle-treated group (A) and BM-573 treated group (10 mg/kg/h, i.v.) (B). Thrombus is indicated on picture by letter T. Both sections were stained with hematoxylin and eosin (20 \times).

CONCLUSIONS

Preliminary *in vitro* studies with BM-573 demonstrated that this drug is a strong ligand at human platelet TXA₂ receptor and an inhibitor of human platelet TXA₂ synthase. Moreover, BM-573 had no hypoglycemic or diuretic effects and did not prolong bleeding time. These properties were confirmed in further pharmacological studies designed to evaluate the use of BM-573 as an alternative strategy to prevent the prothrombotic action of TXA₂ without blocking cyclooxygenase. These experiments indicated that BM-573 had potent antiplatelet and antithrombotic activity in a rat model of arterial thrombosis. It relaxed rat aorta and guinea pig trachea, pre-contracted by U-46619, and prevented pulmonary hypertension, induced in pigs by U-46619, early sepsis or pulmonary embolism. Finally, BM-573 had protective effects in a pig myocardial infarction model. We believe, therefore, that BM-573 and drugs with similar pharmacological effects could offer new therapeutic opportunities in several pathologies such as asthma, sepsis, pulmonary embolism, thrombotic disorders or ischemic cardiopathy.

Addendum. U-46619, 9,11-dideoxy-9,11-methanoepoxy-prostaglandin F₂; SQ-29548: [1S-[1 α ,2 β (5Z),3 β ,4 α]-7-[3-[[2-[(phenylamino) carbonyl]hydrazino]methyl]-7-oxabicyclo[2.2.1]hept-2-yl]-5-heptenoic acid.

REFERENCES

1. Bhagwat SS, Hamann PR, Still WC, Bunting S, Fitzpatrick FA. Synthesis and structure of the platelet aggregation factor thromboxane A₂. *Nature* 1985;315:511-513.
2. Brezinski ME, Yanagisawa A, Lefer AM. Cardioprotective actions of specific thromboxane receptor antagonist in acute myocardial ischemia. *J Cardiovasc Pharmacol* 1987;9:65-71.
3. Cocks TM, King SJ, Angus JA. Glibenclamide is a competitive antagonist of the thromboxane A₂ receptor in dog coronary artery *in vitro*. *Br J Pharmacol* 1990;100:375-378.
4. Coleman RA, Humphrey PP, Kennedy I, Levy GP, Lumley P. Comparison of the actions of U-46619, a prostaglandin H₂-analogue, with those of prostaglandin H₂ and thromboxane A₂ on some isolated smooth muscle preparations. *Br J Pharmacol* 1981;73:773-778.

5. Collins BJ, Blum MG, Parker RE, et al. Thromboxane mediates pulmonary hypertension and lung inflammation during hyperacute lung rejection. *J Appl Physiol* 2001;90:2257–2268.
6. D’Orio V, Lamberton B, Detry O, et al. Pulmonary impedance and right ventricular-vascular coupling in endotoxin shock. *Cardiovasc Res* 1998;38:375–382.
7. De Clerck F, Beetens J, Van de WA, Vercammen E, Janssen PA. R 68 070: Thromboxane A₂ synthetase inhibition and thromboxane A₂/prostaglandin endoperoxide receptor blockade combined in one molecule. II. Pharmacological effects *in vivo* and *ex vivo*. *Thromb Haemost* 1989;61:43–49.
8. Dogne JM, de Leval, X, Kohl P, et al. Pharmacological evaluation of the novel thromboxane modulator BM-567 (I/II). Effects of BM-567 on platelet function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003;68:49–54.
9. Dogne JM, de Leval, X, Neven P, et al. Effects of a novel non-carboxylic thromboxane A₂ receptor antagonist (BM-531) derived from torasemide on platelet function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2000;62:311–317.
10. Dogne JM, Hanson J, de Leval, X, et al. Pharmacological characterization of N-tert-butyl-N’-[2-(4’-methyl-phenylamino)-5-nitrobenzenesulfonyl]urea (BM-573), a novel thromboxane A₂ receptor antagonist and thromboxane synthase inhibitor in a rat model of arterial thrombosis and its effects on bleeding time. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;309:498–505.
11. Dogne JM, Wouters J, Rolin S, et al. Design, synthesis and biological evaluation of a sulfonylcyanoguanidine as thromboxane A₂ receptor antagonist and thromboxane synthase inhibitor. *J Pharm Pharmacol* 2001;53:669–680.
12. Eikelboom JW, Hirsh J, Weitz JI, Johnston M, Yi Q, Yusuf S. Aspirin-resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke, or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events. *Circulation* 2002;105:1650–1655.
13. Ellis EF, Oelz O, Roberts LJ, et al. Coronary arterial smooth muscle contraction by a substance released from platelets: Evidence that it is thromboxane A₂. *Science* 1976;193:1135–1137.
14. Fiddler GI, Lumley P. Preliminary clinical studies with thromboxane synthase inhibitors and thromboxane receptor blockers. A review. *Circulation* 1990;81:169–178.
15. Fishbein MC, Meerbaum S, Rit J, et al. Early phase acute myocardial infarct size quantification: Validation of the triphenyl tetrazolium chloride tissue enzyme staining technique. *Am Heart J* 1981;101:593–600.
16. Fitzgerald DJ, Roy L, Catella F, Fitzgerald GA. Platelet activation in unstable coronary disease. *N Engl J Med* 1986;315:983–989.
17. Ghysen A, Lamberton B, Dogne JM, et al. Effect of BM-573 [N-tertbutyl-N’-[2-(4’-methylphenylamino)-5-nitrobenzenesulfonyl]urea], a dual thromboxane synthase inhibitor and thromboxane receptor antagonist, in a porcine model of acute pulmonary embolism. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;310:964–972.
18. Granstrom E, Diczfalusy U, Hamberg M, Hansson G, Malmsten C, Samuelsson B. Thromboxane a2: Biosynthesis and effects on platelets. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 1982;10:15–58.
19. Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B. Thromboxanes: A new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:2994–2998.
20. Hamberg M, Svensson J, Wakabayashi T, Samuelsson B. Isolation and structure of two prostaglandin endoperoxides that cause platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974;71:345–349.
21. Hamm CW, Lorenz RL, Bleifeld W, Kupper W, Woer W, Weber PC. Biochemical evidence of platelet activation in patients with persistent unstable angina. *J Am Coll Cardiol* 1987;10:998–1006.
22. Heylen L, De Clerck F, Somers Y, Leysen JE. Thromboxane A₂ per prostaglandin endoperoxide (TXA₂/PG-END) receptor binding properties in human platelets of ridogrel, a combined TXA₂ synthase inhibitor — TXA₂ per PG-END receptor antagonist. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1991;2:617–621.
23. Hirsh PD, Firth BG, Campbell WB, Dehmer GJ, Willerson JT, Hillis LD. Effects of provocation on transcardiac thromboxane in patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1983;51:727–733.
24. Hirsh PD, Hillis LD, Campbell WB, Firth BG, Willerson JT. Release of prostaglandins and thromboxane into the coronary circulation in patients with ischemic heart disease. *N Engl J Med* 1981;304:685–691.
25. Hock CE, Brezinski ME, Lefer AM. Anti-ischemic actions of a new thromboxane receptor antagonist, SQ-29,548, in acute myocardial ischemia. *Eur J Pharmacol* 1986;122:213–219.
26. Hoshino M, Sim J, Shimizu K, Nakayama H, Koya A. Effect of AA-2414, a thromboxane A₂ receptor antagonist, on airway inflammation in subjects with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:1054–1061.
27. Imamoto T, Terashita Z, Tanabe M, Nishikawa K, Hirata M. Protective effect of a novel thromboxane synthetase inhibitor, CV-4151, on myocardial damage due to coronary occlusion and reperfusion in the hearts of anesthetized dogs. *J Cardiovasc Pharmacol* 1986;8:832–839.

28. Kundu SK, Heilmann EJ, Sio R, Garcia C, Davidson RM, Ostgaard RA. Description of an *in vitro* platelet function analyzer — PFA-100. *Semin Thromb Hemost* 1995;21(Suppl 2):106–112.
29. Lambermont B, Ghysen A, Dogne JM, et al. Effects of BM-573, a novel thromboxane A₂ inhibitor, on pulmonary hemodynamics in endotoxic shock. *Arch Physiol Biochem* 2003;111:224–231.
30. Lambermont B, Ghysen A, Kolh P, et al. Effects of endotoxic shock on right ventricular systolic function and mechanical efficiency. *Cardiovasc Res* 2003;59:412–418.
31. Lambermont B, Kolh P, Dogne JM, et al. Effects of U-46619 on pulmonary hemodynamics before and after administration of BM-573, a novel thromboxane A₂ inhibitor. *Arch Physiol Biochem* 2003;111:217–223.
32. Lambermont B, Kolh P, Ghysen A, et al. Effect of a novel thromboxane A₂ inhibitor on right ventricular-arterial coupling in endotoxic shock. *Shock* 2004;21:45–51.
33. Lebrun P, Arkhammar P, Antoine MH, Nguyen QA, Hansen JB, Pirotte B. A potent diazoxide analogue activating ATP-sensitive K⁺ channels and inhibiting insulin release. *Diabetologia* 2000;43:723–732.
34. Ma H, Hara A, Xiao CY, et al. Increased bleeding tendency and decreased susceptibility to thromboembolism in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP(3). *Circulation* 2001;104:1176–1180.
35. Masereel B, Damas J, Fontaine J, et al. Thromboxane A₂ receptor antagonism in man and rat by a sulphonyl-cyanoguanidine (BM-144) and a sulphonylurea (BM-500). *J Pharm Pharmacol* 1999;51:695–701.
36. Needelman P, Wyche A, Raz A. Platelet and blood vessel arachidonate metabolism and interactions. *J Clin Invest* 1979;63:345–349.
37. Nijkamp FP, Moncada S, White HL, Vane JR. Diversion of prostaglandin endoperoxide metabolism by selective inhibition of thromboxane A₂ biosynthesis in lung, spleen or platelets. *Eur J Pharmacol* 1977;44:179–186.
38. Ogletree ML, Brigham KL. Effects of cyclooxygenase inhibitors on pulmonary vascular responses to endotoxin in unanesthetized sheep. *Prostaglandins Leukot Med* 1982;8:489–502.
39. Pawlowski NA, Kaplan G, Hamill AL, Cohn ZA, Scott WA. Arachidonic acid metabolism by human monocytes. Studies with platelet-depleted cultures. *J Exp Med* 1983;158:393–412.
40. Rolin S, Dogne JM, Michaux C, Delarge J, Masereel B. Activity of a novel dual thromboxane A₂ receptor antagonist and thromboxane synthase inhibitor (BM-573) on platelet function and isolated smooth muscles. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2001;65:67–72.
41. Rolin S, Petein M, Tchana-Sato V, et al. BM-573, a dual thromboxane synthase inhibitor and thromboxane receptor antagonist, prevents pig myocardial infarction induced by coronary thrombosis. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;306: 59–65.
42. Saldeen TG, Saldeen P, Nichols WW, Lawson DL, Nicolini FA, Mehta JL. Increased production of thromboxane A₂ by coronary arteries after thrombolysis. *Am Heart J* 1993;125:277–284.
43. Smulders YM. Pathophysiology and treatment of haemodynamic instability in acute pulmonary embolism: The pivotal role of pulmonary vasoconstriction. *Cardiovasc Res* 2000;48:23–33.
44. Stanke F, Cracowski JL, Chavanon O, et al. Glibenclamide inhibits thromboxane A₂-induced contraction in human internal mammary artery and saphenous vein. *Eur J Pharmacol* 1998;341:65–71.
45. Stein PD and Henry JW. Prevalence of acute pulmonary embolism among patients in a general hospital and at autopsy. *Chest* 1995;108:978–981.
46. Svensson J, Hamberg M, Samuelsson B. On the formation and effects of thromboxane A₂ in human platelets. *Acta Physiol Scand* 1976;98:285–294.
47. Tanaka T, Ito S, Higashino R, et al. A new thromboxane receptor antagonist, Z-335, ameliorates experimental thrombosis without prolonging the rat tail bleeding time. *Thromb Res* 1998;91:229–235.
48. The Ridogrel Versus Aspirin Patency Trial. Randomized trial of ridogrel, a combined thromboxane A₂ synthase inhibitor and thromboxane A₂ per prostaglandin endoperoxide receptor antagonist, versus aspirin as adjunct to thrombolysis in patients with acute myocardial infarction. The Ridogrel Versus Aspirin Patency Trial (RAPT). *Circulation* 1994;89:588–595.
49. Uchida T, Kido H, Yamanaga K, Okita M, Watanabe M. A novel loop diuretic, torasemide, inhibits thromboxane A₂-induced contraction in the isolated canine coronary artery. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1992;45:121–124.
50. Watts IS, Wharton KA, White BP, Lumley P. Thromboxane (Tx) A₂ receptor blockade and TXA₂ synthase inhibition alone and in combination: comparison of anti-aggregatory efficacy in human platelets. *Br J Pharmacol* 1991;102:497–505.
51. Wise WC, Cook JA, and Halushka PV. Implications for thromboxane A₂ in the pathogenesis of endotoxic shock. *Adv Shock Res* 1981;6:83–91.