

Monitorización hemodinámica en un modelo de shock por reperfusión intestinal en rata

Ulibarrena, M. A.; García-Alonso, I.; Portugal, V.; García Redondo, B., y Méndez, J.

Laboratorio de Cirugía Experimental. Universidad del País Vasco. Lejona (Vizcaya).

RESUMEN

OBJETIVO: diseñar un modelo de monitorización hemodinámica en el síndrome de reperfusión intestinal, que pueda aplicarse a futuros ensayos terapéuticos.

DISEÑO EXPERIMENTAL: A) Tres grupos de 12 ratas, monitorizadas durante cuatro horas: 1) Control: sin isquemia intestinal; 2) Isquemia: se clampa durante 60 minutos la arteria mesentérica superior; 3) Suero Salino: además se perfunden 2 ml de suero salino en los 15 últimos minutos de la isquemia. Se monitorizan tensión arterial media, frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria y diuresis, y se evalúa la mortalidad a las 48 h. B) En el grupo control y en el grupo Suero Salino, se han obtenido gasometría arterial, hematimetría e iones plasmáticos, exanguinando animales al inicio y al final de la isquemia, y en los tiempos de reperfusión 5', 60' y 180'.

RESULTADOS: Mortalidad: 0% para la serie 1 y 83% para las series 2 y 3 ($p < 0,001$). Las variables hemodinámicas permanecieron estables durante la isquemia, mientras que al comenzar la reperfusión se produjo una caída brusca de la tensión arterial y de la diuresis, así como una elevación progresiva de las frecuencias cardíaca y respiratoria. Los otros parámetros medidos tampoco se alteraron durante la isquemia, pero durante la reperfusión se desarrolló acidosis metabólica ($\text{pH} = 7,15$; $p < 0,01$; $\text{HCO}_3 = 8$; $p < 0,01$), apareció hiperkaliemia (6 mEq/l ; $p < 0,01$) y el hematocrito ascendió (56%; $p < 0,01$).

CONCLUSIÓN: el modelo experimental resulta fiable y de fácil reproducción, permite una monitorización hemodinámica adecuada del shock producido en el síndrome de reperfusión intestinal, y parece apropiado para valorar el efecto de diferentes terapéuticas.

Palabras clave: isquemia-reperfusión, intestino, rata, shock, monitorización.

Ulibarrena MA, García-Alonso I, Portugal V, García Redondo B, Méndez J. Hemodynamic monitoring in a model of shock induced by intestinal reperfusion in the rat. Rev Esp Enferm Dig 1998;90:94-9.

INTRODUCCIÓN

Desde los años cincuenta se conoce que el daño tisular producido en el intestino durante un período de isquemia, se intensifica durante la reperfusión. Pero además, la reperfusión se acompaña de un deterioro hemodinámico (shock) y de la disfunción de diferentes órganos (hígado, riñón, pulmón, etc), pudiendo desembocar en un cuadro de fracaso multiorgánico y muerte.

En 1981 Granger y McCord propusieron que los radicales libres del oxígeno (RLO) eran los principales agentes patogénicos en el síndrome de reperfusión intestinal (1). Estas moléculas altamente reactivas provocan lesiones no solo directamente sobre los enterocitos y las células endoteliales, sino también mediante la activación de los PMN y el sistema inmune (2, 3). La existencia de un exceso de RLO durante la reperfusión se ha podido demostrar tanto por métodos directos (quimioluminiscencia, resonancia nuclear paramagnética (4-6) como indirectos (malondialdehído) (7). También se ha comprobado una mejoría de las lesiones tras administrar antioxidantes antes de la reperfusión (8, 9). En este sentido, diversos trabajos realizados en nuestro Laboratorio han demostrado que los antioxidantes administrados durante la fase de isquemia, inmediatamente antes de la reperfusión, mejoran las lesiones intestinales producidas por ésta y disminuyen la mortalidad.

Sin embargo, son escasas las publicaciones en las que se estudia la relación existente entre la producción de RLO y el shock, habitualmente irreversible, que se produce tras el SRI. El propósito de este trabajo ha sido diseñar un modelo en el que pudieran monitorizarse los parámetros hemodinámicos básicos y los gases sanguíneos en ratas sometidas a reperfusión intestinal.

MÉTODOS

Se han utilizado ratas Sprague-Dawley hembras de 200 g, no sometidas a ayuno previo. Los experimentos se han llevado a cabo siempre a la misma hora, con el fin de evitar las posibles modificaciones debidas a los ritmos biológicos circadianos, y siguiendo la normativa vigente sobre protección de los animales utilizados para experimentación.

Procedimientos quirúrgicos

Tras anestesiarse el animal mediante inoculación i.p. de Pentobarbital Sódico (30 mg/kg) y Diacepam (2,5 mg/kg),

Correspondencia:

IGNACIO GARCÍA-ALONSO MONTOYA. Lab. de Cirugía Experimental. Facultad de Medicina y Odontología. 48940 Lejona (Vizcaya).

Recibido: 4-VII-96.

Aceptado: 3-IX-97.

TABLA I
Valor predictivo de los parámetros hemodinámicos

	Valor limitante	Valor predictivo (+)	Valor predictivo (-)	V. P. global	Sensibilidad	Especificidad
TAM (R-5)	< 80 mmHg	91%	71%	83%	83%	83%
TAM (R-15 a 30)	≤ 90 mmHg	95%	61%	78%	72%	91%
Fc	≥ 500 lpm	83%	76%	81%	91%	62%
Fr	> 100 rpm	79%	67%	72%	81%	54%
Diuresis	< 0,5 ml/kg/h	83%	61%	75%	79%	67%

Entre paréntesis se indica el momento de medición (minutos tras restablecer la perfusión intestinal); donde no se indica nada, se refiere a cualquier momento del estudio.

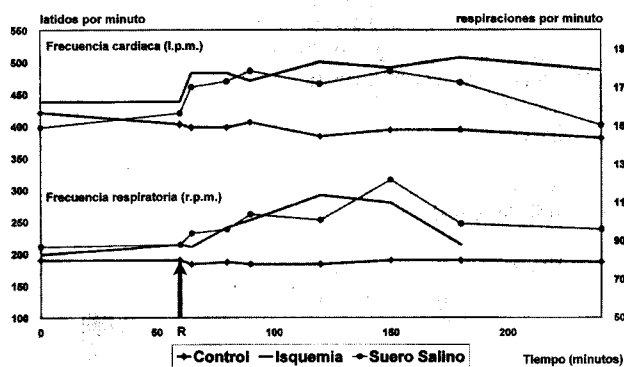


FIG. 2.— Curvas de frecuencia cardíaca y frecuencia respiratoria. En los animales sometidos a isquemia intestinal, la reperfusión se acompaña de una brusca elevación de la frecuencia cardíaca (arriba) y taquipnea progresiva (abajo), que se mantienen durante todo el experimento. Las diferencias frente al grupo control son significativas.

valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, valor global, sensibilidad y especificidad.

RESULTADOS

Mortalidad y supervivencia

Las maniobras quirúrgicas necesarias para provocar la isquemia mesentérica se han tolerado perfectamente, no derivándose de ellas mortalidad alguna. En cambio, la reperfusión tras 60 minutos de clampaje mesentérico ha provocado una mortalidad del 83,3%; tasa que no experimenta variaciones tras la administración i.v. de 2 ml de suero salino.

Parámetros hemodinámicos

Durante la fase de isquemia intestinal los parámetros estudiados no se han modificado significativamente. En cambio, tras el desclampaje de la arteria mesentérica se observa una caída importante de la TAM seguida de una recuperación variable durante los siguientes 25 minutos. A partir de

ese momento la TAM bien se mantiene estable, o bien da paso a un deterioro progresivo hasta el fallecimiento del animal (Fig. 1). Dentro de cada grupo, se observa que la TAM es netamente inferior en los animales que fallecen que en los que sobreviven (Fig. 1). Las cifras de TAM en los minutos 5, 15 y 30 post-reperfusión muestran el mayor valor predictivo (tabla I).

La frecuencia cardíaca se ha elevado progresivamente durante la reperfusión (Fig. 2), observándose unas cifras significativamente mayores en aquellos animales que fallecen; de tal manera que superar los 500 l.p.m. adquiere un importante valor predictivo de mortalidad (tabla I). A pesar de que la frecuencia respiratoria permaneció prácticamente constante en el grupo control y durante la fase de isquemia (FR < 96 r.p.m.), durante la reperfusión se instauró una taquipnea progresiva (Fig. 2). Valores superiores a 120 r.p.m. alcanzan un valor predictivo de mortalidad del 80% (tabla I).

La diuresis, que se ha mantenido constante a lo largo de todo el experimento en el grupo control (0,75 ml/kg/h; rango 0,5-1) y durante la isquemia (1 ml/kg/h; rango 0,25-1,5), casi desapareció durante la reperfusión (0,1 ml/kg/h; rango 0-0,5; $p < 0,001$). No se han observado diferencias entre los animales que viven y los que mueren.

La administración de suero salino durante los últimos minutos de isquemia no ha tenido repercusiones valorables en ninguno de los parámetros hemodinámicos estudiados.

Parámetros analíticos

Durante la isquemia el pH ha permanecido estable, aunque el bicarbonato disminuyó significativamente (25,5 vs 17 mEq/l; $p < 0,01$). Durante la primera hora de reperfusión, el pH cayó bruscamente (7,43 vs 7,15; $p < 0,01$) y el bicarbonato se redujo a la mitad (17 vs 8 mEq/l). A partir de ese momento se pudo observar una cierta recuperación, elevándose el pH a 7,21 y el bicarbonato a 14,5 mEq/l (Fig. 3). Los gases arteriales no se han visto afectados a lo largo de la experiencia.

En cuanto al ionograma, destaca la instauración de una hiperkaliemia progresiva, que se inicia durante la isquemia (4,8 mEq/l), se exagera al iniciarse la reperfusión con un pico muy marcado a los cinco minutos (6 mEq/l) seguido de

se introdujo un catéter de teflon transparente 16G en la tráquea, y otro de 21G en la vejiga. A continuación, se expusieron la arteria y vena femorales izquierdas, introduciéndose un catéter de teflon 22G en la arteria y una aguja 27G en la vena.

Mediante un polígrafo (Hewlett Packard 7754 B System) se registró el trazado electrocardiográfico y la tensión arterial. La vía arterial se mantuvo permeable mediante la infusión de bolus de 0,05 ml de suero fisiológico heparinizado (4 UI/ml) cada vez que la gráfica dibujada mostraba parámetros de amortiguación.

La isquemia intestinal se indujo mediante clampaje directo de la arteria mesentérica superior en su salida de la aorta (10). En los casos indicados, veinte minutos antes de fina-

lizar la isquemia se inició la infusión de 2 ml de suero fisiológico a través de la vena femoral (133 µl/min). Cumplidos 60 minutos de isquemia se reabrió la laparotomía, se retiraron los clips vasculares (comprobando el restablecimiento del flujo mesentérico) y se volvió a suturar la herida quirúrgica.

La monitorización de la tensión arterial y EKG se prolongó durante las tres primeras horas de reperfusión. Finalizado ese período, se retiró el catéter arterial y se ligó el vaso.

Series experimentales

Se han considerado tres series. En el grupo control se llevaron a cabo todos los procedimientos quirúrgicos descritos, pero los clamps no se dejaron colocados. Los animales del grupo isquemia fueron sometidos a 60 minutos de clampaje de la arteria mesentérica superior. En el grupo salino, cada animal recibió 2 ml de suero salino a través de la vena femoral antes de la reperfusión intestinal.

Parámetros analizados

Se han estudiado tres tipos de parámetros: hemodinámicos, analíticos sanguíneos y supervivencia. La tensión arterial media (TAM), la frecuencia cardíaca (FC), la frecuencia respiratoria (FR) y la diuresis se han registrado al inicio del procedimiento, a los 30 y 60 minutos de establecida la isquemia y a los 5, 15, 30, 60, 90, 120 y 180 minutos tras la reperfusión. La TAM se ha calculado según la fórmula: $TA_p + 1/3 (TA_s - TA_p)$.

Los parámetros analíticos se han estudiado en grupos de diez animales, al inicio y fin de la isquemia y durante la reperfusión en el minuto 5, 60 y 180. Antes de sacrificar al animal se han extraído 2,5 ml de sangre arterial para hematimetría (hemoglobina, hematocrito, leucocitos y plaquetas), electrolitos (Na y K) y gasometría (pH, pO₂, pCO₂, HCO₃). Estos análisis se realizaron exclusivamente en el grupo control y en el salino.

La tasa de mortalidad y la supervivencia se han valorado en doce animales de cada serie durante las primeras 48 h, ya que todos los animales que fallecen en este modelo experimental lo hacen dentro de dicho período.

Tratamiento estadístico

Para el procesamiento y análisis estadístico de los datos se ha utilizado el programa R-Sigma®. Las tasas de mortalidad se han comparado mediante el test exacto de Fisher, mientras que las curvas de supervivencia se han estudiado con la prueba de Kaplan-Meier. El test de Kolmogorov-Smirnov ha permitido determinar que ninguna de las demás variables sigue una distribución normal, por lo que su estudio se ha llevado a cabo mediante el test de la U de Mann-Whitney. Todas las pruebas estadísticas se han realizado con contraste bilateral y aceptando como significativo un valor de $p < 0,05$.

El valor pronóstico de mortalidad de los parámetros hemodinámicos se ha evaluado mediante la determinación del

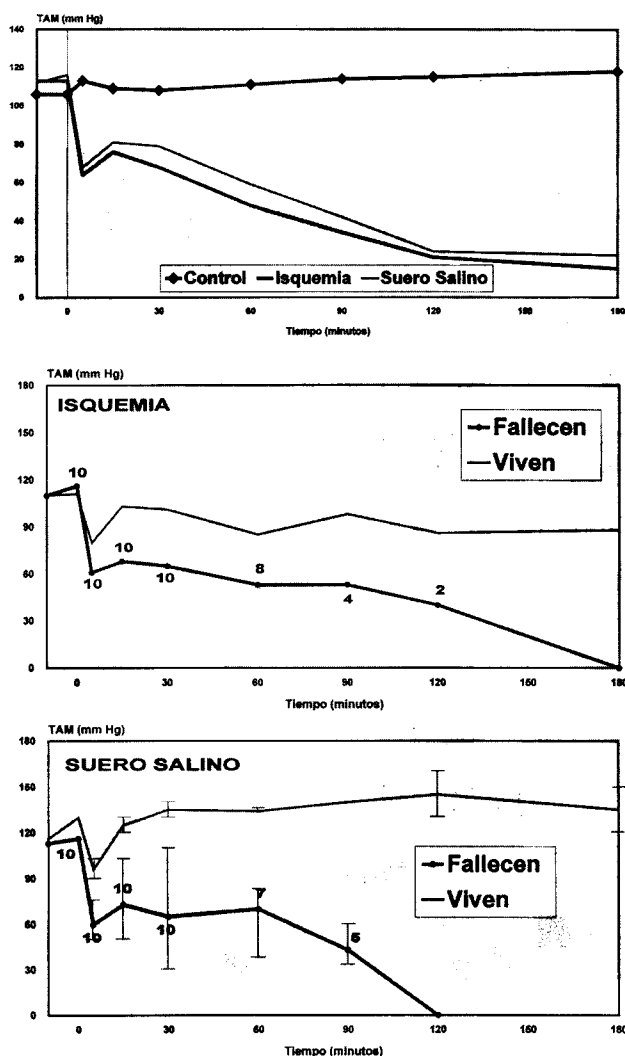


FIG. 1.— Curvas de Tensión Arterial media. Se aprecia el brusco descenso provocado por la restauración del flujo sanguíneo al intestino isquémico (superior). En los animales que sobreviven este descenso es menos pronunciado y se puede observar una rápida recuperación (medio e inferior; los números representan los animales todavía vivos del grupo en que fallecen).

se lleve a cabo una monitorización similar a la nuestra, probablemente debido a la disparidad de modelos y objetivos de los diferentes trabajos (25-30). Si nos fijamos en los trabajos de Lefer, aquellos que muestran una mayor similitud en el diseño experimental, dicho grupo objetivó una marcada hipotensión durante la reperfusión. Sin embargo, ningún animal recupera la TAM en los primeros minutos de la reperfusión y, por tanto, fallecen (31). A nivel bioquímico también constatan la elevación del hematocrito durante la reperfusión, pero no analizan otros parámetros, probablemente más fiables para definir el estado de shock, como son el pH y el bicarbonato. En nuestro modelo, durante la fase de reperfusión, hemos podido demostrar que los animales, además de hipotensión, experimentan acidosis metabólica, oliguria, taquicardia y taquipnea.

Así pues, hemos procurado desarrollar un modelo de monitorización del shock basado en nuestro modelo previo de isquemia-reperfusión. Consideramos que este objetivo se ha cumplido, ya que se han conseguido datos claros y fiables sobre la situación hemodinámica del animal, sin alterar la evolución ni la mortalidad de la isquemia-reperfusión intestinal. Y lo que nos parece más importante, estos resultados se han obtenido manteniendo la simplicidad original del modelo, lo que nos permitirá valorar si el efecto beneficioso de ciertos antioxidantes sobre la mortalidad (demostrado en trabajos previos de este Laboratorio) es debido a la disminución de la lesión mucosa intestinal, a una mejoría de la situación hemodinámica, o a ambas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Granger DN, Rutili G, McCord JM. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology* 1981;81:22-9.
2. Lefer AM, Tsao PS, Lefer DJ. Role of endothelial dysfunction in the pathogenesis of reperfusion injury following myocardial ischemia. *FASEB J* 1991;5:2029-34.
3. Lucchesi BR. Modulation of leukocyte-mediated myocardial reperfusion injury. *Annu Rev Physiol* 1990;52:561-76.
4. Roldán EJA, Pinus CR, Turrens JF, Boveris A. Chemiluminescence of ischaemic and reperfused intestine *in vivo*. *Gut* 1989;30:184-7.
5. Defraigne J, Franssen C, Pincemail J, Defechereux C, Canivet C, Philippart C, Serteyn D, Deby C, Meurise M. *In vivo* direct detection of free radicals in reperfused rabbit kidney by spin trapping with nitron PBN. *Europ Surg Res* 1990;22:68-9.
6. Kunz R, Brune H, Marzinzig M, Beger H. A direct evidence of free radical production during rat liver ischemia and reperfusion by electron spin resonance *in vivo*. *Europ Surg Res* 1990;22:89-90.
7. Ogilvie AC, Groeneveld ABJ, Straub JP, Thijs LG. Plasma lipid peroxides and antioxidants in human septic shock. *Inten Care Med* 1991;17:40-4.
8. Pincemail J, Deby-Dupont G, Lamy M. Biochemical alterations in ischemia and reperfusion. In: Vincent JL (ed): *Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine* 1992. Berlin: Springer-Verlag; 1992. p. 105.
9. Holgado MM, Refoyo AE, Mariño EH, Martín-Rollan C, García-García J, Macías JFN. Efecto de los inhibidores de la xantina-oxidasa sobre el pronóstico de la isquemia intestinal aguda. *An Med Intern* 1989;6:177-82.
10. Bilbao J, García-Alonso I, Portugal V, Barceló P, Ortiz J, Méndez J. Utilidad terapéutica de fármacos antioxidantes en el síndrome de reperfusión intestinal experimental. *Rev Esp Enferm Dig* 1991;80:237-41.
11. Ortiz J, García-Alonso I, Portugal V, Méndez J. Influencia del peso corporal y del periodo de isquemia mesentérica aguda en la mortalidad de ratas sometidas a revascularización intestinal. *Rev Esp Enf Ap Digest* 1990;77:263-7.
12. García-Alonso I, Ortiz J, Basañez A, Portugal V, Méndez J. Cuantificación de las lesiones en el síndrome de revascularización intestinal: método morfométrico. *Gastr Hepat* 1990;13:274-9.
13. Ortiz-Lacorzana J, García-Alonso I, Basañez A, López de Tejada I, Barberá-Guillem E, Méndez J. Modificaciones lesionales en la revascularización intestinal experimental mediante inmunosupresión. *Cir Esp* 1990;48:305-9.
14. Ortiz-Lacorzana J, García-Alonso I, Apecechea A, Iturburu I, Lopez de Tejada I, Méndez J. The immune system and oxygen-derived free radical in small bowel reperfusion injury in the rat. *Res Surg* 1990;2(3):106-11.
15. Bilbao J, García-Alonso I, Portugal V, Baeceló P, Apecechea A, Méndez J. Eficacia de tratamientos antioxidantes (ácido fólico y alfatocoferol) en las lesiones intestinales inducidas por reperfusión. *Cir Esp* 1992;51:262-6.
16. Park PO, Haglund U, Bulkley GB, Fält K. The sequence of development of intestinal tissue injury following strangulation ischemia and reperfusion. *Surgery* 1990;107:574-80.
17. Aoki N, Siegfried M, Tsao P, Lento P, Lefer AM. Beneficial mechanisms of action of a prostacyclin enhancing agent in splanchnic artery occlusion shock. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1988;60:275-89.
18. Karasawa A, Rochester JA, Ma X, Lefer AM. Protection of endothelial damage and systemic shock by benidipine, a calcium antagonist, in rats subjected to splanchnic ischemia and reperfusion. *Circ Shock* 1991;33:135-41.
19. Furlan LE, Johnson G III, Siegfried M, Lefer AM. Protective effects of the specific thromboxane receptor antagonist (+)-S145Na in splanchnic artery occlusion shock in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1990;253:525-9.
20. Karasawa A, Rochester JA, Lefer AM. Effects of adenosine, an adenosine-A1 antagonist, and their combination in splanchnic occlusion shock in rats. *Circ shock* 1992;36:154-61.
21. Reilly PM, Bulkley GB. Vasoactive mediators and splanchnic perfusion. *Crit Care Med* 1993;21:S55-S68.
22. Antonsson JB, Fiddian-Green RG. The role of the gut in shock and multiple system organ failure. *Eur J Surg* 1991;157:3-12.
23. The ACCP/SCCM consensus conference committee. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* 1992;101:1644-55.
24. Ahren C, Haglund V. Mucosal lesions in the small intestine of the cat during low flow. *Acta Physiol Scand* 1973;88:1-9.

25. Bitterman H, Aoki N, Lefler AM. Anti-shock effect of human superoxide dismutase in splanchnic artery occlusion (SAO) shock. *Proc Soc Exp Biol Med* 1988;188:265-71.
26. Schmeling DJ, Caty MG, Oldham KT, Guice KS, Hinshaw DB. Evidence for neutrophil-related acute lung injury after intestinal ischemia-reperfusion. *Surgery* 1989;106:195-201.
27. Lento PH, Saukkonen K, Aoki N, Lefler AM, Slivjak MJ. Beneficial effects of a specific leucotriene-receptor-antagonist in splanchnic artery occlusion shock. *Eur J Pharmacol* 1989;165:241-9.
28. Aoki N, Lefler AM. Protective effects of thromboxane receptor blockade in splanchnic artery occlusion shock. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1988;10:413-8.
29. Johnson G III, Lefler AM. Protective effects of a novel 21-aminosteroid during splanchnic artery occlusion shock. *Circ Shock* 1990;30:155-64.
30. Aoki N, Siegfried M, Tsao P, Lefler A. Acute effects of unsaturated fatty acids in splanchnic artery occlusion shock. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1989;37:89-95.
31. Lefler AM. Significance of lipid mediators in shock states. *Circ Shock* 1989;27:3-12.

Hemodynamic monitoring in a model of shock induced by intestinal reperfusion in the rat

Ulibarrena, M. A.; García-Alonso, I.; Portugal, V.; García Redondo, B., and Méndez, J.

Laboratory of Experimental Surgery. University of The Basque Country. Lejona (Vizcaya), Spain.

ABSTRACT

OBJECTIVE: an experimental model to monitor hemodynamics during intestinal reperfusion syndrome is presented.

EXPERIMENTAL DESIGN: A) Three groups of rats were monitored during four hours: 1) Control: sham operated, 2) Ischemic: clamping the superior mesenteric artery for 60', and 3) Saline: adding 2 ml of saline during the last 15 minutes of ischemia. Blood mean pressure, heart rate, breath rate and diuresis are monitored, while mortality is assessed 48 hours later. B) Blood gases, haematimetry and electrolytes were assessed both in control animals and in rats subjected to intestinal ischemia and reperfusion (at the beginning and concluding the ischemic period, and 5', 60' and 180' following reperfusion).

RESULTS: mortality rate was 0% for control animals, while 83% for both ischemic-reperfused groups ($p < 0.01$). Hemodynamic parameters remained stable during intestinal ischemia. Starting reperfusion, blood pressure and diuresis dropped sharply, while heart and breath rates showed a steady increase. The other parameters assessed also remained constant during ischemia. However, during reperfusion acidosis progressed ($\text{pH} = 7.15$, $p < 0.01$; $\text{HCO}_3^- = 8$, $p < 0.01$), hyperkalaemia appeared (6 mEq/l , $p < 0.01$), and haematocrit rose (56% , $p < 0.01$).

CONCLUSION: this experimental model is easy to establish, allows an appropriate hemodynamic monitoring of shock during intestinal reperfusion syndrome, and seems appropriate for considering the impact of drug intervention.

Key words: ischemia-reperfusion, gut, rat, shock, monitoring.

Ulibarrena MA, García-Alonso I, Portugal V, García Redondo B, Méndez J. Hemodynamic monitoring in a model of shock induced by intestinal reperfusion in the rat. Rev Esp Enferm Dig 1998;90:100-4.

INTRODUCTION

It is well known that intestinal injury induced by ischemia increases sharply following reperfusion. But besides mucosal damage, reperfusion impairs hemodynamics (shock) and the functionality of various organs (liver, lung, kidney, etc), which may lead to multiorgan failure and death.

In 1981 Granger y McCord proposed that oxygen free radicals (OFR) were the main pathogenic agents in intestinal reperfusion syndrome (1). These highly reactive molecules induce tissue damage not only by a direct effect on mucosa and endothelium, but by immune cell's activation as well (2, 3). OFR have been shown to increase during intestinal reperfusion both by direct [quimioluminescence, magnetic nuclear resonance (4-6)] and indirect techniques [malonyldialdehyde (7)]. It has also been assessed that antioxidant administration decreases reperfusion injury (8, 9). Our group has established that some of these drugs, if administered just prior to releasing the clamps, decrease the mucosal damage index and the mortality rate.

However, there are very few experiments concerning OFR and reperfusion-induced shock. The aim of this experience was to develop a model in which basic hemodynamics and blood gases could be monitored in rats subjected to reperfusion of the ischemic gut.

METHODS

Female Sprague-Dawley rats weighing 200 g have been used. They were allowed free access to food and water. Surgery has always been carried out at the same hour, to avoid interference from circadian rhythms. The laws about protection of laboratory animals have been carefully observed.

Surgical procedures

Animals were anesthetized with Sodium Pentobarbital (30 mg/kg) and diazepam (2,5 mg/kg) i.p., and teflon catheters were introduced into the trachea (16G) and the urethra (21G). Then, the left femoral vessels are dissected, the artery being cannulated with a 22G teflon catheter while a 27G needle is introduced into the vein.

Correspondence:

IGNACIO GARCÍA-ALONSO MONTOYA. Lab. de Cirugía Experimental. Facultad de Medicina y Odontología. 48940 Lejona (Vizcaya).

Received: 4-VII-96.

Accepted: 3-IX-97.

EKG and blood pressure (BP) are registered (Hewlett Packard 7754 B System), keeping the arterial catheter permeable by bolus infusion of 0.05 ml of heparinized saline (4 UI/ml) when needed.

Intestinal ischemia was induced by clamping the superior mesenteric artery as it arises from the aorta (10). Twenty minutes before reperfusion, 2 ml of saline were inoculated through the femoral vein (133 μ l/min) when indicated. After 60 minutes of ischemia, the clamps are removed, mesenteric pulse is assessed, and the laparotomy is closed.

EKG and BP are monitored for the first three hours post-reperfusion. Then, the arterial catheter is removed and the vessel is ligated.

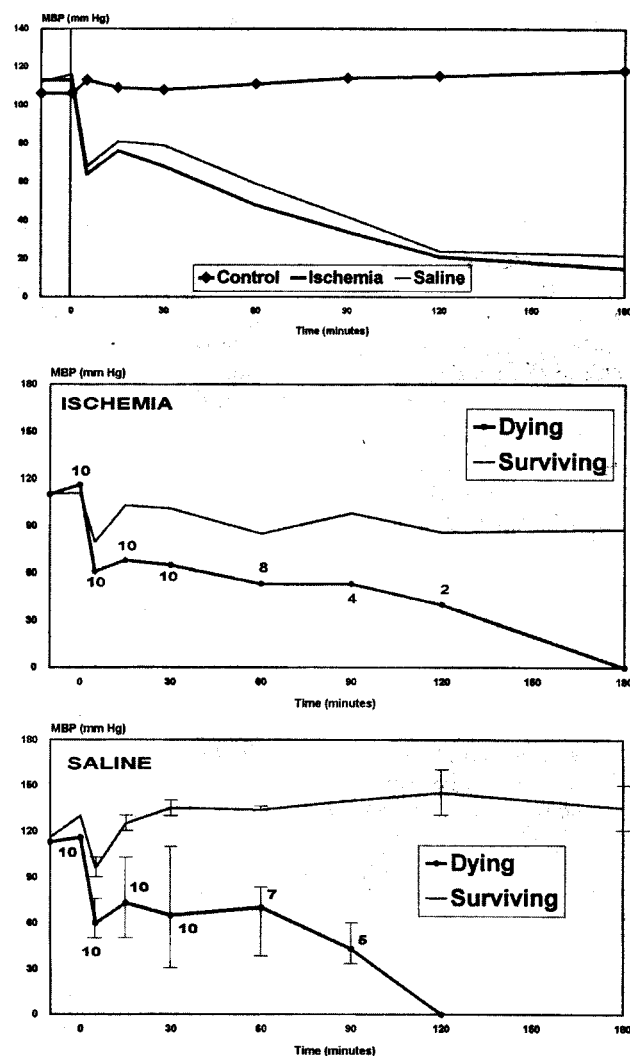


FIG. 1.— Mean Blood Pressure Curves. A dramatic decrease produced by the restoration of blood flow to the ischemic intestine is observed (above). In surviving animals, the drop is less pronounced and a quick recovery may be observed (medium and bottom; the numbers represent the number of animals still alive in the dying group).

Experimental series

Three series have been considered. In the control group, all the surgical procedures were carried out, but the clamp was not left in place. Animals in the ischemic group were subjected to clamping of the superior mesenteric artery for 60 minutes. In the saline group, each animal received 2 ml of saline through the femoral vein prior to reperfusion.

Parameters assessed

Three different sets of parameters have been assessed: hemodynamics, blood analysis and survival. Mean blood pressure (MBP), cardiac rate (CR), respiratory rate (RR) and diuresis have been recorded at the beginning of the experiment, 30 and 60 minutes after clamping, and 5, 15, 30, 60, 90, 120 y 180 minutes following reperfusion in twelve animals from each series. MBP has been calculated as $BP_D + 1/3 (BP_S - BP_D)$.

Blood samples were obtained from groups of ten animals at the beginning and the end of ischemia, and 5, 60 y 180 minutes following reperfusion. Before sacrificing the animal, 2.5 ml of arterial blood were withdrawn for haematometry (hemoglobin, haematocrit-reading, leukocytes, platelets), electrolytes analysis (sodium and potassium) and blood gases (pH, O_2 , CO_2 , HCO_3). These tests were performed in control and saline groups.

Twelve animals from each series were followed up for 48 hours to assess the mortality rate, as it was well established that deaths occur only in that early period.

Statistical analysis

Statistical analysis were performed with R-Sigma[®]. Mortality rates were compared with Fisher Exact Test, while survival curves were analyzed with Kaplan-Meier Test. As all the other parameters proved to be non-parametric variables (Kolmogorov-Smirnov), the Mann-Whitney Test was used. Values of "p" below 0.05 were regarded as significant.

The mortality prognosis value of the hemodynamic parameters has been assessed through the determination of positive and negative predictive value, global value, sensitivity and specificity.

RESULTS

Mortality and survival

Surgical maneuvers needed to monitor and induce ischemia are well tolerated, inducing no mortality. However, reperfusion following 60 minutes of mesenteric ischemia has induced a mortality rate of 83.3%; which has not been modified by infusion of 2 ml of saline.

Hemodynamic parameters

Hemodynamic parameters were not modified during the ischemic period. However, BMP dropped sharply just after

TABLE I
Predictive accuracy of hemodynamic parameters

	Border value	Predictive accuracy (+)	Predictive accuracy (-)	Total P.A.	Sensitivity	Specificity
MBP (R-5)	< 80 mmHg	91%	71%	83%	83%	83%
MBP (R-15 to 30)	≤ 90 mmHg	95%	61%	78%	72%	91%
CR	≥ 500 lpm	83%	76%	81%	91%	62%
RR	> 100 rpm	79%	67%	72%	81%	54%
Diuresis	< 0.5 ml/kg/h	83%	61%	75%	79%	67%

In brackets the time of measuring is indicated (minutes after establishing the intestinal reperfusion); where there is nothing indicated, it is referred to any moment of the study.

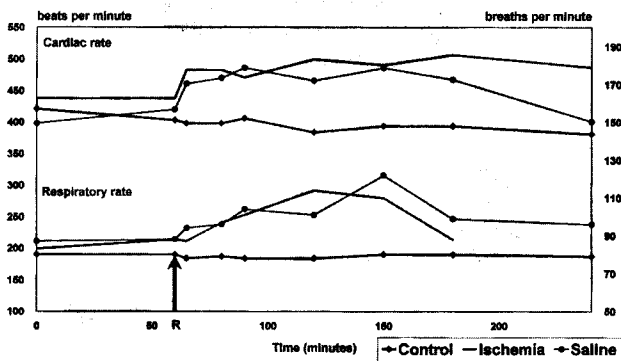


FIG. 2.— Cardiac and Respiratory Rate Curves. In those animals subjected to intestinal ischemia, reperfusion induces an abrupt increase in cardiac rate (above) and a progressive tachypnea (below). Differences with the control group are statistically significant.

starting reperfusion, partially recovering along the next 25 minutes. From there on, BMP remains more or less stable or undergoes a progressive deterioration until the animal dies (Fig. 1). BMP in surviving animals is clearly higher than in those which die. Measurements performed at 5, 15 and 30 minutes following reperfusion show the highest predictive value (table I).

CR has steadily increased during reperfusion (Fig. 2), with clearly higher values in those animals which die. And so, values over 500 beats/min reach a high predictive value (table I). Though RR remained fairly constant in the control group and during ischemia (< 96 breaths/min), a progressive tachypnea developed during reperfusion (Fig. 2). Rates over 120 breaths/min have demonstrated a predictive value of mortality of 80% (table I).

Diuresis remained constant through all the experiment in the control group (0.75 ml/kg/h; range 0.5-1.0) and during ischemia (1 ml/kg/h; range 0.25-1.5), but it was nearly abolished during reperfusion (0.1 ml/kg/h; range 0-0.5; $p < 0.001$). No difference was observed between surviving animals and those which died.

In all the hemodynamics parameters, no significant differences were found between the ischemic and saline groups.

Blood analysis

During ischemia pH remained stable, though plasmatic bicarbonate decreased significantly (25.5 vs 17 mEq/l; $p < 0.01$). During the first hour of reperfusion, pH dropped sharply (7.43 vs 7.15; $p < 0.01$) and bicarbonate was cut by half (17 vs 8 mEq/l). From there on, there was a mild recovery, with pH rising to 7.21 and bicarbonate to 14.5 mEq/l (Fig. 3). Blood gases were not significantly disturbed through all the experiment.

Regarding plasmatic electrolytes, the most striking observation was a progressive hyperkalaemia, starting during ischemia (4.8 mEq/l), with a marked peak five minutes after restoring blood flow (6 mEq/l), followed by a steady decrease (5.15 mEq/l). The sodium levels, in spite of a slight tendency to hyponatraemia, showed no significant changes.

During reperfusion, there was an increase in leukocytes (6,000/mm³ vs 8,000 /mm³), platelets (400,000/mm³ vs 800,000/mm³) and haematocrit reading (42% vs 55%), but only the later was statistically significant.

DISCUSSION

The aim of this experience was to develop a protocol of hemodynamic monitoring on a previous model of intestinal ischemia-reperfusion (11-15), which should be easy to perform, reproducible and reliable, so it would allow studying the shock induced by intestinal reperfusion, quantifying hemodynamic alterations.

A good experimental model should accomplish the following three characteristics: allow a sufficient monitoring, reach an appropriate rate of mortality, and provide a useful via to apply treatments.

Diuresis and MBP allow a reliable, direct and quick assessment of tissue perfusion, CR and MBP inform about circulatory repercussions of intestinal reperfusion syndrome, while RR offers indirect information about respiratory work and pulmonary involvement. On the other hand, blood analysis assess metabolic acidosis and electrolyte's disorders. As all these techniques can be carried out by one single investigator in each animal, we may conclude that the first requisite has been satisfactorily reached.

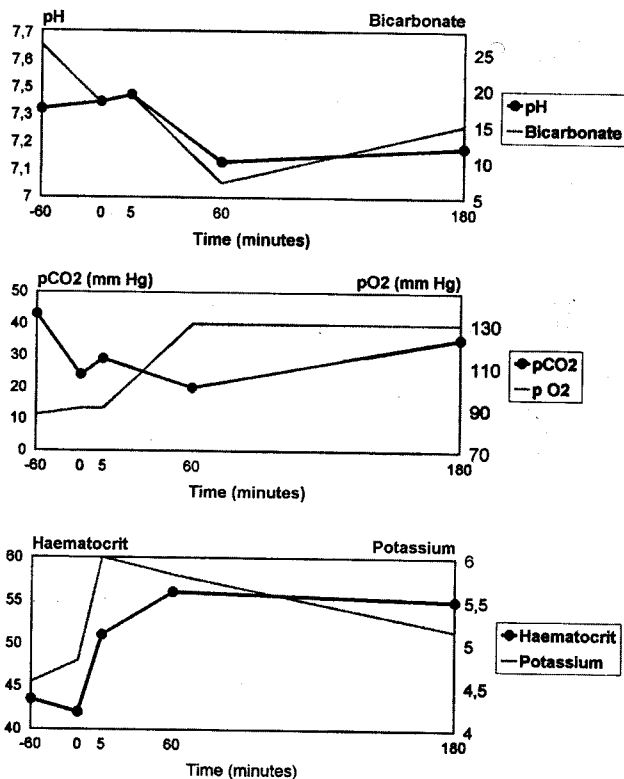


FIG. 3.— Analytical parameters in saline group. Acidosis is shown as a drop in both pH and bicarbonate (above). Changes in O₂ and CO₂ are not significant (medium). Haematocrit and potassium increase during reperfusion (below).

The second characteristic was a mortality rate such that variations induced by manipulation of the animals may easily reach statistical significance. As treatments improving the animal's condition are to be tested, the mortality rate should be high, but under 90% (16). In our model, the stress induced by monitoring maneuvers increased the mortality rate, so we had to reduce by half the ischemic period to keep a rate round 80%. Attempts to avoid the effect of this stress with mild sedation (diazepam) did not succeed (unpublished results). However, the ischemic periods used in our experiences are quite longer than those reported by other authors, which may be due to differences in the occlusion technique (17-20), and the great impact of animal weight, strain and sex on tolerance to intestinal ischemia (11).

Finally, the vascular access selected has proved to be easy to prepare, allows great volumes of infusion and does not affect the mortality rate. It has also been established that infusion of 2 ml of saline (probable vehicle for drugs) has no effects on the rat's hemodynamics.

Our second objective was to verify the appearance of a shock in this model of intestinal ischemia-reperfusion, and to establish its chronology. Though many authors talk about the existence of shock during intestinal reperfusion (21, 22), most of them base their statement just on the fact of finding hypotension. However, hypotension may not be considered synonymous of shock, as well established during the ACCP/

SCCM consensus conference on sepsis and organ failure (23). Besides hypotension, signs of tissue hypoperfusion such as metabolic acidosis and oliguria- are required to diagnose a shock.

Sixty minutes of intestinal ischemia is not aggression enough to seriously affect animal's hemodynamics, nor induce mortality at all. However, as the ischemic period progresses, both potassium and the haematocrit reading increase. Haglund (24) has published similar findings, which he imputes to increased capillary permeability (secondary to hypoperfusion and endothelium injury), to venous stasis, and to ileus.

On the other hand, during reperfusion all of the parameters analyzed show early and significant changes and mortality rate increases. Similar results have been described by other authors, but involving only part of our parameters. We have found no references about experiments with a monitoring protocol similar to ours, probably due to the disparity of objectives and experimental models (25-30).

The experiments more alike are the ones from Lefer et al. They have also observed hypotension during reperfusion. However, they do not find the partial recovery we have described, and all of their animals died (31). Regarding blood analysis, they have also found an increased haematocrit reading during reperfusion, but they do not analyze other parameters, more appropriate in order to define a shock, such as pH and bicarbonate. In our model, during reperfusion, we have found not only hypotension, but acidosis, oliguria, tachypnea and tachycardia as well, which means that a shock is clearly established.

In conclusion, we have tried to develop a model for shock monitoring based on our previous model of intestinal ischemia-reperfusion. We think the goal has been reached as clear and reliable data about the hemodynamic condition of the animal have been obtained, without modifying neither the clinical evolution nor the mortality rate of the intestinal reperfusion syndrome. And what is more important, these results have been achieved preserving the original simplicity of the experimental model, which will allow us to analyze whether those antioxidant drugs we have previously found to decrease the mortality rate also improve the hemodynamics.

REFERENCES

1. Granger DN, Rutigli G, McCord JM. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology* 1981;81:22-9.
2. Lefer AM, Tsao PS, Lefer DJ. Role of endothelial dysfunction in the pathogenesis of reperfusion injury following myocardial ischemia. *FASEB J* 1991;5:2029-34.
3. Lucchesia BR. Modulation of leukocyte-mediated myocardial reperfusion injury. *Annu Rev Physiol* 1990;52:561-76.
4. Roldán EJA, Pinus CR, Turrens JF, Boveris A. Chemiluminescence of ischaemic and reperfused intestine *in vivo*. *Gut* 1989;30:184-7.
5. Defraigne J, Franssen C, Pincemail J, Defechereux C, Canivet C, Philippart C, Serteyn D, Deby C, Meurise M.

- In vivo* direct detection of free radicals in reperfused rabbit kidney by spin trapping with nitron PBN. *Europ Surg Res* 1990;22:68-9.
6. Kunz R, Brune H, Marzinzig M, Beger H. A direct evidence of free radical production during rat liver ischemia and reperfusion by electron spin resonance *in vivo*. *Europ Surg Res* 1990;22:89-90.
 7. Ogilvie AC, Groeneveld ABJ, Straub JP, Thijs LG. Plasma lipid peroxides and antioxidants in human septic shock. *Inten Care Med* 1991;17:40-4.
 8. Pincemail J, Deby-Dupont G, Lamy M. Biochemical alterations in ischemia and reperfusion. In: Vincent JL (ed): *Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine* 1992. Berlin: Springer-Verlag; 1992. p. 105.
 9. Holgado MM, Refoyo AE, Mariño EH, Martín-Rollan C, García-García J, Macías JFN. Efecto de los inhibidores de la xantina-oxidasa sobre el pronóstico de la isquemia intestinal aguda. *An Med Intern* 1989;6:177-82.
 10. Bilbao J, García-Alonso I, Portugal V, Barceló P, Ortiz J, Méndez J. Utilidad terapéutica de fármacos antioxidantes en el síndrome de reperfusión intestinal experimental. *Rev Esp Enferm Dig* 1991;80:237-41.
 11. Ortiz J, García-Alonso I, Portugal V, Méndez J. Influencia del peso corporal y del período de isquemia mesentérica aguda en la mortalidad de ratas sometidas a revascularización intestinal. *Rev Esp Enf Ap Digest* 1990;77:263-7.
 12. García-Alonso I, Ortiz J, Basáñez A, Portugal V, Méndez J. Cuantificación de las lesiones en el síndrome de revascularización intestinal: método morfométrico. *Gastr Hepat* 1990;13:274-9.
 13. Ortiz-Lacorzana J, García-Alonso I, Basáñez A, López de Tejada I, Barberá-Guillem E, Méndez J. Modificaciones lesionales en la revascularización intestinal experimental mediante inmunosupresión. *Cir Esp* 1990;48:305-9.
 14. Ortiz-Lacorzana J, García-Alonso I, Apecechea A, Iturburu I, Lopez de Tejada I, Méndez J. The immune system and oxygen-derived free radical in small bowel reperfusion injury in the rat. *Res Surg* 1990;2(3):106-11.
 15. Bilbao J, García-Alonso I, Portugal V, Baeceló P, Apecechea A, Méndez J. Eficacia de tratamientos antioxidantes (ácido fólico y alfatocoferol) en las lesiones intestinales inducidas por reperfusión. *Cir Esp* 1992;51:262-6.
 16. Park PO, Haglund U, Bulkley GB, Fält K. The sequence of development of intestinal tissue injury following strangulation ischemia and reperfusion. *Surgery* 1990;107:574-80.
 17. Aoki N, Siegfried M, Tsao P, Lento P, Lefer AM. Beneficial mechanisms of action of a prostacyclin enhancing agent in splanchnic artery occlusion shock. *Res Commun Chem Phatol Pharmacol* 1988;60:275-89.
 18. Karasawa A, Rochester JA, Ma X, Lefer AM. Protection of endothelial damage and systemic shock by benidipine, a calcium antagonist, in rats subjected to splanchnic ischemia and reperfusion. *Circ Shock* 1991;33:135-41.
 19. Furlan LE, Johnson G III, Siegfried M, Lefer AM. Protective effects of the specific thromboxane receptor antagonist (+)-S145Na in splanchnic artery occlusion shock in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1990;253:525-9.
 20. Karasawa A, Rochester JA, Lefer AM. Effects of adenosine, an adenosine-A1 antagonist, and their combination in splanchnic occlusion shock in rats. *Circ shock* 1992;36:154-61.
 21. Reilly PM, Bulkley GB. Vasoactive mediators and splanchnic perfusion. *Crit Care Med* 1993;21:S55-S68.
 22. Antonsson JB, Fiddian-Green RG. The role of the gut in shock and multiple system organ failure. *Eur J Surg* 1991;157:3-12.
 23. The ACCP/SCCM consensus conference committee. definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* 1992;101:1644-55.
 24. Ahren C, Haglund V. Mucosal lesions in the small intestine of the cat during low flow. *Acta Physiol Scand* 1973;88:1-9.
 25. Bitterman H, Aoki N, Lefer AM. Anti-shock effect of human superoxide dismutase in splanchnic artery occlusion (SAO) shock. *Proc Soc Exp Biol Med* 1988;188:265-71.
 26. Schmeling DJ, Caty MG, Oldham KT, Guice KS, Hinshaw DB. Evidence for neutrophil-related acute lung injury after intestinal ischemia-reperfusion. *Surgery* 1989;106:195-201.
 27. Lento PH, Saukkonen K, Aoki N, Lefer AM, Slivjak MJ. Beneficial effects of a specific leucotriene-receptor-antagonist in splanchnic artery occlusion shock. *Eur J Pharmacol* 1989;165:241-9.
 28. Aoki N, Lefer AM. Protective effects of thromboxane receptor blockade in splanchnic artery occlusion shock. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1988;10:413-8.
 29. Johnson G III, Lefer AM. Protective effects of a novel 21-aminosteriod during splanchnic artery occlusion shock. *Circ Shock* 1990;30:155-64.
 30. Aoki N, Siegfried M, Tsao P, Lefer A. Acute effects of unsaturated fatty acids in splanchnic artery occlusion shock. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1989;37:89-95.
 31. Lefer AM. Significance of lipid mediators in shock states. *Circ Shock* 1989;27:3-12.