



SAHLGRENSKA AKADEMIN

Kroppstemperaturens betydelse för utvecklingen av experimentell Takotsubo-kardiomyopati

Examensarbete, 30 hp

Jasmina Chamat

Läkarprogrammet

Göteborg, Sverige 2018

Handledare: Björn Redfors

Institutionen för medicin

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

ABSTRACT.....	2
INTRODUKTION	3
SYFTEN	13
MATERIAL OCH METODER	14
ETIK	18
RESULTAT	19
DISKUSSION.....	22
KONKLUSION OCH BETYDELSE.....	25
POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING	26
TACK.....	28
REFERENSER	29

ABSTRACT

Title: The importance of body temperature for the development of experimental Takotsubo cardiomyopathy

Degree project, Programme in Medicine

Author: Jasmina Chamat

Supervisor: Björn Redfors

Institute of Medicine, The Sahlgrenska Academy, University of Gothenburg

2018, Gothenburg, Sweden

Introduction: Takotsubo cardiomyopathy (TCM), also known as stress-induced cardiomyopathy (SIC), is characterized by an acute onset of a reversible left ventricular akinesia that cannot be explained by an occlusion of a coronary artery. The mechanisms behind the pathogenesis of TCM are unknown but catecholamines are suggested to be involved. One theory is that excess metabolic demand may play a role. Cardiac metabolic demand is determined in part by body temperature, which is increased by catecholamines.

Aims: To study the effect of body temperature on catecholamine-induced takotsubo cardiomyopathy and hemodynamics in rats.

Methods: 76 male Sprague Dawley rats were anaesthetized by an intraperitoneal (i.p) administration of ketamine (50 mg/kg) and midazolam (5 mg/kg). They were placed on a heating pad and rectal temperature was continuously monitored. I.p isoprenaline (50 mg/kg) was administered and the body temperature was controlled according to the experimental protocol. In the first experimental setup, the body temperature was allowed to increase spontaneously post isoprenaline (n=44). In the second set of experiments, 32 rats were randomized to temperature control post isoprenaline at $37.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (normothermia, n=16) or $41.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (hyperthermia, n=16). Invasive hemodynamics were measured in a subgroup of rats that had been randomized to normothermia (n=8) or hyperthermia (n=8). Left ventricular (LV) function was studied by echocardiography 90 minutes post isoprenaline administration. TCM-like akinesia was expressed as percentage of total LV endocardial length.

Results: Peak body temperature was associated with the extent of isoprenaline-induced TCM-like dysfunction ($r^2=0.19$, $p=0.006$). Rats randomized to hyperthermia developed a significantly greater degree of TCM-like dysfunction (median 19.62% (interquartile range 7.61%-25.82%) vs median 0% (interquartile range 0%-0%), $p=0.00002$) and a significantly higher incidence of apical ballooning (8/16 (50%) vs 0/16 (0%), $p=0.002$). Rats randomized to hyperthermia developed a higher mean heart rate (574 ± 21 vs 522 ± 7 , $p=0.002$) and maximum heart rate (620 ± 14 vs 557 ± 21 , $p=0.0004$).

Conclusions: Body temperature appears to affect the development of isoprenaline-induced TCM-like dysfunction in rats.

Key words: Takotsubo cardiomyopathy. Stress-induced cardiomyopathy. Body temperature.

INTRODUKTION

Takotsubo-kardiomyopati (TK) är en hjärtsjukdom som karaktäriseras av en akut insättande regional dysfunktion av vänster kammare. Funktionsnedsättningen är ofta omfattande och kan leda till akut hjärtsvikt och kardiogen chock. Om patienten överlever den akuta fasen är TK dock ett reversibelt tillstånd [1]. Olika delar av vänster kammare kan vara påverkade vid TK, men i majoriteten av fallen är det den apikala delen som är akinetisk. Hjärtats morfologi under systole påminner då om ett japansk krukformat fiskeredskap, med en rund botten och en smal hals, som används för att fånga bläckfiskar [2]. Denna bläckfiskfångare heter tako-tsubo och har gett namn åt TK. TK benämns också takotsubo syndrom (TS), stressinducerad kardiomyopati (SIC), broken heart syndrome och apical ballooning syndrome.

Sjukdomens historia

År 1990 publicerade Japanska forskare de första fallrapporterna avseende TK och myntade termen takotsubo-kardiomyopati [2]. Fall som i efterhand skulle kunna tolkas som TK hade däremot beskrivits innan 1990 utan att definiera något specifikt tillstånd.

I två studier, från 1967 respektive 1969, hade man följt nära släktingar till avlidna personer och i båda studierna förelåg ett ökat antal dödsfall det första året efter bortgången [3, 4].

Majoriteten av dessa orsakades av kardiovaskulära händelser och författarna diskuterade om att emotionell stress kunde vara en bakomliggande orsak. En fallrapport från 1986 presenterade en 44-årig kvinna som hade utvecklat en typisk klinisk bild för TK efter att ha fått besked om att hennes son hade begått självmord [5]. Händelsen inträffade dock fyra år innan takotsubo-diagnosen definierades och därmed kunde inte en säker diagnos ställas.

Termen stressinducerad kardiomyopati beskrevs i en studie från 1980 där två amerikanska patologer undersökte patienter som hade dött efter fysiska överfall. Obduktionerna visade inte

någon egentlig skada av de inre organen, men de hittade histopatologiska fynd som överensstämde med en stressinducerad kardiomyopati [6]. De två patologerna föreslog att katekolaminer och stress låg bakom dödsfallen men artikeln blev troligtvis inte tillräckligt uppmärksammas inom kardiologin.

Klinisk presentation

TK kan drabba alla etniska grupper och sjukdomen är numera känd i hela världen [7]. Den första svenska patienten diagnosticerades på Sahlgrenska Universitetssjukhus år 2005. Varje månad diagnosticeras 3-5 nya fall på sjukhuset och årligen totalt cirka 2000 fall i hela Sverige [8]. Minhas et al. [9] och Murugiah et al. [10] rapporterade att sjukdomens incidens och antalet som sjukhusvårdades för sjukdomen signifikant ökade i USA mellan 2006 respektive 2007 och 2012, vilket sannolikt beror på ökad kännedom om sjukdomen. Incidensen är dock möjligtvis högre än vad som har rapporterats eftersom det inte är ovanligt att tillståndet feldiagnosticeras eller inte uppmärksammas av olika anledningar [11].

Nyligen delades sjukdomen in i en primär och sekundär takotsubo-kardiomyopati [1]. Vid primär TK söker patienterna vård med nytillkomna akuta symtom. Denna form är oftast orsakad av emotionella triggerfaktorer, som exempelvis dödsfall av en nära anhörig, mottagandet av svåra besked eller ekonomiska förluster [7]. Detta är bakgrunden till att sjukdomen kallas för broken heart syndrome. Sekundär TK drabbar patienter sekundärt till ett annat sjukdomstillstånd, t.ex. subaraknoidalblödning, ischemisk stroke, sepsis, multitrauma eller stora blödningar. Denna form orsakas istället av fysiska triggerfaktorer [1]. I en studie med 1750 TK-fall orsakades 36,0% av en fysisk triggerfaktor, 27,7% av en emotionell triggerfaktor och 7,8% av båda. 28,5% av patienterna saknade en triggande faktor i anamnesen [12].

Takotsubo-kardiomyopati är en sjukdom som huvudsakligen drabbar postmenopausala kvinnor. Flertal studier har rapporterat att ungefär 90% av alla TK-patienter är kvinnor och att medelåldern vid insjuknandet är 68 ± 10 år [12-15]. Även personer under 40 år kan drabbas [16]. Bland kvinnor är emotionella triggerfaktorer vanligast men bland män är istället fysiska triggerfaktorer vanligare [13]. Förekomsten av kardiovaskulära riskfaktorer, så som hypertoni, hyperkolesterolemi, diabetes och rökning, är vanligare bland TK-patienter jämfört med den generella befolkningen [17].

Den kliniska symtombilden är oftast identiskt med bilden vid en hjärtinfarkt [7]. De vanligaste symtomen som patienterna söker med är bröstsmärta med utstrålning mot hals, axlar och armar, dyspné och palpitationer. Ejektionsfraktionen är oftast påverkad och patienten kan därför vara hemodynamiskt instabil [18]. I allvarigare fall förekommer lungödem och synkopé till följd av kardiogen chock, ventrikulära arytmier eller ventrikulär utflödesobstruktion [1]. En patient som söker för bröstsmärta med en misstänkt kardiell genes ska handläggas enligt riktlinjerna för akuta koronara syndrom med bland annat elektrokardiografi (EKG), koronarangiografi och laboratorieprover [1].

Det vanligaste fyndet på ett 12-avlednings-EKG hos patienter med TK är ST-höjningar [19]. ST-sänkningar, nytillkomna vänstergrenblock, T-vågsinversioner, en förlängd QT-tid och patologiska Q-vågor förekommer också [20], men reciprokala ST-förändringar är däremot ovanligare [21, 22]. En minoritet av patienterna har ett normalt EKG. EKG-förändringarna är oftast övergående och olika förändringar kan ses beroende på när i sjukdomsförloppet som EKG-registreringen sker [1].

Man uppskattar att 1-2% av patienterna som genomgår en akut koronarangiografi för en misstänkt hjärtinfarkt istället har TK [18, 23]. Vid TK ses oftast normala epikardiella kranskärl till skillnad från vid en hjärtinfarkt då det föreligger ocklusioner i dessa [1, 7].

Cirka 15% av TK-patienterna har dock en aterosklerotisk kranskärlssjukdom sedan tidigare med delvis obstruerade kranskärl [12, 23]. Hos dessa blir utmaningen att värdera om dessa förträngningar kan förklara den aktuella vänsterkammardysfunktionen.

Efter att koronarangiografien har uteslutit en hjärtinfarkt bör man gå vidare med en vänstersidig ventrikulografi eller ekokardiografi (UCG/ TTE) för att bekräfta diagnosen. Vid TK ser man ett dyskinetiskt område som oftast är mer utbrett än vad som kan förklaras av ett kranskärls försörjningsområde [1]. Vanligtvis drabbas den anteriora, laterala och inferiora väggen. Hos 75–80% av patienterna ser man den klassiska varianten, med en apikal akinesi och en kompensatorisk basal hyperkinesi, som har givit sjukdomen dess namn. I resterande fall ses en midventrikulär eller basal variant, vilka benämns som atypisk TK [7]. I en tredjedel av fallen är även höger kammare drabbad, d.v.s. en biventrikulär variant [18].

Vid TK kan flera biomarkörer avvika [1]. Troponin T och I samt kreatininkinas är proteiner som finns i hjärtmuskulaturen och en stegring av dessa i blodet kan indikera skada av hjärtmuskelceller. De används därför som hjärtskademarkörer. Hos >90% av TK-patienterna föreligger förhöjda nivåer av troponin och kreatininkinas, men dessa nivåer är relativt låga i jämförelse med akinesins utbredning [24]. Om motsvarande akinesi istället skulle ha orsakats av en hjärtinfarkt hade nivåerna varit betydligt högre. Hjärtsviktsmarkörerna BNP och NT-proBNP är i princip alltid förhöjda vid den akuta fasen av TK och till skillnad från hjärtskademarkörerna korrelerar dessa nivåer bättre till graden av akinesi [25]. Andra förhöjda laboratorieprover kan innefatta serumnivåerna av katekolaminer (adrenalin, noradrenalin och dopamin), neuropeptid Y och serotonin [26]. C-reaktivt protein (CRP) kan vara lätt förhöjt men även kraftigt förhöjt om tillståndet föregås av en infektion [1].

Sedan Mayo Clinic presenterade sina diagnoskriterier år 2004 har olika forskningsgrupper föreslagit sina kriterier [27]. Heart Failure Association of the European Society of Cardiology

(HFA of the ESC) har granskat och reviderat samtliga diagnoskriterier och år 2015 presenterade de nya [1].

HFA of the ESC's diagnoskriterier: (översatta av författaren)

1. En övergående regional dyskinesi av vänsterkammarens eller högerkammarens myokardium som ofta, men inte alltid, föregås av en stressutlösande faktor (emotionell eller fysisk).
2. Det dyskinetiska området är vanligtvis mer utbrett än ett kranskärns försörjningsområde och resulterar ofta i en cirkumferent dysfunktion av de involverade kammarsegmenten.
3. Avsaknad av en bakomliggande aterosklerotisk kranskärnsjukdom, inkluderande akut plackruptur, trombosbildning och kranskärnsdissektion, eller annat patologiskt tillstånd (t.ex. hypertrofisk kardiomyopati, viral myokardit) som mer övertygande förklarar den tillfälliga vänsterkammardysfunktionen.
4. Nya och reversibla EKG-förändringar (ST-höjningar, ST-sänkningar, vänstergrenblock, T-vågsinversion och/eller en förlängd QT-tid) under den akuta fasen (3 månader).
5. Signifikant förhöjda serumnivåer av BNP eller NT-proBNP under den akuta fasen.
6. Lätt stegring av troponiner (d.v.s. diskrepans mellan troponinnivåer och dysfunktionens utbredning).
7. Återhämtning av vänsterkammardysfunktionen på kardiell bilddiagnostik vid uppföljningstillfället (3–6 månader).

Diagnostiken och diagnoskriterierna syftar till stor del till att utesluta en hjärtinfarkt. En hjärtinfarkt kan däremot ge upphov till emotionell och fysisk stress, som båda kan bidra till en takotsubo-kardiomyopati. Det finns till och med beskrivna fall där TK har utvecklats sekundärt till en hjärtinfarkt [28, 29].

Karaktäriserande för sjukdomen är en spontan förbättring av vänster kammarens rörlighet, vilket vanligtvis sker inom 12 veckor [1]. Patienterna bör vårdas inlagda med telemetriövervakning och återhämtningen bör följas med upprepade UCG-undersökningar. Det saknas randomiserade kliniska studier och evidensbaserade riktlinjer för hur man ska behandla tillståndet [30]. I det akuta stadiet syftar behandlingen till att stödja hjärtats

kvarvarande funktion och att förhindra komplikationer [30]. Patienter med en sekundär TK drabbas av komplikationer i högre grad och har därmed en sämre prognos, vilket kan bero på att de har ett annat samtidigt sjukdomstillstånd [12]. I dessa fall är det viktigt att optimera behandlingen av det bakomliggande tillståndet. Dödsfall under sjukhusvård drabbar 4-5%, vilket motsvarar mortaliteten vid en hjärtinfarkt [8, 23]. Detta sker oftast till följd av kardiogen chock och ventrikulära arytmier [1].

Experimentell takotsubo-kardiomyopati

När patienterna söker vård och diagnosticeras med en takotsubo-kardiomyopati har den maximala graden av akinesi oftast redan uppnåtts, vilket indikerar att de patofysiologiska processerna troligtvis sker innan patienterna upplever symtom [1]. Eftersom det inte är etiskt rätt att stressa människor till att utveckla TK behövs djurmodeller för att klargöra de bakomliggande mekanismerna och på så sätt kunna ta fram evidensbaserade behandlingsriktlinjer.

Råttmodeller har sedan tidigare bevisats vara bra djurmodeller för att undersöka mänskliga hjärtsjukdomar och det finns flera råttmodeller beskrivna för att inducera experimentell TK. En modell innefattar att binda fast dem tills de är tillräckligt stressade [31]. I en annan modell introduceras en ny råtta till en annan rattas bur för att initiera ett sympatikuspåslag till följd av att den nya rattan inkräktar på den andras territorium [32]. Den vanligaste metoden är att administrera katekolaminer och att därefter värdera hjärtats rörlighet med hjälp av ekokardiografi. Den etiska fördelen med denna metod är möjligheten att söva råttorna.

Den djurmodell som min forskningsgrupp använder sig av bygger på att sövda råttor får 50 mg/kg isoprenalin intraperitonealt (i.p) [33]. En anmärkning till modellen är att unga hanrättor används för att studera ett tillstånd som framförallt drabbar postmenopausala kvinnor.

Anledningen till att inte honrättor används är för att de har en större spridning i deras normala

fysiologiska data till följd av förändringar under menstruationscykeln. För att erhålla statistisk power hade i så fall ett större antal råttor behövt användas, vilket är mindre etiskt samt bidrar till högre kostnader. En annan anmärkning är användningen av isoprenalin, som är en syntetisk katekolamin som normalt inte förekommer i kroppen. Anledningen till att denna ändå används i djurmodellen är att det var den enda katekolaminen som, vid jämförelse med andra, gav upphov till en apikal akinesi [34]. Adrenalin, noradrenalin, fenylefrin och dopamin inducerade istället mestadels en basal akinesi.

Patofysiologi

Patofysiologin bakom takotsubo-kardiomyopati anses vara komplex, multifaktoriell och till stor del fortfarande okänd [1]. Eftersom det är känt att tillståndet föregås av stress antas katekolaminer spela en central roll i patofysiologin [26]. Den akuta stressen aktiverar både det autonoma och centrala nervsystemet, inkluderande HPA-axeln (hypotalamus-hypofys-binjure-axeln), vilket resulterar i ökade nivåer av kortisol och katekolaminer [35]. Frisättningen av adrenalin och noradrenalin till blodbanan sker från binjuremärgen medan noradrenalin även frisätts lokalt till hjärtat från de sympatiska nervändarna [35]. Hur det kardiovaskulära systemet svarar på katekolaminerna och hur de ger upphov till en övergående vänsterkammerakinesi är idag inte fullt klarlagt [11]. Det finns olika teorier om hur detta sker och förmodligen samverkar flera mekanismer [36].

En teori är att katekolaminerna har en direkt kardiotoxisk effekt som histologiskt resulterar i nekros av de kontraktila banden samt ökning av extracellulär matrix och fibrosbildning [26, 36].

En annan teori är att akinesin uppkommer till följd av en tillfällig myokardiell ischemi orsakat av vasospasm i de epikardiella och mikrovaskulära kranskärlen [37] eller annan mikrovaskulär dysfunktion [38]. Det är känt att ischemisk stuning, d.v.s. en övergående

kontraktilitets-nedsättning, kan ske till följd av en tillfällig myokardiell ischemi [39].

Vasospasmen tros orsakas av en endotelial dysfunktion som ger upphov till en obalans mellan vasokonstrigerande och vasodilaterande faktorer [36, 40]. Under normala förhållanden kommer en sympatisk aktivering att leda till en vasodilatation av kranskärlen via stimulering av β_2 -receptorer, men om det däremot föreligger en endoteldysfunktion kommer istället en vasokonstriktion att ske som resultat av att α_1 - och α_2 -receptorena istället stimuleras [41]. Endoteldysfunktion är inte ovanligt bland TK-patienter [40] och det kan föreligga till följd av bland annat minskade östrogennivåer [36]. Minskade östrogennivåer leder även till en ökad sympatisk aktivitet och detta skulle kunna förklara varför TK huvudsakligen drabbar postmenopausala kvinnor [42].

Den tredje teorin handlar om att katekolaminerna ger upphov till en obalans mellan hjärtats syrebehov och syretillförsel som resulterar i ischemisk stuning [36, 43]. Detta grundar sig i att katekolaminer fysiologiskt stimulerar till en ökad inotropi (kontraktionskraft) och kronotropi (hjärtfrekvens), vilket i sin tur ökar hjärtats syrebehov [35]. Vid ett akut koronart syndrom uppstår motsvarande obalans men denna beror istället på en minskad syretillförsel till följd av en kranskärlsockklusion [44]. Hjärtats kontraktila enheter förbrukar majoriteten av hjärtats syre och energi och genom att tillfälligt stänga av dessa, d.v.s. inducera ischemisk stuning, kan syret istället användas för att bibehålla de basala cellfunktionerna [43].

Ischemisk stuning kommer att minska hjärtats syrebehov och därmed jämna ut obalansen.

Denna teori ger underlag för att takotsubo-kardiomyopati är ett protektivt tillstånd som skyddar hjärtat mot omfattande ischemiska skador.

Det har även föreslagits att höga adrenalinnivåer stimulerar B_2 -receptorn till att ändra sina intracellulära signalkaskader från G_s (stimulerande) till G_i (inhiberande) [45]. Detta resulterar i att stimulering av B_2 -receptorn istället får en negativ inotropisk effekt, vilket resulterar i akinesi. Att akinesin oftast ses apikalt kan förklaras av att densiteten av B_2 -receptorer är högre

i apex jämfört med basen [46]. Densiteten borde dock kunna variera mellan olika individer och det skulle i så fall kunna förklara förekomsten av atypisk TK. Ändringen till Gi tros ske för att skydda myocyterna mot de höga katekolaminnivåerna och därmed begränsa den myokardiella skadan som redan har skett [36].

Den aktuella studien

Som tidigare nämnts ökar hjärtats kronotropi och inotropi som ett fysiologiskt svar till cirkulerande katekolaminer och en ökad sympatisk nervaktivitet [35]. En ökad kroppstemperatur bidrar också till en ökad kronotropi genom att påverka hjärtats sinusknuta, vilket i sin tur ökar hjärtats metabola behov [35]. En ökad kroppstemperatur fås bland annat av infektioner och fysisk aktivitet, men även utav cirkulerande katekolaminer eftersom de stimulerar cellerna till en ökad metabolism [47]. Katekolaminer kan alltså öka hjärtats syre- och energibehov dels direkt genom stimulering av hjärtats betareceptorer men även indirekt genom att höja kroppstemperaturen.

Värmeslag, även kallat hypertemi, definieras som en kroppstemperatur över 40°C som orsakas av att temperaturregleringen i det centrala nervsystemet inte lyckas bibehålla en normal kroppstemperatur när kroppen utsätts för mycket varmt väder eller hård fysisk belastning [48]. Detta tillstånd kan påverka hjärtat och ge upphov till EKG-förändringar, i form av bl.a. ST-förändringar, samt förhöjda nivåer av hjärtskademarkörer och patologiska fynd på ekokardiografen [49-51].

Etiologin bakom dessa avvikande undersökningsfynd är inte alltid känd. Förhöjda serumnivåer av katekolaminer har rapporterats hos patienter drabbade av värmeslag [52-54], vilket kan indikera att kroppen upplever värmeslag som ett stressande tillstånd. Hypertermi kan alltså orsakas av katekolaminer men även bidra till ökade katekolaminnivåer. Värmeslag borde därmed teoretiskt kunna ge upphov till en sekundär TK.

Chen et al. [55] och Tada et al. [56] har presenterat varsin patient som har drabbats av TK till följd av värmeslag. Innan dessa rapporter hade två liknande fallrapporter beskrivits som handlade om två patienter som hade drabbats av kardiella komplikationer med ST-höjningar, förhöjda hjärtskademarkörer och en diffus dyskinesi till följd av värmeslag [57, 58]. I dessa fallrapporter diskuterades att TK kunde vara en möjlig diagnos men eftersom ingen koronarangiografi utfördes var det svårt att differentiera mellan en ST-höjningsinfarkt.

Eftersom en ökad kroppstemperatur kan öka nivåerna av katekolaminer samt öka hjärtats syrebehov borde det kunna bidra till den obalans som leder till ischemisk stuning, d.v.s. akinesi. En hypotes är därmed att katekolaminer i kombination med hypertermi ger en större grad av akinesi än i kombination med normotermi. Det finns få studier gjorda om kroppstemperaturens betydelse för utvecklingen av takotsubo-kardiomyopati och därför undersöks det i denna studie.

SYFTEN

- Det primära syftet med studien var att undersöka huruvida en ökad kroppstemperatur påverkar utvecklingen av experimentell takotsubo-kardiomyopati.
- Det sekundära syftet var att undersöka hur hemodynamiken påverkas av en förhöjd kroppstemperatur vid samtidig administrering av katekolaminer.

MATERIAL OCH METODER

Försöksdjur

De experimentella djurförsöken utfördes på 10-veckors gamla hanråttor som vägde mellan 250–350 gram. Vi använde en albinoart som kallas för Sprague Dawley. Innan djurförsöken ägde rum förvarades de i en kontrollerad miljö med 25°C, 12-timmars ljus/mörker-cykler och fri tillgång till föda och vatten. Försöken utfördes på Laboratoriet för Experimentell Biomedicin vid Sahlgrenska akademien.

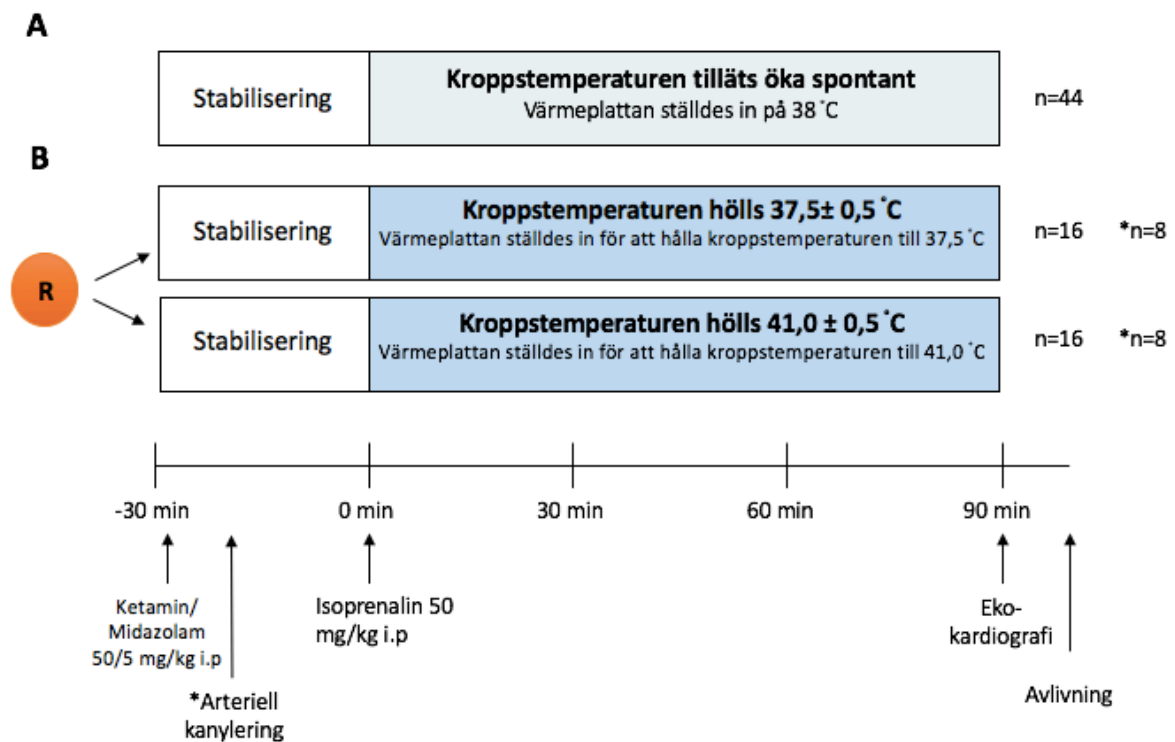
Råttorna sövdes ner med en intraperitoneal (i.p) administrering av ketamin (50 mg/kg) och midazolam (5 mg/kg) och hölls nedsövda under hela försöket. De placerades på en värmeplatta och den rektala kroppstemperaturen mättes kontinuerligt. Håret på bröstet togs bort med en trimmer och hårborttagningskräm för att förbereda dem för ekokardiografin. Djuren återfick inte medvetandet under försöket och avlivades vid försökets slut.

Experimentellt protokoll

Upplägget av experimentet, som består av två delar, är beskrivet i figur 1. Samtliga råttor förbereddes enligt ovanstående beskrivning och erhöll isoprenalin (50 mg/kg) i.p efter 30 minuters stabilisering. I den första delen (figur 1A) av experimentet observerades 44 råttor. Värmeplattan var inställd på 38°C och kroppstemperaturen tilläts öka spontant efter isoprenalin-administreringen. I den andra delen (figur 1B) randomiserades 32 råttor till två grupper. Hos ena gruppen hölls kroppstemperaturen på $37,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ (normotermi) och hos den andra gruppen fick kroppstemperaturen öka spontant de första 15 minuterna efter administreringen, varefter den bibehölls på $41,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ (hypertermi).

Hos en subgrupp av de råttor som hade randomiserats till att hållas normoterma (n=8) respektive hyperterma (n=8) mättes hemodynamiken invasivt under hela försöket. Detta

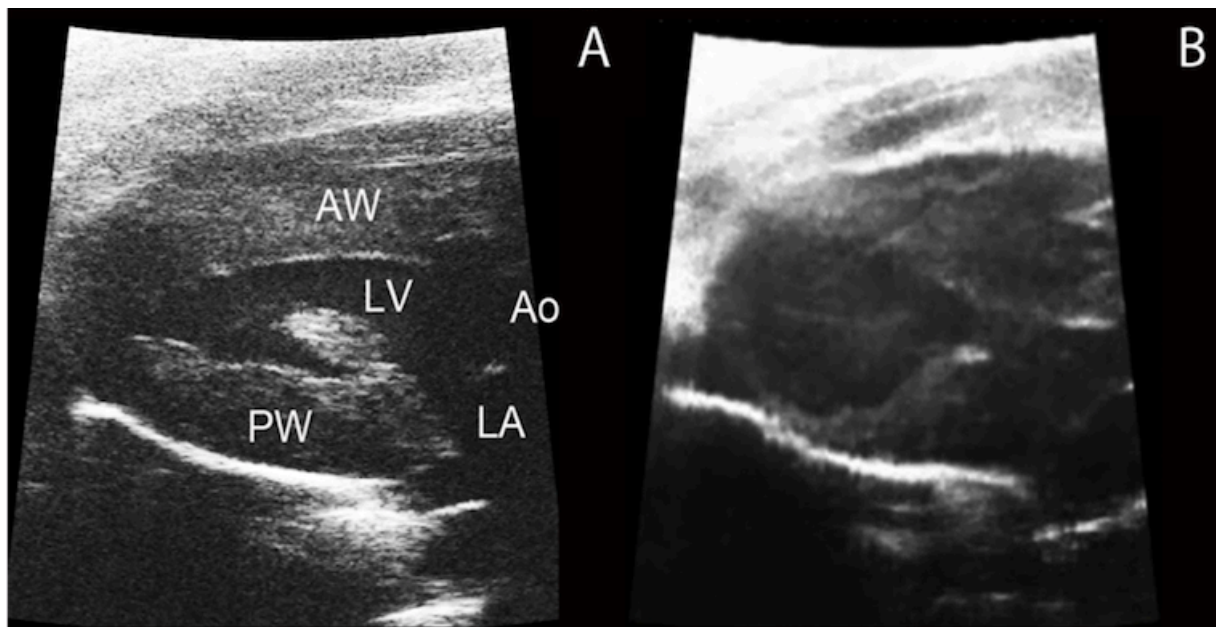
möjliggjordes genom dissektion och kanylering av den högra karotisartären, vilket ägde rum strax efter nedsövningen. Kanylen kopplades sedan till en tryckkateter som var ansluten till en dator. De hemodynamiska värdena och kroppstemperaturen registrerades kontinuerligt i programvaran Pharmed.



Figur 1. Experimentellt protokoll. (A) I den första delen av experimentet placerades råttorna på en värmeplatta inställd på 38,0 °C. Kroppstemperaturen tilläts öka spontant efter i.p administrering av isoprenalin (50 mg/kg). (B) I den andra delen randomiserades råttorna till att hållas hyperterma (41,0 ± 0,5°C) eller normoterma (37,5 ± 0,5°C) efter i.p administrering av isoprenalin (50 mg/kg). *Hos en subgrupp av råttorna i de randomiserade grupperna utfördes arteriell kanylering och hemodynamisk mätning. i.p: intraperitoneal

Ekokardiografi

90 minuter efter isoprenalin-administreringen utfördes ekokardiografi med hjälp av VisualSonics 770 VEVO imaging station för att undersöka hjärtfunktionen och graden av akinesi. En speciell ställning användes för att positionera ultraljudsproben och bibehålla dess position under undersökningen. En optimal vy av den parasternala långaxeln uppnåddes genom att visualisera både mitralklaffen och aortaklaffen, samtidigt som man fann det maximala avståndet mellan aortaklaffen och apex (figur 2). Genom att använda ECG-gated kilohertz visualization technique erhöles en högupplöst inspelning av hjärtecykeln bestående av >1000 bilder, som sedan kunde användas för att beräkna hur stor del av vänster kammare som var akinetisk. Personen som bedömde akinesigraden var blindad angående rättans grupptillhörighet. Den akinetiska utbredningen beskrevs som en procentuell andel av vänsterkammarens totala endokardiella längd. Apikal ballonering definierades som en akinesi med en utbredning ≥ 20 % av vänsterkammarens endokardiella längd.



Figur 2. Ekokardiografisk avbildning i slutsystolisk fas. (A) Normalt rätt hjärta. (B) Apikal akinesi 90 min efter intraperitoneal administrering av isoprenalin (50 mg/kg). AW: Anterior vägg. PW: Posterior vägg. LV: Vänster kammare. LA: Vänster förmak. Ao: Aorta.

Statistiska metoder

Värdena från Pharmed och ekokardiografen analyserades statistiskt med STATA v13.1. Från den första delen av försöket erhöles en enkel linjär regressionsmodell med den beroende variabeln "akinesigrad" och prediktorvariabeln "maximalt uppnådda kroppstemperatur". I den andra delen av experimentet jämfördes grupperna med Mann-Whitney U-test (grad av akinesi) samt Fishers exakta test (andel som utvecklade apikal ballonering, definierat som akinesi i $\geq 20\%$ av vänster kammare). Skillnaden på medelhjärtfrekvensen respektive den maximalt uppnådda hjärtfrekvensen mellan grupperna analyserades med hjälp av Students t-test. Data är uttryckt i medelvärde \pm SD och i samtliga analyser ansågs $p < 0,05$ vara signifikant.

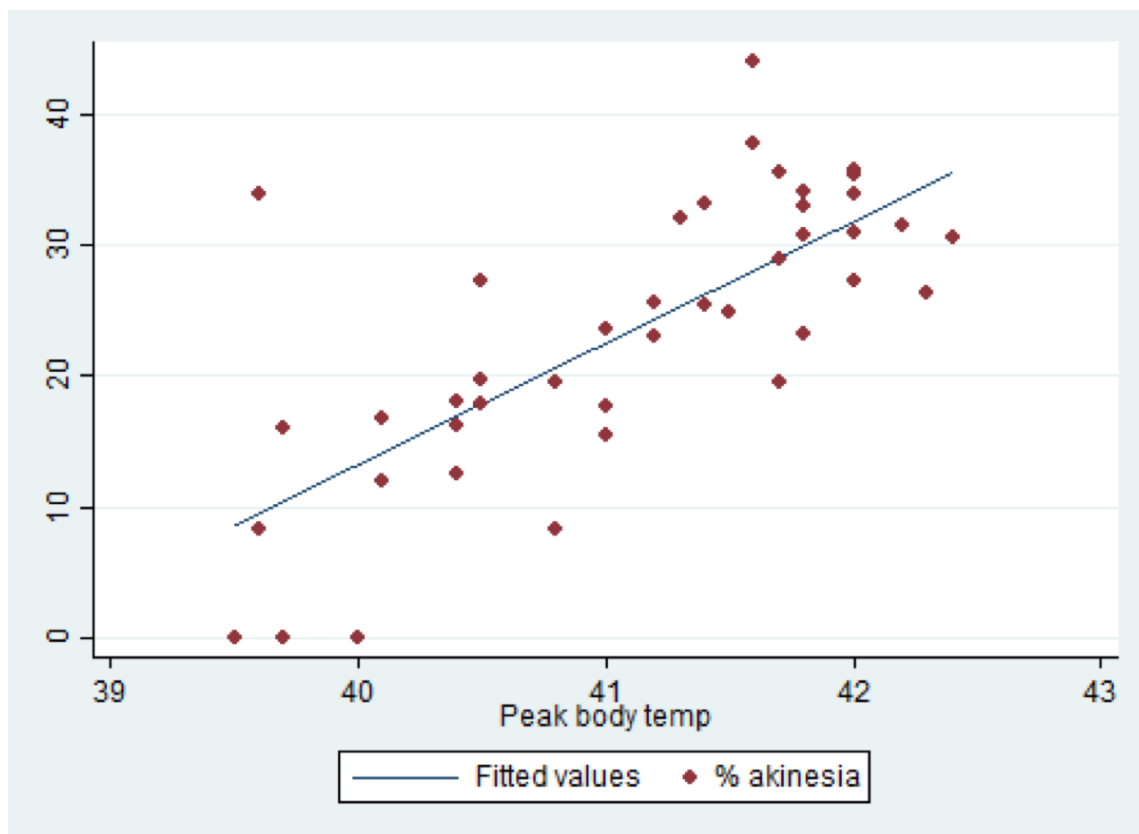
ETIK

Innan experimentets start godkändes studieupplägget av Göteborgs Djurförsöksetiska Nämnd. All vår djurforskning följer de riktlinjer som är framtagna av USA:s hälsodepartement, National Institutes of Health (NIH). Medicinsk forskning skall respektera försöksdjurs välbefinnande, vilket noggrant regleras i lagar och regler. I vår studiedesign försökte vi även följa den så kallade 3R-principen (Replace, Reduce, Refine). Målet med denna princip är att djurförsök ska planeras och genomföras med största möjliga omsorg. Att ersätta djur (replace) med något annat är för närvarande inte möjligt inom vårt forskningsområde för denna typ av studie. Genom att ha tydliga syften och frågeställningar samt en noggrann planering av studieupplägget har vi försökt att minska antalet djur i studien (reduce). För att minimera djurens lidande (refine) hölls de noggrant nedsövda under hela försöket.

RESULTAT

En högre maximal kroppstemperatur är associerad med en större grad av TK-lik dysfunktion

Relationen mellan den maximalt uppnådda kroppstemperaturen efter isoprenalin-administrering och graden av apikal akinesi är illustrerad i figur 3. Den maximala kroppstemperaturen hade ett signifikant samband med den utvecklade graden av vänsterkammarakinesi ($r^2=0,19$, $p=0,006$). Två råttor avled under försöket.



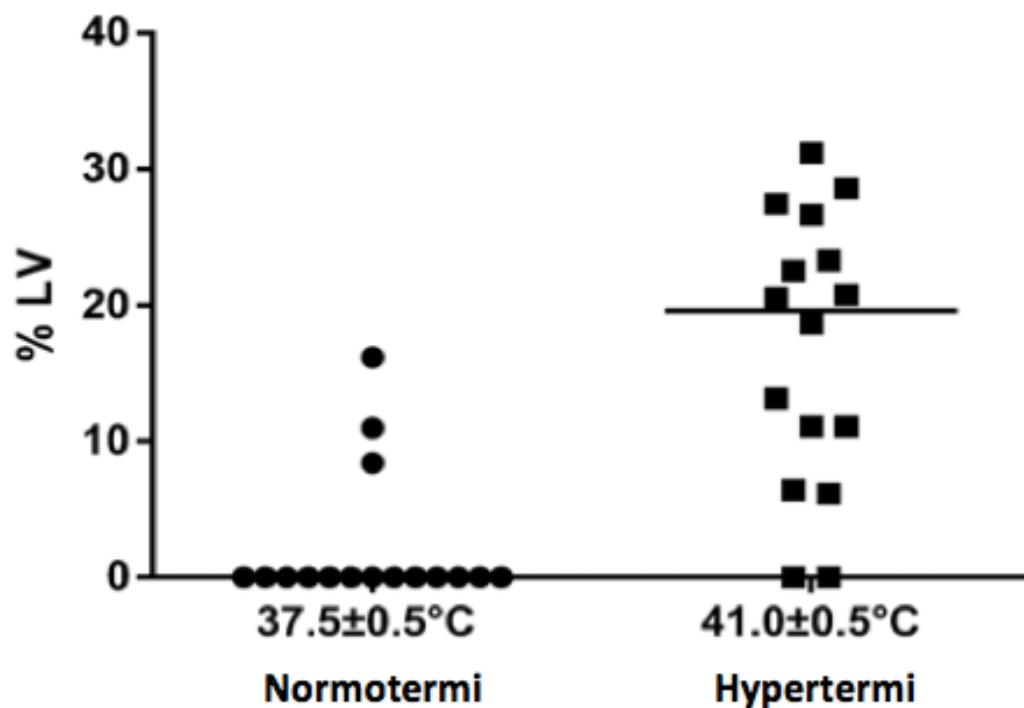
Figur 3. Grad av TK-lik apikal akinesi 90 minuter efter intraperitoneal administrering av isoprenalin (50 mg/kg) i korrelation till den maximalt uppnådda kroppstemperaturen (n=42). Det fanns ett signifikant samband mellan den maximalt uppnådda kroppstemperaturen och graden av TK-lik apikal akinesi ($r^2=0,19$, $p=0,006$).

Hypertermi resulterade i en större grad av TK-lik dysfunktion jämfört med normotermi

Kroppstemperaturen hölls inom det eftersträvade intervallet hos alla råttor. Graden av isoprenalin-inducerad vänsterkammars-akinesi hos de två grupperna är illustrerad i figur 4.

Råttor som randomiserades till att hållas hyperterma ($41,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$) utvecklade en signifikant större grad av apikal akinesi jämfört med normoterma ($37,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$) råttor (median 19,62% (kvartilavstånd 7,61%-25,82%) vs median 0% (kvartilavstånd 0%-0%), $p=0,00002$).

Incidensen av apikal ballonering, d.v.s. akinetisk utbredning $\geq 20\%$ av vänster kammare, var signifikant högre i den hyperterma gruppen jämfört med den normoterma gruppen (8/16 (50%) vs 0/16 (0%), $p=0,002$).



Figur 4. Grad av TK-lik apikal akinesi 90 minuter efter intraperitoneal administrering av isoprenalin (50 mg/kg). Hyperterma råttor (n=16) utvecklade en signifikant större grad av apikal akinesi jämfört med normoterma råttor (n=16) (median 19,62% (kvartilavstånd 7,61%-25,82%) vs median 0% (kvartilavstånd 0%-0%), $p=0,00002$). Incidensen av apikal ballonering, d.v.s. akinetisk utbredning $\geq 20\%$, var signifikant högre i den hyperterma gruppen (8/16 (50%) vs 0/16 (0%), $p=0,002$).

Hypertermi resulterade i en högre hjärtfrekvens

Efter administrering av isoprenalin ökade hjärtfrekvensen hos samtliga råttor som resultat av dess positiva kronotropiska effekt. Till följd av mätfel har hemodynamiska mätvärden exkluderats från de båda randomiseringsgrupperna (hypertermi, n=2 respektive normotermi, n=4). Hjärtfrekvensen har analyserats för 6 hyperterma råttor och 4 normoterma råttor.

Medelhjärtfrekvensen under 90 minuter var signifikant högre i den hyperterma gruppen jämfört med den normoterma (574 ± 21 vs 522 ± 7 , $p=0,002$). Hyperterma råttor uppnådde en signifikant högre maximal hjärtfrekvens jämfört med normoterma råttor (620 ± 14 vs 557 ± 21 , $p=0,0004$).

DISKUSSION

Fynden i denna studie antyder att kroppstemperaturen har en betydande roll i utvecklingen av experimentell takotsubo-kardiomyopati i vår djurmodell. Genom att hålla råttor hyperterma ($41,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$) snarare än normoterma ($37,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$) efter administrering av katekolaminer kan man utveckla en större grad av TK-lik apikal akinesi. Dessutom kommer en högre kroppstemperatur efter administrering av katekolaminer att ge upphov till en högre hjärtfrekvens än en normal kroppstemperatur efter administreringen.

Hypertermis påverkan på utvecklingen av experimentell TK

Varför hypertermi efter administrering av katekolaminer ger upphov till en signifikant större incidens av TK-lik vänsterkammar-dysfunktion än normotermi är inte helt uppenbart, vilket beror på att patofysiologin bakom utvecklingen av takotsubo-kardiomyopati än idag inte är fullständigt klarlagd [1]. Det antas att stress och katekolaminer har en central roll [26].

Gemensamt för katekolaminer och hypertermi är att de båda ökar hjärtats syre- och energibehov [35]. En av teorierna till uppkomsten av TK är att katekolaminer orsakar en obalans mellan hjärtats syrebehov och syretillförsel [36, 43]. Hypertermi efter administrering av katekolaminer borde ytterligare kunna öka denna obalans till skillnad från normotermi, vilket skulle innebära att resultaten i vår studie stödjer denna teori. Hos normoterma råttor uppstod det möjligtvis inte en tillräckligt stor obalans för att utveckla dysfunktionen.

Hypertermi, utan föregående administrering av katekolaminer, har beskrivits kunna ge upphov till myokardiella skador hos människor [49-51, 55-58], råttor [59] och till och med hos hundar [60]. En annan förklaring till resultatet i den aktuella studien kan vara att hypertermis myokardiella påverkan måste finnas, samtidigt som katekolaminerna påverkar hjärtat på sitt sätt, för att utveckla experimentell TK.

I vår studie utvecklade endast en minoritet av de normoterma råttorna en TK-lik akinesi till skillnad från de hyperterma råttorna (figur 4). Detta trots att samtliga erhöll en lika stor dos av katekolaminer (50 mg/kg). Dessa fynd skulle kunna indikera att en förhöjd kroppstemperatur är en bidragande faktor för att utveckla experimentell TK. En förhöjd kroppstemperatur fås fysiologiskt till följd av administrerade katekolaminer [47], men en allt för hög kroppstemperatur kan däremot upplevas som ett stressande tillstånd och bidra till en frisättning av endogena katekolaminer [52-54]. En tredje teori till resultatet är att råttorna i den hyperterma gruppen utvecklade en TK-lik akinesi till följd av en större mängd cirkulerande katekolaminer (administrerade och endogena). För att undersöka denna teori bör ett liknande experiment utföras med tillägg utav mätningar av katekolaminnivåer.

Hypertermens påverkan på hjärtfrekvensen

Att katekolaminer i kombination med hypertermi ger upphov till en högre hjärtfrekvens än i kombination med normotermi är inte oväntat med tanke på att både katekolaminer och hypertermi stimulerar till detta [35]. Liknande fynd har beskrivits av Quinn et al. [61] som undersökte hypertermens kardiovaskulära påverkan hos råttor utan administrering av katekolaminer. De såg att hjärtfrekvensen var högre ju varmare råttorna var.

Klinisk betydelse

I det aktuella experiment hade kroppstemperaturen en betydande roll för utvecklingen av experimentell takotsubo-kardiomyopati. Nästa steg blir att undersöka huruvida liknande fynd kan ses hos människor. Bland patienter som har sökt vård för en primär TK skulle man retrospektivt kunna undersöka hur kroppstemperaturen var vid ankomst till akutmottagningen, men eftersom de patofysiologiska processerna troligtvis äger rum innan patienten utvecklar symptom ger dessa värden otillräcklig information om hur kroppstemperaturen var under sjukdomsutvecklingen. Detta är däremot lättare att undersöka bland patienter som har

utvecklat en sekundär TK på intensivvårdsavdelningar. Tack vare att vårdpersonalen frekvent noterar vitalparametrarna kan man retrospektivt undersöka kroppstemperaturens utveckling under vårdtillfället och studera om det förelåg någon temperaturökning strax innan patienten blev hemodynamiskt påverkad av en TK. Om temperaturen skulle ha en betydelse för utvecklingen av sekundär TK skulle en noggrann temperaturkontroll kunna minska incidensen av detta.

Styrkor och svagheter

Den experimentella metoden har ett flertal styrkor. Till att börja med delades råttorna in i de två grupperna med hjälp av randomisering. Under försöket tillät en kontinuerlig rektal temperaturmätning att vi noggrant kunde hålla temperaturen inom det bestämda intervallet. En kontinuerlig temperatur- och hemodynamisk mätning möjliggjorde även att vi kunde få fram exakta medel- och maximalvärden till vår statistiska analys. Personen som bedömde akinesigraden på de ekokardiologiska inspelningarna var blindad angående rättans gruppstillhörighet under försöket. Bedömning påverkades därför inte.

Svagheten med studiemetoden är däremot att den inte gav någon patofysiologisk förklaring till hur hypertermin bidrog till utvecklingen av experimentell takotsubo-kardiomyopati. En annan svaghet är att det förelåg tekniska problem vid den hemodynamiska mätningen hos båda grupperna som resulterade i bortfall av mätvärden.

KONKLUSION OCH BETYDELSE

Vi har visat att kroppstemperaturen spelar roll i utvecklingen av experimentell takotsubokardiomyopati hos råttor i vår djurmodell. Hyperterma råttor utvecklar en större TK-lik dysfunktion än normoterma råttor. Om liknande fynd kan ses hos kliniska patienter skulle en noggrann temperaturkontroll kunna användas för att förhindra utvecklingen av TK hos kritiskt sjuka patienter. Det behövs dock mer forskning för att klarlägga den patofysiologiska mekanismen bakom hur hypertermi bidrar till utvecklingen av experimentell TK.

Resultaten i denna studie har givit oss förståelse för att kroppstemperaturen spelar roll i vår aktuella djurmodell. Denna information kommer att användas vid framtida experiment. Med vetskap om temperaturens inverkan på akinesigraden kan vi kontrollera denna variabel och därmed få en mindre spridning av data och bättre statistisk power, vilket i sin tur leder till att ett mindre antal råttor behöver användas. Fynden har även betydelse vid utveckling av nya experimentella djurmodeller för andra närliggande kardiologiska sjukdomar.

POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING

Kroppstemperaturens betydelse för utvecklingen av experimentell Takotsubo-kardiomyopati

År 1990 definierades en hjärtsjukdom i Japan med namnet takotsubo-kardiomyopati (TK). Sjukdomen kallas även för broken heart syndrome eller brustet hjärta, eftersom den är kopplad till akut sorg, trauma och stress. Upp till 90% av de som drabbas är kvinnor och majoriteten av dessa efter klimakteriet. Drabbade patienter upplever liknande besvär som vid en hjärtinfarkt, d.v.s. bröstsmärta som samtidigt kan kännas i halsen, axlarna och armarna samt andningssvårigheter och hjärklappningar. Vid en undersökning av hjärtats blodkärl kan man se att dessa är helt normala vid TK till skillnad från vid en hjärtinfarkt då det föreligger förträngningar som stoppar blodflödet till hjärtmuskulaturen. Utöver normala blodkärl kan man även se att hjärtat inte pumpar normalt och att en del av hjärtat har antagit en ballonglikande form. Hjärtat kommer därmed att likna en japansk bläckfiskfångare som heter tako-tsubo och det är så sjukdomen fick sitt namn.

Än idag är det inte fullt klarlagt hur sjukdomen utvecklas men man antar att höga halter av cirkulerande stresshormoner, bl.a. adrenalin och noradrenalin, spelar en central roll. Det saknas även kunskap och forskningsbaserade riktlinjer för hur tillståndet ska behandlas på bästa sätt. Dödsfall under sjukhusvistelsen drabbar 4–5%, vilket motsvarar dödligheten vid en hjärtinfarkt, men om patienten överlever det akuta skedet kommer hjärtfunktionen spontant att förbättras inom 12 veckor. Hjärtat blir därmed oftast helt normalt igen, som om ingenting har hänt.

En teori är att sjukdomen utvecklas till följd av att hjärtats syrebehov kraftigt ökar, vilket bl.a. kan ske av en förhöjd kroppstemperatur. I den aktuella studien har vi därför undersökt kroppstemperaturens betydelse för att utveckla ett brustet hjärta hos råttor. För att undersöka

detta behövde vi först framkalla sjukdomen hos sövda råttor med en spruta innehållande stresshormoner. Sedan fick de ha olika kroppstemperatur under experimentet beroende på vilken grupp de tillhörde. En naturlig effekt av stresshormoner är att kroppstemperaturen stiger, vilket den tilläts göra okontrollerat hos en grupp råttor. En annan grupp lottades till att antingen ha en normal ($37,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$) eller förhöjd ($41,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$) kroppstemperatur under experimentet. Hos en undergrupp mätte vi dessutom hjärtfrekvensen för att undersöka om kroppstemperaturen påverkade denna. 90 minuter efter att sprutan var given var experimentet slut och då undersöktes hjärtfunktionen med hjälp av ett ultraljud. Genom att avslutningsvis analysera mätvärdena fick vi fram studiens resultat.

I den första gruppen, där kroppstemperaturen fick öka spontant, var graden av hjärtfunktionsnedsättning större ju högre kroppstemperatur som uppnåddes. Bland de råttor där vi istället aktivt kontrollerade kroppstemperaturen, till att antingen vara normal eller förhöjd, utvecklades en större funktionsnedsättning hos de varma råttorna. De hade även en högre hjärtfrekvens under experimentet. Hjärtfunktionen efter 90 minuter var normal hos majoriteten av de råttor som hade en normal kroppstemperatur under försöket.

Slutsatsen från studien är att kroppstemperaturen har en betydande roll i utvecklingen av TK i vår råttmodell. Det krävs dock mer forskning för att kartlägga den exakta mekanismen bakom hur detta sker. Man bör även undersöka om liknande fynd kan ses hos människor och om en noggrann temperaturkontroll kan förhindra att sjukdomen utvecklas hos kritiskt sjuka patienter.

TACK

Jag vill rikta ett särskilt tack till min handledare Björn Redfors för ovärderlig hjälp och undervisning under mitt examensarbete. Jag vill även tacka resterande medlemmar i forskningsgruppen för ett varmt välkomnande samt för all hjälp och stöttning under arbetets gång. Tack till Anwar Ali, Joel Lundgren, Jessica Alkhoury, Aaron Espinosa, Elmir Omerovic och Jonatan Oras.

REFERENSER

1. Lyon, A.R., et al., *Current state of knowledge on Takotsubo syndrome: a Position Statement from the Taskforce on Takotsubo Syndrome of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology*. European journal of heart failure, 2016. **18**(1): p. 8-27.
2. Sato, H., *Tako-tsubo-like left ventricular dysfunction due to multivessel coronary spasm*. Clinical aspect of myocardial injury: from ischemia to heart failure, 1990.
3. Rees, W.D. and S.G. Lutkins, *Mortality of bereavement*. British Medical Journal, 1967. **4**(5570): p. 13.
4. Parkes, C.M., B. Benjamin, and R.G. Fitzgerald, *Broken heart: a statistical study of increased mortality among widowers*. Br med J, 1969. **1**(5646): p. 740-743.
5. Ryan, T.J. and J.T. Fallon, *Case 18-1986: A 44-Year-Old Woman with Substernal Pain and Pulmonary Edema after Severe Emotional Stress*. New England journal of Medicine, 1986. **314**(19): p. 1240-1247.
6. Cebelin, M.S. and C.S. Hirsch, *Human stress cardiomyopathy: myocardial lesions in victims of homicidal assaults without internal injuries*. Human pathology, 1980. **11**(2): p. 123-132.
7. Akashi, Y.J., H.M. Nef, and A.R. Lyon, *Epidemiology and pathophysiology of Takotsubo syndrome*. Nature Reviews Cardiology, 2015. **12**(7): p. 387.
8. Omerovic, E., *Takotsubo syndrome: not as benign as once believed*. European journal of heart failure, 2016. **18**(6): p. 657-659.
9. Minhas, A.S., A.B. Hughey, and T.J. Koliass, *Nationwide trends in reported incidence of Takotsubo cardiomyopathy from 2006 to 2012*. The American journal of cardiology, 2015. **116**(7): p. 1128-1131.
10. Murugiah, K., et al., *Trends in short-and long-term outcomes for Takotsubo cardiomyopathy among Medicare fee-for-service beneficiaries, 2007 to 2012*. JACC: Heart Failure, 2016. **4**(3): p. 197-205.
11. Templin, C., L.C. Napp, and J.R. Ghadri, *Takotsubo syndrome: underdiagnosed, underestimated, but understood?* 2016, Journal of the American College of Cardiology.
12. Templin, C., et al., *Clinical features and outcomes of takotsubo (stress) cardiomyopathy*. New England Journal of Medicine, 2015. **373**(10): p. 929-938.
13. Schneider, B., et al., *Gender differences in the manifestation of tako-tsubo cardiomyopathy*. International journal of cardiology, 2013. **166**(3): p. 584-588.
14. Sharkey, S.W., et al., *Natural history and expansive clinical profile of stress (tako-tsubo) cardiomyopathy*. Journal of the American College of Cardiology, 2010. **55**(4): p. 333-341.
15. Deshmukh, A., et al., *Prevalence of Takotsubo cardiomyopathy in the United States*. American heart journal, 2012. **164**(1): p. 66-71. e1.
16. Wang, Y., et al., *A new insight into sudden cardiac death in young people: a systematic review of cases of Takotsubo cardiomyopathy*. Medicine, 2015. **94**(32).
17. Pelliccia, F., et al., *Comorbidities frequency in Takotsubo syndrome: an international collaborative systematic review including 1109 patients*. The American journal of medicine, 2015. **128**(6): p. 654. e11-654. e19.

18. Prasad, A., A. Lerman, and C.S. Rihal, *Apical ballooning syndrome (Tako-Tsubo or stress cardiomyopathy): a mimic of acute myocardial infarction*. American heart journal, 2008. **155**(3): p. 408-417.
19. Kurisu, S., et al., *Time course of electrocardiographic changes in patients with takotsubo syndrome*. Circulation Journal, 2004. **68**(1): p. 77-81.
20. Frangieh, A.H., et al., *ECG criteria to differentiate between takotsubo (stress) cardiomyopathy and myocardial infarction*. Journal of the American Heart Association, 2016. **5**(6): p. e003418.
21. Ogura, R., et al., *Specific findings of the standard 12-lead ECG in patients with takotsubo cardiomyopathy*. Circulation journal, 2003. **67**(8): p. 687-690.
22. Jim, M.-H., et al., *A new ECG criterion to identify takotsubo cardiomyopathy from anterior myocardial infarction: role of inferior leads*. Heart and vessels, 2009. **24**(2): p. 124-130.
23. Redfors, B., et al., *Mortality in takotsubo syndrome is similar to mortality in myocardial infarction—a report from the SWEDEHEART registry*. International journal of cardiology, 2015. **185**: p. 282-289.
24. Pilgrim, T.M. and T.R. Wyss, *Takotsubo cardiomyopathy or transient left ventricular apical ballooning syndrome: a systematic review*. International journal of cardiology, 2008. **124**(3): p. 283-292.
25. Madhavan, M., et al., *Stress hormone and circulating biomarker profile of apical ballooning syndrome (Takotsubo cardiomyopathy): insights into the clinical significance of B-type natriuretic peptide and troponin levels*. Heart, 2009. **95**(17): p. 1436-1441.
26. Wittstein, I.S., et al., *Neurohumoral features of myocardial stunning due to sudden emotional stress*. New England Journal of Medicine, 2005. **352**(6): p. 539-548.
27. Redfors, B., et al., *Diagnostic criteria for takotsubo syndrome: a call for consensus*. International journal of cardiology, 2014. **176**(1): p. 274-276.
28. Y-Hassan, S., *Takotsubo syndrome triggered by acute coronary syndrome in a cohort of 20 patients: an often missed diagnosis*. Int J Cardiol Res, 2015. **2**: p. 28-33.
29. Redfors, B., et al., *Takotsubo triggered by acute myocardial infarction: a common but overlooked syndrome?* Journal of geriatric cardiology: JGC, 2014. **11**(2): p. 171.
30. Redfors, B., Y. Shao, and E. Omerovic, » *Primum nil nocere «förstahandsalternativ vid takotsubo-kardiomyopati-Vid allvarliga fall bör mekaniskt stöd som brygga till återhämtning prövas*. Lakartidningen, 2013. **111**.
31. Ueyama, T., *Emotional stress-induced Tako-tsubo cardiomyopathy: animal model and molecular mechanism*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2004. **1018**(1): p. 437-444.
32. Wideman, C.H., et al., *An animal model of stress-induced cardiomyopathy utilizing the social defeat paradigm*. Physiology & behavior, 2013. **120**: p. 220-227.
33. Shao, Y., et al., *Novel rat model reveals important roles of β -adrenoreceptors in stress-induced cardiomyopathy*. International journal of cardiology, 2013. **168**(3): p. 1943-1950.
34. Redfors, B., et al., *Different catecholamines induce different patterns of takotsubo-like cardiac dysfunction in an apparently afterload dependent manner*. International journal of cardiology, 2014. **174**(2): p. 330-336.
35. Hall, J.E.G., Arthur C. , *Guyton and Hall textbook of medical physiology (Thirteenth ed., Guyton Physiology)*. 2015: Elsevier Health Sciences.

36. Pelliccia, F., et al., *Pathophysiology of Takotsubo Syndrome*. *Circulation*, 2017. **135**(24): p. 2426-2441.
37. Dote, K., et al., *Myocardial stunning due to simultaneous multivessel coronary spasms: a review of 5 cases*. *Journal of cardiology*, 1991. **21**(2): p. 203-214.
38. Vitale, C., G.M. Rosano, and J.C. Kaski, *Role of coronary microvascular dysfunction in Takotsubo cardiomyopathy*. *Circulation Journal*, 2016. **80**(2): p. 299-305.
39. Chalkias, A. and T. Xanthos, *Pathophysiology and pathogenesis of post-resuscitation myocardial stunning*. *Heart failure reviews*, 2012. **17**(1): p. 117-128.
40. Naegele, M., et al., *Endothelial function and sympathetic nervous system activity in patients with Takotsubo syndrome*. *International journal of cardiology*, 2016. **224**: p. 226-230.
41. Baumgart, D., et al., *Augmented α -adrenergic constriction of atherosclerotic human coronary arteries*. *Circulation*, 1999. **99**(16): p. 2090-2097.
42. Vitale, C., M.E. Mendelsohn, and G.M. Rosano, *Gender differences in the cardiovascular effect of sex hormones*. *Nature Reviews Cardiology*, 2009. **6**(8): p. 532.
43. Redfors, B., et al., *Are the different patterns of stress-induced (Takotsubo) cardiomyopathy explained by regional mechanical overload and demand: supply mismatch in selected ventricular regions? Medical hypotheses*, 2013. **81**(5): p. 954-960.
44. Redfors, B., et al., *Current hypotheses regarding the pathophysiology behind the takotsubo syndrome*. *International journal of cardiology*, 2014. **177**(3): p. 771-779.
45. Lyon, A.R., et al., *Stress (Takotsubo) cardiomyopathy—a novel pathophysiological hypothesis to explain catecholamine-induced acute myocardial stunning*. *Nature Reviews Cardiology*, 2008. **5**(1): p. 22.
46. Paur, H., et al., *High Levels of Circulating Epinephrine Trigger Apical Cardiodepression in a β 2-Adrenoceptor/Gi-Dependent Manner: A New Model of Takotsubo Cardiomyopathy*. *Circulation*, 2012. **126**(6): p. 697-706.
47. Cannon, B. and J. Nedergaard, *Nonshivering thermogenesis and its adequate measurement in metabolic studies*. *Journal of Experimental Biology*, 2011. **214**(2): p. 242-253.
48. Bouchama, A. and J.P. Knochel, *Heat stroke*. *New England Journal of Medicine*, 2002. **346**(25): p. 1978-1988.
49. Kew, M.C., et al., *The heart in heatstroke*. *American heart journal*, 1969. **77**(3): p. 324-335.
50. Al-Harathi, S.S., et al., *Non-invasive evaluation of cardiac abnormalities in heat stroke pilgrims*. *International journal of cardiology*, 1992. **37**(2): p. 151-154.
51. Akhtar, M.J., et al., *Electrocardiographic abnormalities in patients with heat stroke*. *Chest*, 1993. **104**(2): p. 411-414.
52. al-Hadramy, M.S. and F. Ali, *Catecholamines in heat stroke*. *Military medicine*, 1989. **154**(5): p. 263-264.
53. Ishikawa, T., et al., *Immunohistochemistry of catecholamines in the hypothalamic–pituitary–adrenal system with special regard to fatal hypothermia and hyperthermia*. *Legal Medicine*, 2010. **12**(3): p. 121-127.
54. Yoshida, C., et al., *Postmortem biochemistry and immunohistochemistry of chromogranin A as a stress marker with special regard to fatal hypothermia and hyperthermia*. *International journal of legal medicine*, 2011. **125**(1): p. 11-20.

55. Chen, W.-T., et al., *Stress-induced cardiomyopathy caused by heat stroke*. *Annals of emergency medicine*, 2012. **60**(1): p. 63-66.
56. Tada, Y., et al., *Severe heatstroke complicated with Takotsubo cardiomyopathy*. *Acute medicine & surgery*, 2016. **3**(2): p. 174-177.
57. García-Rubira, J.C., J. Aguilar, and D. Romero, *Acute myocardial infarction in a young man after heat exhaustion*. *International journal of cardiology*, 1995. **47**(3): p. 297-300.
58. Wakino, S., et al., *A case of severe heat stroke with abnormal cardiac findings*. *International heart journal*, 2005. **46**(3): p. 543-550.
59. Nakagawa, Y., et al., *Molecular biological analysis of cardiac effect of high temperature in rats*. *Legal Medicine*, 2012. **14**(2): p. 63-68.
60. Varshney, J., *Evaluation of Myocardial Damage in Dogs with Heat Stroke*. *Journal of Animal Research*, 2017. **7**(5): p. 979-981.
61. Quinn, C.M., et al., *Cardiovascular and thermoregulatory biomarkers of heat stroke severity in a conscious rat model*. *Journal of Applied Physiology*, 2014. **117**(9): p. 971-978.