

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS
MEDICINOS AKADEMIJA

Vilius Kviesulaitis

**RADIODAŽNINĖS ABLIACIJOS
POVEIKIS ŠIRDIES AUTONOMINEI
INERVACIJAI**

Daktaro disertacija
Biomedicinos mokslai,
medicina (06B)

Kaunas, 2018

Disertacija rengta 2012–2018 metais Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Kardiologijos klinikoje.

Mokslinis vadovas

prof. habil. dr. Aras Puodžiukynas (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, biomedicinos mokslai, medicina, 06B).

Disertacija ginama Lietuvos sveikatos mokslų universiteto biomedicinos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkas

doc. dr. Juozas Kupčinskas (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06B).

Nariai:

prof. dr. Eglė Ereminienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06B);

prof. dr. Gediminas Jaruševičius (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06B);

prof. dr. Sigita Aidietienė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06B);

prof. dr. Gustavs Latkovskis (Latvijos universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06B).

Disertacija ginama viešame medicinos mokslo krypties tarybos posėdyje 2018 m. rugpjūčio 23 d. 13 val. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto ligoninės Kauno klinikų Kardiologijos klinikos II prof. J. Blužo auditorijoje.

Disertacijos gynimo vietos adresas: Eivenių g. 2, LT-50161 Kaunas.

LITHUANIAN UNIVERSITY OF HEALTH SCIENCES
MEDICAL ACADEMY

Vilius Kviesulaitis

**IMPACT OF THE RADIOFREQUENCY
ABLATION ON THE INTRINSIC
AUTONOMIC INNERVATION
OF THE HEART**

Doctoral dissertation
Biomedical science,
Medicine (06B)

Kaunas, 2018

Dissertation has been prepared at the Department of Cardiology of Lithuanian University of Health Sciences during the period of 2012–2018.

Scientific Supervisor

Prof. Aras Puodžiukynas (Lithuanian University of Health Sciences, Biomedical Sciences, Medicine 06B)

Dissertation is defended at the Medical Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences:

Chairperson

Assoc. Prof. Dr. Juozas Kupčinskas (Lithuanian University of Health Sciences, Biomedical Sciences, Medicine – 06B).

Members:

Prof. Dr. Eglė Ereminienė (Lithuanian University of Health Sciences, Biomedical Sciences, Medicine – 06B);

Prof. Dr. Gediminas Jaruševičius (Lithuanian University of Health Sciences, Biomedical Sciences, Medicine – 06B);

Prof. Dr. Sigita Aidietienė (Vilnius University, Biomedical Sciences, Medicine – 06B);

Prof. Dr. Gustavs Latkovskis (University of Latvia, Biomedical Sciences, Medicine – 06B).

Dissertation is defended at the open session of the Medical Research Council of Lithuanian University of Health Sciences on the 23rd of August, 2018 at 1 p.m. in the II Prof. J. Blužo Auditorium of the Department of Cardiology of the Hospital of Lithuanian University of Health Sciences Kauno klinikos.

Address: Eiveniu 2, LT-50161 Kaunas, Lithuania.

TURINYS

SUTRUMPINIMAI	7
ĮVADAS.....	8
1. LITERATŪROS APŽVALGA	11
1.1. Širdies autonominė nervų sistema ir jos tyrimo būdai	11
1.1.1. Širdies autonominės nervų sistemos struktūra	11
1.1.2. Širdies vidinės autonominės nervų sistemos sandara	12
1.1.3. Širdies vidinės autonominės nervų sistemos funkcija.....	14
1.2. Širdies vidinės nervų sistemos tyrimo būdai.....	14
1.3. Širdies ritmo variabilumo panaudojimas vertinant širdies autonomės nervų sistemos funkciją.....	15
1.3.1. Širdies ritmo variabilumo parametrų stabilumas laike	18
1.3.2. Aplinkos ir rizikos veiksnių įtaka ŠRV pokyčiams	18
1.4. Širdies vidinė autonominė nervų sistema ir aritmijos	19
2. TYRIMO MEDŽIAGA IR METODIKA	22
2.1. Leidimas eksperimentiniam tyrimui su gyvūnais ir gyvūnų įsigijimas	22
2.2. Eksperimentiniai gyvūnai.....	22
2.3. Tyrimo metodika	23
2.3.1. Tyrimo trukmė, etapai ir kitos ypatybės	23
2.3.2. Tyrimo užbaigimas, gyvūnų eutanazija	25
2.3.3. Epikardinė radiodažninė abliacija	26
2.3.4. Autonominės nervų sistemos funkcijos vertinimo metodika	29
2.3.5. Autonominės nervų sistemos struktūrinių pokyčių vertinimo metodika	35
2.3.6. Statistiniai metodai taikyti tyrimo metu.....	37
3. REZULTATAI	39
3.1. Bendrosios klinikinės tiriamųjų gyvūnų charakteristikos	39
3.2. Širdies ritmo variabilumo parametrų tyrimo rezultatai	40
3.2.1. Širdies susitraukimų dažnis.....	40
3.2.2. Laiko srities parametrų įvertinimas.....	42
3.3. Dažnių srities parametrų vertinimas.....	51
3.3.1. ADK pokyčių vertinimas	51
3.3.2. ŽDK pokyčių vertinimas.....	53
3.3.3. LŽDK pokyčių vertinimas	55
3.3.4. ŽDK/ADK santykio vertinimas	57
3.4. Imunohistologinio ištyrimo rezultatų įvertinimas	60

4. REZULTATŲ APŽARIMAS	65
5. IŠVADOS.....	69
6. LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	70
PUBLIKACIJŲ MOKSLINIO DARBO TEMA SĄRAŠAS	85
SUMMARY	108
CURRICULUM VITAE	122
PADEKA.....	123

SUTRUMPINIMAI

- AChE – aceticholinesterazė
ADK – Aukštų dažnių komponentė
ANS – Autonominė nervų sistema
CNS – centrinė nervų sistema
DP – dešinys prieširdis
EKG – elektrokardiograma
Hz – hercai
KD – kvėpavimo dažnis
KP – kairys prieširdis
KS – kairysis skilvelis
LŽDK – labai žemo dažnio komponentė
NM – nervinis mazgas
PNN50 – (angl. *proportion of adjacent cycles that are >50 ms. apart*) procentas gretimų R-R intervalų, besiskiriančių vienas nuo kito daugiau nei 50 ms (matuojama, proc.)
PLV – plautinės venos
PV – prieširdžių virpėjimas
RDA – radiodažninė abliacija
RMSSD – (angl. *root mean square successive differences*) vidutinis kvadratinės šaknies skirtumas tarp vienas po kito einančio R-R intervalo trukmės (matuojama ms)
SDANN – (angl. *standart deviation of the average of NN intervals for each 5-min period over selected interval*) standartinis nuokrypis RR intervalų vidurkių, apskaičiuotų per viso monitoravimo metu užrašytas 5 min. trukmės EKG atkarpas
SDNN – (angl. *standart deviation of all normal NN intervals*) standartinis nuokrypis nuo vidutinės visų normalių RR intervalų trukmės (matuojama ms)
SDRR – standartinis nuokrypis nuo visų RR intervalų trukmės (ms)
ŠANS – širdies autonominė nervų sistema
ŠIANS – širdies išorinė autonominė nervų sistema
ŠRV – širdies ritmo variabilumas
ŠRV T – ŠRV trikampis indeksas yra grafinis metodas vertinantis RR tankio histogramos integralo santykį su jos aukščiu
ŠVANS – širdies vidinė autonominė nervų sistema
ŽDK – žemo dažnio komponentė
UŽDK – ultra žemų dažnių komponentė
PGP 9,5 – proteino geno produktas – nesavitasis žymuo nervinėms skaiduloms žymėti (angl. *Protein gene product 9,5*)
TH – tiroksinhidroksilazė

ĮVADAS

Temos aktualumas

Širdies vidinė autonominė nervų sistema (ŠVANS) – tai grupė nervinių mazgų (NM) rezginių (angl. *ganglionated plexi*) išsidėsčiusių prieširdžiuose bei skilveliuose. Šie rezginiai susideda iš mišrių simpatinių ir parasimpatinių širdies išorinės autonominės nervų sistemos (ŠIANS) aksonų, nervinių mazgų ir tarpinių neuronų, kurių tinklas išsidėsto epikardo riebaliniuose kūneliuose (angl. *fat pads*). Žmogaus širdyje identifikuojama iki 10 tokių rezginių, tačiau pavieniai mazgai yra išsibarstę visame miokarde. Prieširdžiuose 5 rezginiai išsidėstę priekiniame ir užpakaliniame jų paviršiuose. Be to, užpakalinis dešiniojo prieširdžio (DP) ir kairiojo prieširdžio (KP) užpakalinis vidinis rezginiai susijungia ir pereina į tarpprieširdinę pertvarą. Skilveliuose nervinių mazgų rezginiai išsidėstę apie aortos šaknį, abiejų vainikinių kraujagyslių ir stambesnių jų šakų žiotis. Gausiausi NM rezginiai yra randami KP užpakaliniame paviršiuje apie plautinių venų (PLV) žiotis [1].

ŠVANS reguliuoja daugumą fiziologinių procesų širdyje. Ji perduoda simpatinių bei parasimpatinių nervų eferenčių postganglinių skaidulų impulsus iš centrinės nervų sistemos (CNS) į ŠIANS struktūras taip reguliuodama kardiovaskulinius refleksus [2]. Nuo jos priklauso sinusinio mazgo veikla ir atrioventrikulinio mazgo laidumas, miokardo kontraktiliškumas, refrakteriškumas bei vainikinių kraujagyslių kraujotaka [3, 4].

Šios sistemos veikla labai svarbi prieširdinių aritmijų kilimui bei tęstinumui [4, 5, 6]. Dažniausia ir svarbiausia iš šių aritmijų yra prieširdžių virpėjimas [7, 8, 9]. Yra nustatytas ryšys tarp ŠVANS aktyvumo ir prieširdžių virpėjimo patofiziologinių mechanizmų. Tyrimais įrodyta, jog cheminė ar elektrinė ŠVANS stimuliacija gali sukelti prieširdžių virpėjimą, palengvinti šios aritmijos sukėlimą ar ją palaikyti [4, 10]. Abliacija NM rezginių vietose tam užkerta kelią [11, 12, 13]. Magnetinio rezonanso tyrimai rodo, jog riebalinių epikardo kūnelių destrukcijos plotas atvirkščiai proporcingai koreliuoja su prieširdžių virpėjimo recidyvų dažniu [2]. Eksperimentiniais darbais įrodyta, jog izoliuota NM rezginių abliacija kairiajame prieširdyje gali būti naudojama paroksizminiam prieširdžių virpėjimui gydyti [14, 15, 16, 17, 18, 19]. Be to, didesnės ar mažesnės apimties nervinių struktūrų destrukcija KP neišvengiamai įvyksta kiekvienos PLV izoliacijos procedūros metu dėl anatomicinio struktūrų persidengimo.

ŠVANS parametrą vertinti dažniausiai naudojamas širdies ritmo variabilumo (ŠRV) tyrimas [20]. Analizuojant laiko ir dažnio srities parametrus vertinama simpatinės ir parasimpatinės nervų sistemos įtaka širdies ritmo svyravimams. Atlikus radiodažninę abliaciją (RDA) nervinių mazgų rez-

ginių vietose prie PLV žiočių, KP ar DP užpakalinėje sienelėje stebimi ŠRV parametrų pokyčiai [21, 22]. Šie pokyčiai įvairių autorių duomenimis išlieka nuo 3 iki 12 mėnesių po procedūros, nors iki šiol ilgesnės trukmės stebėsenos tyrimų neatlikta. Ilgainiui pastebimas dalinis ar net visiškas parametrų normalizavimasis [23, 24, 25, 26]. Tai leidžia manyti, kad egzistuoja kompensaciniai mechanizmai, sąlygojantys ŠVANS funkcijų atsistatymą.

Po PLV izoliavimo procedūros prieširdžių virpėjimo priepuoliai yra linkę atsinaujinti. Skirtingų autorių duomenimis po pirmosios procedūros per 5 metus PV nesikartoja tik 29–47 proc. pacientų [27, 28]. Pakartotinos procedūros šiuos rodiklius pagerina, tačiau, įvairių tyrimų duomenimis, nuo 23 iki 96 proc. pacientų, kuriems pasikartoję PV, PLV žiotys buvo visiškai izoliuotos [29, 30, 31, 32]. Eksperimentiniai tyrimai taip pat leidžia įtarti, kad širdies ANS struktūriniai ir funkciniai pokyčiai vykstantys po PLV izoliavimo procedūrų ar tikslių NM abliacijos procedūrų gali būti potencialiai susiję su vėlyvuju PV atkryčiu [33, 34, 35, 36, 37, 38].

Ankstesnių LSMU atliktų tyrimų su avimis metu buvo nustatyta, kad po RDA kairiajame prieširdyje ŠVANS struktūros sunyksta ne tik pačiame KP, bet ir distaliau nuo abliacijos vietos – skilvelių miokarde [39]. Tačiau pastarojo tyrimo metu nebuvo vertinta bendra ŠVANS funkcija. Be to, 2–3 mėnesių tyrimo trukmė buvo per trumpa, norint įvertinti galimus kompensacinius mechanizmus, tokius kaip nervinių galūnių regeneracija.

Mūsų tiriamojo darbo temos naujumas yra tas, kad nėra tyrimų, vertinančių kartu ir funkcinis, ir struktūrinius ŠVANS pakitimus, vykstančius po didelės apimties abliacijos procedūrų širdyje. Vertindami ŠRV pokyčius po radiodažninės abliacijos aplink PLV žiotis, siekėme iširti šios procedūros įtaką ŠVANS funkcijai, įvertinti ar po efektyvios radiodažninės kablacijos procedūros ŠVANS funkcija ir struktūra atsistato ir, jeigu tai įvyksta, tai koku mastu. Buvo svarbu įvertinti koku būdu vyksta atsistatymas: ar regeneruoja nerviniai mazgai, ar sunaikintų nervinių rezginių funkciją perima kiti mazgai, ar funkcijos pokyčiai yra tik tariami ir vyksta dėl traumuojančio procedūros pobūdžio, kai tuo tarpu RDA procedūra neturi poveikio nervinėms struktūroms.

Hipotezė

RDA procedūros bet kurioje širdies vietoje, o ypač KP užpakalinėje sienelėje prie PLV žiočių, įtakoja ŠVANS veiklą. Po procedūros atsiradę ŠVANS funkcijos pokyčiai literatūros duomenimis ilgainiui sumažėja arba visai išnyksta. Kadangi ŠVANS aktyvumas gali įtakoti prieširdžių virpėjimo patogenezę, todėl yra svarbu iširti galimas šių ŠVANS pokyčių priežastis ir mechanizmus.

Darbo tikslas

Ištirti stambiųjų gyvūnų (avių) širdies vidinės autonominės nervų sistemos funkcinis ir struktūrinius pokyčius po radiodažninės širdies nervinių mazgų rezginių abliacijos kairiajame prieširdyje. Įvertinti šių pokyčių dinamiką per 12 mėnesių.

Darbo uždaviniai

1. Įvertinti bazinius tiriamųjų gyvūnų (avių) ŠRV laiko (ŠSD, SDNN, RMSSD, pNN50, ŠRV TI) ir dažnių srities (AD, ŽD, LŽD, ŽD/AD) parametrus, atspindinčius širdies veiklos autonominę funkciją.
2. Atlikti epikardinę radiodažninę abliaciją avies širdies plautinių venų žiočių srityje.
3. Įvertinti tiriamojo gyvūno širdies vidinės autonominės nervų sistemos funkcijos pokyčius po procedūros artimuoju (po 2–3 parų) bei atokiuoju (po 12 mėnesių) laikotarpiu.
4. Įvertinti struktūrinius (histologinius) tiriamojo gyvūno ŠVANS pokyčius po procedūros.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Širdies autonominė nervų sistema ir jos tyrimo būdai

1.1.1. Širdies autonominės nervų sistemos struktūra

Širdies autonominė nervų sistema (ŠANS) kaip ir visa organizmo autonominė nervų sistema (ANS) yra sudaryta iš simpatinės ir parasimpatinės dalių. Funkcine prasme simpatinės sistemos nervinės skaidulos gerina širdies dromotropinę, chronotropinę ir inotropinę funkcijas, o parasimpatinės skaidulos veikia priešingai ir šias funkcijas slopina. Tačiau šių dviejų sistemų sąveika neapsiriboja vien tik antagonistiniu poveikiu ir yra kur kas sudėtingesnė [40]. Struktūriškai bei topografiškai išskiriamos išorinė bei vidinė ŠANS dalys. Paprasčiau vertinant, širdies išorinė autonominė nervų sistema (ŠIANS) yra sudaryta iš nugaros smegenyse esančių centrų ir simpatinių bei parasimpatinių nervų, einančių į širdį, o širdies vidinė autonominė nervų sistema (ŠVANS) yra sudaryta iš nervinių mazgų rezginių, išsidėsčiusių širdies endokardo, miokardo bei epikardo sluoksniuose [41].

Dauguma eferentinių preganglinių parasimpatinių ŠIANS neuronų prasideda dvilypiam branduolyje (lot. *nucleus ambiguus*), esančiame nugaros smegenyse. Nedidelė jų dalis taip pat yra dorzaliniam motoriniam branduolyje (lot. *nucleus motoricus dorsalis*) bei srityje, esančioje tarp abiejų branduolių. Šie neuronai inervuoja širdyje esančius postganglinius neuronus, priklausančius ŠVANS struktūroms [42]. Tuo tarpu, simpatinės skaidulos prasideda nuo interomediolateralinio branduolio esančio nugaros smegenyse, jungiasi su simpatiniais nerviniais mazgais, esančiais krūtinės ląstoje (žvaigždiniais mazgais, viduriniu ir viršutiniu kakliniais mazgais, tarpuplaučio bei kranio-torakalinės simpatinės grandies nerviniais mazgais) ir inervuoja ŠVANS nervinius rezginius [43]. Be to, į ŠVANS sudėtį įeina ir aferentiniai neuronai, perduodantys į nugaros smegenis mechaninių ir cheminių receptorių signalus iš didžiųjų kraujagyslių, esančių netoli širdies krūtinės ir kaklo srityje [44].

Istoriškai manyta, jog ŠVANS yra simpatinių ir parasimpatinių neuronų terminalės su paraganglinėmis chromafininėmis ląstelėmis sudarančios junginius, tiesiogiai priimančius centrinės nervų sistemos (CNS) signalus ir perduodančius juos širdies struktūroms. Tačiau paskutinio dešimtmečio tyrimai parodė, kad tai yra sudėtinga sistema, turinti ir savus neuronus, o yra ne tik CNS ar ANS tęsinys širdyje. ŠVANS yra sudaryta iš aferentinių (sensorinių), tarpinių bei eferentinių (motorinių) neuronų, tarpusavyje sudarančių atskiras smulkesnes struktūras atsakingas už atskirų širdies dalių ar bendras kardiovaskulinės sistemos funkcijas. ŠVANS galima traktuoti kaip

atskiras nedideles smegenis, kadangi jos neuronai geba ne tik priimti CNS ir ANS reguliacinius signalus, receptorių bei cirkuliuojančių katecholaminų siunčiamą informaciją, bet dėka tarpneuroninių ryšių gali apdoroti gaunamą informaciją bei ją paskirstyti [42].

1.1.2. Širdies vidinės autonominės nervų sistemos sandara

Pagrindinis ŠVANS struktūrinis vienetas yra nervinis mazgas. Tai nervinių ląstelių (neuronų) ir jų aksonų sancaupa savo struktūra panaši į kitus autonominės nervų sistemos mazgus. Šie nerviniai mazgai su nervais sudaro stambesnes struktūras – nervinių mazgų rezginius, kurie susijungia į bendrą širdies nervinį rezginį. Į rezginį ateinančių ir išeinančių nervų bei rezginyje esančių nervinių mazgų kiekis ir dydis skiriasi tarp gyvūnų rūšių ir net tarp atskirų individų. Jų kiekis mažėja su amžiumi. Tačiau pagrindinių rezginių vietos širdyje yra pastovios ir net panašios tarp kai kurių gyvūnų rūšių. Toks tarprūšinis panašumas būdingas žinduoliams, tame tarpe ir žmonėms, avims, kiaulėms bei šunims [1, 45, 46, 40]. Žmogaus širdyje yra 7 tokie rezginiai. Tai kairiosios ir dešinėsios vainikinių arterijų rezginiai, ventralinis ir dorzalinis DP rezginiai, ventralinis, vidurinis dorzalinis bei dorzalinis KP rezginiai [45].

ŠIANS nervai, į minėtus rezginius ateinantys iš žvaigždinių branduolių ir klajoklio nervo, į širdį patenka per vadinamuosius širdies vartus [47]. Tai serozinio perikardo ribojama vieta ties širdies baze, pro kurią taip pat praeina aorta ir plautinis kamienas bei kitos stambiosios širdies kraujagyslės. Toliau šie nervai pasiskirsto į 7 skirtingas grupes, kurios savo ruožtu suformuoja 7 pagrindinius nervinius subrezginius, kartu sudarančius bendrą širdies nervinį rezginį [45].

Didžiausia nervinių skaidulų dalis inervuoja prieširdžius. Šie nervai į juos patenka eidami per veninę širdies vartų dalį, pagal viršutinę tuščiąją bei plautines venas [46]. Jie leidžiasi trimis pagrindiniais keliais – per KP nervinę raukšlę, taip pat tarp abiejų viršutinių plautinių venų bei tarp viršutinės dešinėsios plautinės venos ir viršutinės tuščiosios venos. Po to dalinasi į 5 pluoštus ir suformuoja prieširdžių nervinius rezginius. Nervai nusileidžiantys taku tarp viršutinės tuščiosios venos ir viršutinės dešinėsios plautinės venos formuoja dešiniojo prieširdžio rezginius. Likusieji nervai formuoja KP ir skilvelių nervinius rezginius.

Nors simpatinės ir parasimpatinės nervų skaidulos širdies rezginyje susilieja ir susimaišo tarpusavyje, tačiau ANS inervacija širdyje nėra homogeniška. Cholinerginės ir adrenerginės skaidulos netolygiai inervuoja atskiras širdies dalis susijusias su labiau specializuota funkcija.

Didžiausia cholinerginių skaidulų koncentracija yra dešiniajame prieširdyje apie sinusinį ir atrioventrikulinį mazgus, kadangi jie atsakingi už tikslų širdies susitraukimų dažnio reguliavimą. Parasimpatinės skaidulos šiose srityse taip pat įeina į poendokardinius miokardo sluoksnius, kad pasiektų inervuojamas struktūras. Tuo tarpu kitose srityse dažniausiai skaidulos pasibaigia perikardo riebaliniuose kūneliuose. Skilvelių inervacija parasimpatinėmis skaidulomis yra labai menka lyginant su prieširdžiais [48]. Simpatinės nervų sistemos inervacija širdyje, lyginant su parasimpatine, yra pasiskirsčiusi gana tolygiai. Nors daugiausia adrenerginių skaidulų yra prieširdžiuose ir jų tankis tolygiai mažėja einant link širdies viršūnės, tačiau priešingai nei cholinerginių skaidulų, jų gausiai randama visoje širdyje [49].

Vertinant bendrai, ANS struktūrų pasiskirstymas širdyje taip pat nėra tolygus. Dauguma nervinių rezginių yra susitelkę prieširdžiuose, o ypač kairiajame. Vertinant pagal neuronų skaičių, KP esančiuose rezginiuose yra apie 50 proc. visų širdies nervinių mazgų. Taip pat pastebėtina, jog absoliuti dauguma KP nervinių rezginių neuronų yra išsidėstę gana ribotoje zonoje – nugariniame ir nugariniame šoniniame prieširdžio paviršiuose. Vertinant pagal atskirų rezginių skaičių, KP jų yra daugiausiai nei kitose širdies ertmėse. Jame yra trys anksčiau minėti rezginiai: ventralinis, dorzalinis ir dorzalinis vidurinis. Ventralinis rezginys yra viršutinėje priekinės KP sienelės dalyje. Pagal labai mažą šį rezginį sudarančių nervinių skaidulų kiekį (apie 1 proc. visų širdies neuronų) tikėtina, jog jo funkcija autonominei širdies reguliacijai nėra labai svarbi. Tuo tarpu kairiojo prieširdžio dorzalinis rezginys yra daug didesnis ir apima sritį, padengiančią vidurinę KP užpakalinės sienelės dalį, kairiąją vainikinę vagą bei apatinę ir užpakalinę KS sienelę. Šiame rezginyje yra trečdalis visų širdies nervinių mazgų. Vidurinis dorzalinis KP rezginys yra kiek mažesnis, bet labai svarbi jo lokalizacija. Pagrindinė šio rezginio neuronų dalis yra KP viršutiniame ir nugariniame paviršiuose, bet jie tęsiasi per vainikinę vagą į dorzalinį kairiojo skilvelio paviršių ir net iki viršutinio KP ausytės paviršiaus. Šis rezginys yra kiek mažesnis už dorzalinį KP rezginį, tačiau jį sudaro apie 21 proc. visų širdies nervinių mazgų [45]. Klinikine prasme jis yra labai reikšmingas, nes apima visas plautines venas. Šis faktas yra labai svarbus, gydant PV intervenciniu būdu.

Dar vienas didelis nervinis rezginys yra DP. Jį sudaro 26 proc. širdies nervinių skaidulų. Tai dorzalinis DP nervinis rezginys. Jis leidžiasi nuo tarp-prieširdinės pertvaros viršutinės dalies, link DP viršutinės nugarinės sienelės dalies bei per nugarinę dešinėsios vainikinės vagos dalį iki apatinės ir vidurinės DP srities. Ventralinis DP ir abu skilvelių rezginiai savo dydžiu palyginti yra maži ir išsidėsto siaurose srityse apie vainikines arterijas bei priekiniame viršutiniame DP paviršiuje [45]. Elektrofiziologine prasme šie

rezginiai nėra labai svarbūs, kadangi jie nėra anatomicinėse srityse, kuriose paprastai atliekamos intervencinės elektrofiziologinės procedūros.

1.1.3. Širdies vidinės autonominės nervų sistemos funkcija

ŠVANS koordinuoja ir modifikuoja simpatinių bei parasimpatinių nervų eferenčių postganglinių skaidulų impulsus, perduodančius centrinės nervų sistemos (CNS) ir ŠIANS kardiovaskulinius refleksus į širdį [2]. Nuo jos priklauso sinusinio mazgo veikla ir atrioventrikulinio mazgo laidumas, miokardo kontraktiškumas, refraktoriškumas bei vainikinių kraujagyslių kraujotaka [4]. ŠVANS nėra vien tik paprastas iš CNS ir PNS ateinančių centrinių reguliacinių impulsų paskirstytojas. Net pačiame širdies nerviniame rezginyje egzistuoja atskiri dariniai specializuotai atliekantys sudėtingą atskirų autonominių širdies funkcijų reguliavimą. Pavyzdžiui tyrimuose su katėmis nustatyta, kad kranioventrikulinis nervinių mazgų rezginyje reguliuoja selektyviai tik inotropinę širdies funkciją [50]. Tuo tarpu nervinis rezginyje esantis prie dešinėsios plautinės venos išskirtinai reguliuoja chrontropinę širdies funkciją [51]. Bendrai ŠVANS galima vertinti kaip atskirą nervinę struktūrą, kuri autonomiškai gali valdyti daugelį širdies funkcijų. Tai ypač akivaizdu transplantuotoje širdyje, kuri geba savarankiškai funkcionuoti neturėdama jokie tiesioginio ryšio su centrinėmis nervinėmis struktūromis.

1.2. Širdies vidinės nervų sistemos tyrimo būdai

Klinikinėje praktikoje dažniausiai vertinama ŠVANS funkcija. Autonominės nervų sistemos aktyvumą, reguliuojantį širdies ritminę veiklą, atspindi ŠRV ir baroreflekso jautrumas. ŠRV nustatyti naudojamos kelios metodikos. Jos skirstomos į analizuojančias laiko charakteristikas, apskaičiuojamas tiesiogiai iš RR intervalų sekos, ir analizuojančias dažnio charakteristikas, atspindinčias RR intervalų sekoje esantį periodiškumą. Baroreflekso jautrumo rodiklis parodo galimybę refleksiškai padidinti klajoklio nervo aktyvumą ir sumažinti simpatinių aktyvumą, esant staigiam kraujo spaudimo pokyčiui.

Šios sistemos struktūriniai tyrimai dažniausiai atliekami tik moksliniais tikslais eksperimentų metu. Ištirti struktūrinius ŠVANS pokyčius žmonėms galimybės yra ribotos dėl etinių priežasčių ir gali būti tik atliekamos su donorų ir mirusiųjų širdimis ar širdies raumens biopsine medžiaga [52]. Šios aplinkybės labai riboja tyrimų galimybes. Todėl dauguma eksperimentų atliekama su gyvūnais. Tokių tyrimų metu dažnai vertinamas nervinių skaidulų tankio pasiskirstymas, jų sudėtis adrenerginiu ar cholinergiu požiūriu

[53], o taip pat nervinių skaidulų regeneracija ar proliferacija [54, 55, 56, 57, 58]. Šie autonominės nervų sistemos nervų pokyčiai buvo stebėti gyvūnams eksperimentiniu būdu sukeltant PV. Jie buvo atkartoti žvaigždinį branduolį stimuliuojant elektros impulsais bei paveikiant augimo hormonais [59, 60, 61]. Atliekant histologinius tyrimus su augimo hormonais nustatyta, kad regeneruojantys nervai neatstato žuvusių nervinių struktūrų. Regeneracija vyksta ne tiksliai atkartojant buvusius nervų darinius, o tiesiog apaugant pažeistą širdies dalį. Taip pat pastebėta, kad regeneracija dažniausiai yra perteklinė ir ženkliai padidina autonominių tonusą širdžiai. Šių tyrimų rezultatai sudaro pagrindą prielaidai, kad PV metu vyksta ženklus širdies autonominės nervų sistemos struktūrinis persitvarkymas.

1.3. Širdies ritmo variabilumo panaudojimas vertinant širdies autonomės nervų sistemos funkciją

Autonominės nervų sistemos disfunkcija vaidina svarbų vaidmenį daugelio ligų, tame tarpe ir kardiovaskulinės sistemos sutrikimų, patofiziologiniuose mechanizmuose. Šiuo metu visuotinai pripažinta, jog ANS įtaką reguliuojant širdies veiklą, atspindi ŠRV [62]. ŠRV suvokiamas kaip širdies susitraukimų dažnio svyravimas, apie vidutinį širdies susitraukimų dažnį [63].

Šis tyrimas yra neinvazinis, jautrus, lengvai atliekamas tyrimo metodas. Literatūroje plačiai aprašyta ir praktikoje dažnai naudojamas ŠRV, vertinant ligonių persirgusių miokardo infarktu prognozę, padeda atpažinti ligonius su padidinta skilvelių tachiaritmijų, taigi ir staigios širdinės mirties rizika. Taip pat ŠRV naudojamas vertinti autonominės nervų sistemos disbalansui AH ir IŠL metu, bei naudojamas ligonių, sergančių šiomis ligomis, gydymo efektyvumui kontroliuoti. ŠRV gali padėti įvertinti riziką ir ligos progresavimą širdies funkcijos nepakankamumo metu, bei reinervaciją po širdies transplantacijos [64, 65, 66, 67].

ŠRV apibudinamas kaip sinusinio ritmo dažnio svyravimai, kylantys dėl vidinių ir išorinių veiksnių įtakos. Sudėtingame širdies ritmo reguliavimo procese dalyvauja centrinė nervų sistema, smegenų žievė, pailgosios smegenys, periferiniai nervų sistemos mazgai ir rezginiai, receptoriai bei sinusinis mazgas. Galimas dvejetainis sinusinio mazgo veiklos reguliavimas. Centrinės nervų sistemos reguliaciniai signalai jį gali pasiekti per simpatinius ir parasimpatinius autonominės nervų sistemos ekstrakardialinius nervus bei humoraliniu keliu. Širdyje autonominės nervų sistemos skaidulos raumens ląsteles paveikia išskirdamos jose susintezuojamus ar pernešamus neuromediatorius bei hormonus. Neuromediatorių ir hormonų sukeltas

poveikis nervų sistemos aktyvumo reguliavime panašus, tik skiriasi atsako greitis bei trukmė. Atsakas į neuromediatorius gali pasireikšti beveik staiga – per kelias sekundes ar net jos dalis, tuo tarpu hormonų poveikis yra lėtas, bet gali tęstis valandomis ar net paromis [68, 69].

Svarbiausi nuo autonominės nervų sistemos veiklos priklausomi širdies funkcinio aktyvumo parametrai yra susitraukimų dažnis, miokardo susitraukimo jėga bei atsipalaidavimo greitis ir laipsnis. Sveikam organizmui esant ramybės būsenoje šiuose reguliavimo procesuose dominuoja parasimpatinė nervų sistema. Ji pasižymi slopinamuoju poveikiu. Aktyviuose procesuose labiau įsigali simpatinė nervų sistema, pasižyminti aktyvinančiu poveikiu. Abiejų autonominės nervų sistemos dalių tarpusavio sąveika yra vadinama pabrėžtuoju antagonizmu. Ši būklė nėra parasta abiejų poveikių suma. Slopinantį parasimpatinį poveikį pabrėžia aukštas simpatinis tonusas [70, 71, 72]. Ryšys tarp parasimpatinės nervų sistemos aktyvumo ir ŠRV nėra tiesinis. Didėjant parasimpatinės nervų sistemos aktyvumui ŠRV didėja, kol pasiekia plato lygį, po ko, net ir didėjant parasimpatiniam aktyvumui, ŠRV mažėja [73].

Simpatinė-parasimpatinė sąveika nėra sąlygota vien tik mediatorių ir hormonų aktyvumo. Neuropeptidai gali modifikuoti neurotransmiterių veikimą. Tai neuropeptidas Y, galaninas, enkefalinas, angiotenzinas II, vazopresinas [74].

Veikiant visiems anksčiau aprašytiems mechanizmomams, vyksta toninė ir refleksinė širdies ritminės veiklos reguliacija. Toninė reguliacija susijusi su nuolatine, iš receptorinių sričių į centrinę nervų sistemą patenkančia aferentine impulsacija, dėl to nusistovint tam tikram širdies ritminės veiklos autonominio reguliavimo aktyvumo santykiui. Šis santykis yra pagrindas širdies ritmo reguliavimo kitimui dėl refleksinio poveikio. Refleksinė reguliacija vyksta kintant kvėpavimo dažniui ir gyliui, AKS, kūno temperatūrai, rūgščių-šarmų balansui [75].

Autonominės nervų sistemos aktyvumą, reguliuojant širdies ritminę veiklą, atspindi ŠRV ir baroreflekso jautrumas. ŠRV nustatyti naudojamos kelios metodikos. Jos skirstomos į analizuojančias laiko charakteristikas, apskaičiuojamas tiesiogiai iš RR intervalų sekos, ir analizuojančias dažnio charakteristikas, atspindinčias RR intervalų sekoje esantį periodiškumą.

Dažniausiai tyrimuose naudojami ŠRV laiko srities parametrai:

- mRR (mean RR interval) – vidutinis atstumas tarp 2 atskirų QRS kompleksų R dantelių, arba vidutinė širdies ciklo trukmė
- SDNN (the standart deviation of all normal NN intervals) – standartinis nuokrypis nuo vidutinės visų RR intervalų trukmės (ms).

- SDANN (the standart deviation of the average of NN intervals for each 5-min period over selected interval) – RR intervalų vidurkių, apskaičiuotų per viso monitoravimo metu užrašytas 5 min. trukmės EKG atkarpas, standartinis nuokrypis (ms),
- RMSSD (the root mean square successive differences) – vidutinis kvadratinės šaknies skirtumas tarp vienas po kito einančio R-R intervalo trukmės (ms),
- PNN50 (the proportion of adjacent cycles that are > 50 msec. apart) – procentas gretimų R-R intervalų, besiskiriančių vienas nuo kito daugiau nei 50 ms (proc.),
- ŠRV TI – ŠRV trikampis indeksas yra grafinis metodas vertinantis RR tankio histogramos integralo santykį su jos aukščiu

Dažnių srities parametrai:

- Aukštų dažnių komponentė (ADK), kurios dažnis svyruoja nuo 0,15 iki 0,4 Hz,
- Žemų dažnių komponentė (ŽDK), kurios dažnis svyruoja nuo 0,04 iki 0,15 Hz,
- Labai žemų dažnių komponentė (LŽDK), kurios dažnis svyruoja nuo 0,0033 iki 0,04 Hz,
- Ultra žemų dažnių komponentė (UŽDK), kurios dažnis svyruoja nuo 0,0 iki 0,0033 Hz,
- Bendras dažnio spektras tai svyravimas nuo 0,0 iki 0,4 Hz, atspindintis ADK, ŽDK, LŽDK ir UŽDK sumą,
- ŽDK/ADK santykis,
- LogADK atspindinti simpatinės nervų sistemos įtaką,
- LogŽDK atspindinti parasimpatinės nervų sistemos įtaką.

Be šių, gerai žinomų ir palčiai naudojamų ŠRV vertinimo metodų naudojami ir nelinijiniai ŠRV analizės metodai, kurie remiasi „chaoso“ teorija. Ši metodika grindžiama tuo, jog kardiovaskulinės sistemos funkciją įtakojantys veiksniai nėra pastovūs ir tarpusavyje saveikauja ne linijine priklausomybe. Lietuvoje ši metodika sukurta ir plėtotą Kauno medicinos universitete, vadovaujant prof. D. Žemaitytei. Ji skiriasi nuo tradicinių ŠRV vertinimo metodų tuo, jog vertina ne variabilumo dydį, o jo kompleksškumą ir koreliacines savybes [76, 77]. Nors sukurta daug nelinijinių metodų, tačiau klinikinėje praktikoje prigijo nedaugelis. Populiariausios yra skategogramos, kitaip dar vadinamos Poincare diagramomis, lengvai suprantama forma pateikiančios daug informacijos [78].

1.3.1. Širdies ritmo variabilumo parametrų stabilumas laike

Širdies ritmo variabilumo parametrų, apskaičiuotų iš EKG monitoravimo metu užregistruotų įrašų, stabilumas laike, nekintant klinikinei tiriamojo būklei, įrodytas klinikiniuose tyrimuose [79, 80]. Tai ypač svarbu planuojant ilgalaikius tyrimus, kurių metu kartotinai vertinami ŠRV parametrai.

Tiriant pacientus, kuriems kartojasi vazovagalinės sinkopės, nustatyta, kad vienos paros laikotarpyje ŠRV koreliacijos koeficientai visiems laiko parametrams buvo $> 0,96$. Šiems pacientams stabiliausi parametrai buvo RMSSD ir PNN50 [81]. Ziegler vadovaujamame tyrime, įrodytas statistiškai reikšmingas laiko ir dažnio parametrų atgaminimas per 29 savaites. Tirtų parametrų koreliacijos koeficientas kito nuo 0,66 iki 0,43. Tik tai ŽDK/ADK santykio bei ŽDK reikšmės normalizuotais vienetais koreliacijos koeficientai nebuvo statistiškai reikšmingi [82]. Pardo ištyrė, kaip ŠRV parametrų atkuriami sergantiesiems išemine širdies liga tyrimus atliekant su vienos dienos pertrauka. Nustatytas statistiškai reikšmingas ($p < 0,001$) laiko ir dažnio ŠRV parametrų koreliacijos koeficientas siekė net 0,99 [83]. Tiriant pacientų, sirgusiųjų MI, dažnio parametrų atgaminamumą, esant vidutiniam 7,9 dienų intervalui tarp tyrimų, ŠRV dažnio parametrų koreliacijos koeficientai buvo statistiškai reikšmingi ir svyravo nuo 0,79 iki 0,96 bei buvo panašūs į sveikų kontrolinės grupės asmenų koreliacijos koeficientus [84]. Tokie tyrimai įrodo, jog ŠRV gali būti naudojamas kaip autonominės nervų sistemos funkcijos vertinimo metodas, turintis gerą parametrų atgaminimą skirtingų tyrimų metu.

1.3.2. Aplinkos ir rizikos veiksnių įtaka ŠRV pokyčiams

Organizmui senstant, ŠRV mažėja ir tai yra biologinis senėjimo žymuo. ŠRV mažėja dėl nykstančio klajoklio nervo eferentinio tonuso ir sumažėjusio beta-adrenerginio atsako [85]. Nuo 50 metų amžiaus stebimas laipsniškas reliatyvus simpatinės nervų sistemos aktyvumo didėjimas ir dominavimas prieš silpnesnį parasimpatinį aktyvumą. Tačiau, vyresniojo amžiaus žmonėms stebimas ir sumažėjęs širdies atsakas į simpatinės nervų sistemos aktyvumą. Taigi, senstant nusistovi nauja pusiausvyra tarp dviejų autonominės nervų sistemos dalių [86, 87]. ŠRV parametrų dydžiai pastebimai skiriasi tarp lyčių, vyrams nustatyti didesni laiko ir dažnio parametrai. Tačiau moterų ADK didesnė, o ŽDK/ADK santykis mažesnis nei vyrų [88, 89].

ŠRV susijęs su ŠSD. Didėjant simpatinės nervų sistemos aktyvumui ŠSD didėja, o didėjant parasimpatinės nervų sistemos aktyvumui, ŠSD mažėja. Tačiau, nepaisant ryšio su ŠSD, ŠRV teikia daugiau informacijos apie autonominės nervų sistemos būklę nei vien tik ŠSD [63, 90].

Miego metu autonominės nervų sistemos įtaka, reguliuojant širdies veiklą, kinta priklausomai nuo miego stadijų. Sveikiems žmonėms lėtojo miego stadijos metu didėjančią ŠRV labiau lemia simpatinės įtakos mažėjimas nei parasimpatinės didėjimas. Greitojo miego stadijos metu simpatinis aktyvumas nekinta, bet mažėja parasimpatinis aktyvumas. Pacientai persirgę MI praranda parasimpatinę aktyvaciją miego metu ir jiems simpatinis aktyvumas dominuoja visų miego stadijų metu. Tai vaidina labai svarbų vaidmenį staigios mirties mechanizme miego metu [91, 92].

Žmonių, kurių fizinis treniruotumas yra geras, ŠRV parametrai būna didesni nei tokio paties amžiaus ir svorio netreniruotų asmenų, nes auga parasimpatinės ir nekinta simpatinės nervų sistemos aktyvumas [93, 94]. Emocijos ir stresai keičia simpatovagalinį balansą, dėl vyraujančio simpatinio aktyvumo. Taigi, vertinant ŠRV tarp skirtingų pacientų grupių, nereikia pamiršti ir emocijų įtakos.

Pacientams, priklausantiems nuo alkoholio, ŠRV yra sumažėjęs. Pavartojus alkoholio, pradžioje žymiai sumažėja parasimpatinės nervų sistemos įtaka (dėl aferentinės autonominės inervacijos silpnėjimo), vėliau pradeda dominuoti simpatinis aktyvumas [95]. Rūkymas sukelia staigų ir trumpalaikį parasimpatinio aktyvumo sumažėjimą ir simpatinio padidėjimą. Daug rūkantiems ŠRV pokyčiai, keičiant kūno padėtį, sumažėja [62].

Nutukusiems asmenims sumažėja parasimpatinės nervų sistemos aktyvumą atspindinčių ŠRV parametrai. Tuo iš dalies būtų galima paaiškinti ir didesnę nutukusių žmonių sergamumą ir mirštamumą [62].

1.4. Širdies vidinė autonominė nervų sistema ir aritmijos

Domėjimasis ŠVANS sąsaja su širdies aritmijomis labai padidėjo paskutinįjį dešimtmetį, pradėjus geriau suprasti PV patogenezę ir atsiradus tokioms naujoms perkaterinio gydymo technologijoms, kaip balioninė plaučių venų krioabliacija. Užuominų, kad ANS veikla gali būti susijusi su PV patogeneze būta jau pirmaisiais XX a. dešimtmečiais. Tuo metu Rothbergas, Winterbergas, Lewis, Drudis, Bulgeris ir Hoffas atliko daugybę eksperimentų, tirdami klajoklio nervo stimuliacijos ir cholinerginių medžiagų įtaką PV kilti [96]. Šie tyrimai įrodė, jog cholinerginių skaidulų stimuliacija gali sukelti PV priepuolius. Tačiau taip pat pastebėta, kad adrenerginės sistemos aktyvumas yra ne mažiau svarbus. Padaryta išvada, jog sutrikusi pusiausvyra tarp simpatinės ir parasimpatinės ANS dalių, o ne konkrečiai, kurios nors iš jų suaktyvėjimas, yra atsakinga už proaritminių poveikių miokardui [97, 98, 99, 100, 101, 102].

Eksperimentinių tyrimų metu nustatyta, kad užsitęsus PV, vyksta ŠVANS struktūrinis persitvarkymas. Tyrimuose su gyvūnais pastebėta, kad, sukėlus PV eksperimentinėmis sąlygomis, suaktyvėja širdies nervų proliferacija ir regeneracija [54]. Panašūs nervinių struktūrų pokyčiai vyksta ir po miokardo infarkto [57] bei sergant širdies nepakankamumu [55]. Tačiau pažeistų nervų regeneracija ir proliferacija šių būklių metu yra chaotiška, perteklinė ir sudaro sąlygas lengviau kilti įvairioms širdies aritmijoms [56].

Bandymuose su gyvūnais, tiriant širdies aritmijas, taip pat stebėti ir funkciniai ŠVANS pokyčiai. Ilgalaikės elektrinės stimuliacijos metu dirbtinai sukėlus širdies nepakankamumą šunims, padidėjo bendras simpatinės ir parasimpatinės ANS aktyvumas. Šis ANS suaktyvėjimas buvo glaudžiai susijęs su prieširdinėmis tachiaritmijomis ir suintensyvėdavo prieš pat aritmiją [103, 104]. Proaritminis ANS veikimas buvo patvirtintas ir sušvirktus adrenerginių ir cholinerginių medžiagų į sinusinį mazgą maitinančią arteriją [105] bei elektrinės ŠVANS struktūrų stimuliacijos metu [105, 101]. Eksperimentų metu taip pat nustatyta, kad proaritminis ANS aktyvumas atsiranda ne atsitiktine, chaotiška tvarka. Elektrinės adrenerginės ir cholinerginės sistemos iškrovo širdies raumenyje yra tarpusavyje koordinuotos ir kontroliuojamos [106].

Aptariant ŠVANS įtaką širdies aritmijoms svarbu paminėti ir tai, kad užpakalinės KP sienelės miokardo elektrinės savybės gerokai skiriasi nuo likusios širdies dalies. Eksperimentuose su gyvūnais įrodyta, jog veikimo potencialo trukmė šioje srityje yra trumpesnė dėl savitos jonų kanalų fiziologijos [107]. Normaliomis sąlygomis prieširdžių miokardas yra atsparus proaritminiams poveikiams. Tačiau, pakitus autonominės nervų sistemos tonusui, toks veikimo potencialo sutrumpėjimas gali tapti aritmijų priežastimi. Įvertinus ir tai, kad užpakalinė KP sienelė yra labai gausiai įnervuota autonominių skaidulų, proaritminių sąlygų atsiradimas šioje srityje yra lengvai paaiškinamas. Autonominė nervų sistema informaciją perduoda elektriniais impulsais per savituosius receptorius. Parasimpatinės nervų sistemos informacija perduodama, keičiant jonų kanalo I_{KAcH} aktyvumą. Beta adrenerginė simpatinės sistemos dalis stimuliuoja jonų kanalų I_{CaL} ir I_{ks} veiklą. O alfa adrenerginė sistema savo funkcijas atlieka slopindama I_{K1} kanalus [107, 108, 109]. Šių kanalų veiklos pokyčiai įtakoja Ca^{2+} srautus ir repoliarizacijos trukmę. Tai yra fiziologinio mechanizmo, reguliuojančio širdies chronotropinę bei inotropinę funkciją dalis. Tačiau susidarius nepalankioms stresinėms sąlygoms ar esant įgimtai jonų kanalų disfunkcijai, elektrinio ANS aktyvumo padidėjimas gali sąlygoti ektopinio automatizmo sustiprėjimą [110, 111, 112]. Tuo būdu, prieširdinės tachiaritmijos gali kilti dėl pernelyg ankstyvos depoliarizacijos (ekstrasistolijos), užsitęsios repoliarizacijos

arba padidėjusio automatizmo sąlygotų dažnų ektopinių iškrovų plaučių venose.

Proaritmėnis autonominės nervų sistemos poveikis neapsiriboja molekulinio ir ląstelinio lygio pokyčiais. Jis gali būti dar labiau sustiprintas per grįžtamojo ryšio (angl. *re-entry*) mechanizmą, kuriame taip pat gali dalyvauti ŠVANS struktūros. Parasimpatinė nervų sistema širdyje yra pasiskirsčiusi netolygiai, susitelkusi apie sinusinę ir atrioventrikulinę mazgus bei vainikinių arterijų kamienus. Tuo tarpu simpatinė inervacija yra palyginti homogeniška. Tai sąlygoja netolygų cholinerginio poveikio ląstelių refraktoriškumą ir adrenerginio poveikio veikimo potencialo trukmę. Esant palankioms sąlygoms, miokarde gali susidaryti skirtingo elektrinio potencialo sritys, o tai sukuria sąlygas atsirasti grįžtamojo ryšio prieširdinėms aritmijoms [113, 49]. Be to, ilgalaikis adrenerginės nervų sistemos tonuso padidėjimas taip pat pakeičia ir prieširdžių miokardo struktūrą. Tyrimais įrodyta, kad sergant širdies nepakankamumu, simpatinio tonuso padidėjimas skatina genų, atsakingų už miokardo hipertrofiją, remodeliaciją ir fibrozę, ekspresiją [114, 115]. Šių dviejų veiksnių derinys sąlygoja nevienodas sąlygas elektrinio potencialo sklidimui miokarde. Susidariusios greito ir lėto elektrinio potencialo plitimo zonos padeda susidaryti ydingiems grįžtamojo ryšio ratams ir taip sudaro sąlygas kilti aritmijoms.

2. TYRIMO MEDŽIAGA IR METODIKA

2.1. Leidimas eksperimentiniam tyrimui su gyvūnais ir gyvūnų įsigijimas

Eksperimentiniam terminaliniam tyrimui su stambiaisiais gyvūnais vykdyti gautas Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos leidimas Nr. 33IV-62 išduotas 2014 03 04, remiantis Lietuvos bandomųjų gyvūnų naudojimo etikos komisijos prie Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos 2014 02 19 dienos posėdžio pirmoji išvada, – leidžiama Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Veterinarijos akademijai ir Kardiologijos institutui atlikti bandymo su gyvūnais projektą „Radiodažninės abliacijos įtaka širdies autonominei reguliacijai ir širdies autonominei inervacijai“.

Tyrimas atliktas laikantis Europos Sąjungos Parlamento priimtos direktyvos dėl moksliniams tyrimams naudojamų gyvūnų apsaugos 2010/63 (angl. *Directive 2010/63/EU*).

Tiriamieji gyvūnai įsigyti iš privataus gyvulininkystės ūkio, esančio Prienujų rajone, Pakuonio kaime.

2.2. Eksperimentiniai gyvūnai

Tyrimui buvo panaudota 15 Romanovo veislės avių (7 moteriškos ir 8 vyriškos lyties). Pasirinkti visišką lytinę brandą (5–7 mėn. amžiaus) pasiekę avių jaunikliai [116]. Patinėliai buvo kastruoti iki 1 mėn. amžiaus, laikantis įprastos procedūros praktikos gyvulininkystėje [117]. Prieš pradėdant tyrimą visi gyvūnai apžiūrėti veterinarijos gydytojo, jų sveikatos būklė įvertinta kaip gera. Vidutinė avių kūno masė tyrimo pradžioje siekė $21,6 \pm 3,1$ kg.

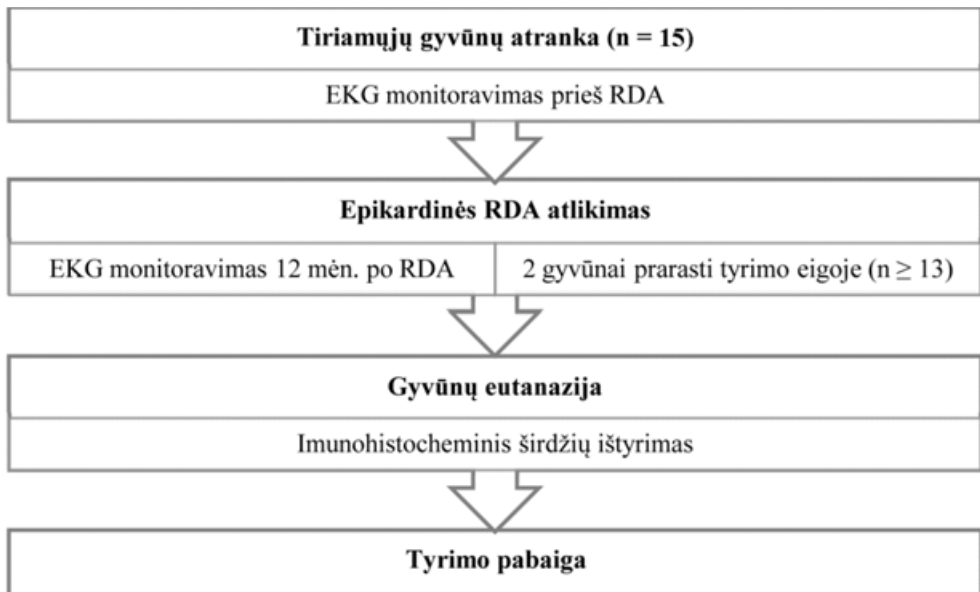
Didžiąją tyrimo trukmės dalį eksperimente dalyvavusios avys laikytos tame pačiame ūkyje, iš kurio buvo įsigytos. Radiodažninės abliacijos procedūrai gyvūnai buvo specialiu pritaikytu transportu perkelti į LSMU Veterinarijos akademiją, kur perioperaciniame laikotarpyje (2–3 paras iki procedūros ir apie savaitę po jos), buvo prižiūrimi veterinarijos gydytojų bei tyrimo dalyvių. Po procedūros gyvūnai grąžinti atgal į ūkį. Avys, atsigavusios po torakotomijos, likusią tyrimo dalį buvo laikomos kartu su motinine banda. Šiltuoju metų laiku banda laikyta laisvai, ganoma pievoje su įrengta pastoge apsaugai nuo nepalankių klimato sąlygų. Šaltuoju metų laiku gyvūnai laikyti tvarte, garduose, skiriant apie 4–5 m² laisvo ploto vienam gyvuliui. Pašarai tiriamiesiems gyvūnams nesiskyrė nuo įprastinių. Esant galimybei buvo šeriama šviežia žolė, šaltuoju metų laiku šienų, papildomai

primaitinant įvairių rūšių grūdais ar jų miltais bei mikroelementais, skirti vitaminai. Tyrimo pabaigoje gyvūnai vidutiniškai svėrė $83 \pm 14,2$ kg. Tai nesiskyrė nuo vidutinių rūšies charakteristikų ir galima manyti, kad buvo užtikrinta pakankama mityba. Viso tyrimo metu buvo prieinamos reikalingos veterinarinės paslaugos, avys vakcinuotos ir dehelmintizuotos įprasta tvarka. Buvo užtikrinta nuolatinė veterinarijos gydytojo priežiūra.

2.3. Tyrimo metodika

2.3.1. Tyrimo trukmė, etapai ir kitos ypatybės

Tyrimo tikslas buvo atlikti ilgalaikę (12 mėnesių) stebėseną po epikardinės kairiojo prieširdžio RDA ir įvertinti šios procedūros įtaką ŠVANS funkcijai ir struktūrai. Tyrimo schema pateikiama 2.3.1.1 pav. Kadangi eksperimento metodika buvo pagrįsta teorinėmis žiniomis iš literatūros apžvalgos ir negausia praktine patirtimi, todėl pradiniam tyrimo etape nuspręsta atlikti pilotinį tyrimą su nedideliu avių kiekiu, norint patikrinti ir optimizuoti darbo metodiką. Šiai tyrimo daliai pasirinkti 5 ėriukai, atvesti kovo ir balandžio mėnesiais. Tuo būdu, pradėdant tyrimą spalio mėnesį, jų amžius buvo apie 6–7 mėnesiai ir vertinta kaip pakankama branda tyrimui atlikti.



2.3.1.1 pav. Tyrimo struktūra

EKG – elektrokardiograma; RDA – radiodažninė abliacija.

Tyrimas pradėtas, atliekant 24 val. EKG monitoravimą sveikoms avims, siekiant įvertinti bazinius EKG ir ŠRV parametrus tiriamajai grupei bei palyginti juos su esamais literatūros duomenimis. Po atlikto EKG amonitoravimo visos avys buvo perkeltos iš ūkio į veterinarijos kliniką epikardinės RDA atlikimui. Kadangi buvo atliekama po vieną procedūrą per dieną, be to, nekasdien, įskaitant perioperacinę stebėseną, trukusią apie savaitę po RDA, avys atgal į ūkį gražintos maždaug po 24 parų. RDA atlikimas vertintas kaip tyrimo pradžia. Po procedūros avys stebėtos 12 mėnesių iki numatytos tyrimo pabaigos ir eutanazijos. Pirmasis EKG monitoravimas atliktas per pirmąsias 2–3 paras po epikardinės RDA procedūros ankstyvajam poveikiui įvertinti. Vėliau EKG monitoravimas kartotas kas mėnesį ištisus metus.

Šio tyrimo metu buvo tobulinta tyrimo metodika. Tikslinti avių bendrinės nejautos, dirbtinės plaučių ventilacijos bei torakotomijos protokolai, RDA aplikacijų vieta ir kiekis. Taip pat savitai modifikuota stambiųjų gyvūnų Holter monitoravimo metodika, pritaikant ją avims. Įsisavinta ir optimizuota pati monitoravimo technika.

Pilotiniame tyrime netekome 2 avių. Viena jų nugaišo ankstyvuojų pooperaciniu laikotarpiu, antrąją parą po procedūros. Nors po RDA avies gyvybinės funkcijos buvo geros ir praėjus 2 valandoms avis buvo visiškai atsigavusi po bendrinės nejautos, ganėsi ganykloje su kitais eksperimentiniais gyvūnais, tačiau antros paros rytą ji buvo rasta nugaišusi. Skrodimo metu paaiškėjo, kad mirties priežastis buvo kairiosios vainikinės arterijos pažaida procedūros metu, dėl kurios įvyko vainikinės arterijos trombozė bei kairiojo skilvelio miokardo infarktas. Įvykis vertintas kaip tyrėjo klaida. Buvo adaptuota RDA procedūra, siekiant išvengti šios komplikacijos pasikartojimo, koreguota abliacijos linija, nutolinta nuo vainikinės (atrioventrikulinės) vagos. Antroji avis nugaišo, praėjus 18 savaitių nuo tyrimo pradžios. Avis pasidarė vangi, nustojo ėsti, pradėjo kosėti, pasunkėjo kvėpavimas, auskultuojant buvo girdimi karkalai dešinėje. Kadangi fermoje tuo metu sirgo keletas gyvūnų, todėl būklė vertinta kaip infekcinė liga. Skirtas empirinis antibakterinis gydymas penicilino G prokaino druskos injekcijomis į raumenis. Mirties priežastis buvo dešiniojo plaučio uždegimas, galimai virusinės kilmės, nes nebuvo atsako į antibakterinį gydymą. Diagnozė patvirtinta kliniškai ir apžiūrint plaučius autopsijos metu. Abu gyvūnai utilizuoti pagal numatytą protokolą. Likusių trijų avių sveikatos būklė viso tyrimo metu buvo gera.

Baigus pilotinį tyrimą, kitą rudenį, pradėtas pagrindinis tyrimas. Prie šio tyrimo duomenų pridėti ir išgyvenusių trijų avių duomenys. Tyrimui atrinkta 10 avių, taip pat iš pavasarinės vados. Šio eksperimento eiga buvo sklandi. Visi dalyvavusieji gyvūnai neturėjo sveikatos sutrikimų, gerai tole-

ravo torakotomiją ir epikardinę KP RDA. Tyrimo metu avys stebėtos 12 mėnesių po procedūros, tačiau nuo pirmosios operacijos iki paskutinės avies eutanazijos tyrimas truko apie 13 mėnesių (2015-10–2016-11).

2.3.2. Tyrimo užbaigimas, gyvūnų eutanazija

Suplanuotas eksperimentinis tyrimas buvo terminalinio pobūdžio. Jo pabaigoje numatytas histologinis širdies nervinių struktūrų ištyrimas, todėl eksperimento pabaigoje, baigus numatytus EKG monitoravimo tyrimus, gyvūnai anestezuoti ir atlikta eutanazija. Jų širdys paimtos histologiniam ištyrimui.

Įvadinei sedacijai prieš eutanaziją pasirinkta ksilazino tirpalo injekcija į raumenis. Tai alfa2-adrenerginių receptorių agonistas, naudojamas veterinarijoje praktikoje gyvūnų sedacijai nuo 1968 metų Šis preparatas pasirinktas, nes jis turi raminantį, nestiprų nuskausminantį ir centrinį raumenis atpalaiduojantį poveikį [118]. Jo poveikis yra nuo rūšies priklausomas. Skirtingoms gyvūnų rūšims įvairuoja minėtų trijų poveikio komponentų raiška. Preparatui itin jautrūs galvijai ir arkliai. Avims ir ožkoms poveikis yra kiek silpnesnis, tačiau taip pat labai stiprus. Siekiant kuo labiau sumažinti gyvūnui keliamą stresą prieš numatomą eutanaziją, pasirinktos avys buvo šeriamos kartu su likusia bandos dalimi ar keletu kitų avių. Šėrimo metu, joms pažįstamas asmuo (šeimininkas) išvirkšdavo 2 proc. ksilazino tirpalo į raumenis, dozuojant 0,1 mg/kg kūno masės. Po to 5–10 min. buvo laukiama vaisto poveikio požymių pradžios (vangumo, lengvos dezorientacijos). Atsiradus raminamajam poveikiui, gyvūnai buvo atskiriami nuo bandos ir pervedami į atskirą patalpą eutanazijai.

Baigiamajai anestezijai ir gyvūno eutanazijai pasirinktas pentobarbitalio natrio druskos tirpalas 400 mg/ml. Tai barbitūratų grupės preparatas. Jo veikimas labai greitas. Su kraujo tėkme patekęs į centrinę nervų sistemą jis per keletą sekundžių neskusmingai slopina visas gyvybines funkcijas. Teisingai atlikus injekciją, per 5 sekundes pasiekiamas visiškas nuskausminimas, kvėpavimas sustoja per 20 sekundžių. Dėl savo savybių pentobarbitalio natrio druska laikoma vienu iš žmogiškiausių preparatų naudojamų gyvūnų eutanazijai [119]. Preparatas veterinarijos gydytojo buvo švirkščiamas į jungo veną srove dozuojant 0,1–0,2 ml/kg kūno masės. Pradinei nejautrai pentobarbitalio injekcija buvo leidžiama lėtai, kol gyvūnas netekdavo sąmonės. Po to likusi preparato dalis buvo iš karto suleidžiama srove ir tęsiami kiti veiksmai. Kadangi tyrimo tikslas buvo atlikti širdies raumens histologinius preparatus ir ištyrimui buvo reikalinga kuo geresnė audinių kokybė. Šiam tikslui pasiekti buvo būtina pašalinti kraują iš širdies kraujagyslių

ir ertmių kuo greičiau ir efektyviau, dar nepradėjus kraujui krešėti. Netekus sąmonės, avims buvo kuo greičiau nupjaunama galva, siekiant pašalinti kraują iš audinių, dar nesustojus širdžiai. Šis metodas pasirinktas, nes tai yra vienas humaniškiausių gyvūnų skerdimo metodų. Jo metu gyvūno kančia būna labai trumpa net ir be bendrinės nejautos, kadangi mechanškai nutraukiamas ryšys tarp galvos ir nugaros smegenų. Po galvos nupjovimo gyvūnas buvo pakeliamas vertikaliai, galva žemyn ir kuo skubiau širdis išimama iš krūtinės ląstos.

Širdys apdorotos specialios paskirties tirpalais, pašalinant kraujo likučius iš apytakinės sistemos. Per kylančiąją aortą švirškštu praplaunama atšaldytu fosfatinio fiziologiniu tirpalu (pH – 7,4). Išplovus kraują iš širdies kamerų bei kraujagyslių, buvo praplaunama 4 proc. paraformaldehido tirpalu fosfatiname buferyje, laikoma jame 15 min., kol audiniai užsifikuos ir praplaunama 3×10 min. fosfatinio fiziologiniu tirpalu. Tolimesniam paruošimui bei ištyrimui širdys buvo gabenamos į Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Anatomijos instituto laboratoriją. Po eutanazijos avių kūnai utillizuoti, laikantis tyrimo protokolo.

2.3.3. Epikardinė radiodažninė abliacija

Tyrimo tikslas buvo atlikti kairiojo prieširdžio užpakalinėje sienelėje esančių nervinių struktūrų abliaciją. Pasirinktas epikardinis RDA atlikimo būdas. Nuspręsta, jog mažiausiai traumuojanti gyvūnus ir patogiausia prieiga prie KP yra kairioji torakotomija. Procedūrą nuspręsta atlikti stambųjų gyvūnų chirurgijos operacinėje, taikant bendrinę nejautrą ir gyvybines funkcijas palaikant mechaniniais prietaisais. Operacijos protokolą sukūrėme ankstesnių mūsų klinikoje atliktų tyrimų su avimis metu [39]. Operacijoje dalyvavo tyrėjai, veterinarijos gydytojai (atliko chirurgines manipuliacijas), gydytojas anesteziologas (atliko bendrinę nejautrą ir stebėjo gyvybines funkcijas), gydytojas elektrofiziologas (atliko RDA), anatomijos specialistas (patikslino abliacijos vietą) bei pagalbiniai darbuotojai.

Gyvūnai iš vakaro prieš operaciją nebuvo šeriami, norint išvengti skrandžio turinio evakuacijos ir aspiracijos intubacijos metu. Operacijos atliktos rytais, siekiant trumpinti badavimo laiką ir sumažinti diskomfortą gyvūnams.

Siekiant paruošti gyvūną operacijai ir sukelti mažiau streso, įvadinei sedacijai buvo skiriama 2 proc. ksilazino tirpalo injekcija į raumenis, dozuo-jant pagal kūno masę po 0,1 mg/kg svorio. Po 2–5 minučių avis tapdavo abejinga vidutinio stiprumo dirgikliams ir tada buvo gabenama į operacinę. Bakterinių komplikacijų profilaktikai prieš procedūrą buvo skiriama amok-sicilino ir klavulaninės rūgšties injekcija. Tromboembolinių komplikacijų

profilaktikai buvo skiriama mažos molekulinės masės heparino po oda. Elektrinėmis žirkklėmis kiek įmanomai trumpiau buvo nukerpamas visas kailis. Operacinio lauko zona nuskutama plikai. Gyvūnas perkeliamas ant operacinio stalo ir guldomas ant dešiniojo šono. Prijungiami gyvybinių funkcijų stebėsenos prietaisai. Kardiovaskulinės sistemos būklei stebėti buvo registruojama EKG. Tam naudoti krokodiliniai gnybtiniai elektrodai sudrėkinti fiziologiniu tirpalu bei EKG monitorius. Dirbtinės plaučių ventiliacijos efektyvumui stebėti prie gyvūno liežuvio buvo pritvirtinamas saturometas, vertinti arterinio kraujo dujų išotininimą deguonimi.

Įvadinei bendrinei nejautrai sukelti prieš intubaciją skirta 0,03 mg/kg midazolamo ir 2 mg/kg ketamino injekcija į raumenis. Gyvūną intubavus, bendrinei nejautrai palaikyti buvo skiriama intraveninė fentanilio infuzija 5 µg/kg svorio automatinė švirkštine pompa bei pastovi ventiliacija halotano dujomis dirbtinės plaučių ventiliacijos metu. Taikant dirbtinę plaučių ventiliaciją, buvo palaikomas pastovus teigiamas slėgis, norint išvengti plaučių subliūškimo. Visos operacijos metu skysčių balansas buvo palaikomas nuolatine Ringerio tirpalo infuzija į veną 15 ml/kg/val.

Operacinis laukas paruoštas dezinfekuojant odą 70 proc. 2-propanolio ir 1,3-butandiolio tirpalu, išlaikant drėgną odą > 60 sekundžių. Visas gyvūnas buvo apklojamas steriliu apklotu, paliekant atidengtą operacinį lauką, kuris apklijuotas sterilia permatoma plėvele. Krūtinės ląsta buvo atveriamą piūviu kairėje, penktame tarpšonkauliniame tarpe, perpjaunant tarpšonkaulinius raumenis pagal šonkaulių eigą. Kraujavimas stabdytas elektrokaustika ir perrišant stambiausias gyslas. Tarpšonkaulinis tarpas padidintas skėstuvu. Nustūmus kairįjį plautį atvertas perikardo maišas, vizualizuotas užpakalinis kairiojo prieširdžio paviršius ir tada buvo atliktos RDA aplikacijos (2.3.3.1 pav.).



2.3.3.1 pav. Epikardinės RDA eiga

Procedūra atlikta veterinarijos klinikos operacinėje, taikant bendrinę nejautrą ir dirbtinę plaučių ventilaciją. Prie epikardo prieita, atveriant kairiosios pusės krūtinės ląstos sieną penktame tarpšonkauliniame tarpe. RDA aplikacijų poveikis stebėtas vizualiai. Baigus procedūrą, žaizda susiūta pasluoksniui, užbaigiant ištisine odos siūle.

RDA aplikacijos buvo atliekamos KP paviršiaus nugarinėje dalyje, ribojamoje kairiosios ir vidurinės plautinių venų, vainikinio ančio bei kaudalinės ir lykinės venų. Mūsų manymu šioje srityje yra kairiojo prieširdžio nugarinis ir vidurinis nugarinis nerviniai rezginiai. Abu rezginiai kartu apima apie 40 proc. visų avies širdies nervinių mazgų, todėl siekdami paveikti kuo daugiau ŠVANS struktūrų abliacijai pasirinkome būtent šią zoną [120]. RDA atlikti pasirinkome 4 mm elektrofiziologinį kateterį aušinamu elektrodu (*Biosense Webster, Thermocool, Diamond Bar*). Aušinimui naudojome nuolatinį praplovimą izotoniniu tirpalu. Norint suformuoti norimo dydžio poveikio sritį reikėjo nuo 10 iki 15 RDA aplikacijų. Aplikacijų skaičius priklausė nuo širdies dydžio. Visų atliktų aplikacijų poveikis vertintas vizualiai. Mūsų nuomone, transmuraliai prieširdžio miokardo pažaidai sukelti reikalingas optimalus radiodažninės energijos kiekis buvo 20 W energijos, 500 kHz dažnio, 30 s aplikacijos. Audinių plyšimo fenomeno (angl. *popping phenomena*) buvo išvengta, kontroliuojant abliacijos vietą vizualiai, rankiniu būdu dozuojant elektrodo prispaudimo prie audinių jėgą ir adekvačiai

aušinant elektrodą (pasirinktas +50 °C audinių temperatūros slenkstis automatiniam abliacijos nutraukimui).

Po procedūros skysčių perteklius iš perikardo ertmės buvo atsiurbtas ir nusausinta tvarsliaiva. Perikardo ertmė nebuvo užsiuvama. Krūtinės žaizda užsiūta pasluoksniui. Tarpšonkauliniai raumenys ir poodis susiūti tirpiu pintu antibakteriniu siūlu (ETHICON, VICRYL™ Plus 0). Šonkauliai papildomai fiksuoti vienas prie kito netirpaus pinto poliesterio siūlo (BBRAUN, PremiCron 0) kilpomis. Prieš užveriant krūtinės ląstą plaučiai maksimaliai išpūsti, norint išvengti jų subliūškimo ir pašalinti oro bei skysčio likučius iš pleuros ertmės. Oda taip pat susiūta ištisine netirpaus pinto poliesterio siūlu siūle. Pooperacinė žaizda visiškai sugijo apie 5–7 paras. Tris paras po operacijos buvo tęsta empirinė profilaktika antibiotikais, norint išvengti bakterinių žaizdos komplikacijų. Tvarstyta steriliais priklijuojamais tvarsčiais papildomai juos sutvirtinant plataus pleistro juosta, apjuosiant krūtinės ląstą du kartus. Tvarsčiai nuimti 5 parą po operacijos. Pjūvio vieta buvo dezinfekuota purškiamu 70 proc. 2-propanolio ir 1,3-butandiolio tirpalu. Taip pat kasdien buvo atnaujintas kraikas aptvare, kuriame avys nakvodavo. Žaizdos gerai sugijo visiems gyvūnams, tačiau dėl jų aktyvaus būdo odos siūlai buvo pašalinti tik po 3 savaitių, norint išvengti žaizdų atsivėrimo. Komplikacijų dėl ilgesnės siūlų laikymo trukmės nestebėta.

Procedūrų metu reikšmingų komplikacijų nebuvo. Dviem avims, atvėrus perikardo ertmę, kilo PV paroksizmai dėl mechaninio prieširdžių dirginimo. Aritmijos buvo trumpalaikės (ilgiausias truko 94 s) ir nutrūko savaime. Vienai aviai, atvėrus perikardo ertmę, žirklėmis buvo perforuotas prieširdis. Defektas buvo nedidelis, 1 × 1 mm dydžio. Jis buvo susiūtas ir įtakos procedūros eigai neturėjo. Stebint gyvūną, dinamikoje atlikta dvimatė širdies echoskopija portatyviniu aparatu, tačiau skysčio perikarde neatsirado.

2.3.4. Autonominės nervų sistemos funkcijos vertinimo metodika

Širdies autonominės nervų sistemos funkcijai vertinti pasirinkome širdies ritmo variabilumo parametrų stebėseną. Tuo tikslu atlikome tiriamųjų gyvūnų 24 valandų EKG monitoravimą. Pirmasis tyrimas buvo atliekamas prieš numatytą RDA procedūrą. Po procedūros, praėjus 2–3 paroms, tyrimas buvo pakartotas, norint įvertinti ankstyvuosius pooperacinius ŠRV pokyčius. Vėliau EKG monitoravimas buvo kartotas kas mėnesį 12 mėnesių iš eilės.

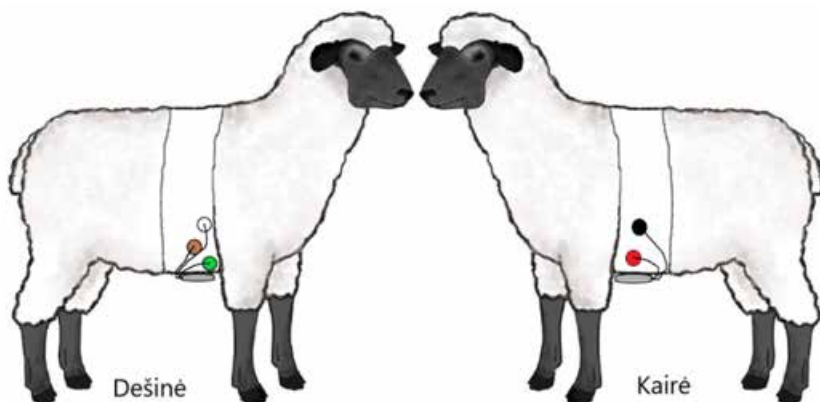
Pilotinio tyrimo metu išbandėme keletą gamintojų Holter monitorius (Schiller MT-101, SR-Medizinelektronik Cardio Scout recorder, Custo Cor-3) skirtus žmonių EKG monitoravimui. Įvertinę jų savybes, nusprendėme pasirinkti gamintojo „SR-Medizinetchnik“ Holter monitorių „Cardioscout

recorder“. Viena iš pagrindinių savybių, turėjusių įtakos parinkčiai, buvo galimybė stebėti monitoriaus registruojamą EKG signalą nuotoliniu būdu. Tai labai palengvino signalo kokybės kontrolę ir dažnai padėjo pastebėti elektrodų disfunkciją, išvengiant pakartotinių tyrimų. Be to, prietaisas yra tvirtas, santykinai gerai apsaugotas tiek nuo mechaninio poveikio, tiek nuo drėgmės. Kadangi prietaisas yra valdomas nuotoliniu būdu iš darbinės stoties (personalinio kompiuterio), šio modelio aparatai neturi papildomų ekranų ir mygtukų įmontuotų korpuse. Šie ypatumai labai praktiški, dirbant su stambiais gyvūnais. Nors buvo imtasi visų atsargumo priemonių, per visą tyrimą buvo nepataisomai sugadinti du monitoriai bei keletas laidų komplektų.

Patirties atlikti Holterio monitoravimą gyvūnams neturėjome, todėl avių Holter monitoravimo metodiką sukūrėme, pritaikę įprastinės klinikinės praktikos su žmonėmis žinias ir pasinaudojome literatūros duomenimis apie kitų stambiųjų gyvūnų monitoravimo metodikas [121, 122, 123, 124, 125]. Esant poreikiui, ypač pradiniais tyrimo etapais avys prieš tyrimą būdavo ramiamos 2 proc. ksilazino tirpalo injekcija 0,1 mg/kg svorio į raumenis. Didėjant patirčiai, medikamentinė sedacija buvo reikalinga tik išskirtiniais atvejais. Avis kirpome specialiomis elektrinėmis vilnakirpių žirkklėmis. Elektrodų aplikacijos vietos buvo papildomai išskustos plieniniu skustuviu, pašalinant vilnos likučius. Oda nuriebinta muilu ir spiritiniais dezinfektantais.

Gnybtiniai ir įsiuvami elektrodai mūsų tyrime nepasiteisino, dėl gyvūnus traumuojančio poveikio, todėl naudojome priklijuojamus sidabro / sidabro chlorido elektrodus. Šie elektrodai, net ir gerai paruošus odą laikėsi nepakankamai tvirtai, kad būtų galima kokybiškai registruoti EKG numatytą laiko tarpą, todėl teko juos papildomai fiksuoti. Tam panaudojome momentinius klijus. Be to, elektrodus, laidus ir patį monitorių pritvirtindavome papildomai, apjuosdami dviguba elastinio pleistro juosta, norėdami apsaugoti nuo nešvarumų bei fizinio poveikio. Drėgnuoju laikotarpiu papildomai apjuosdavome vandeniui nelaidžia izoliacine juosta.

Elektrodus tvirtinome frontalinėje plokštumoje apie krūtinės ląstą, keletą centimetrų už priekinių galūnių. Pasirinkome vadinamąjį prieširdinį (*angl. precordial*) elektrodų išdėstymo būdą, kai elektrodai išdėstomi pilvinėje plokštumoje aplink širdį. Juodą ir raudoną elektrodus tvirtinome kairėje, o baltą, rudą ir žalią kairėje (2.3.4.1 pav.). Nors literatūros duomenimis kitais metodais (pvz.: registruojant galūnines derivacijas ar elektrodus tvirtinant išilginėje kūno ašyje) galima išgauti geresnę signalo kokybę, tačiau tie metodai netiko ilgalaikiam judančio gyvūno monitoravimui [122, 125, 121]. Be to, šio metodo parinktį lėmė santykinai trumpi monitoriaus laidai (30 cm) ir patogus bei patikimas sistemos fiksavimas šioje padėtyje.



2.3.4.1 pav. EKG monitoriaus ir elektrodų išdėstymas tyrimo metu
Kairėje tvirtinami juodas ir raudonas elektrodai, dešinėje – baltas, rudas ir žalias.

EKG signalui analizuoti naudojome gamintojo programine įranga „*Cardio Explorer version 3.2*“. Vienas iš svarbiausių veiksnių, lėmusių šio gamintojo pasirinkimą, taip pat buvo galimybė užregistruotą EKG signalą konvertuoti į skaitines RR intervalų reikšmes. Ši funkcija buvo esminė, norint ŠRV parametrus analizuoti „*Kubios HRV version 2.1*“ programine įranga, kadangi pačių gamintojų įdiegtos galimybės buvo nepakankamos visuose išbandytuose prietaisuose.

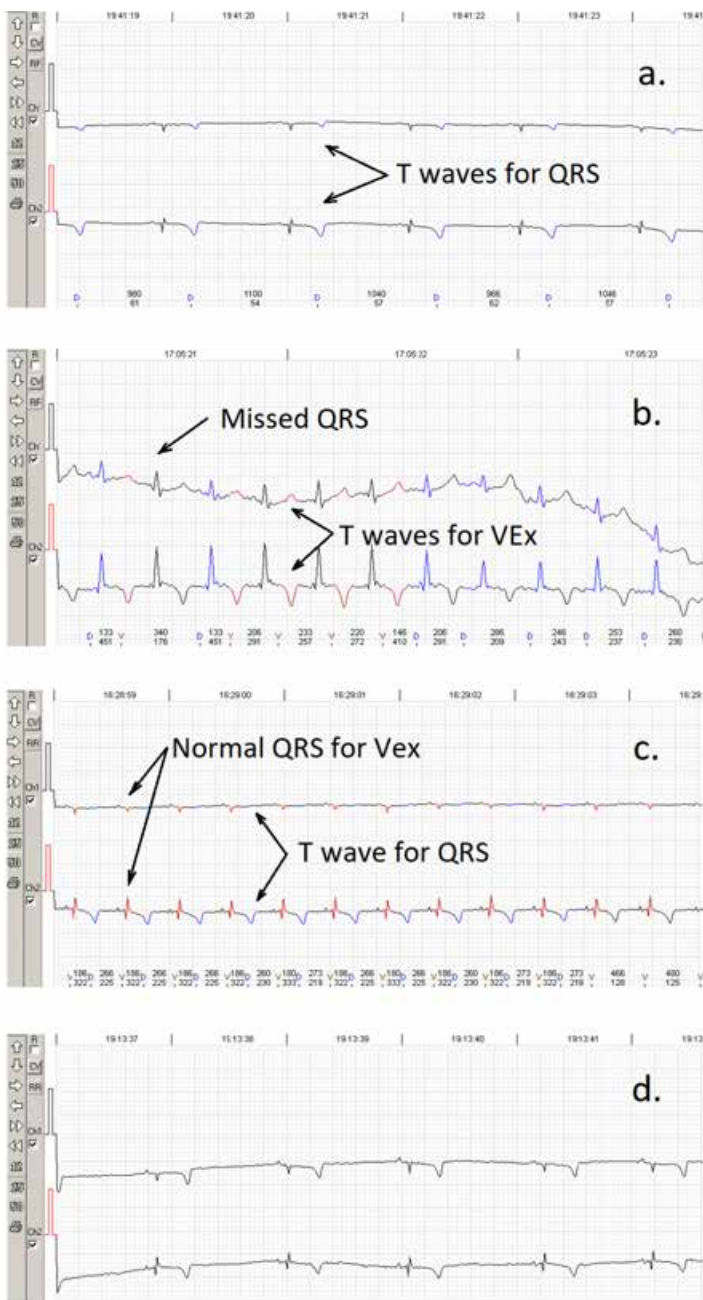
Holterio monitoriumi buvo užrašoma dviejų bipoliarinių derivacijų EKG, duomenys siunčiami į kompiuterio atmintį ir atliekama rezultatų analizė. Kompiuterinei sistemai automatiškai atliekant analizę, nustatomi visi QRS kompleksai. Kiekvieno QRS komplekso R bangos pike dedamas žymuo, nurodantis širdies susitraukimą. Pagal šio žymens santykį su prieš jį ir po jo einančiais žymenimis, QRS komplekso plotį bei kitus standartinius kompiuterinės programos algoritmus, visi QRS kompleksai suskirstomi į šablonus, pavadinant juos normaliais dominuojančiais, prieširdiniais ektopiniais, skilveliniais ektopiniais, nežinomais ar artefaktais.

Registruota paros EKG pirmiausiai buvo analizuojama įprastiniu automatinu būdu gamykline programine įranga. Po to vizualinės ir rankinės analizės būdu buvo pašalinami EKG signalo artefaktai. Buvo vizualiai patikrinti ir, esant reikalui, kitaip suklasifikuoti arba ištrinti visi ekstrasistoliniai QRS kompleksai, priepuolinių tachikardijų ir bradikardijų epizodai. Ekstrasistolėmis buvo klasifikuoti tie QRS kompleksai, kurių ankstyvumas prieš tai esančio QRS komplekso atžvilgiu buvo ≥ 12 proc. Pauzėms priskirti tie R-R intervalai, kurių $R-R \geq 1,9$ sekundes. Skilveline tachikardija ir skilvelių ritmu klasifikuoti epizodai, kurių metu vienas po kito esančių plačių QRS

kompleksų skaičius buvo ≥ 3 . Priepuolinėms supraventrikulinėms tachikardijoms priskirti tie epizodai, kurių metu $\dot{S}SD \geq 120$ k/min., ir jų atsiradimo metu $\dot{S}SD$ pakito ≥ 50 proc. nuo prieš tai buvusio. Sinusinei tachikardijai priskirti epizodai, kurių metu $\dot{S}SD > 130$ k/min., sinusinei bradikardijai epizodai, kurių metu $\dot{S}SD < 45$ k/min. Jeigu artefaktų, ektopinių QRS kompleksų ar prieuolinių tachikardijų epizodų metu fiksuotų QRS kompleksų skaičius buvo didesnis nei 5 proc. visų QRS kompleksų, įrašas buvo pripažįstamas kaip netinkamas tolesnei analizei.

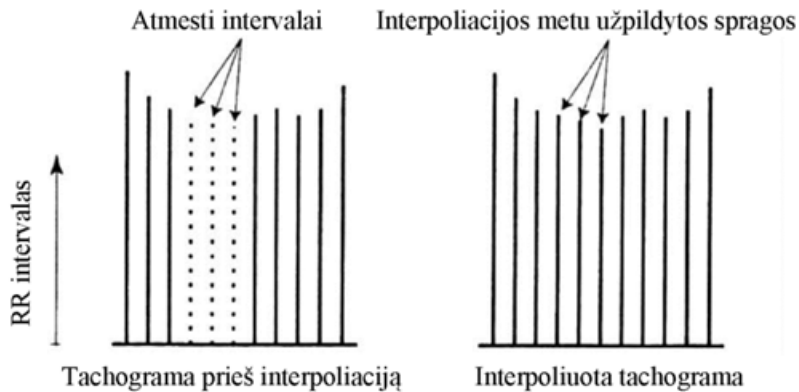
Analizės metu paaiškėjo avarių EKG savybės sąlygojusios keletą automatinės analizės klaidų (2.3.4.2 pav.) būdingų ir kai kurioms kitoms gyvūnų rūšims (žiurkėms, triušiams). Pagrindinė iškilusi problema buvo santykinai mažas QRS komplekso voltažas bei santykinai didelis T dantelis lyginant su žmogaus QRS komplekso morfologija. Dėl mažo voltažo dalis QRS kompleksų buvo tiesiog neregistruojami, nors vizualiai ir aiškiai matomi. Didelis T dantelis epizodiškai buvo vertinamas kaip skilvelių ekstrasistolė arba QRS kompleksas ir atvirkščiai. Be to, buvo stebėti įvairūs klaidų deriniai. Šios automatinės analizės klaidos buvo koreguojamos rankiniu būdu, tačiau ženkliai prailgino duomenų apdorojimo procesą ir žmoniškų resursų sąnaudas. Be šių savitų automatinės analizės klaidų buvo stebimos ir įprastos klaidos, pasitaikančios tyrimuose su žmonėmis.

Apskaičiuojant ŠRV parametrus, naudotos Amerikos Širdies asociacijos ir Europos Kardiologų draugijos 2017 metais priimtose rekomendacijos. ŠRV analizė atlikta EKG signalo dažnio diapazonui esant > 100 Hz. EKG įrašas buvo filtruojamas, analizuojant tiksliai normalius QRS kompleksus ir atmetant ektopinius prieširdinius ir skilvelinius kompleksus, skilvelinės tachikardijos, skilvelių ritmo, paroksizminės supraventrikulinės tachikardijos, abso-
liučios aritmijos epizodus bei pauzes. Norint išvengti ektopinių impulsų, aritmijų ir artefaktų įtakos ŠRV parametrams, buvo atliekama interpoliacija, kurios metu R-R intervalų sekoje, dėl atmestų kompleksų atsiradusios spragos, buvo užpildytos, įterpiant automatiškai apskaičiuotus R–R intervalus (2.3.4.3 pav.) [126, 127]. Pasirinktas R–R intervalų sekos kvantavimo dažnis lygus 292 ms., trendo pašalinimui (angl. *detrending*) naudotas parabolinis metodas, dažnio parametų apskaičiavimui naudotas greitos Fourje transformacijos metodas [128, 129].



2.3.4.2 pav. Automatinės duomenų analizės klaidos pasitaikančios analizuojant avių EKG įrašus

- a) T dantelis žymimas kaip QRS kompleksas; b) T dantelis žymimas, kaip skilvelinė ekstrasistolė; c) Normalus QRS kompleksas žymimas kaip skilvelinė ekstrasistolė, o T dantelis kaip QRS; d) QRS kompleksai neidentifikuojami dėl mažo voltažo.



2.3.4.3 pav. Tachograma prieš interpoliaciją ir po jos

Po koregavimo geros kokybės EKG signalas buvo konvertuojamas į RR intervalų skaitines reikšmes ir perkeliamas apdorojimui su *Kubios HRV 2.1* programa. Tyrimo metu mes pasirinkome vertinti vidutinį širdies susitraukimų dažnį ir daugumą laiko (SDNN, RMSSD, PNN50, ŠRV TI) bei dažnių (ADK, ŽDK, LŽDK, ŽDK/ADK) srities ŠRV parametrų.

Laiko srities parametrai:

- SDNN – standartinis nuokrypis nuo vidutinės visų RR intervalų trukmės (ms).
- RMSSD – vidutinis kvadratinės šaknies skirtumas tarp vienas po kito einančio R-R intervalo trukmės (ms).
- PNN50 – procentas gretimų R-R intervalų, vienas nuo kito besiskiriančių daugiau nei 50 ms (proc.). ŠRV TI – grafinis metodas vertinantis RR tankio histogramos integralo santykį su jos aukščiu.
- Vertinant ŠRV dažnio charakteristikas, naudoti šie parametrai:
- ADK – aukštų dažnių komponentė, kurios dažnis svyruoja nuo 0,15 iki 0,4 Hz;
- ŽDK – žemų dažnių komponentė, kurios dažnis svyruoja nuo 0,04 iki 0,15 Hz;
- LŽDK – labai žemų dažnių komponentė, kurios dažnis svyruoja nuo 0,0033 iki 0,04 Hz; LDK/ADK santykis, atspindintis simpatinės ir parasimpatinės nervų sistemos pusiausvyrą.

2.3.5. Autonominės nervų sistemos struktūrinių pokyčių vertinimo metodika

Baigus 12 mėn. trukusią avių stebėseną po KP epikardinės RDA, norint įvertinti struktūrinius ŠVANS pokyčius, avių širdys buvo paimtos imunohistocheminiam ištyrimui.

Vienas iš šio ištyrimo tikslų buvo nustatyti ar RDA metu tikrai buvo pažeisti nugarinės KP sienelės nervinių mazgų rezginiai. Taip pat buvo svarbu įvertinti, kokie pokyčiai vyksta nervinėse miokardo struktūrose, praėjus metams po poveikio radiodažnine energija. Palyginimui buvo tirta kontrolinė grupė 3 širdžių iš avių, kurioms RDA nebuvo atlikta. Tuo tikslu panaudotos avių širdys iš anksčiau universitete atliktų tyrimų.

Kairiojo prieširdžio dorzalinio rezginio srities preparatai buvo dažomi acetilholinesterazei (AChE) išryškinti [120]. Nervinės struktūros nudažytos šiuo būdu buvo vertinamos ir fotografuojamos stereo mikroskopu *Stemi 2000 CS* (Carl Zeiss, Jena, Germany) apšvietimui naudojant iliuminatorių *KL 2500 LCD* (Schot AG, Mainz, Germany). Vaizdai buvo fotografuojami fotokamera *Axiocam MRC5* (Zeiss, Göttingen, Germany).

Imunohistocheminiams tyrimams su ŠVANS struktūromis buvo iškerpami 10×20 mm dydžio širdies raumens gabaliukai. Tiek tiriamųjų avių, tiek kontrolinės grupės avių širdžių preparatai buvo laikyti $+4$ °C temperatūros, 25 proc. sacharozės ir fosfatinio buferio tirpale 1–2 paras, kol nugrimzdavo iki dugno. Po to gabaliukai greitai užšaldyti skystu azotu ir saugoti 40 °C temperatūroje. Miokardo su epikardu gabalėliai buvo orientuojami taip, kad pjūvyje būtų epikardinių bei miokardinių nervų skerspjūviai. Kriotomu CryoStar NX70 (Thermo Fisher Scientific, Vokietija) atpjauti $18 \mu\text{m}$ storio pjūviai, perkelti ant *SuperFrost* (Thermo Fisher Scientific, Vokietija) objektinių stiklelių ir išdžiovinti kambario temperatūroje. Prieš atliekant reakciją su antikūnais, preparatai buvo plaunami 3 kartus po 10 min. fosfatiniame fiziologiniame tirpale su 0,5 proc. Triton X-100 (CarlRoth, Karlsruhe, Vokietija) ir 2 val. laikomi blokuojančiame tirpale, turinčiame 5 proc. normalaus asilo serumo (*angl. normal donkey serum*, NDS; CarlRoth, Vokietija), siekiant sumažinti nespecifinę imunohistocheminę reakciją į antikūnus. Praplovus 3×10 minučių su fosfatiniu fiziologiniu tirpalu, preparatai inkubuoti tirpale su pirminiais antikūnais 24 valandas 4 °C temperatūroje. Praplovus 3×10 minučių su fosfatiniu tirpalu, 2 valandas inkubuoti antrinių antikūnų mišinyje (2.3.5.1 lentelė) ir vėl 3×10 minučių nuplauti fosfatiniu fiziologiniu tirpalu. Nervai buvo dažyti, naudojant tris pagrindinius imunohistocheminius nervinių struktūrų žymenis. TH – andrenerginėms skaiduloms, ChAT – cholinerginėms skaiduloms ir PGP 9,5 – (nespecifinis markeris, pažymintis visas nervines struktūras). Pabaigoje

preparatai buvo užlieti Vectashield (Vector Laboratories, JAV) dengiamąja terpe ir uždengti dengiamaisiais stikleliais, kraštai hermetiškai užsandarinti skaidriu nagų laku.

2.3.5.1 lentelė. Antikūnai, naudoti imunohistocheminiam ištyrimui

Antikūnai	Kilmė	Skiedimas	Katalogo nr.
Pirminiai prieš			
PGP 9,5	Pelė	1:1000	AB 8189
PGP 9,5	Triušis	1:2000	AB 1761
TH	Triušis	1:1000	AB 152
TH	Pelė	1:800	MAB 318
TH	Ožka	1:500	AB 1542
ChAT	Pelė	1:800	MAB 305
ChAT	Ožka	1:500	AB 144P
Antriniai prieš			
Pelę	Asilas	1:300	AB 96593
Pelę	Asilas	1:500	AP 195F
Triušį	Asilas	1:200	AP 180C
Triušį	Asilas	1:500	AP 182C
Ožką	Asilas	1:300	AP 184F

Imunohistochemiškai nudažyti preparatai buvo tirti naudojant fluorescencinį mikroskopą *AxioImager Z1* su apotomu ir įdiegta *AxioVision 4.8.1* programine įranga (Zeiss, Gottingen, Germany). Vaizdai fotografuoti *Axiocam MRm* monochromine skaitmenine fotokamera. Naudojant filtrus, kurie sužadina fluoresceino (FITC) ir cianino (Cy3) sujungto su antriniais antikūnais fluorescenciją, buvo fotografuotos išryškintos epikardinės nervinės struktūros. Pirmiausia 5 kartus didinančiu objektyvu fotografuoti pilni imunohistocheminiu metodu parengti preparatų vaizdai (pjūviai), naudojant *AxioVision Mosaic* modulį. Pažymėjus vietą išsklotinėje, epikardiniai nervai buvo fotografuoti 40 kartų didinančiu objektyvu. Panaudojant *AxioVision 4.8.1* programą, mikrofotografijose rankiniu būdu buvo pažymėtos epikardinių nervų ribos ir skirtingo nervinio tipo skaidulų užimamas plotas. Buvo vertintas epikardinių nervų plotas ir skirtingo nervinio tipo skaidulų procentinė sudėtis tame nerve. Miokardas buvo fotografuotas sistemiškai vienu atsitiktiniu imties būdu (angl. *systemic uniform random sampling*) su 20 kartų padidiniu, o skaičiavimo rėmais (angl. *counting frame*) buvo laikyta visa nuotrauka (nuotraukos plotas 150 135 μm^2), laikantis apie 3000 μm^2 atstumo tarp užfiksuotų preparato laukų. Miokardo nervinių skaidulų

tankis buvo įvertintas, padalinus nervinių skaidulų užimamą plotą iš viso užfiksuoto miokardo ploto ir išreikštas procentais.

2.3.6. Statistiniai metodai taikyti tyrimo metu

Tyrimo imties dydžio pasirinkimas

Planuodami numatomą tyrimo imties dydį, mes pasinaudojome generalinės aibės vidurkio intervalo formulės išvestine:

$$n = \frac{z^2 s^2}{\Delta^2}$$

n – stebėjimų skaičius (imties tūris), P – pasikliautinumo lygmuo, z – normaliojo skirstinio $N(0,1)$ $1+P/2$ kvantilis, s – imties dispersija, Δ – generalinės aibės vidurkio įvertinimo tikslumas.

Kadangi mūsų atliktas eksperimentas buvo terminalinio pobūdžio (tyrimo pabaigoje eksperimentiniai gyvūnai nužudomi), todėl pagal 2010/63/EU direktyvos reikalavimus siekėme kiek įmanoma sumažinti imties skaičių. Dėl šios priežasties sumažinome generalinės aibės vidurkio vertinimo tikslumą iki $\Delta \sim s/2$. ŠRV parametrų standartinių nuokrypių skaičiavimams pasinaudojome anksčiau atliktų tyrimų su avimis ir galvijais duomenimis [130, 131, 132]. Vidutiniai šiuose tyrimuose gauti standartiniai nuokrypiai SDNN buvo: 8,3; 10,8 ir 7, o RMSSD: 8,8; 8,2 ir 77. Mūsų pageidaujamas pasiklovimo lygmuo buvo 0,95, šiuo atveju „ z “ yra lygus 1,96. Taigi, esant SDNN standartiniam nuokrypiui 8,3 ms pagal mūsų pasirinktus kriterijus minimalus imties dydis turėtų būti: $15,36 = 1,96^2 \times 8,3^2/4,15^2$. Todėl tyrimui pasirinkta 15 avių.

Statistiniai metodai

Visi statistiniai skaičiavimai, apdorojant tyrimo metu surinktus duomenis, buvo analizuojami naudojant IBM SPSS 21.0 statistinį paketą.

Pagrindinis naudotas statistinis metodas buvo vidurkių palyginimas. Vertinant ŠRV parametrų dinamiką buvo paskaičiuotos vidutinės mėnesinės šių parametrų reikšmės. Vidurkiai buvo skaičiuoti, sudedant visas tą mėnesį atliktų tyrimų reikšmes ir padalinant sumą iš tyrimų skaičiaus. Nors prieš RDA procedūrą ir po jos EKG monitoravimai buvo atlikti tą patį mėnesį, tačiau jų vidurkiai buvo skaičiuoti atskirai. ŠRV parametrų vidurkių pokyčiams po epikardinės RDA vertinti, kontroline grupe pasirinkti tų pačių eksperimentinių gyvūnų tyrimų rezultatai, įvertinti iki RDA atlikimo. Kadangi tyrimo imtis buvo minimali, todėl norėdami palyginti skirtumus tarp kiekybinių neparimetrinių duomenų vidurkių, naudojome Vilksoksono (Wilcoxon) ir Frydmano (Friedman) testus. Duomenys laikyti statistiškai reikš-

mingais, kai $p < 0,05$. Atliekant imuohistocheminių duomenų statistinę analizę, pasiskirstymo normalumas duomenų imtyje buvo patikrinamas Levene's testu. Parametriniam dviejų nepriklausomų grupių duomenų vidurkių statistiniam skirtumų palyginimui buvo taikytas Student'o t testas, pasirinkus 95 proc. pasiklovimo lygmenį ($p < 0,05$). Skilvelių epikardo nervinių skaidulų santykinis tankis buvo apskaičiuotas nervinių skaidulų plotą dalinant iš nervo ploto. Kiekybiniai duomenys pateikti aritmetiniu vidurkiu su standartine vidurkio paklaida.

3. REZULTATAI

3.1. Bendrosios klinikinės tiriamųjų gyvūnų charakteristikos

Ekspirimente dalyvavę gyvūnai atrinkti atsitiktine tvarka iš pasirinktame ūkyje buvusių tinkamo amžiaus ėriukų. Tyrimui naudojome lytiškai subrendusius avių jauniklius (6–7 mėn. amžiaus). Pagrindinis atrankos kriterijus buvo akivaizdžių sveikatos sutrikimų nebuvimas. Šį reikalavimą tenkino visos pasirinktos avys. Avių klinikinės charakteristikos tyrimo pradžioje ir pabaigoje pateikiamos 3.1.1 lentelėje.

3.1.1 lentelė. Bendrosios klinikinės eksperimentinių gyvūnų charakteristikos tyrimo pradžioje ir pabaigoje

Požymis	Tyrimo pradžia	Tyrimo pabaiga
Gyvūnų kiekis	15	13
Amžius (mėn.)	6,3 ± 1,2	19,4 ± 1,4
Kūno masė (kg)	21,6 ± 3,1	83 ± 14,2
Širdies susitraukimų dažnis (k/min.)	81 ± 12,3	76,7 ± 7,2
Kvėpavimo dažnis (k/min)	13,3 ± 3,7	14,1 ± 3,2

Vidutinė avių kūno masė nesiskyrė nuo vidutinės šios veislės masės nei tyrimo pradžioje, nei pabaigoje. Tyrimo pabaigoje kūno masė labiau skyrėsi tarp abiejų lyčių individų, todėl stebėtas didesnis reikšmių pasiskirstymas. Patinėliai buvo stambesni, tačiau tai vertinta kaip normos variantas. Tokie pagrindiniai klinikiniai bruožai kaip vidutinis ŠSD ir kvėpavimo dažnis taip pat nesiskyrė nuo įprastų rūšių charakteristikų.

Tiriamųjų gyvūnų ŠRV parametrai prieš atliekant epikardinę RDA pateikiami 3.1.2 lentelėje. Šiuos duomenis palyginome su literatūroje pateikiamais sveikų avių ŠRV stebėjimų rezultatais. Nors lyginome skirtingų veislių savybes, tačiau iš esamų rezultatų galima pastebėti, jog daugumos parametrų vidurkių reikšmės ir standartiniai nuokrypiai persidengia. Tai leidžia daryti prielaidą, jog mūsų tiriamoji imtis savo savybėmis ženkliai nesiskyrė nuo kitų rūšių atstovų [133].

Lyginti ŠRV parametrų normas tarp rūšių yra sudėtinga, tačiau galima įžvelgti panašumus tarp literatūroje pateikiamų žmogaus ŠRV parametrų normų bei mūsų avių imties. Toks ŠRV parametrų panašumas leidžia teigti, kad avys gali tikt eksperimentiniams tyrimams, analizuojant žmogaus ŠRV [134, 135, 136].

3.1.2 lentelė. Tiriamųjų gyvūnų ŠRV parametrų reikšmės prieš RDA procedūrą ir jų palyginimas su literatūros šaltiniuose pateikiamomis avių ir žmonių parametrų normomis.

Parametras	Žmogaus	Avių	Tiriamųjų avių
ŠSD (k/min.)	76	84	80,13 ± 12,54
SDNN (ms)	50 ± 16	23 ± 7	60,42 ± 5,58
RMSSD (ms)	42 ± 15	18 ± 77	62,63 ± 9,64
pNN50 (proc.)	7,9 ± 7,8	–	25,07 ± 10,48
ŠRV TI	–	–	13,51 ± 2,67
LŽDK (ms ²)	–	–	2957 ± 1855
ŽDK (ms ²)	519 ± 291	1704 (272–41841)	987 ± 228
ADK (ms ²)	657 ± 777	367,8 (24–6240)	1385 ± 259
ŽDK/ADK	2,8 ± 2,6	4,9 (1,7–11,3)	0,7260 ± 0,15

3.2. Širdies ritmo variabilumo parametrų tyrimo rezultatai:

3.2.1. Širdies susitraukimų dažnis

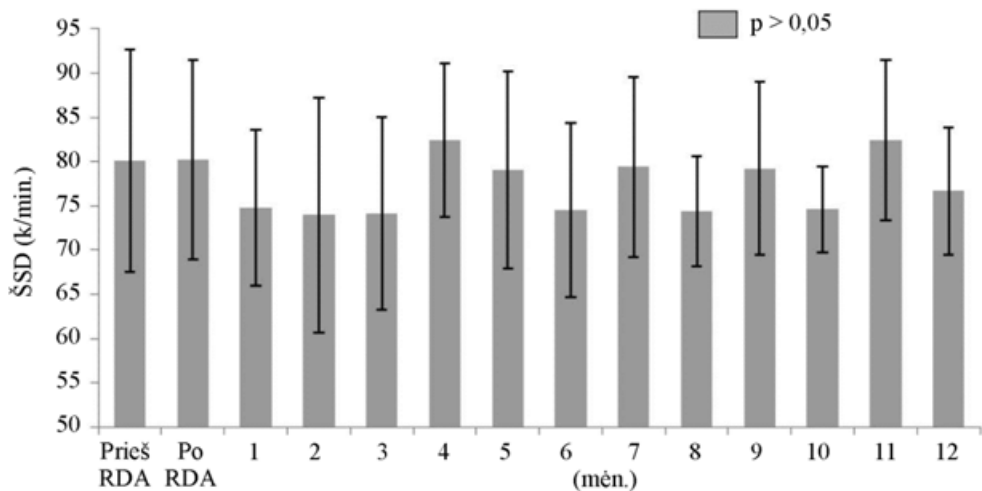
Vidutinės eksperimentinių gyvūnų širdies susitraukimų dažnio (ŠSD) reikšmės buvo paskaičiuotos pagal automatinės analizės rezultatus iš Holter monitoravimo duomenų atskiriems gyvūnams. Bendras mėnesio vidurkis buvo apskaičiuotas sudėjus visus vidutinius paros ŠSD skaičiavimus ir padalinus iš atliktų matavimų skaičiaus. Vidutinė ir kraštutinės (minimali ir maksimali to matavimo vertė) ŠSD reikšmės pateikiamos 3.2.1.1 lentelėje.

Nei iš karto po atliktos RDA, nei per visą tyrimą akivaizdžių vidutinių skaitinių ŠSD verčių skirtumų nepastebėta. Norint įvertinti ar vidutinis ŠSD po epikardinės RDA pakito, vidurkiai palyginti taikant Frydmano ir Wilkoxsono testus. Nors vidutinės ŠSD skaitinės reikšmės nežymiai skyrėsi tyrimo eigoje, tačiau statistiškai reikšmingų skirtumų, lyginant su priešoperaciniu ŠSD bei bendrai tarpusavyje ($p > 0,186$) dėl didelio atskirų matavimų reikšmių išsibarstymo nestebėta. Testų rezultatus grafiškai pateikti 3.2.1.1 pav.

3.2.1.1 lentelė. Vidutinės mėnesio ŠSD reikšmės

Tyrimo laikas	N	Minimalus (k/min.)	Maksimalus (k/min.)	Vidutinis (k/min.)	Standartinis nuokrypis (k/min.)
ŠSD prieš RDA	15	58,804	100,340	80,13773	± 12,547643
ŠSD po RDA	14	61,000	94,700	80,17729	± 11,231878
1 mėn.	14	58,854	88,400	74,73907	± 8,802204
2 mėn.	13	56,410	102,430	73,97923	± 13,242994
3 mėn.	13	58,739	91,275	74,19100	± 10,867072
4 mėn.	13	68,256	95,261	82,42469	± 8,654937
5 mėn.	13	58,230	98,361	79,09377	± 11,126000
6 mėn.	13	58,389	91,457	74,55569	± 9,823424
7 mėn.	13	68,068	93,601	79,38246	± 10,203328
8 mėn.	13	64,256	83,544	74,43092	± 6,207295
9 mėn.	13	64,568	96,000	79,23523	± 9,784932
10 mėn.	13	68,214	84,144	74,59392	± 4,896200
11 mėn.	13	68,251	92,261	82,40708	± 9,091577
12 mėn.	13	68,000	88,324	76,68669	± 7,198501

RDA – radiodažninė abliacija, ŠSD – širdies susitraukimų dažnis.



3.2.1.1 pav. Širdies susitraukimų dažnio vidutinių reikšmių dinamika tyrimo metu

Vidutinės ŠSD reikšmės (pateikiamos su standartiniais nuokrypiais) statistškai reikšmingai nesiskyrė ($p = 0,363$). RDA – radiodažninė abliacija, ŠSD – širdies susitraukimų dažnis.

Apibendrinant galima teigti, kad KP epikardinė RDA neturėjo įtakos eksperimentinių gyvūnų širdies susitraukimų dažniui. Tai gali būti paaiškinta tuo, kad už širdies chronotropinę funkciją yra atsakingi dešiniojo prieširdžio nerviniai rezginiai. Mūsų tyrime RDA procedūros metu buvo paveiktos tik KP nervinės struktūros, kurios sąlyginai yra nutolusios nuo sinusinio mazgo ir atrioventrikulinės jungties ir pastarosioms didesnės įtakos neturi.

3.2.2. Laiko srities parametų įvertinimas

Vertindami ŠRV laiko srities parametrus mes tyrėme pNN50, SDNN, RMSSD, ŠRV trikampį indeksą. Tyrime nevertinome NN50, SDRR, SDSD, SDANN ir SDNNI, ŠSD Maks – ŠSD Min. NN50 nevertinome dėl mažos informacinės vertės, kadangi parametras labai priklauso nuo tyrimo trukmės ir jo ryšys su ANS tonusu labai silpnas. SDRR netyrėme, kadangi šis parametras nesuteikia papildomos informacijos, lyginant su SDNN ir yra netikslus. Be to, visi EKG monitoravimo automatinės analizės duomenys buvo koreguoti, pašalinant artefaktus ir ekstrasistoles, kas iš esmės padaro šio parametro skaičiavimą negalimą. SDANN nevertinome, kadangi šis parametras nesuteikia jokios papildomos informacijos, lyginant su SDNN, o SDSD atsisakėme, nes jis yra skirtas tik labai mažos trukmės (60-240 s) ŠRV svyravimams vertinti. Dėl panašios priežasties nevertinome ir SDNNI. Nors SDNNI ir turi ryšį su LŽD komponente, tačiau jis vertina tik tuos ŠRV pokyčius, kurie vyksta 5 min. trukmės intervaluose ir nesuteikia papildomos informacijos, lyginant su SDNN. ŠSD Maks – ŠSD Min nevertinome, kadangi jis neatspindi ANS įtakos ŠSD ir yra labai stipriai priklausomas nuo kvėpavimo dažnio sąlygotos aritmijos. Mūsų eksperimentas truko ištisus metus tiek šiltuoju, tiek šaltuoju metų laiku, kas priklausomai nuo aplinkos sąlygų sąlygojo akivaizdžiai netolygų KD pasiskirstymą tyrimo metu, todėl sunku būtų interpretuoti ši parametras kaip susijusį su mūsų atlikta procedūra.

3.2.2.1. pNN50 vertinimas

Parametras pNN50 nėra toks informatyvus, kaip 24 valandų SDNN ar RMSSD skaičiavimai, vertinant ANS tonuso įtaka širdžiai. Tačiau jis turi ryšį su parasimpatine nervų sistema ir vidutiniškai koreliuoja su RMSSD bei AKD. Be to, jis yra tikslesnis ir informatyvesnis nei NN50, todėl ir buvo pasirinktas pokyčiams tyrimo metu įvertinti. Tuo tikslu apskaičiuoti kiekvienos stebėsenos vidurkiai, sudėtos visų matavimų reikšmės ir padalintos iš matavimų skaičiaus. Vidutinės ir kraštinės pNN50 reikšmės pateiktos 3.2.2.1.1 lentelėje.

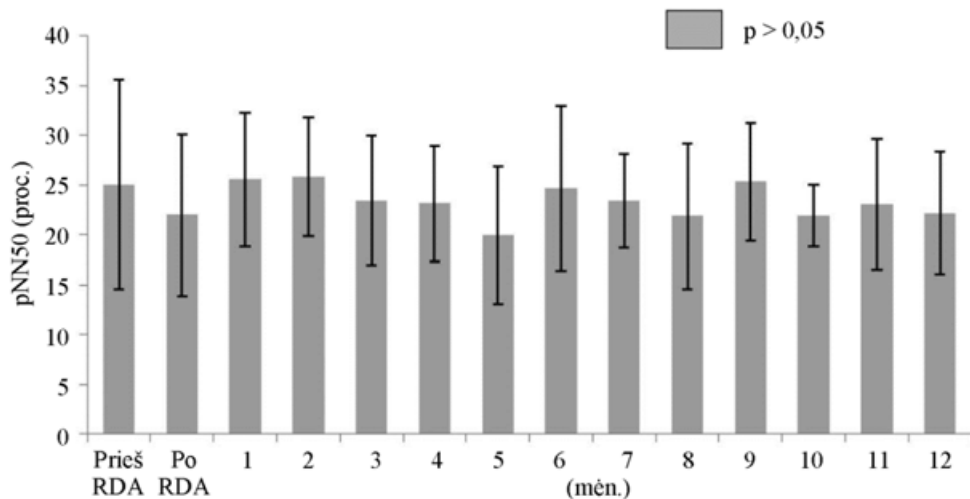
3.2.2.1.1 lentelė. pNN50 dinamika tyrimo laikotarpiu

Tyrimo laikas	N	Minimali reikšmė (proc.)	Maksimali reikšmė (proc.)	Vidutinė reikšmė (proc.)	Standartinis nuokrypis (proc.)
pNN50 prieš RDA	15	15,862	55,000	25,07513	± 10,487120
pNN50 po RDA	14	8,1794	36,4400	21,988600	± 8,0780025
1 mėn.	14	10,286	38,221	25,55000	± 6,736207
2 mėn.	13	12,614	36,225	25,83108	± 5,931808
3 mėn.	13	12,5840	32,6980	23,429815	± 6,4884643
4 mėn.	13	13,332	31,254	23,12500	± 5,809133
5 mėn.	13	10,852	34,230	20,00185	± 6,886891
6 mėn.	13	11,915	35,221	24,68531	± 8,281650
7 mėn.	13	16,662	33,973	23,42577	± 4,708701
8 mėn.	13	11,6500	33,9810	21,883431	± 7,3228822
9 mėn.	13	15,681	33,870	25,33554	± 5,941353
10 mėn.	13	17,580	28,750	21,86338	± 3,102894
11 mėn.	13	12,336	36,410	23,08092	± 6,516875
12 mėn.	13	12,330	34,221	22,19646	± 6,127973

pNN50 – gretimų R-R intervalų, besiskiriančių vienas nuo kito daugiau nei 50 ms dalis išreikšta procentais, RDA – radiodažninė abliacija, N – imties dydis.

Norint įvertinti ar stebimi skaitinių reikšmių skirtumai buvo statistiškai reikšmingi atlikta duomenų statistinė analizė. Vidutinių pNN50 reikšmių palyginimui taikėme neparametrinius Vilkoksono ir Frydmano kriterijus. Grafinis vidurkių su standartiniais nuokrypiais palyginimas pateiktas 3.2.2.1.1 pav.

Bendras pNN50 vidurkių kitimas per visą tyrimą nebuvo statistiškai reikšmingas ($p = 0,475$) ir nesiskyrė nuo priešoperacinių dėl didelio reikšmių išsibarstymo. Tačiau vidutinės skaitinės pNN50 reikšmės tyrimo pradžioje iš karto po atliktos RDA turėjo tendenciją mažėti lyginant su priešoperaciniu vidurkiu. Nors stebėtas pNN50 sumažėjimas nuo $25,08 \pm 10,49$ proc. iki $21,98 \pm 8,08$ proc. nebuvo statistiškai reikšmingas ($p = 0,198$) mūsų pasirinktu pasiklovimo lygmeniu ($p < 0,05$), tačiau jis išliko nežymiai sumažėjęs pirmąjį ($p = 0,06$) mėnesį, lyginant su pradiniu priešoperaciniu vidurkiu. Todėl galima prielaida, kad RDA poveikis šiam ŠRV parametrai, nors ir silpnas, galėjo būti tyrimo pradžioje.



3.2.2.1.1 pav. Vidutinių pNN50 reikšmių dinamikos palyginimas tyrimo eigoje

Statistiškai reikšmingo skirtumo tarp pNN50 vidurkių nebuvo ($p > 0,05$). Vidurkiai pateikti su standartiniais nuokrypiais. RDA – radiodažninė abliacija; pNN50 – dalis gretimų R-R intervalų, besiskiriančių vienas nuo kito daugiau nei 50 ms (proc.).

3.2.2.2. SDNN pokyčių vertinimas

Šis ŠRV parametras yra vienas iš dažniausiai naudojamų ANS tonusą atspindinčių rodiklių. SDNN įtakoja tiek simpatinės, tiek parasimpatinės nervų sistemos aktyvumas. Taip pat yra stiprus ryšys tarp SDNN ir tokių dažnių srities parametru, kaip ŽDK, LŽDK ir UŽDK. Žemų dažnių komponentų įtaka SDNN ypač sustiprėja ilgalaikio EKG monitoravimo metu. Todėl manoma, kad šis parametras ypač informatyvus, vertinant 24 val. EKG monitoravimo duomenis. Be to, ilgėjant monitoravimo trukmei, didėja ir jo tikslumas. Tyrimo metu apskaičiuotos vidutinės SDNN matavimų reikšmės, susumuojant visų tiriamųjų gyvūnų EKG monitoravimo rezultatus ir juos padalinant iš tyrimų skaičiaus. Vidurkiai ir kraštinės SDNN reikšmės pateiktos 3.2.2.2.1 lentelėje.

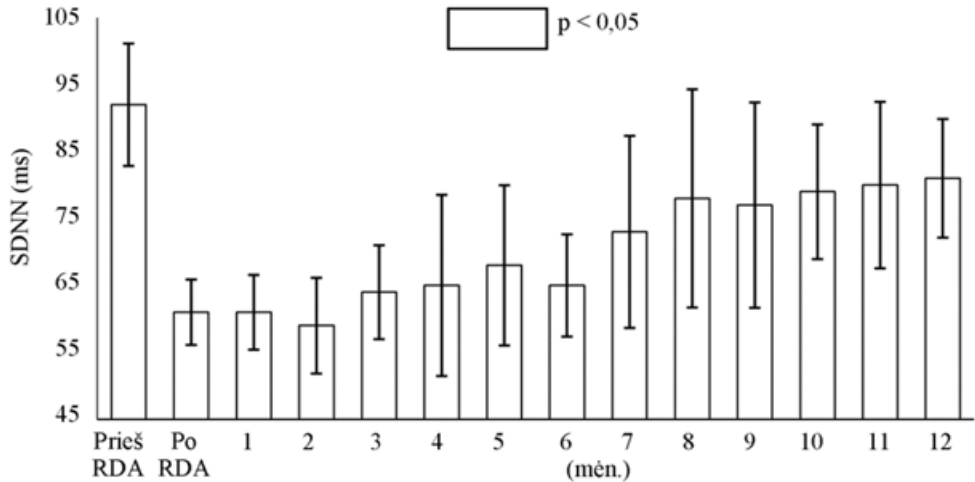
3.2.2.2.1 lentelė. Vidutinės ir krašutinės SDNN reikšmės tyrimo metu, pateiktos su standartiniais nuokrypiais

Tyrimo laikas	N	Minimali reikšmė (ms)	Maksimali reikšmė (ms)	Vidutinė reikšmė (ms)	Standartinis nuokrypis (ms)
SDNN prieš RDA	15	76,892	106,990	92,15707	± 9,137741
SDNN po RDA	14	53,751	69,696	60,45493	± 4,886879
1 mėn.	14	52,378	72,147	60,41871	± 5,581953
2 mėn.	13	45,890	71,025	59,52046	± 7,154085
3 mėn.	13	56,275	83,022	64,03838	± 7,012611
4 mėn.	13	46,258	95,613	64,77200	± 13,524790
5 mėn.	13	52,331	89,439	67,65869	± 11,966763
6 mėn.	13	57,643	78,335	66,44954	± 7,641269
7 mėn.	13	58,220	105,022	73,12254	± 14,350390
8 mėn.	13	48,327	101,900	77,81608	± 16,293281
9 mėn.	13	54,304	110,256	77,00185	± 15,334457
10 mėn.	13	68,014	95,365	79,06515	± 10,058617
11 mėn.	13	62,147	112,360	80,19215	± 12,425232
12 mėn.	13	69,150	92,331	81,08185	± 8,860324

SDNN – standartinis nuokrypis nuo vidutinės visų normalių RR intervalų trukmės (matuojama ms); RDA – radiodažninė abliacija.

Pastebėta, kad skaitinės SDNN reikšmės ženkliai pakito iš karto po atliktos RDA. SDNN vidurkis buvęs $92,16 \pm 9,14$ ms prieš procedūrą, kitas paras ženkliai sumažėjo iki $60,45 \pm 4,89$ ms. Be to, panašios vidurkių reikšmės išliko beveik iki tyrimo vidurio, o po to ėmė palaipsniui didėti.

Norint įvertinti ar stebimi pokyčiai buvo statistiškai patikimi, atlikti vidurkių palyginimo testai. Tuo tikslu naudoti Frydmano ir Vilkoksono testai neparametriniams kriterijams vertinti. Šių testų rezultatai pateikti 3.2.2.2.1 pav.



3.2.2.2.1 pav. SDNN vidurkių dinamika tyrimo metu

Visos reikšmės statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) skyrėsi nuo pradinių. SDNN vidurkiai pateikiami su standartiniais nuokrypiais. SDNN – standartinis nuokrypis nuo vidutinės visų normalių RR intervalų trukmės (matuojama ms); RDA – radiodažninė abliacija.

Po RDA SDNN ženkliai sumažėjo jau pirmosiomis dienomis. Šis pokytis buvo statistiškai reikšmingas ($p < 0,001$) ir išliko visus 12 mėnesių nuo tyrimo pradžios. Grafike matyti, kad SDNN mėnesinių vidurkių reikšmės tyrimo eigoje pradeda didėti, ypač nuo pusės tyrimo. Tačiau nepaisant didėjančių vidurkių reikšmių ir jų išsibarstymo, jos statistiškai reikšmingai skyrėsi lyginant su priešoperacinio tyrimo reikšmėmis. Tai įgalina daryti prielaidą, kad pradiniai ženklūs ANS tonuso pokyčiai, laikui bėgant pradeda grįžti į pradines reikšmes. Tačiau šiai prielaidai įrodyti ar paneigti nepakanka tyrimo imties ir / arba trukmės.

Apibendrinant galima teigti, kad išreikšti SDNN pokyčiai po epikardinės RDA atspindi stiprų procedūros poveikį ŠVANS funkcijai. Šiuo atveju vertinant SDNN atskirai nuo kitų parametrų negalima griežtai teigti apie išskirtinį poveikį vien simpatinėms ar parasimpatinėms nervinėms skaiduloms, kadangi šis parametras priklauso nuo abiejų sistemų tonuso.

3.2.2.3. RMSSD pokyčių vertinimas

RMSSD skaičiuojama, išmatavus visus skirtumus tarp gretimų RR intervalų ms ir atskirai kiekvieną jų pakeliant kvadratu. Kitu etapu skaičiuojamas bendras šių kvadratų vidurkis ir iš gauto rezultato ištraukiama kvadratinė šaknis. Nors dažniausiai RMSSD skaičiuojama iš trumpų 5 min. trukmės ir trumpesnių (10–60 sek.) EKG atkarpų, tačiau šio parametro reikšmė

nemažiau svarbi ir atliekant 24 val. trukmės vertinimus. Ilgalaikio monitoravimo metu gautos RMSSD reikšmės turi stiprų ryšį su NN50, pNN50 ir ADK. RMSSD yra labai jautrus parasimpatinės nervų sistemos tonuso svyravimams. Pagrindinis šio parametro panaudojimo tikslas yra įvertinti klajoklio nervo įtaką ŠSD svyravimams.

Tyrimo metu apskaičiavome vidutines RMSSD matavimų reikšmes, susumuodami visų tiriamųjų gyvūnų EKG monitoravimo rezultatus ir juos padalindami iš tyrimų skaičiaus. Vidurkiai bei kraštinės RMSSD reikšmės pateiktos 3.2.2.3.1 lentelėje.

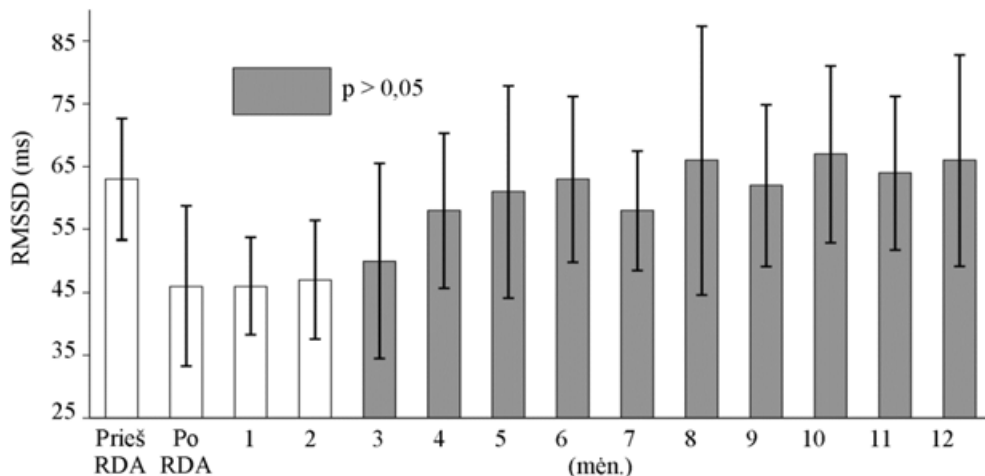
3.2.2.3.1 lentelė. Vidutinės ir kraštinių RMSSD reikšmių dinamika tyrimo metu pateikiama su standartiniais nuokrypiais

Tyrimo laikas	N	Minimali reikšmė (ms)	Maksimali reikšmė (ms)	Vidutinė reikšmė (ms)	Standartinis nuokrypis (ms)
RMSSD prieš RDA	15	47,516	84,975	62,63160	± 9,646036
RMSSD po RDA	14	21,357	70,785	44,30900	± 12,711747
1 mėn.	13	38,871	65,901	46,30838	± 7,717710
2 mėn.	13	34,571	63,520	47,30423	± 9,409675
3 mėn.	13	30,870	86,327	50,03631	± 15,503953
4 mėn.	13	34,251	77,560	58,15262	± 12,300033
5 mėn.	13	35,821	98,241	60,85823	± 16,861019
6 mėn.	13	38,956	92,960	62,98169	± 13,163228
7 mėn.	13	39,651	72,450	57,58908	± 9,471885
8 mėn.	13	42,010	121,550	66,18369	± 21,372335
9 mėn.	13	35,960	85,247	62,04023	± 12,843454
10 mėn.	13	48,127	94,360	67,26215	± 14,040344
11 mėn.	13	48,225	94,325	63,84746	± 12,192192
12 mėn.	13	44,650	95,244	65,89646	± 16,794632

RMSSD – kvadratinė šaknis iš gretimai esančių RR intervalų skirtumų kvadratų vidurkio; RDA – radiodažninė abliacija.

Vertinant RMSSD vidurkių pokyčius, analogiškai, kaip ir SDNN atveju, jau pirmosiomis dienomis po atliktos RDA pastebėtas ženklus skaitinių RMSSD verčių sumažėjimas nuo $62,63160 \pm 9,646036$ ms iki $44,30900 \pm 12,711747$ ms. Tačiau šis vidutinių RMSSD reikšmių sumažėjimas priešin-

gai nei SDNN atveju išliko tik keletą mėnesių. Akivaizdus poveikis buvo stebėtas apie 2–3 mėnesius po RDA. Norint patikslinti šių pokyčių statistinį patikimumą, taip pat atlikti Frydmano ir Vilkoksono neparametrinių kriterijų testai. Šių testų rezultatas pateiktas 3.2.2.3.1 pav.



3.2.2.3.1 pav. Grafiškai pavaizduota RMSSD vidurkių dinamika tyrimo metu, pateikta su standartiniais nuokrypiais

Pilku fonu užpildyti stulpeliai statistiškai reikšmingai nesiskyrė nuo RMSSD reikšmių prieš RDA ($p > 0,05$). RMSSD – kvadratinė šaknis iš gretimai esančių RR intervalų skirtumų kvadratų vidurkio; RDA – radiodažninė abliacija.

Atlikus statistinę analizę paaiškėjo, jog RMSSD iš karto po KP epikardinės RDA statistiškai reikšmingai ($p < 0,001$) sumažėjo. Tačiau lyginant su priešoperacinėmis reikšmėmis statistiškai patikimas RMSSD sumažėjimas išliko tik iki antro mėnesio. Vėliau, padidėjus reikšmių išsibarstymui, patikimų skirtumų negauta, nors SDNN vidurkių skaitinės reikšmės išliko mažesnės už sveikų avių dar iki 7-to mėnesio.

Apibendrinant galima teigti, kad epikardinė RDA sąlygojo ženklų nors ir ne ilgalaikį RMSSD pokytį. Tai gali būti siejama su poveikiu parasimpatinės nervų sistemos skaiduloms, patekusioms į radiodažninės energijos poveikio zoną. Šią prielaidą taip pat sustiprina ir panaši pNN50 pokyčių dinamika po RDA, kadangi abu šie parametrai atspindi parasimpatinės širdies inervacijos tonusą. Daryti išvadas apie šių pokyčių normalizavimosi priežastis, kurios gali būti įvairios, sunku, tačiau labiausiai tikėtina, jog RDA metu buvo paveiktas mažesnis parasimpatinių nervinių skaidulų kiekis, nei simpatinių, todėl poveikis RMSSD ir pNN50 išliko žymiai trumpiau nei SDNN.

3.2.2.4. ŠRV TI pokyčių vertinimas

Nors ŠRV TI yra grafinis metodas ŠRV vertinti, tačiau jį galima išreikšti ir skaitine reikšme. Šis laiko srities parametras yra skirtas ilgiems laiko intervalams vertinti, kadangi ilgėjant stebėsenos trukmei, didėja parametro tikslumas. Dėl šios priežasties jis buvo tinkamas mūsų tyrimui. ŠRV TI panašiai kaip ir SDNN atspindi bendrą ANS tonusą, todėl remiantis juo negalima vertinti kurios nors ANS komponentės aktyvumo atskirai [137].

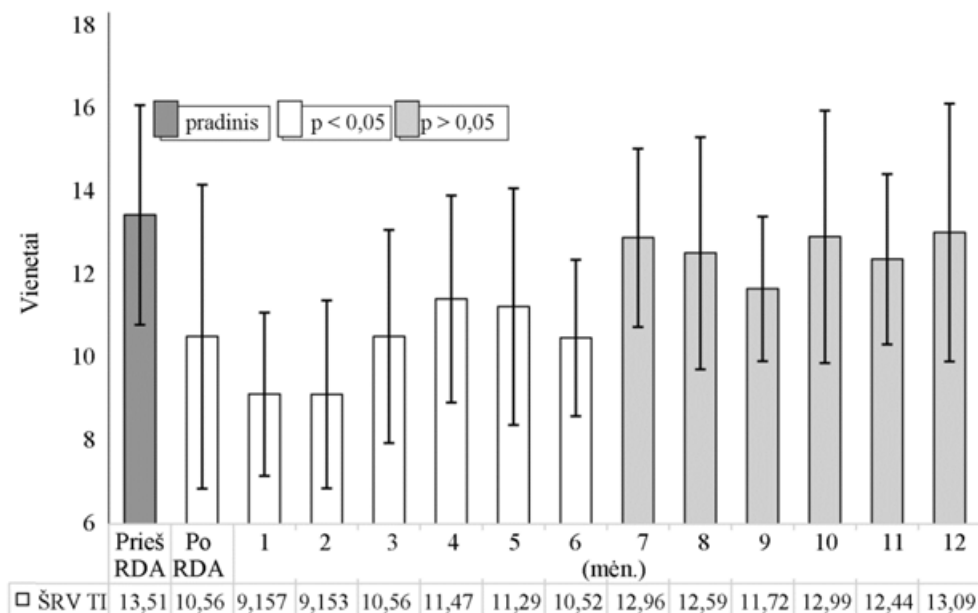
Vidutinės ŠRV TI reikšmės pateiktos 3.2.2.4.1 lentelėje kartu su kraštinėmis stebėsenos mėnesio reikšmėmis bei standartiniu nuokrypiu.

3.2.2.4.1 lentelė. ŠRV TI vidurkio bei kraštinių reikšmių dinamika tyrimo metu, pateikta su standartiniais nuokrypiais.

Tyrimo laikas	N	Minimali reikšmė	Maksimali reikšmė	Vidutinė reikšmė	Standartinis nuokrypis
ŠRV TI prieš RDA	15	10,2570	20,7240	13,514913	$\pm 2,6717616$
ŠRV TI po RDA	14	4,9882	16,8030	10,557057	$\pm 3,6954487$
1 mėn.	14	5,8790	12,4400	9,157479	$\pm 1,9841661$
2 mėn.	13	4,2113	11,8950	9,153208	$\pm 2,2856886$
3 mėn.	13	7,7890	14,9650	10,561900	$\pm 2,5897559$
4 mėn.	13	7,4412	15,2400	11,472177	$\pm 2,5171010$
5 mėn.	13	7,8900	17,3000	11,286446	$\pm 2,8778834$
6 mėn.	13	8,2214	14,2200	10,524915	$\pm 1,9011595$
7 mėn.	13	10,3560	17,0540	12,961292	$\pm 2,1682566$
8 mėn.	13	9,1200	18,0590	12,586754	$\pm 2,8222932$
9 mėn.	13	8,2254	15,4500	11,718754	$\pm 1,7589133$
10 mėn.	13	7,8910	18,8870	12,985892	$\pm 3,0687441$
11 mėn.	13	9,5620	16,3510	12,439708	$\pm 2,0708372$
12 mėn.	13	8,7412	19,8200	13,088231	$\pm 3,1343639$

ŠRV TI – širdies ritmo variabilumo trikampis indeksas; RDA – radiodažninė abliacija.

Įvertinus ŠRV TI vidurkius nustatyta, kad skaitinės šio rodiklio reikšmės sumažėjo nuo $13,514913 \pm 2,6717616$ vienetų iki $10,557057 \pm 3,6954487$ vienetų iš karto po atliktos epikardinės RDA. Šis pokytis taip pat buvo stebimas keletą mėnesių, maždaug iki tyrimo vidurio, po to parametro reikšmių vidurkiai ėmė tolygiai didėti, išliekant gana panašiams standartiniams nuokrypiams. Norint įvertinti statistinį šių vidurkių skirtumų reikšmingumą, jie buvo palyginti, taikant Frydmano ir Vilkoksono testus neparametriniams kriterijams patikrinti. 3.2.2.4.1 paveiksle pateikti šių testų rezultatai kartu su standartiniais nuokrypiais.



3.2.2.4.1 pav. ŠRV TI vidurkių dinamika tyrimo metu

Balta spalva pažymėti matavimai, kurie skyrėsi statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) nuo pradinio vidurkio. ŠRV TI – širdies ritmo variabilumo trikampis indeksas; RDA – radiodažninė abliacija.

Kaip anksčiau aptarti ŠRV laiko srities parametrai, taip ir ŠRV TI staigiai bei statistiškai reikšmingai ($p < 0,001$) sumažėjo pirmomis dienomis po epikardinės RDA procedūros. Nors ŠRV TI vidurkių skaitinės reikšmės iki tyrimo pabaigos taip ir nepasiekė pradinių verčių, buvusių prieš procedūrą, tačiau mūsų pasirinktu pasiklovimo lygmeniu statistiškai reikšmingi skirtumai išliko tik iki 6-to mėnesio.

Apibendrinant rezultatus, galima daryti išvadą, kad po epikardinės RDA vertinant ŠRV TI, buvo stebėtos panašios ANS funkcijos pokyčių tendencijos kaip ir kitų ŠRV laiko srities parametrų. Vertinant visus laiko srities parametrus kartu, galima teigti, kad KP epikardinės RDA užpakalinėje sienoje metu buvo paveikta ŠVANS funkcija. Ryškiausias poveikis ANS tonusui stebėtas keletą pirmųjų mėnesių po procedūros. Vėliau daugumos vertintų parametrų vidurkiai ėmė didėti ir, išskyrus SDNN, statistiškai reikšmingai nebesiskyrė nuo išėities reikšmių.

Vertinant vien ŠRV laiko srities parametrų pokyčius negalima daryti išvados apie išskirtinį poveikį kuriai nors iš ANS sudedamųjų dalių. Tačiau iš stebėtų parametrų tik SDNN išliko statistiškai reikšmingai sumažėjęs visą tyrimo laikotarpį, o kiti tirti parametrai si normalizavosi per 3–6 mėnesius.

Žinant, kad pNN50 ir RMSSD labiausiai atspindi parasimpatinės nervų sistemos aktyvumą, o SDNN bendrą abiejų sistemų tonusą, galima teigti kad ilgiau išlikęs sumažėjęs SDNN gali būti susijęs su stipresniu poveikiu simpatinės nervų sistemos skaiduloms.

3.3. Dažnių srities parametrų vertinimas

ŠRV dažnių srities parametrų vertinti buvo pasirinkti dažniausiai moksliniuose tyrimuose naudojami ADK, ŽDK, LŽDK ir ŽDK/ADK. Nevertinome UŽDK, kadangi jo ryšys su ANS funkcija iki šiol nėra aiškus ir galimai neegzistuoja. Taip pat nevertinome logaritminių ADK, ŽDK ir LŽDK išraiškų normalizuotais vienetais. Nors šie parametrai literatūros duomenimis yra mažiau jautrūs artefaktams, tačiau papildomos informacijos prie pagrindinių parametrų neprideda.

3.3.1. ADK pokyčių vertinimas

ADK apima ŠSD svyravimus 0,15–0,40 Hz diapazone. Tai apytiksliai atitinka žmogaus kvėpavimo dažnį 16–24 k/min. Kadangi avių kvėpavimo dažnis yra labai panašus, todėl manome, kad šis parametras labai tinkamas eksperimentiniams tyrimams su avimis. ADK turi stiprų nors ir netiesioginį ryšį su klajoklio nervo (tuo pačiu ir parasimpatinės nervų sistemos) tonusu. Ši komponentė atspindi ciklinius ŠSD kitimus, sąlygotus klajoklio nervo funkcijos kitimų kvėpavimo ciklo metu ir su jais koreliuoja, tačiau ji tiesiogiai nepriklauso nuo pačio klajoklio nervo tonuso [138]. ADK gerai koreliuoja su tokiais laiko srities parametrais kaip pNN50 ir RMSSD, kurie atspindi parasimpatinės nervų sistemos aktyvumą.

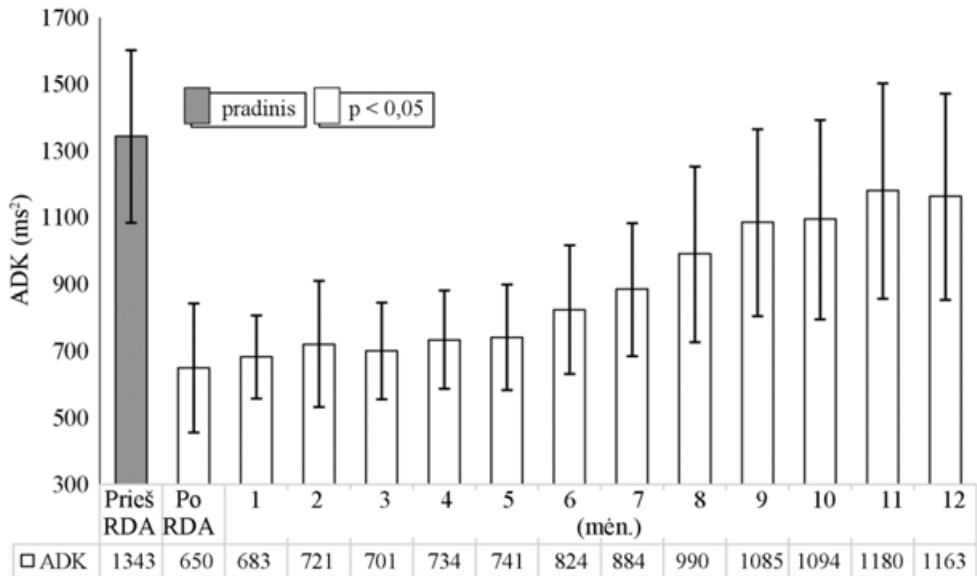
Vidutines ADK reikšmes apskaičiavome sudėję kiekvieno mėnesio atskirų matavimų rezultatus ir juos padalinę iš bendro tyrimų skaičiaus. Rezultatai pateikti 3.3.1.1 lentelėje kartu su kraštinėmis to mėnesio ADK reikšmėmis bei standartiniu nuokrypiu.

3.3.1.1 lentelė. Vidutinių ir kraštinių ADK reikšmių dinamika tyrimo metu, pateikta su standartiniais nuokrypiais

Tyrimo laikas	N	Minimali reikšmė (ms ²)	Maksimali reikšmė (ms ²)	Vidutinė reikšmė (ms ²)	Standartinis nuokrypis (ms ²)
ADK prieš RDA	15	961,03	1732,00	1385,8980	± 259,15264
ADK po RDA	14	427,64	1131,94	652,8771	± 193,64761
1 mėn.	14	409,68	925,54	685,9543	± 124,76136
2 mėn.	13	402,33	1142,30	720,8754	± 188,30191
3 mėn.	13	510,11	961,96	700,7654	± 145,20764
4 mėn.	13	529,11	1027,60	734,0954	± 146,26696
5 mėn.	13	470,25	989,63	740,8754	± 157,24758
6 mėn.	13	589,63	1213,63	824,3485	± 192,05340
7 mėn.	13	526,31	1289,63	883,7415	± 198,30555
8 mėn.	13	448,42	1538,36	989,1738	± 262,67612
9 mėn.	13	514,68	1524,12	1085,6438	± 279,50955
10 mėn.	13	420,21	1520,86	1094,1715	± 298,11253
11 mėn.	13	513,54	1639,33	1180,1538	± 322,27863
12 mėn.	13	482,15	1709,85	1163,1600	± 308,58018

ADK – aukštų dažnių komponentė; RDA – radiodažninė abliacija.

Įvertinus ADK vidurkius, nustatyta, kad iš karto po atliktos epikardinės RDA, skaitinės šio parametro reikšmės sumažėjo nuo 1385,8980 ± 259,15264 vienetų iki 652,8771 ± 193,64761 vienetų. Šis sumažėjimas išliko visus 12 mėnesių iki tyrimo pabaigos. Nors skaitinės ADK vidurkių reikšmės ir turėjo tendenciją didėti, bet verčių buvusių prieš operaciją nepasiekė. Norint įvertinti statistinį šių vidurkių skirtumų reikšmingumą, jie palyginti taikant nparametrinių kriterijų testus. 3.3.1.1 pav. pateikti šių testų rezultatai kartu su standartiniais nuokrypiais.



3.3.1.1 pav. ADK vidurkių dinamika tyrimo metu

Balta spalva pažymėti statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) nuo pradinio vidurkio skyręsi matavimai. ADK – aukštų dažnių komponentė; RDA – radiodažninė abliacija.

Kaip ir daugumos laiko srities parametų, jau kitą parą po epikardinės RDA buvo stebėtas ženklus ir statistiškai reikšmingas ($p < 0,001$) ADK vidurkio sumažėjimas. Taip pat stebėtas akivaizdus ADK vidurkių didėjimas stebėsenos laikotarpiu ir šis pokytis išliko statistiškai reikšmingas iki tyrimo pabaigos. Gautas ADK vidurkių sumažėjimas po procedūros leidžia teigti, kad RDA metu buvo stipriai paveikta parasimpatinė širdies inervacija ir jos aktyvumo sumažėjo. Pastovus ADK vidurkių didėjimas tyrimo metu leidžia daryti prielaidą, kad tyrimo trukmė buvo per trumpa, norint tiksliai įvertinti šio parametro pokyčius, nes tokia jų dinamika visiškai neatmeta galimo normalizavimosi per ilgesnį stebėsenos periodą.

3.3.2. ŽDK pokyčių vertinimas

ŽDK apima ŠSD ciklinių svyravimų spektrą nuo 0.04 Hz iki 0.15 Hz. Šios komponentės kilmė iki šiol nėra visiškai išaiškinta. Manoma, kad toks dažnių spektras atspindi šią komponentę įtakojančių veiksnių daugialypiškumą. ŽDK atspindi tiek simpatinės, tiek parasimpatinės ANS tonusą, tiek ir kardiovaskulinės sistemos baroreceptorių sąlygotus ŠSD svyravimus. Taip pat manoma, kad parasimpatinė nervų sistema gali turėti didesnę įtaką šiai komponentei, kadangi simpatinės nervų sistemos signalai retai kada būna

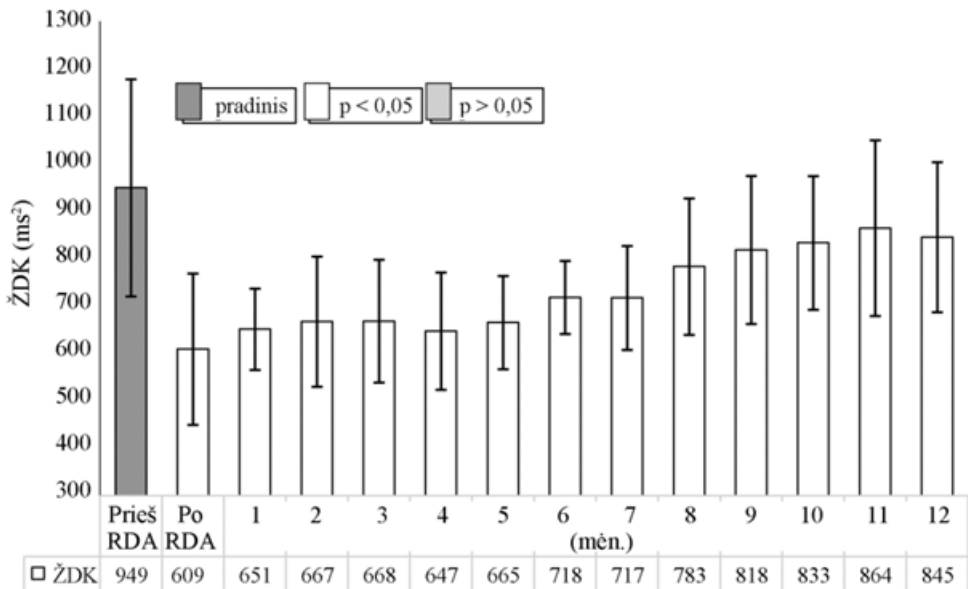
lėtesni nei 0,1 Hz. Vidutinių ADK reikšmių rezultatai pateikti 3.3.2.1 lentelėje kartu su kraštinėmis to mėnesio reikšmėmis bei standartiniu nuokrypiu.

3.3.2.1 lentelė. Vidutinių ir kraštinių ŽDK reikšmių dinamika tyrimo metu pateikta su standartiniais nuokrypiais

Tyrimo laikas	N	Minimali reikšmė (ms ²)	Maksimali reikšmė (ms ²)	Vidutinė reikšmė (ms ²)	Standartinis nuokrypis (ms ²)
ŽDK prieš RDA	15	718,550	1658,700	987,65060	± 228,789771
ŽDK po RDA	14	325,06	853,17	602,9643	± 159,40678
1 mėn.	14	493,57	789,24	659,9700	± 85,72849
2 mėn.	13	457,02	1002,40	666,6469	± 137,18227
3 mėn.	13	494,35	894,24	667,9431	± 129,36712
4 mėn.	13	318,86	823,54	647,1438	± 123,51688
5 mėn.	13	501,23	814,80	665,2131	± 98,27686
6 mėn.	13	629,31	875,63	717,8515	± 77,01537
7 mėn.	13	497,37	912,54	716,8323	± 109,49092
8 mėn.	13	592,33	1058,46	782,6238	± 143,77701
9 mėn.	13	552,06	1107,20	817,9385	± 155,97481
10 mėn.	13	606,82	1125,56	832,9254	± 140,79559
11 mėn.	13	633,210	1352,230	864,22092	± 185,019005
12 mėn.	13	580,321	1125,230	845,00931	± 158,140897

ŽDK – žemų dažnių komponentė; RDA – radiodažninė abliacija.

Tyrimo pradžioje, iš karto po atliktos RDA, skaitinės ŽDK reikšmės ženkliai sumažėjo. ŽDK vidurkis prieš procedūrą buvęs $987,65 \pm 228,79 \text{ ms}^2$ kitas paras po procedūros ženkliai sumažėjo: iki $602,96 \pm 159,41 \text{ ms}^2$. Be to, panašios vidurkių reikšmės išliko iki tyrimo pabaigos, nors nuo tyrimo vidurio ėmė tolygiai didėti.



3.3.2.1 pav. ŽDK vidurkių dinamika tyrimo metu

Balta spalva pažymėti statistiškai reikšmingi ($p < 0,05$) matavimų skirtumai nuo priešoperacinio vidurkio. ŽDK – žemų dažnių komponentė; RDA – radiodažninė abliacija

Šių vidurkių palyginimo rezultatai pateikti 3.3.2.1 pav. Gauti rezultatai labai panašūs kaip į ADK kitimus. ŽDK statistiškai patikimai sumažėjo iš karto po epikardinės RDA. Nors ir buvo stebėtas vidurkių ir jų reikšmių išsibarstymo didėjimas antroje tyrimo pusėje, tačiau pokytis išliko statistiškai reikšmingas ($p < 0,001$) visus 12 mėn. nuo tyrimo pradžios.

3.3.3. LŽDK pokyčių vertinimas

Šios komponentės fiziologinis atitikmuo taip pat nėra visiškai išaiškintas. Manoma, kad jos išreikštumas labiausiai susijęs su fiziniu aktyvumu ir renino-angiotenzino sistemos įtaka širdies veiklai [139, 140], bet LŽDK gali turėti ryšį ir su parasimpatine nervų sistema [141].

Vidutinės LŽDK reikšmės pateiktos 3.3.3.1 lentelėje kartu su kraštinėmis to mėnesio reikšmėmis bei standartiniu nuokrypiu. Įvertinę LŽDK vidurkius, nustatėme, kad iš karto po atliktos epikardinės RDA šio rodiklio vidurkiai sumažėjo nuo $2957,1967 \pm 1855,12033$ iki $2287,8400 \pm 1845,46555$ ms². Tačiau šis sumažėjimas išliko tik 3 mėnesius, be to, akivaizdžiai dideli standartiniai nuokrypiai, sudarantys daugiau nei pusę vidurkio reikšmės, sudarė prielaidą galvoti apie mažą šio parametro informatyvumą, vertinant ANS aktyvumą.

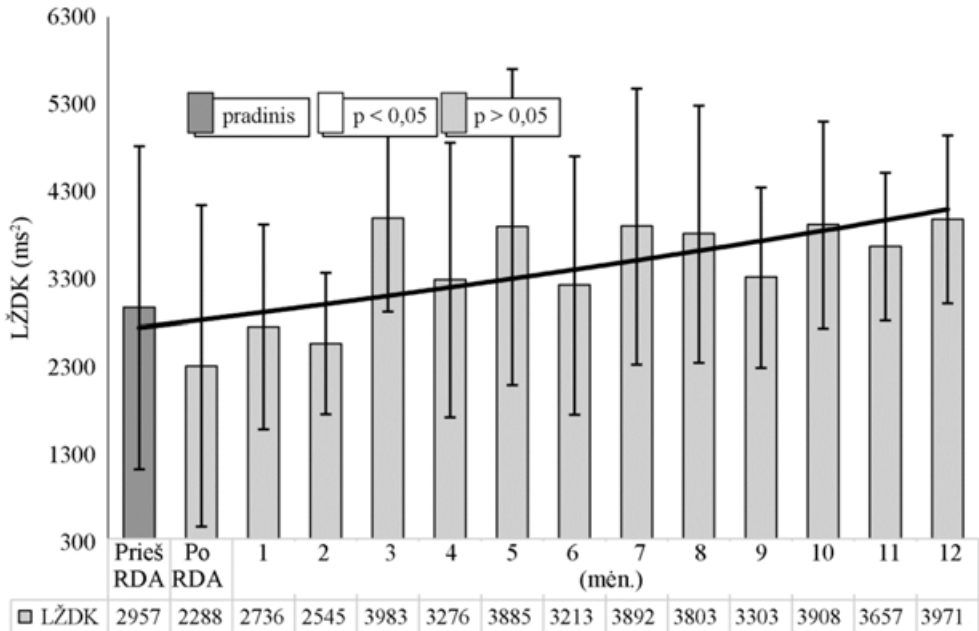
3.3.3.1 lentelė. Vidutinių ir kraštinių LŽDK reikšmių dinamika tyrimo metu, pateikta su standartiniais nuokrypiais

Tyrimo laikas	N	Minimali reikšmė (ms ²)	Maksimali reikšmė (ms ²)	Vidutinė reikšmė (ms ²)	Standartinis nuokrypis (ms ²)
LŽDK prieš RDA	15	837,70	6956,80	2957,1967	± 1855,12033
LŽDK po RDA	14	221,46	6872,30	2287,8400	± 1845,46555
1 mėn.	14	946,36	4679,45	2736,0286	± 1174,02318
2 mėn.	13	1420,10	4235,14	2545,1969	± 809,91967
3 mėn.	13	1978,24	5726,18	3983,2069	± 1074,31348
4 mėn.	13	1094,10	6332,00	3275,8846	± 1576,30587
5 mėn.	13	1029,40	6661,22	3885,0692	± 1814,47256
6 mėn.	13	1057,00	6524,38	3212,7231	± 1483,08047
7 mėn.	13	1244,44	5731,33	3891,9092	± 1583,92805
8 mėn.	13	1059,40	6521,00	3803,4785	± 1475,64005
9 mėn.	13	1999,44	5513,21	3303,4531	± 1034,06838
10 mėn.	13	2195,45	6822,09	3908,4215	± 1187,67338
11 mėn.	13	2458,10	5421,31	3657,1438	± 849,84456
12 mėn.	13	2258,30	5223,47	3970,6608	± 966,16856

LŽDK – labai žemų dažnių komponentė; RDA – radiodažninė abliacija.

Norint įvertinti statistinį šių vidurkių skirtumų reikšmingumą, jie buvo palyginti, taikant Frydmano ir Vilkoksono testus neparamestriniams kriterijams patikrinti. 3.3.3.1 pav. pateikti šių testų rezultatai ir jų standartiniai nuokrypiai.

Atlikus statistinę analizę, pastebėta bendra LŽDK vidurkio didėjimo tendencija tyrimo metu (3.3.3.1 pav. ištisinė linija), tačiau vidurkių skirtumai nebuvo statiškai reikšmingi. Be to, remiantis literatūros duomenimis, sumažėjęs parasimpatinės nervų sistemos aktyvumas (to galima tikėtis ir iš kitų parametrų stebėjimų rezultatų) turėtų pasireikšti LŽDK sumažėjimu. Tai leidžia manyti, kad šis parametras nebuvo pakankamai informatyvus ANS funkcijai įvertinti mūsų tyrimo metu.



3.3.3.1 pav. LŽDK vidurkių dinamika tyrimo metu

Pilka spalva pažymėti statistiškai nereikšmingai ($p > 0,05$) nuo pradinio vidurkio skyresni matavimai. LŽDK – labai žemų dažnių komponentė; RDA – radiodažninė abliacija.

3.3.4. ŽDK/ADK santykio vertinimas

Kadangi ADK ir ŽDK fiziologiniai atitikmenys nors ir persidengdami, tačiau iš esmės atspindi skirtingų ANS dalių funkciją, todėl jų santykio vertinimas gali padėti įvertinti, kuri iš šių sistemų dominuoja tiriamuoju atveju [142]. Kadangi ŽDK yra įtakojama tiek simpatinės tiek parasimpatinės nervų sistemos, o ADK labiau atspindi parasimpatinės nervų sistemos tonusą, todėl galima daryti prielaidą, kad sąlyginai šis santykis yra lygus simpatinė+parasimpatinė/parasimpatinės nervų sistemos. Taigi, kuo santykis didesnis, tuo didesnė simpatinės nervų sistemos įtaka tiriamuoju atveju. Tai reiškia, kad santykiui esant disesniam už 1,0 vyrauja simpatinė inervacija, o jeigu jis yra mažesnis, vyrauja parasimpatinė. Tačiau tokia prielaida nėra visiškai tiksli ir turėtų būti vertinama atsargiai. Taip yra todėl, kad tiek ADK, tiek ŽDK neturi griežtos linijinės priklausomybės nuo kurios nors iš ANS dalių. Be to, abi šias komponentes įtakoja ir kiti fiziologiniai parametrai, neturintys tiesioginės sąsajos su ANS. Laiko intervalas, kurio metu vertinamas šis santykis, taip pat turi įtakos. Skiriasi veiksniai, įtakojantys ilgalaikio ir trumpalaikio EKG monitoravimo ADK ir ŽDK rezultatus. Dėl šių priežasčių ŽDK/ADK santykio vertinimas negali būti absoliutus, tačiau jis

leidžia daryti prielaidas apie vienos iš šių sistemų dominavimą kitos atžvilgiu.

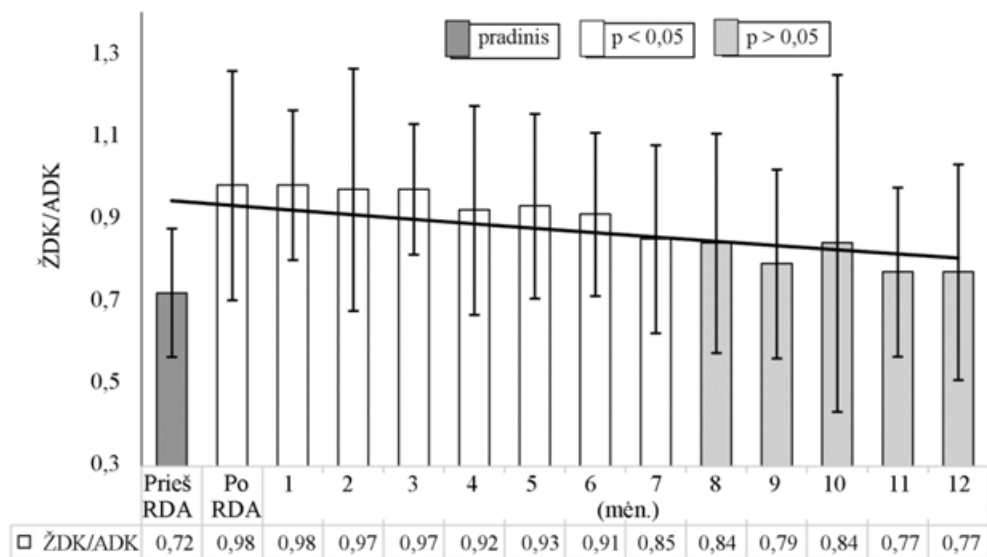
Vidutinės ŽDK/ADK santykio reikšmės pateiktos 3.3.4.1 lentelėje kartu su standartiniu nuokrypiu ir kraštinėmis vertėmis. Įvertinus ŽDK/ADK santykio vidurkius nustatyta, kad iš karto po atliktos procedūros šio rodiklio vidurkiai padidėjo nuo $0,7260 \pm 0,15475$ iki $0,9628 \pm 0,27702$. Padidėjimas buvo ženkliausias pirmaisiais mėnesiais po RDA ir tyrimo metu rodiklio vidutinės reikšmės ėmė mažėti, tačiau visus 12 mėn. išliko didesnės nei pradinės reikšmės.

3.3.4.1 lentelė. Vidutinių ir kraštinių ŽDK/ADK reikšmių dinamika tyrimo metu, pateikta su standartiniais nuokrypiais

Tyrimo laikas	N	Minimali reikšmė	Maksimali reikšmė	Vidutinė reikšmė	Standartinis nuokrypis
ŽDK/ADK prieš RDA	15	0,50	1,02	0,7260	$\pm 0,15475$
ŽDK/ADK po RDA	14	0,53	1,38	0,9628	$\pm 0,27702$
1 mėn.	14	0,75	1,48	0,9841	$\pm 0,18151$
2 mėn.	13	0,56	1,72	0,9732	$\pm 0,29269$
3 mėn.	13	0,65	1,25	0,9663	$\pm 0,15841$
4 mėn.	13	0,31	1,31	0,9231	$\pm 0,25240$
5 mėn.	13	0,61	1,34	0,9322	$\pm 0,22289$
6 mėn.	13	0,52	1,20	0,9077	$\pm 0,19691$
7 mėn.	13	0,43	1,31	0,8520	$\pm 0,22699$
8 mėn.	13	0,53	1,56	0,8407	$\pm 0,26504$
9 mėn.	13	0,65	1,47	0,7907	$\pm 0,22800$
10 mėn.	13	0,46	2,12	0,8446	$\pm 0,40732$
11 mėn.	13	0,50	1,23	0,7723	$\pm 0,20403$
12 mėn.	13	0,51	1,55	0,7738	$\pm 0,26043$

ADK – aukštų dažnių komponentė; ŽDK – žemų dažnių komponentė;
RDA – radiodažninė abliacija.

Statistinės analizės duomenys pateikti 3.3.4.1 pav. Nustatyta, kad ŽDK/ADK santykio vidurkiai po RDA statistiškai reikšmingai padidėjo ($p < 0,005$). Jų padidėjimas stebėtas nuo pat pirmojo EKG monitoravimo po procedūros. Tyrimo metu stebėta ŽDK/ADK vidurkių mažėjimo tendencija ir didėjo jų reikšmių išsibarstymas. Maždaug 8 mėn. po RDA šis santykis pasiekė prieš operaciją buvusias vertes ir likusį stebėsenos laiką statistiškai reikšmingai nebesiskyrė nuo kontrolinių matavimų prieš epikardinę RDA.



3.3.4.1 pav. ŽDK/ADK vidurkių dinamika tyrimo metu

Balta spalva pažymėti statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) nuo pradinio vidurkio skyresni matavimai. ŽDK – žemų dažnių komponentė; ADK – aukštų dažnių komponentė; RDA – radiodažninė abliacija.

Pastebėta, kad tiek tyrimo pradžioje, tiek po RDA vidutinės ŽDK/ADK santykio reikšmės neviršijo 1,0. Tai leidžia daryti prielaidą apie parasimpatinės nervų sistemos dominavimą viso tyrimo metu, nepaisant atlikto poveikio nervinėms širdies struktūroms. Sunku vienareikšmiškai paaikškinti nežymų šio santykio padidėjimą po procedūros. Tai galėtų atspindėti trumpalaikį simpatinės nervų sistemos aktyvumo padidėjimą ir netiesiogiai teigti, kad parasimpatinės nervų sistemos struktūros RDA metu buvo paveiktos labiau nei simpatinės. Tačiau turint omenyje anksčiau įvardintas šio santykio savybes, toks vertinimas gali būti netikslus.

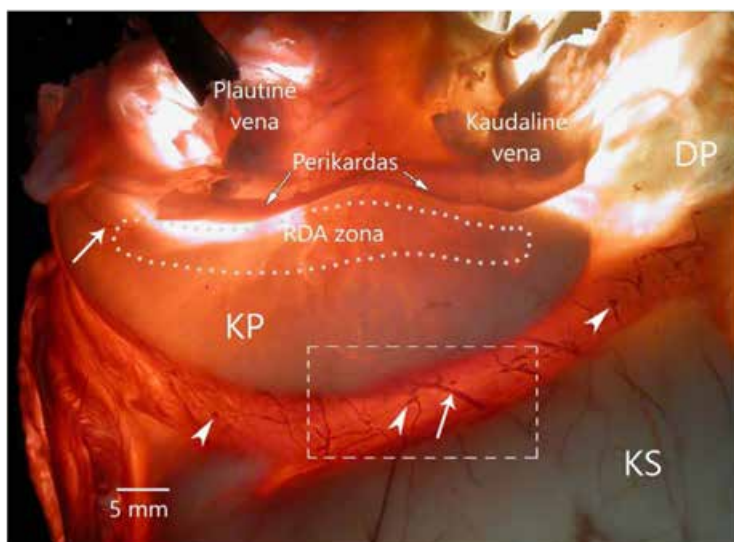
Apibendrinant dažnių srities parametrų stebėsenos rezultatus galima padaryti išvadą, kad KP epikardinė RDA turėjo įtakos šių parametrų vidurkiams: ADK, ŽDK bei ŽDK/ADK reikšmės statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) pakito iš karto po procedūros. LŽDK vidurkio skaitinės reikšmės taip pat pakito, tačiau statistiškai nereikšmingai ($p > 0,05$).

Sprendžiant iš dažnių srities ŠRV parametrų pokyčių, yra akivaizdu, kad ŠVANS funkcija po procedūros pasikeitė. Abi šios sistemos dalys buvo paveiktos procedūros metu, tačiau sudėtinga įrodyti, kuri iš jų labiau. Taip yra todėl, kad nė vienas iš ŠRV dažnių srities parametrų neturi griežtos linijinės priklausomybės nuo simpatinės ar parasimpatinės nervų sistemos aktyvumo. Vertinant ŽDK/ADK santykio pokytį ir stebėtą jo padidėjimą tyrimo pir-

mojoje pusėje, būtų galima daryti prielaidą, kad KP epikardinės RDA metu ŠVANS parasimpatinės struktūros buvo paveiktos labiau. Tačiau vertinant absoliučias ŽDK/ADK santykio reikšmes, panašu, kad parasimpatinė nervų sistema dominavo prieš simpatinę viso tyrimo metu. Bet vertinant vien tik šį santykį, galimos prielaidos yra tik apytikslės.

3.4. Imunohistologinio ištyrimo rezultatų įvertinimas

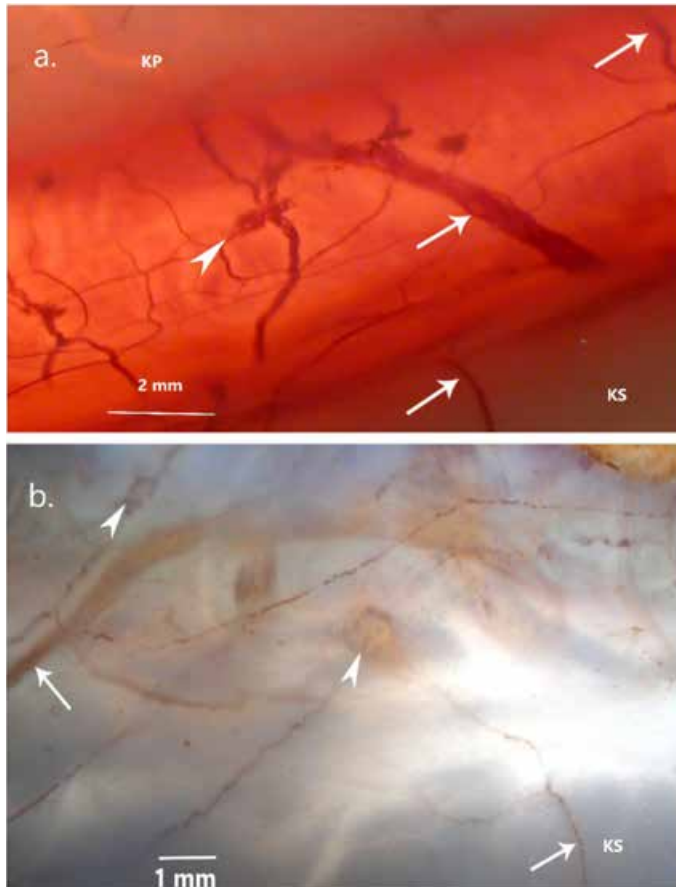
Pirminio ištyrimo metu nervinių struktūrų pokyčiai buvo įvertinti makroskopiškai. Nudažius KP preparatus AChE, dorzalinio KP nervinio rezginio struktūros buvo gerai matomos tiek kontrolinėje, tiek tiriamojoje gyvūnų grupėse. 3.4.1 pav. pateiktas makroskopinis išpūstos kontrolinės avies širdies KP nugarinio paviršiaus vaizdas. Jame dažant AChE aiškiai matomos nepažeistos ŠVANS struktūros. Plika akimi galima įžiūrėti stambesnes nervines skaidulas bei nervinius mazgus.



3.4.1 pav. Makroskopinis išpūstos kontrolinės avies širdies KP preparatas iš nugarinio paviršiaus

Širdies vidinės nervinės struktūros išryškintos dažant AChE. KP nuo KS riboja vainikinio ančio vaga, kurioje aiškiai matomi epikardiniai nervai ir nerviniai mazgai. Nerviniai mazgai žymimi trumpomis rodyklėmis. Nervai žymimi ilgomis rodyklėmis. Taškine punktyrine linija apvesta apytikslė sritis, kurioje atlikta RDA. Brūkšnine punktyrine linija apvesta sritis, kurios preparatai lyginti tarp kontrolinės ir tiriamosios grupės. RDA – radiodažninė abliacija; DP – dešinysis prieširdis; KP – kairysis prieširdis; KS – kairysis skilvelis.

Šia metodika paruoštuose makroskopiniuose preparatuose nervinės struktūros taip pat buvo gerai matomos ir tiriamojėje grupėje, tačiau kontrolinėje grupėje jos dažėsi žymiai ryškiau. Skirtumus galima pastebėti 3.4.2 pav. pateiktose papildintose vainikinio ančio srities nuotraukose. Iš šių vaizdų galima daryti netiesiogines išvadas, kad nervinės struktūros žemiau RDA poveikio zonos yra sunykusios.

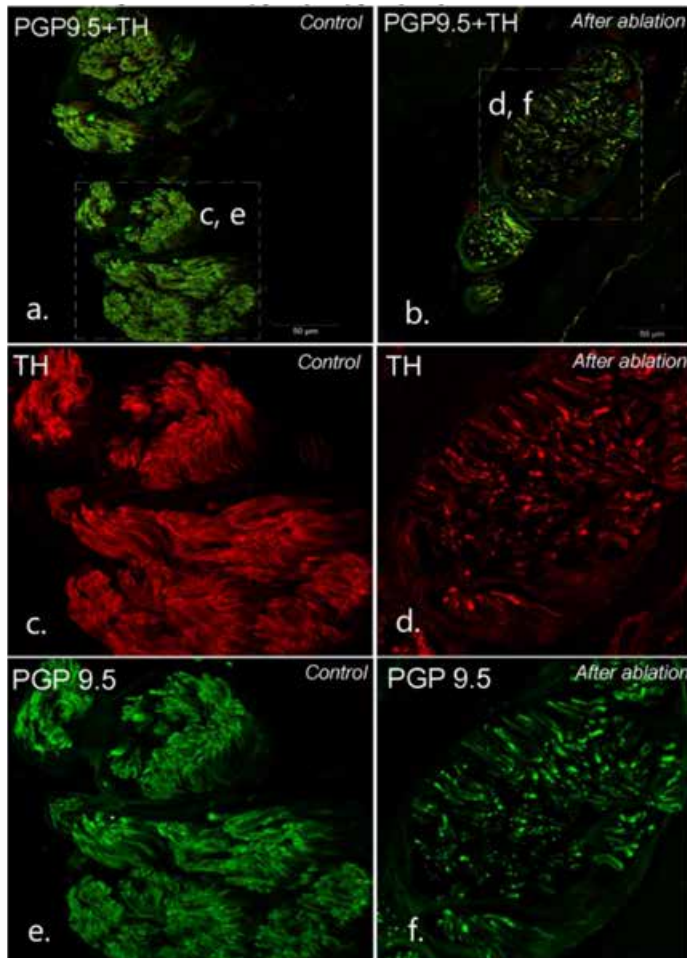


3.4.2 pav. Kontrolinės (a) ir tiriamosios (b) grupės makroskopiniai KP nugarinio paviršiaus preparatai, apimantys vainikinio ančio zoną

Tiriamosios grupės nervinės struktūros žemiau radiodažninės abliacijos atlikimo vietos dažosi akivaizdžiai silpniau. Ilgomis rodyklėmis žymimi nervai, trumpomis rodyklėmis žymimi nerviniai mazgai. KP – kairysis prieširdis; KS – kairysis skilvelis.

Kitame etape, norėdami nustatyti nervinių skaidulų tankio epikardiniuose nervuose kiekybinius skirtumus tarp kontrolinės ir tiriamosios grupių, atlikome imunohistocheminį širdžių ištyrimą. Nervai buvo dažomi naudojant

TH, ChAT ir PGP 9,5. Kontrolinės grupės epikardinių nervų preparatuose iš nugarinio KP nervinio rezginio ir kairiojo skilvelio nugarinio paviršiaus buvo stebimi sveiki nepakitusios struktūros nervai. Jų skerspjūviai buvo visiškai ir tolygiai užpildyti nervinėmis skaidulomis, padengtomis epineuriumu. Tuo tarpu, tiriamosios grupės preparatuose, paimtuose iš dorzalinio KP paviršiaus, kiek žemiau RDA atlikimo zonos, buvo stebėtas ženklus aksonų tankio sumažėjimas nervų skerspjūviuose. 3.4.3 pav. pateiktas šių pokyčių pavyzdys.



3.4.3 pav. *Paveiksle (a) pateiktas kontrolinės avies nervas nudažytas bendrai PGP 9,5 ir TH*

Paveiksle (b) pateiktas nervo skerspjūvis po atliktos RDA, nudažytas PGP 9,5 ir TH. Po RDA stebėtas ženkliai sumažėjęs nervinių skaidulų tankis ir jų dažymosi intensyvumas. Toks pats rezultatas stebėtas lyginant kontrolinę (c, e) ir RDA (d, f) grupes, nudažius abiem metodais atskirai.

Šie vizualiai pastebimi nervų sudėties pokyčiai leidžia daryti išvadą, kad epikardinė RDA buvo efektyvi. Be to, paveikti ne tik į tiesioginio poveikio zoną patekę KP audiniai, bet ir distaliau esantys nervai, besitęsiantys KS nugariniu paviršiumi.

Svarbu pažymėti, kad imunohistocheminio ištyrimo metu nepastebėjome jokių nervų regeneracijai būdingų pokyčių.

Norint įvertinti nervuose stebimus pokyčius objektyviai, apskaičiuotas nervinių skaidulų kiekis nervų skerspjūviuose. Apskaičiuoti nervinių skaidulų santykinio tankio vidurkiai pateikti 3.4.1 lentelėje. Nervinių skaidulų santykinis tankis buvo apskaičiuotas nervinių skaidulų plotą dalinant iš nervo ploto.

3.4.1 lentelė. *Santykinio nervinių skaidulų tankio tiriamojoje ir kontrolinėje grupėje palyginimas*

Kairiojo skilvelio sritis		Kontrolė (n = 3)			Tiriamosios avys (n = 6)		
		Pagrindas	Vidurys	Viršūnė	Pagrindas	Vidurys	Viršūnė
Santykinis skaidulų tankis nerve	Žymuo						
	TH	55,94 ± 1,35 (n = 90)	54,52 ± 1,35 (n = 61)	52,68 ± 2,44 (n = 42)	37,72 ± 1,68 (n = 115)	37,52 ± 1,09 (n = 171)	37,94 ± 2,06 (n = 55)
	PGP 9,5	63,93 ± 1,54 (n = 58)	63,62 ± 1,10 (n = 58)	58,16 ± 2,08 (n = 45)	46,31 ± 1,31 (n = 122)	46,86 ± 1,32 (n = 155)	44,62 ± 1,53 (n = 91)
	ChAT	0,96 ± 0,06 (n = 83)	0,907 ± 0,08 (n = 63)	0,999 ± 0,11 (n = 30)	0,658 ± 0,09 (n = 97)	0,444 ± 0,05 (n = 156)	0,531 ± 0,11 (n = 45)

Po atliktos RDA skirtingų nervinių skaidulų epikardiniuose nervuose sumažėjo nevienodai. PGP 9,5 imunoreaktyvių struktūrų sumažėjo 23–28 proc. ir šis pokytis buvo statistiškai reikšmingas visose tirtose skilvelių dalyse ($p < 0,001$). Kiek ženkliau – 28–33 proc. sumažėjo simpatinių – TH imunoreaktyvių skaidulų tankis, šis pokytis taip pat buvo statistiškai reikšmingas ($p < 0,001$) visose skilvelių dalyse.

Nors cholinerginių nervinių skaidulų sumažėjo ženkliausiai – net 32–51 proc. lyginant su atitinkamų skilvelių dalių kontroliniais nervais, tačiau šio tipo skaidulų skilvelių epikardiniuose nervuose yra labai mažai ir gauti skirtumai skilvelių pamate bei viršūnėje nebuvo statistiškai reikšmingi. Šių skaidulų santykinis tankis statistiškai reikšmingai sumažėjo tik skilvelių vidurinėje dalyje ($p < 0,001$).

Apibendrinant imunohistologinio ištyrimo rezultatus, galima padaryt keletą išvadų. Pirmiausiai svarbu, kad nervinių struktūrų sunykimas KP ir KS įrodo, jog RDA procedūra, buvo atlikta visoms tyrime dalyvavusioms avims ir buvo veiksminga. Tai leidžia atmesti tikimybę, kad neefektyvios RDA atveju, ŠRV parametų pokyčius galėjo sąlygoti krūtinės ląstos ir perikardo

ertmės atvėrimas. Pagal gautus tyrimų rezultatus galima teigti, kad EKG monitoravimo metu stebėti ilgalaikiai ŠVANS funkcijos pokyčiai yra tiesiogiai susiję su struktūriniais pokyčiais šioje sistemoje. Be to, galima pastebėti, jog praėjus 12 mėn. po atliktos RDA, jokių nervinių struktūrų regeneracijos požymių neaptikta. Tai leidžia spėti, kad regeneracija nesusijusi su funkcinio ŠVANS pokyčių dinamika.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Aptariant tyrimo rezultatus, pirmiausia norime atkreipti dėmesį į tai, kad ŠRV parametrų negalima taikyti tiksliai kiekybiniam ANS funkcijos vertinimui, nes nei vienas ŠRV parametras neturi griežtos tiesinės priklausomybės nuo ANS tonuso. Sudėtinga ŠSD reguliacija vyksta kartu veikiant abiem ANS šakoms ir centrinei nervų sistemai, taip pat ją įtakoja organizmo aplinkos ir vidaus sąlygos bei rūšies ir net individų tarpusavio skirtumai. Dėl šių priežasčių rekomenduojama lyginti individualių ŠRV parametrų dinamiką tam pačiam tiriamajam, o ne skirtumus tarp individų [65]. Tačiau tyrimo pradžioje, prieš atliekant KP epikardinę RDA, mūsų tiriamosios avių grupės ŠRV parametrų vidutinės reikšmės buvo panašios į prieinamų negausių literatūros šaltinių duomenis. Nežymūs skirtumai galėjo būti dėl to, kad palyginome kitokio amžiaus, veislės ir sveikatos būklės avis [118, 127, 138]. Be to, pastebėta, kad tokie vidutiniai baziniai avių gyvybiniai rodmenys kaip kvėpavimo ir širdies susitraukimų dažnis buvo labai panašūs į žmogaus rodmenis. Tas pats pasakytina ir apie daugumą vertintų ŠRV parametrų. Įvertinus fiziologinius ir anatominius širdies panašumus, bei tai, kad avis nesudėtinga įsigyti, jų priežiūra yra sąlyginai paprasta dėl nedidelio dydžio ir romaus charakterio, galima teigti, kad šie gyvūnai yra tinkami žmogaus kardiovaskulinės sistemos patologijos ilgalaikiams ir trumpalaikiams eksperimentiniams tyrimams.

Tyrimo metu stebėti ŠRV ir histologinės nervų struktūros pokyčiai, atsiradę po KP epikardinės RDA, patvirtina, kad procedūra turėjo poveikį ŠVANS struktūroms ir jų funkcijai. Gauti rezultatai parodė, kad neabejotinai RDA procedūra buvo atlikta veiksmingai ir stebimi pokyčiai po procedūros nėra sąlygoti tik jos traumatiškumo. Nors krūtinės atvėrimo procedūra buvo traumuojanči ir galėjo sukelti ŠRV parametrų pokyčius, tačiau daugumos gyvūnų savijauta, praėjus vos keletui valandų po procedūros, buvo gera ir stebėti pokyčiai nebūtų išlikę 12 mėnesių.

ŠVANS sąsaja su PV patogeneze yra labai svarbi, todėl mūsų tyrimo metu ir buvo suplanuota atlikti RDA plaučių venų įtekėjimo į kairįjį prieširdį srityje, nes, gydant PV intervenciniu būdu, būtent šiose vietose ir atliekamos RDA aplikacijos, skirtumas tik tas, kad aplikacijos atliekamos cirkuliariai, tolygiai izoliuojant plautines venas. Šių procedūrų metu neišvengiamai pažeidžiama ir ŠVANS. Savo tyrime eksperimentinėmis sąlygomis siekėme dalinai imituoti klinikinėje praktikoje pacientams atliekamą RDA ir ištirti ne tik funkcinis ŠVANS pokyčius, bet ir atlikti histologinius tyrimus, kurie žmonėms yra negalimi.

Mūsų tyrimo metu gauti ŠRV parametrų pokyčiai per 12 mėn. sutapo su PLV izoliavimo metu stebimais laiko ir dažnių srities ŠRV parametrų pokyčiais. Skirtingų tyrimų duomenimis ŠRV pokyčiai išlieka nuo 3 iki 12 mėnesių [139, 140, 141]. Dauguma su žmonėmis atliktų klinikinių tyrimų ŠRV parametrus vertino gana dideliais laiko intervalais – kas 3, 6 ar net 12 mėnesių [14, 18, 142]. Mūsų tyrimo metu ŠRV parametrų dinamika buvo vertinama kas mėnesį ir tai leido tiksliau įvertinti pokyčių trukmę ir jų išraiškos dinamiką.

Tyrimo metu buvo pastebėtas staigus laiko srities parametrų vidurkių sumažėjimas po procedūros, kuris atitiko žmonėms po gydomųjų PLV izoliavimo procedūrų stebimus SDNN, RMSSD ir ŠRV TI pokyčius [143, 144, 145, 146, 147]. Kai kurių tyrimų metu pastebėta, kad tiems pacientams, kuriems po PLV izoliavimo procedūros PV atkryčiai nesikartoja, SDNN ir RMSSD sumažėja ryškiau ir ilgiau negrįžta į normos ribas, nei tiems pacientams, kuriems PV grįžta [143, 144, 146]. Taigi, PV atkryčiai gali būti susiję su RDA sąlygota ŠVANS struktūrų pažaidos apimtimi.

Vertinant ŠRV dažnio srities parametrų pokyčius po PLV izoliavimo procedūrų, mūsų tyrimo rezultatai taip pat panašūs į kitų tyrėjų rezultatus. Daugumoje atliktų tyrimų ADK ir ŽDK ženkliai sumažėjo iš karto po procedūros [148, 149, 150, 151, 152]. Tačiau ŽDK/ADK santykis įvairiuose tyrimuose kito skirtingai. Vienuose jis didėjo [153], kituose nesikeitė [149, 151], o trečiuose mažėjo [143]. Tokie nevienareikšmiai rezultatai verčia abejoti šio parametro nauda vertinti RDA poveikį širdies autonominei nervų sistemai, tačiau parametro pokyčiai gali priklausyti ir nuo procedūros metodikos.

Kai kuriuose su žmonėmis atliktuose tyrimuose norėta tiesiogiai įvertinti nervinių rezginių abliacijos poveikį ŠRV parametrams. Kangas ir bendraautorai po atliktos PLV izoliavimo procedūros suformavo papildomą kabliacijos liniją nuo viršutinės tuščiosios venos iki tarpprieširdinės pertvaros taip siekdamas papildomai paveikti ŠVANS. Ši metodika papildomai sumažino laiko ir dažnių srities parametrus, lyginant su pacientais, kuriems buvo atlikta tik PLV izoliavimo procedūra [154]. Pappone C. Pacientams atliko ir PLV izoliavimo procedūrą, ir papildomai išplėstinę KP nervinių rezginių abliaciją. Po papildomos procedūros toje pacientų grupėje buvo stebėtas ženklus ŽDK/ADK santykio sumažėjimas [155]. Keletoje tyrimų taip pat vertinta nervinių mazgų rezginių abliacijos įtaka paroksizminiam prieširdžių virpėjimui gydyti ir taip pat nustatytas ženklus ADK ir ŽDK sumažėjimas po procedūros [156, 157, 158]. Pokushalovas ir bendraautorai po atliktos izoliuotos nervinių mazgų abliacijos stebėjo ženklų ADK sumažėjimą ir ŽDK bei ŽDK/ADK santykio padidėjimą [18, 13].

Nors autonominės širdies inervacijos pokyčiai iš karto po KP abliacijos procedūros akivaizdūs, jie nėra ilgalaikiai. Mūsų tyrime RMSSD reikšmės sugrįžo į normos ribas po 2 mėn., ŠRVI TI – po 6 mėn., o ŽDK/ADK santykis – po 7 mėn. Be to, buvo stebėta SDNN, ADK bei ŽDK parametrų didėjimo tendencija, grįžtant parametrams iki operacinių verčių. Panašūs rezultatai stebėti ir pacientams po intervencinio PV gydymo. Calo L. ir bendraautorai stebėjo pacientus po nervinių rezginių abliacijos. Pacientams, kuriems PV nesikartojė, autonominės nervų sistemos tonuso pokyčiai išliko 6 mėn., o kitiems pokyčiai atsistatė greičiau, tarp 3 ir 6 mėn. [158]. Pappone C. ir Pokushalovas E. ŠRV pokyčius stebėjo atitinkamai 3 ir 6 mėnesius. Yamada ir Yamaguchi tyrimuose ŠRV parametrų pokyčiai išliko iki 12 mėn. po procedūros [149, 21, 141]. Po to parametrai nebesiskyrė nuo pradinių. Šie rezultatai sutampa ir su mūsų stebėtais ŠRV pokyčiais, o tai sudaro prielaidą manyti, kad egzistuoja kompensaciniai mechanizmai, ir ŠVANS funkcija gali atsistatyti bent dalinai. Mūsų tyrime širdies nervinių struktūrų regeneracijos požymiai nestebėti. Nervų skerspjuvniuose likusios išretėjusios gyvybingos skaidulos vertintos kaip aksonai ateinantys iš abliacijos nepaveiktų širdies vietų. Todėl galima manyti, kad dalinis ŠVANS aktyvumo atsistatymas gali būti susijęs su sveikų nervinių struktūrų gebėjimu iš dalies perimti sunaikintų struktūrų funkcijas. Tačiau negalima atmesti ir tikimybės, kad funkcija atsistato dėl nepakankamos abliacijos apimties ir dalinai pažeistos nervinės struktūros vėl atgauna savo funkcijas. Šis funkcijos atsistatymas daugelio autorių darbuose yra siejamas su PV atkryčiais [159, 27, 160].

Mūsų tyrimo metu siekėme įvertinti, kuri ANS dalis buvo labiau paveikta, atlikus epikardinę RDA KP užpakalinėje sienelėje. Imunohistocheminio ištyrimo metu stebėtas ženklus simpatinės ir parasimpatinės sistemos skaidulų tankio sumažėjimas po procedūros. Simpatinių skaidulų tankis statistškai patikimai ($p < 0,05$) sumažėjo nuo $52,7 \pm 2,4$ iki $37,9 \pm 2,6$, o parasimpatinių – nuo $0,999 \pm 0,11$ iki $0,53 \pm 0,11$. Tačiau akivaizdūs skaidulų kiekio skirtumai buvo pastebėti jau prieš procedūrą ir nebuvo galima daryti objektyvių išvadų. Literatūros duomenimis parasimpatinė širdies inervacija yra labai nehomogeniška ir jai priklausantys nervai telkiasi labai ribotose zonose, pavyzdžiui apie sinusinį ir atrioventrikulinį mazgus [44]. Dėl šios priežasties lyginti RDA poveikio intensyvumą pagal kiekybinius pokyčius ribotoje skilvelių srityje yra sudėtinga. Tačiau ilgalaikės ŠVANS funkcijos stebėsenos rezultatai leido daryti detalesnes išvadas. Dauguma ŠRV parametrų yra susiję su viena ar abiem autonominės nervų sistemos dalimis, pavyzdžiui SDNN, ŠRV TI, ir ŽDK yra įtakojama abiejų sistemų, o RMSSD, pNN50 ir ADK atspindi tik parasimpatinės nervų sistemos tonusą. ŽDK/ADK svarbus tuo, kad padeda įvertinti autonominės nervų sistemos

balansą. Vertinant ŠRV laiko srities parametrus, stebėtas ženklus SDNN, RMSSD ir ŠRV TI reikšmių sumažėjimas iš karto po RDA. RMSSD turi stipriausią ryšį su parasimpatine nervų sistema ir jau tyrimo pradžioje (praėjus 2 mėn.) sugrįžo į priešoperacines normas ribas. Tuo tarpu, su simpatine nervų sistema susiję parametrai ŠRV TI ir SDNN išliko pakitę kur kas ilgiau (7 ir 12 mėn.), todėl buvo padaryta išvada, kad simpatinė nervų sistema buvo paveikta ženkliai stipriau nei parasimpatinė. Vertinant ŠRV dažnių srities parametrus, nustatyta, kad poveikis į ADK ir ŽDK išliko viso tyrimo metu, todėl nebuvo galima teigti, kad kurios nors sistemos aktyvumas buvo didesnis. Tačiau ŽDK/ADK santykis viso tyrimo metu išliko žemesnis nei 1.0, kas rodo, kad vyravo parasimpatinė nervų sistema. Apibendrinant, galima padaryti išvadą, kad abiejų ŠRV sričių parametrai rodo didesnę poveikį adrenerginės sistemos skaiduloms. Tokius rezultatus galima paaiškinti jau anksčiau minėtu faktu, kad lyginant su simpatine, parasimpatinė inervacija širdyje yra labai nehomogeniška ir didžioji cholinerginių skaidulų dalis yra susitelkusi dešiniajame prieširdyje, o atlikus RDA KP buvo galima tikėtis tokių rezultatų.

5. IŠVADOS

1. Avies širdis yra anatomiškai ir fiziologiškai artima žmogui. Širdies susitraukimų dažnis ir kvėpavimo dažnis yra panašus į žmogaus, todėl ŠRV parametrų vertės yra panašios. Gyvūnai dėl savo dydžio bei ramaus būdo yra tinkami trumpalaikiams ir ilgalaikiams eksperimentiniams tyrimams.
2. Tyrimo metu stebėti ŠRV ir histologiniai nervų struktūros pokyčiai atsiradę po KP epikardinės RDA patvirtino, kad procedūra turi poveikį širdies vidinės autonominės nervų sistemos struktūroms ir jų funkcijai.
3. Net ir nedidelės apimties RDA širdyje paveikia ne tik artimas, bet ir atokiau nuo poveikio srities esančias nervines struktūras.
4. Širdies ritmo variabilumo parametrų (SDNN, ADK, ŽDK) sumažėjimas, išliekantis 12 mėnesių po KP epikardinės RDA ir lydymas histologinių nervų pokyčių, buvo statistiškai reikšmingas ($p < 0,05$) ir leidžia teigti, kad įvykę pokyčiai per šį laikotarpį yra tik dalinai grįžtami.
5. Tyrimo metu SDNN, ADK ir ŽDK turėjo tendenciją didėti ir anksti normalizavosi kiti ŠRV parametrai. Todėl galima manyti, kad egzistuoja kompensacinis mechanizmas, atkuriantis ŠVANS funkciją, po dalinio širdies nervinių struktūrų sunaikinimo. Tyrimo metu nebuvo nustatyta nervų regeneracijos požymių, todėl gali būti, kad žuvusių struktūrų funkciją iš dalies perima išlikę nepažeisti rezginiai. Šis kompensacijos mechanizmas priklauso nuo nervinių struktūrų pažaidos masto, o nepakankamas sunaikintų ŠVANS struktūrų kiekis gydomųjų procedūrų metu gali būti susijęs su PV atkryčiu.
6. KP epikardinės RDA metu labiausiai sumažėjo simpatinės nervų sistemos tonusas, tačiau histologiškai nebuvo galima išskirti didesnio poveikio kurios nors sistemos skaiduloms.

6. LITERATŪROS ŠARAŠAS

1. Armour JA, Murphy A, Yuan BX, Macdonald S, Hopkins DA. Gross and microscopic anatomy of the human intrinsic cardiac nervous system. *Anat Rec.* 1997 Feb; 247(2):289-98.
2. Levy M.N., Warner M.R. Parasympathetic effects on cardiac function. In: Armour, J.A., Ardell J.L. (Eds.) *Neurocardiology*. Oxford University Press, New York, pp. 53–76. 1994.
3. Puodziukynas A, et al. Radiofrequency catheter ablation of pulmonary vein roots results in axonal degeneration of distal epicardial nerves. *Auton Neurosci.* 2012 Apr 3(26), 167(1-2):61-5.
4. Hou Y. Ganglionated plexi modulate extrinsic cardiac autonomic nerve input: effects on sinus rate, atrioventricular conduction, refractoriness, and inducibility of atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol.* 2007 Jul 3; 50(1):61-8.
5. Neural mechanisms of paroxysmal atrial fibrillation and paroxysmal atrial tachycardia in ambulatory canines. Tan AY, Zhou S, Ogawa M, Song J, Chu M, Li H, et al. *Circulation* 2008,118, 916–925.
6. Lemola K, Chartier D, Yeh YH, Dubuc M, Cartier R, Armour A, et al. Pulmonary vein region ablation in experimental vagal atrial fibrillation: Role of pulmonary veins autonomic ganglia. *Circulation* 2008; 477, 117: 470 –7.
7. Massimo Zoni-Berisso, Fabrizio Lercari, Tiziana Carazza, Stefano Domenicucci. Epidemiology of atrial fibrillation: European perspective. *Clin Epidemiol.* 2014; 6: 213–220.
8. Thomas Wilke, Antje Groth, Sabrina Mueller, Matthias Pfannkuche, Frank Verheyen, Roland Linder, Ulf Maywald, Rupert Bauersachs, Gunter Breithardt. Incidence and prevalence of atrial fibrillation: an analysis based on 8.3 million patients. *Europace* (2013) 15, 486–493.
9. Gediminas Račkauskas, Vytautas Zabiela, Germanas Marinskis, Arvydas Baranauskas, Deimilė Balkutė, Justina Alunderytė, Aras Puodžiūkynas, Tomas Kazakevičius, Vilius Kviesulaitis, Audrius Aidietis. Evaluation of atrial fibrillation management and cardiovascular risk profile in atrial fibrillation patients: A cross-sectional survey. *Medicina (Kaunas)*, Volume 53, Issue 1, 2017, Pages 19-25.
10. Scherlag BJ, Po S. The intrinsic cardiac nervous system and atrial fibrillation. *Curr Opin Cardiol.* 2006 Jan; 21(1):51-4.
11. Lu Z. et al. Autonomic mechanism for initiation of rapid firing from atria and pulmonary veins: evidence by ablation of ganglionated plexi. *Cardiovasc Res.* 2009 Nov; 84(2):245-52.

12. Zhang Y, Wang Z, Zhang Y, Wang W, Wang J, Gao M, Hou Y. Efficacy of cardiac autonomic denervation for atrial fibrillation: a meta-analysis. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2012 Jun; 23(6):592-600.
13. Haissaguerre M., Jais P., Shah D. C. et al. Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. *N Engl J Med*. 1998; 339, 10,659-66.
14. Pokushalov E, Turov A, Shugayev P, Artyomenko S, Romanov A, Shirokova N. Catheter Ablation of Left Atrial Ganglionated Plexi for Atrial Fibrillation. *Asian Cardiovasc Thorac Ann* 2008;16:194–201.
15. Leonardo Calò et al. Catheter Ablation of Right Atrial Ganglionated Plexi in Patients With Vagal Paroxysmal Atrial Fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2012;5:22-31.
16. Kejing Wang et al. Denervation as a Common Mechanism Underlying Different Pulmonary Vein Isolation Strategies for Paroxysmal Atrial Fibrillation: Evidenced by Heart Rate Variability after Ablation. *The Scientific World Journal*, Volume 2013. doi.:10.1155/2013/569564.
17. Yong Zhang, Mei Gao, Jiangrong Wang and Yinglong Hou (2012). *Ganglionated Plexi Ablation for Atrial Fibrillation, Atrial Fibrillation - Basic Research and Clinical Applications*, Prof. Jong-Il Choi (Ed.),. ISBN: 978953-307-399-6.
18. Geoffrey E.J. et al. Heart Rate Variability and Procedural Outcome in Catheter Ablation for Atrial Fibrillation. *Ann Noninvasive Electrocardiol* 2014;19(1):23–33.
19. Pokushalov E, Romanov A, Artyomenko S, Turov A, Shirokova N, Katritsis DG. Left Atrial Ablation at the Anatomic Areas of Ganglionated Plexi for Paroxysmal Atrial Fibrillation. *s.l., Pacing Clin Electrophysiol*. Oct 2010;33(10):1231–1238.
20. Higuchi K et al. The effect of fat pad modification during ablation of atrial fibrillation: late gadolinium enhancement MRI analysis. *. Pacing Clin Electrophysiol*. 2013, 36(4):467-76.
21. Lim PB et al. Feasibility of multiple short, 40-s, intra-procedural ECG recordings to detect immediate changes in heart rate variability during catheter ablation for arrhythmias. *J Interv Card Electrophysiol*. 2011 Nov 32(2):163-71.
22. Yamaguchi Y, Kumagai K, Nakashima H, Saku K. Long-term effects of box isolation on sympathovagal balance in atrial fibrillation. *. Circ J*. 2010 Jun; 8, 74(6):1096-103.
23. Yamada T et al. The difference in autonomic denervation and its effect on atrial fibrillation recurrence between the standard segmental and circumferential pulmonary vein isolation techniques. *Europace*. 2009 Dec 11(12):1612-1619.

24. Yamada T et al. Vagal modification can be a valid predictor of late recurrence of paroxysmal atrial fibrillation independent of the pulmonary vein isolation technique. *Circ J.* 2009 Sep 73(9):1606-1611.
25. Yenn-Jiang Lin et al. A Prospective, Randomized Comparison of Modified Pulmonary Vein Isolation Versus Conventional Pulmonary Vein Isolation in Patients with Paroxysmal Atrial Fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2012 Nov; 23(11): 1155-62.
26. Oswald H et al. Cryoballoon pulmonary vein isolation temporarily modulates the intrinsic cardiac autonomic nervous system. *J Interv Card Electrophysiol.* 2010 Oct; 29(1):57-62, 21.
27. Ouyang F, Tilz R, Chun J et al. Long-term results of catheter ablation in paroxysmal atrial fibrillation: lessons from a 5-year follow-up. *Circulation.* Dec 7 2010; 122(23):2368–2377. 73.
28. Weerasooriya R, Khairy P, Litalien J et al. Catheter ablation for atrial fibrillation: are results maintained at 5 years of follow-up? . *J Am Coll Cardiol.* Jan 11 2011; 57(2):160–166. 74.
29. Callans D.J., Gerstenfeld E.P., Dixit S., et al. Efficacy of repeat pulmonary vein isolation procedures in patients with recurrent atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2004; 15: pp. 1050-1055.
30. Mainigi S.K., Sauer W.H., Cooper J.M., et al. Incidence and predictors of very late recurrence of atrial fibrillation after ablation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2007; 18: pp. 69-74.
31. Solheim E., Hoff P.I., Off M.K., Ohm O.J., and Chen J. Significance of late recurrence of atrial fibrillation during long-term follow-up after pulmonary vein isolation. *Pacing Clin Electrophysiol* 2007; 30: pp. 108-111.
32. Cheema A., Vasmareddy C.R., Dalal D., et al. Long-term single procedure efficacy of catheter ablation of atrial fibrillation. . *J Interv Card Electrophysiol* 2006; 15: pp. 141-143.
33. Scherlag BJ, Yamanashi W, Patel U, Lazzara R, Jackman WM. Autonomically induced conversion of pulmonary vein focal firing into atrial fibrillation. *s.l., J Am Coll Cardiol.* Jun 7 2005;45(11):1878–1886. 64.
34. Burashnikov A, Antzelevitch C. Reinduction of atrial fibrillation immediately after termination of the arrhythmia is mediated by late phase 3 early afterdepolarization-induced triggered activity. . *Circulation.* May 13 2003;107(18): 2355–2360. 68.
35. Platt M MR, Scherlag BJ, Yamanashi WS, Nakagawa H, Lazzara R, Jackman WM. Limiting the number and extent of radiofrequency applications to terminate atrial fibrillation and subsequently prevent its inducibility. . *Heart Rhythm.* 2004; 1(S). 69.

36. Feasibility study of endocardial mapping of ganglionated plexuses during catheter ablation of atrial fibrillation. Lemery R, Birnie D, Tang AS, Green M, Gollob M. *Heart Rhythm*. Apr 2006;3(4):387–396. 72.
37. Katriotis DG, Giazitzoglou E, Zografos T, Pokushalov E, Po SS, Camm AJ. Rapid pulmonary vein isolation combined with autonomic ganglia modification: a randomized study. *Heart Rhythm*. May 2011; 8(5):672–678.
38. Nakagawa H SB, Patterson E, Ikeda A, Lockwood D, Jackman WM. Pathophysiologic basis of autonomic ganglionated plexi ablation in patients with atrial fibrillation. *Heart Rhythm*. 2009;6:S26–S34. 77.
39. Puodziukynas A, Kazakevicius T, Vaitkevicius R, Rysevaite K, Juku-bauskas M, Saburkina I, Sladkeviciute-Dirzinauskiene V, Dirzinauskas E, Zabiela V, Sileikis V, Plisiene J, Pauziene N, Zaliunas R, Jalife J, Pauza DH. Radiofrequency catheter ablation of pulmonary vein roots results in axonal degeneration of distal epicardial nerves. *Autonomic Neuroscience*. 2012 Apr 3;167(1–2):61–5.
40. Arora RC, Waldmann M, Hopkins DA, Armour JA. Porcine intrinsic cardiac ganglia. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2003 ir 271: 249–258.
41. K. Marron, J. Wharton, M.N. Sheppard, D. Fagan, D. Royston, D.M. Kuhn, M.R. de Leval, B.F. Whitehead, R.H. Anderson, J.M. Polak. Distribution, Morphology, and Neurochemistry of Endocardial and Epicardial Nerve Terminal Arborizations in the Human Heart. *Circulation*. 1995;92:2343-2351.
42. Armour, JA. Potential clinical relevance of the 'little brain' on the mammalian heart. *Exp Physiol*. 2008; 93(2):165-76.
43. Kawashima T. The autonomic nervous system of the human heart with special reference to its origin, course, and peripheral distribution. *Anat Embryol (Berl)*. 2005 Jul; 209(6):425-38.
44. Armour JA. Cardiac neuronal hierarchy in health and disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004, 287(2):R262-71.
45. Pauza DH, Skripka V, Pauziene N, Stropus R. Morphology, distribution, and variability of the epicardial neural ganglionated sub plexuses in the human heart. *Anat Rec*. Aug 1 2000;259(4):353–382.
46. Janes RD, Brandys JC, Hopkins DA, Johnstone DE, Murphy DA, Armour JA. Anatomy of human extrinsic cardiac nerves and ganglia. *Am J Cardiol*. 1986 Feb 1;57(4):299-309.
47. Pauza DH, Pauziene N, Tamasauskas KA, Stropus R. Hilum of the heart. *Anat Rec*. 1997 Jul;248(3):322-4.

48. Berne RM, Levy MN. Cardiovascular physiology. 8th ed. Mosby: St. Louis; 2001.
49. Vaseghi M, Shivkumar K. The Role of the Autonomic Nervous System in Sudden Cardiac Death. *Prog Cardiovasc Dis.* 2008 ; 50(6): 404–419. doi:10.1016/j.pcad.2008.01.003.
50. Gatti PJ, Johnson JA, McKenzie J, Lauenstein JM, Gray A, Massari VJ. Vagal control of left ventricular contractility is selectively mediated by a cranioventricular intracardiac ganglion in the cat. *J Auton Nerv Syst* 1997;66:138–144.
51. Chiou CW, Eble JN, Zipes DP. Efferent vagal innervation of the canine atria and sinus and atrioventricular nodes. . The third fat pad. *Circulation* 1997;95:2573–2584.
52. Nguyen BL, Fishbein MC, Chen LS, Chen PS, Masroor S. Histopathological substrate for chronic atrial fibrillation in humans. . *Heart Rhythm.* 2009;6:454–460.
53. Jayachandran JV, Sih HJ, Winkle W, Zipes DP, Hutchins GD, Olgin JE. Atrial fibrillation produced by prolonged rapid atrial pacing is associated with heterogeneous changes in atrial sympathetic innervation. *Circulation.* 2000;101:1185–1191.
54. Chang CM, Wu TJ, Zhou S, Doshi RN, Lee MH, Ohara T, Fishbein MC, Karagueuzian HS, Chen PS, Chen LS. Nerve sprouting and sympathetic hyperinnervation in a canine model of atrial fibrillation produced by prolonged right atrial pacing. *Circulation.* 2001;103:22–25.
55. Ng J, Villuendas R, Cokic I, Schliamser JE, Gordon D, Koduri H, Benefield B, Simon J, Murthy SN, Lomasney JW, Wasserstrom JA, Goldberger JJ, Aistrup GL, Arora R. Autonomic remodeling in the left atrium and pulmonary veins in heart failure: creation of a dynamic substrate for atrial fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2011;4: 388–396.
56. Miyauchi Y, Zhou S, Miyauchi M, Omichi C, Okuyama Y, Hamabe A, Hayashi H, Mandel WJ, Fishbein MC, Chen LS, Chen PS, Karagueuzian HS. Induction of atrial sympathetic nerve sprouting and increased vulnerability to atrial fibrillation by chronic left ventricular myocardial infarction. *Circulation.* 2001;104:II–77.
57. Vracko R, Thorning D, Frederickson RG. Fate of nerve fibers in necrotic, healing, and healed rat myocardium. *Lab Invest.* 1990;63: 490–501.
58. Cao JM, Chen LS, KenKnight BH, Ohara T, Lee MH, Tsai J, Lai WW, Karagueuzian HS, Wolf PL, Fishbein MC, Chen PS. Nerve sprouting and sudden cardiac death. *Circ Res.* 2000;86:816–821.

59. Swissa M, Zhou S, Gonzalez-Gomez I, Chang CM, Lai AC, Cates AW, Fishbein MC, Karagueuzian HS, Chen PS, Chen LS. Long-term subthreshold electrical stimulation of the left stellate ganglion and a canine model of sudden cardiac death. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43: 858–864.
60. Zhou S, Chen LS, Miyauchi Y, Miyauchi M, Kar S, Kangavari S, Fishbein MC, Sharifi B, Chen PS. Mechanisms of cardiac nerve sprouting after myocardial infarction in dogs. *Circ Res.* 2004;95:76–83.
61. Zhou S, Cao JM, Tebb ZD,. Modulation of QT interval by cardiac sympathetic nerve sprouting and the mechanisms of ventricular arrhythmia in a canine model of sudden cardiac death. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2001;12:1068–1073.
62. Fei L, Malik M. Heart rate variability. In: Aubert AE, Ector E, Stroobandt R. editors. *Cardiac pacing and electrophysiology.* s.l. : Kluwer Academic Publisher; 1994. p. 49-72.
63. Van Ravenswaaij-Arts CMA, Kollé L, Hopman J, et al. Heart rate variability. *Annals of Internal Medicine* 1993; 118: 436-447.
64. Lombardi F, Mortara A. Heart rate variability and cardiac failure. *Heart.* 1998 Sep;80(3):213-4. m.
65. Malik M. Heart rate variability. *Curr Opin Cardiol.* 1998 Jan;13(1):36-44 m.
66. Fred Shaffer, J. P. Ginsberg. An Overview of Heart Rate variability Metrics and Norms. *Frontiers in Public Health.* September 2017, 5:258. DOI: 10.3389/fpubh.2017.00258.
67. Lord SW, Clayton RH, Dark HJ. Sympathetic reinnervation and heart rate variability after cardiac transplantation. . *Heart* 1997; 77: 532-538.
68. Juan Idiaquez, Eduardo Benarroch, Martin Nogues. *Anatomy, Physiology, and Pharmacology of the Autonomic Nervous System (ANS) in Evaluation and Management of Autonomic Disorders.* Springer International Publishing, 2018, pp 3-18.
69. Anthony M Dart, Xiao-Jun Du, Bronwyn A Kingwell. Gender, sex hormones and autonomic nervous control of the cardiovascular system. *Cardiovascular Research*, Volume 53, Issue 3, 15 February 2002, Pages 678–687 m.
70. Braunwald E, Zipes DP, Libby P. *Heart Disease: A textbook of Cardiovascular Medicine*, 6-th edition. W. B. Saunders Company 2001; p. 517-518.
71. Braunwald E, Zipes DP, Libby P. *Heart Disease: A textbook of Cardiovascular Medicine*, 5-th edition. W. B. Saunders Company; 1992.

72. Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. Task Force of The European Society of Cardiology and The North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Eur Heart J* 1996; 17: 354-381 m.
73. Goldberger JJ, Challapalli S, Tung R. Relationship of heart rate variability to parasympathetic effect. *Circulation* 2001; 103: 1977-83.
74. Potter EK. Effects of neuropeptides on the vagal neuroeffector junction. In: Levy MN, Shwartz PJ. editors. *Vagal control of the experimental basis and clinical implications*. NY: Futura publishing company, Inc; 1994; 18: 289-303.
75. Zabiela, Vytautas. Širdies ritmo variabilumas gydant amlodipinu ir lacidipinu sergančiuosius stabiliąja krūtinės angina ir arterine hipertenzija, esant izoliuotai kairiojo skilvelio diastolinei disfunkcijai. *Daktaro disertacija*; Kaunas, 2002.
76. Makikallio TH, Tulppo MP, Seppanen T. Analysis of nonlinear heart rate dynamics in cardiac arrhythmias. *Herzschr Electrophys* 2000; 11: 131-38.
77. Huikuri HV, Makikallio T, Airaksinen J. Measurement of heart rate variability: a clinical tool or a research toy. *JACC* 1999; 34: 1878-1883.
78. Rosangela Akemi, Hoshi Carlos, Marcelo Pastre, Luiz Carlos, Marques Vanderlei, Moacir Fernandes Godoy. Poincaré plot indexes of heart rate variability: Relationships with other nonlinear variables. *Autonomic Neuroscience Volume 177, Issue 2, October 2013, Pages 271-274. m.*
79. Stein PK, Kleiger RE. Insights from the study of heart rate variability. *Annu Rev Med* 1999; 50: 249-61.
80. Stein PK, Rich MW, Rottman JN. Stability of index of heart rate variability in patients with congestive heart failure. *Am Heart J* 1995; 129: 975-81.
81. Kochiadakis GE, Orfanakis AE, Rombola AT,. Reproducibility of time-domain indexes of heart rate variability in patients with vasovagal syncope. *Am J Cardiol* 1997; 79: 160-65.
82. Ziegler D, Piolot R, et al. Normal ranges and reproducibility of statistical, geometric, frequency domain, and non-linear measures of 24-hour heart rate variability. *Horm Metab Res* 1999;31:672-9. m.
83. Pardo Y, Noel B, Paul-Labrador M. Heart rate variability reproducibility and stability using commercially available equipment in coronary artery disease with daily life myocardial ischaemia. *Am J Cardiol* 1996; 78: 866-70.

84. Bigger TJ, Fleiss JL, Rolnitzky LM. Stability over time of heart period variability in patients with previous myocardial infarction and ventricular arrhythmias. *Am J Cardiol* 1992; 69: 718-23.
85. Kristal-Boneh E, Raifel M, Fromm P. Heart rate variability in health and disease. . *Scand J Work Environ Health* 1995; 21: 85-95.
86. Bar-Haim Y, Marshall PJ. Developmental Changes in Heart Period and High-Frequency Heart Period Variability from 4 Months to 4 Years of Age. . *Dev Psychobiol* 2000; 37: 44-56.
87. Yeragani VK, Sobolewski E, Kay J. Effect of age on long-term heart rate variability. . *Cardiovascular Research* 1997; 35: 35-42.
88. Stein PK, Kleiger RE, Rottman JN. Differing effects of age on heart rate variability in men and woman. *Am J Cardiol* 1997; 80: 302-5.
89. Huikuri HV, Pikkujamsa S, Airaksinen J. Sex-related differences in autonomic modulation of heart rate in middle-aged subjects. . *Circulation* 1996; 94: 122-5.
90. Castelanos A, Moleiro F, Chakko S.. Heart rate variability in inappropriate sinus tachycardia. . *Am J Cardiol* 1998; 82: 531-4.
91. Levy WC, Cerqueira MD, Harp GD. Effect of endurance exercise training on heart rate variability at rest in healthy young and older men. . *Am J Cardiol* 1998; 82: 1236-41.
92. Žemaitytė D. Apie širdies ritmo autonominio reguliavimo tyrimus Lietuvoje. *Medicina* 2001; 37(12): 1391-8.
93. Levy WC, Cerqueira MD, Harp GD. Effect of endurance exercise training on heart rate variability at rest in healthy young and older men. . *Am J Cardiol* 1998; 82: 1236-41.
94. Stahle A, Nordlander R, Bergfeldt L. Aerobic group training improves exercise capacity and heart rate variability in elderly patients with a recent coronary event. . *Eur Heart J* 1999; 20: 1638-46.
95. Rossinen J, Viitasalo M. Effects of acute alcohol ingestion on heart rate variability in patients with documented coronary artery disease and stable angina pectoris. *Am J Cardiol* 1997; 79: 477-91.
96. Hoff HE, Geddes LA, McCrady JD. The Maintenance of Experimental Atrial Fibrillation by Cholinergic Factors. *Cardiovasc Res Cent Bull.* Apr–Jun 1965;49: 117–129.
97. Sharifov OF, Fedorov VV, Beloshapko GG, Glukhov AV, Yushmanova AV, Rosenshtraukh LV. Roles of adrenergic and cholinergic stimulation in spontaneous atrial fibrillation in dogs. . *Journal of the American College of Cardiology* 43:3 2004 Feb 4 pg 483-90.
98. Patterson E, Po SS, Scherlag BJ, Lazzara R. Triggered firing in pulmonary veins initiated by in vitro autonomic nerve stimulation. . *Heart Rhythm.* Jun 2005;2(6):624–631.

99. Po SS, Scherlag BJ, Yamanashi WS, Edwards J, Zhou J, Wu R, Geng N, Lazzara R, Jackman WM. Experimental model for paroxysmal atrial fibrillation arising at the pulmonary vein-atrial junctions. . *Heart Rhythm*. Feb 2006;3(2):201–208.
100. Patterson E, Lazzara R, Szabo B, Liu H, Tang D, Li YH, Scherlag BJ, Po SS. Sodium-calcium exchange initiated by the Ca²⁺ transient: an arrhythmia trigger within pulmonary veins. *J Am Coll Cardiol*. Mar 21 2006;47(6):1196–1206.
101. Patterson E, Jackman WM, Beckman KJ, Lazzara R, Lockwood D, Scherlag BJ, Wu R, Po S. Spontaneous pulmonary vein firing in man: relationship to tachycardia-pause early afterdepolarizations and triggered arrhythmia in canine pulmonary veins in vitro. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2007 Sep;18(10):1067-75. Epub 2007 Jul 26.
102. Mark J. Shen, Douglas P. Zipes. Role of the Autonomic Nervous System in Modulating. *Circ Res*. 2014;114:1004-1021 m.
103. Ogawa M, Zhou S, Tan AY, Song J, Gholmieh G, Fishbein MC, Luo H, Siegel RJ, Karagueuzian HS, Chen LS, Lin SF, Chen PS. Left stellate ganglion and vagal nerve activity and cardiac arrhythmias in ambulatory dogs with pacing-induced congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50:335–343. .
104. Tan AY, Zhou S, Ogawa M, Song J, Chu M, Li H, Fishbein MC, Lin SF, Chen LS, Chen PS. Neural mechanisms of paroxysmal atrial fibrillation and paroxysmal atrial tachycardia in ambulatory canines. . *Circulation*. 2008;118:916–925.
105. Sharifov OF, Fedorov VV, Beloshapko GG, Glukhov AV, Yushmanova AV, Rosenshtraukh LV. Roles of adrenergic and cholinergic stimulation in spontaneous atrial fibrillation in dogs. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43:483–490.
106. Shen MJ, Choi EK, Tan AY, Han S, Shinohara T, Maruyama M, Chen LS, Shen C, Hwang C, Lin SF, Chen PS. Patterns of baseline autonomic nerve activity and the development of pacing-induced sustained atrial fibrillation. *Heart Rhythm*. 2011;8:583–589.
107. DiFrancesco D. The role of the funny current in pacemaker activity. *Circ Res*. 2010;106:434–446. m.
108. Sato R, Koumi S. Modulation of the inwardly rectifying K⁺ channel in isolated human atrial myocytes by alpha 1-adrenergic stimulation. *J Membr Biol*. 1995;148:185–191.
109. Maruyama M, Lin SF, Xie Y, Chua SK, Joung B, Han S, Shinohara T, Shen MJ, Qu Z, Weiss JN, Chen PS. Genesis of phase 3 early depolarizations and triggered activity in acquired long-QT syndrome. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2011;4:103–111.

110. Burashnikov A, Antzelevitch C. Reinduction of atrial fibrillation immediately after termination of the arrhythmia is mediated by late phase 3 early afterdepolarization-induced triggered activity. *Circulation*. 2003;107:2355–2360.
111. Choi EK, Chang PC, Lee YS, Lin SF, Zhu W, Maruyama M, Fishbein MC, Chen Z, Rubart-von der Lohe M, Field LJ, Chen PS. Triggered firing and atrial fibrillation in transgenic mice with selective atrial fibrosis induced by overexpression of TGF- β 1. *Circ J*. 2012;76:1354–1362.
112. Marx S, Kurokawa J, Reiken S. Requirement of a macromolecular signaling complex for beta adrenergic receptor modulation of the KCNQ1-KCNE1 potassium channel. *Science* 2002;295:496–499.
113. Liu L, Nattel S. Differing sympathetic and vagal effects on atrial fibrillation in dogs: role of refractoriness heterogeneity. *Am J Physiol*. 1997;273:H805–H816.
114. Lymeropoulos A, Rengo G, Koch WJ. Adrenergic nervous system in heart failure: pathophysiology and therapy. *Circ Res*. 2013;113:739–753.
115. Andrade J, Khairy P, Dobrev D, Nattel S. The clinical profile and pathophysiology of atrial fibrillation: relationships among clinical features, epidemiology, and mechanisms. *Circ Res*. 2014;114:1453–1468.
116. L. Ho, R. A. Field, W. C. Russell, M. L. Riley, S. K. Ercanbrack, F. L. Williams. Influence of Gender, Breed and Age on Maturity Characteristics of Sheep. *Journal of Animal Science*, 1989, 67(9):2460–2470.
117. David R Paull, Alison H Small, Caroline Lee, Pierre Palladin, Ian G Colditz. Evaluating a novel analgesic strategy for ring castration of ram lambs. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 2012, 39, 539–549.
118. Zakarevičiūtė, Brigita. Lietuvos ir Vengrijos smulkių gyvūnų klinikų triušių kelių anestezijos schemų veiksmingumo vertinimas. Kaunas, 2013.
119. Euthanasia Reference Manual. The Humane Society of the United States. Second edition, 2013.
120. Inga Saburkina, Kristina Rysevaite, Neringa Pauziene, Karl Mischke, Patrick Schauerte, José Jalife, Dainius H. Pauza. The Epicardial Neural Ganglionated Plexus of the Ovine Heart: Anatomical Basis for Experimental Cardiac Electrophysiology and Nerve Protective Cardiac Surgery. *Heart Rhythm*. 2010 July ; 7(7): 942–950. m.
121. Ehbart von Borel et al. Heart rate variability as a measure of autonomic regulation of cardiac activity for assessing stress and welfare in

- farm animals – A review. *Physiology and Behavior* (2007) 92;293-316. m.
122. P. Scheer, P. Svoboda, M. Sepsi, K. Janeckova, J. Doubek. The Electrocardiographic Holter Monitoring in Experimental Veterinary Practice. *Physiol. Res.* 59 (Suppl. 1): S59-S64, 2010.
 123. Timm Konold, Gemma E Bone. Heart rate variability analysis in sheep affected by transmissible spongiform encephalopathies. *BMC Research Notes* 2011, 4:539.
 124. D. A. Frese et al. Twenty-four hour Holter monitoring in finishing cattle housed outdoors. *Journal of Veterinary Cardiology* (2017) 19; 153-159. m.
 125. Petrie Jean-Paul. Practical Application of Holter Monitoring in Dogs and Cats. . *Clinical Techniques in Small Animal Practice* (2005) 20; 173-181.
 126. Missing RRI interpolation for HRV analysis using locally-weighted partial least squares regression. Kamata K, Fujiwara K, Yamakawa T, Kano M. 2016 Aug; 2016:2386-2389. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* .
 127. Ellis RJ, Zhu B, Koenig J, Thayer JF, Wang Y. A careful look at ECG sampling frequency and R-peak interpolation on short-term measures of heart rate variability. *Physiol Meas.* 2015 Sep;36(9):1827-52. m.
 128. Liping Li, Changchun Liu, Ke Li, Chengyu Liu. Comparison of Detrending Methods in Spectral Analysis of Heart Rate Variability. *International Journal of Biomedical and Biological Engineering.* 2011, 5(9): 399-402 m.
 129. Eduardo Miranda Dantas, Marcela Lima Sant'Anna, Rodrigo Varejao Andre, Christine Pereira Goncalves, Elis Aguiar Morra, Marcelo Perim Baldo, Sergio Lamego Rodrigues, Jose Geraldo Mill. Spectral analysis of heart rate variability with the autoregressive method:. *Computers in Biology and Medicine* 42 (2012) 164–170 m.
 130. Mohr E, Langbein J, Nurnberg G. Heart rate variability: a noninvasive approach to measure stress in calves and cows. . *Physiol Behav.* 2002 Feb 1-15;75(1-2):251-9. m.
 131. Hagen K, Langbein J, Schmied C, Lexer D, Waiblinger S. Heart rate variability in dairy cows-influences of breed and milking system. . *Physiol Behav.* 2005 Jun 2;85(2):195-204. m.
 132. G. Despres, A. Boissy, L. Desire, Le Neindre, P. Le Neindre, I. Veissier. Validation of the Measure of Sympatho-vagal Effect in Lambs Through Autonomic Blockades and Heart Rate Variability Indexes. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 2003; 2(11): 615-619 m.

133. Timm Konold, Gemma E Bone. Heart rate variability analysis in sheep affected by transmissible spongiform encephalopathies. *BMC Research Notes* 2011, 4:539.
134. Nunan D., Sandercock G. R. H., Brodie D. A. A Quantitative Systematic Review of Normal Values for Short-Term Heart Rate Variability in Healthy Adults. *PACE* 2010; 33:1407–141.
135. Mietus J E, Peng C-K, Henry I, Goldsmith R L, Goldberger A L. The pNNx files: re-examining a widely used heart rate variability measure. *Heart* 2002;88:378–380.
136. Shaffer F., Ginsberg J. P. An Overview of Heart Rate variability Metrics and Norms. *Front. Public Health*, 28 September 2017. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2017.00258> .
137. Hiromitsu Kobayashi, Keita Ishibashi, Hiroki Noguchi. Heart Rate Variability; An Index for Monitoring and Analyzing Human Autonomic Activities. *Appl Human Sci*, 1999, 18(2): 53-59.
138. P. Grossman. Comment on heart rate variability and cardiac vagal tone in psychophysiological research – recommendations for experiment planning, data analysis, and data reporting. *Front Psychol* (2017) 8:213. doi:10.3389/fpsyg.2017.00213 m.
139. Bernardi L, Valle F, Coco M, Calciati A, Sleight P. Physical activity influences heart rate variability and very-low-frequency components in Holter electrocardiograms. *Cardiovasc Res* (1996) 32:234–7 .
140. Akselrod S, Gordon D, Ubel FA, Shannon DC, Barger AC, Cohen RJ. Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat to-beat cardiovascular control. *Science* (1981) 213:220–2.
141. Taylor JA, Carr DL, Myers CW, Eckberg DL. Mechanisms underlying very-low-frequency RR-interval oscillations in humans. *Circulation* (1998) 98:547–55. doi:10.1161/01.CIR.98.6.547 .
142. Shaffer F, McCraty R, Zerr CL. A healthy heart is not a metronome: an integrative review of the heart’s anatomy and heart rate variability. *Front Psychol* (2014) 5:1040.
143. Désiré L, Veissier I, Després G, Boissy A. On the Way to Assess Emotions in Animals: Do Lambs (*Ovis aries*) Evaluate an Event Through Its Suddenness, Novelty, or Unpredictability? *Journal of Comparative Psychology*, Vol 118(4), Dec 2004, 363-374.
144. Yoshida N et al. Vagal modification can also help prevent late recurrence of atrial fibrillation after segmental pulmonary vein isolation. *Circ J*. 2009 Apr; 73(4):632-8.
145. Yenn-Jiang Lin et al. A Prospective, Randomized Comparison of Modified Pulmonary Vein Isolation Versus Conventional Pulmonary

- Vein Isolation in Patients with Paroxysmal Atrial Fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2012 Nov; 23(11): 1155-62.
146. Oswald H et al. Cryoballoon pulmonary vein isolation temporarily modulates the intrinsic cardiac autonomic nervous system. *J Interv Card Electrophysiol*. 2010 Oct; 29(1): 57-62.
 147. Lim PB et al. Feasibility of multiple short, 40-s, intra-procedural ECG recordings to detect immediate changes in heart rate variability during catheter ablation for arrhythmias. *J Interv Card Electrophysiol*. 2011 Nov;32(2):163-71. m.
 148. Seaborn GE, Todd K, Michael KA, Baranchuk A, Abdollah H, Simpson CS, Akl SG, Redfearn DP. Heart rate variability and procedural outcome in catheter ablation for atrial fibrillation. . *Ann Noninvasive Electrocardiol*. 2014 Jan;19(1):23–33.
 149. Wang K, Chang D, Chu Z, Yang Y, Gao L, Zhang S, Xia Y, Dong Y, Yin X, Cong P, Jia J. Denervation as a common mechanism underlying different pulmonary vein isolation strategies for paroxysmal atrial fibrillation: evidenced by heart rate variability after ablation. *The Scientific World Journal*. 2013 Aug 24;2013:559–564.
 150. Verma A, Champagne J, Sapp J, Essebag V, Novak P, Skanes A, Morillo CA, Khaykin Y, Birnie D. Discerning the incidence of symptomatic and asymptomatic episodes of atrial fibrillation before and after catheter ablation (DISCERN AF): a prospective, multicenter study. *JAMA Intern Med*. 2013 Jan 28;173(2):149–56.
 151. Lin YJ, Chang SL, Lo LW, Hu YF, Suenari K, Li CH, Chao TF, Chung FP, Liao JN, Hartono B, Tso HW, Tsao HM, Huang JL, Kao T, Chen SA. A prospective, randomized comparison of modified pulmonary vein isolation versus conventional pulmonary vein isolation in patients with paroxysmal atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2012 Nov;23(11):1155-62. m.
 152. Higuchi K, Akkaya M, Koopmann M, Blauer JJ, Burgon NS, Damal K, Ranjan R, Kholmovski E, Macleod RS, Marrouche NF. The effect of fat pad modification during ablation of atrial fibrillation: late gadolinium enhancement MRI analysis. *Pacing Clin Electrophysiol*. 2013 Apr;36(4):467–76.
 153. Yoshida N, Yamada T, Murakami Y, Okada T, Ninomiya Y, Toyama J, Yoshida Y, Tsuboi N, Muto M, Inden Y, Hirai M, Murohara T. Vagal modification can also help prevent late recurrence of atrial fibrillation after segmental pulmonary vein isolation. *Circ J*. 2009 Apr;73(4):632–8.
 154. Yamada T, Yoshida N, Murakami Y, Okada T, Yoshida Y, Muto M, Inden Y, Murohara T. The difference in autonomic denervation and its

- effect on atrial fibrillation recurrence between the standard segmental and circumferential pulmonary vein isolation techniques. *Europace*. 2009 Dec;11(12):1612–9.
155. De Ferrari GM, Crijns HJ, Borggrefe M, Milasinovic G, Smid J, Zabel M, Gavazzi A, Sanzo A, Dennert R, Kuschyk J, Raspopovic S, Klein H, Swedberg K, Schwartz PJ. CardioFit Multicenter Trial Investigators. Chronic vagus nerve stimulation: a new and promising therapeutic approach for chronic heart failure. *Eur Heart J*. 2011;32:847–855.
 156. Kang KW, Kim TH, Park J, Uhm JS, Joung B, Hwang C, Lee MH, Pak HN. Long-term changes in heart rate variability after radiofrequency catheter ablation for atrial fibrillation: 1-year follow-up study with irrigation tip catheter. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2014 Jul; 25(7):693-700.
 157. Yamada T, Yoshida N, Murakami Y, Okada T, Yoshida Y, Muto M, Inden Y, Murohara T. Vagal modification can be a valid predictor of late recurrence of paroxysmal atrial fibrillation independent of the pulmonary vein isolation technique. *Circ J*. 2009 Sep;73(9):1606–11.
 158. Chen J, Wasmund S, Hamdan M. Back to the future: the role of the autonomic nervous system in atrial fibrillation. *PACE*. 2006; 29(4): 413–21.
 159. Kang KW, Pak HN, Park J, Park JG, Uhm JS, Joung B, Lee MH, Hwang C. Additional linear ablation from the superior vena cava to right atrial septum after pulmonary vein isolation improves the clinical outcome in patients with paroxysmal atrial fibrillation: prospective randomized study. *Europace*. 2014 Dec;16(12):1738–45.
 160. Carlo Pappone, Vincenzo Santinelli, Francesco Manguso, Gabriele Vicedomini. Pulmonary vein denervation enhances long-term benefit after circumferential ablation for paroxysmal atrial fibrillation. *Circulation*. 2004; 109:327–334.
 161. Sakamoto S, Fujii M, Watanabe Y, Hiromoto A, Ishii Y, Morota T, Nitta T. Exploration of theoretical ganglionated plexi ablation technique in atrial fibrillation surgery. *Ann Thorac Surg*. 2014 Nov;98(5): 1598–604.
 162. Malcolm-Lawes LC, Lim PB, Wright I, Kojodjojo P, Koa-Wing M, Jamil-Copley S, Dehbi HM, Francis DP, Davies DW, Peters NS, Kanagaratnam P. Characterization of the left atrial neural network and its impact on autonomic modification procedures. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2013 Jun;6(3):632–40.
 163. Calò L, Rebecchi M, Sciarra L, De Luca L, Fagagnini A, Zuccaro LM, Pitrone P, Dottori S, Porfirio M, de Ruvo E, Lioy E. Catheter ablation

- of right atrial ganglionated plexi in patients with vagal paroxysmal atrial fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2012 Feb;5(1):22–31.
164. Ouyang F, Tilz R, Chun J et al. Long-term results of catheter ablation in paroxysmal atrial fibrillation: lessons from a 5-year follow-up. *Circulation.* Dec 7 2010; 122(23):2368–2377.
165. Weerasooriya R, Khairy P, Litalien J et al. Catheter ablation for atrial fibrillation: are results maintained at 5 years of follow-up? *J Am Coll Cardiol.* Jan 11 2011; 57(2):160–166.

PUBLIKACIJŲ MOKSLINIO DARBO TEMA SĄRAŠAS

Straipsnių, kuriuose buvo paskelbti disertacijos tyrimų rezultatai, sąrašas:

1. Kviesulaitis, Vilius; Puodžiukynas, Aras; Pauža, Dainius Haroldas; Zabiela, Vytautas; Kazakevičius, Tomas; Vaitkevičius, Raimundas; Diržinauskas, Evaldas; Semaška, Vytenis; Strazdas, Antanas; Unikaitė, Rūta; Rysevaitė-Kyguolienė, Kristina; Paužienė, Neringa; Žaliūnas, Remigijus. Heart rate variability after radiofrequency ablation of epicardial ganglionated plexuses on the ovine left atrium. BMC cardiovascular disorders. 2017, vol. 17, no. 1, p. 1-8.
2. Račkauskas, Gediminas; Zabiela, Vytautas; Marinskis, Germanas; Baranauskas, Arvydas; Balkutė, Deimilė; Alunderytė, Justina; Puodžiukynas, Aras; Kazakevičius, Tomas; Kviesulaitis, Vilius; Aidietis, Audrius. Evaluation of atrial fibrillation management and cardiovascular risk profile in atrial fibrillation patients: A cross-sectional survey. Medicina. 2017, vol. 53, no. 1, p. 19-25.
3. Kviesulaitis, Vilius; Kazakevičius, Tomas; Zabiela, Vytautas; Puodžiukynas, Aras. An approach to 24-hour electrocardiogram monitoring in sheep experimental model. Journal of vibroengineering: JVE. Kaunas: JVE international Ltd. 2018, vol. 00, p 00. Spaudoje. Priedas: redakcijos patvirtinimas.

Mokslinė konferencija, kurioje buvo paskelbti disertacijos tyrimų rezultatai:

Račkauskas, Gediminas; Zabiela, Vytautas; Marinskis, Germanas; Baranauskas, Arvydas; Balkutė, Deimilė; Alunderytė, Justina; Puodžiukynas, Aras; Kazakevičius, Tomas; Kviesulaitis, Vilius; Aidietis, Audrius. Evaluation of atrial fibrillation management and cardiovascular risk profile in atrial fibrillation patients: a cross-sectional survey: Abstracts from 26th Nordic-Baltic Congress of Cardiology in Vilnius, Lithuania, June 1-3, 2017. ISSN 1648-9233. 2017, vol. 53, suppl. 1, p. 51-52, no abstr. 40.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Heart rate variability after radiofrequency ablation of epicardial ganglionated plexuses on the ovine left atrium

Vilius Kviesulaitis^{*}, Aras Puodziukynas, Dainius Haroldas Pauza, Vytautas Zabiela, Tomas Kazakevicius, Raimundas Vaitkevicius, Evaldas Diržinauskas, Vytenis Semaška, Antanas Strazdas, Ruta Unikaite, Kristina Rysevaite, Neringa Pauziene and Remigijus Zaliunas

Abstract

Background: Ganglionated plexuses (GP) are terminal parts of cardiac autonomous nervous system (ANS). Radiofrequency ablation (RFA) for atrial fibrillation (AF) possibly affects GP. Changes in heart rate variability (HRV) after RFA can reflect ANS modulation.

Methods: Epicardial RFA of GP on the left atrium (LA) was performed under the general anesthesia in 15 mature Romanov sheep. HRV was used to assess the alterations in autonomic regulation of the heart. A 24-hour ECG monitoring was performed before the ablation, 2 days after it and at each of the 12 following months. Ablation sites were evaluated histologically.

Results: There was an instant change in HRV parameters after the ablation. A standard deviation of all intervals between normal QRS (SDNN), a square root of the mean of the squared differences between successive normal QRS intervals (RMSSD) along with HRV triangular index (TI), low frequency (LF) power and high frequency (HF) power decreased, while LF/HF ratio increased. Both the SDNN, LF power and the HF power changes persisted throughout the 12-month follow-up. Significant decrease in RMSSD persisted only for 3 months, HRV TI for 6 months and increase in LF/HF ratio for 7 months of the follow-up. Afterwards these three parameters were not different from the preprocedural values.

Conclusions: Epicardial RFA of GP's on the ovine left atrium has lasting effect on the main HRV parameters (SDNN, HF power and LF power). The normalization of RMSSD, HRV TI and LF/HF suggests that HRV after epicardial RFA of GPs on the left atrium might restore over time.

Keywords: Radio frequency ablation, Intrinsic cardiac nerves, Ganglionated plexuses, Left atrium, Ovine, Heart rate variability

Background

Autonomic nervous system regulates the physiological processes of the heart [1]. It also plays a part in the pathogenesis of AF [2]. Pulmonary vein (PV) root isolation is a routine procedure to treat AF. GP and neural pathways are affected inevitably during the procedure as they anatomically overlap the sites of ablation. The purpose of the present study was to determine the long term alterations in HRV after the RFA of GP on the LA.

Determined to avoid ethical limitations and medical conditions common in the human studies, we chose a sheep model which heart is well examined neuroanatomically and is rather similar in size to human [3].

Methods

The present study was conducted under the permission (No.: 33JV-62) issued by the State Food and Veterinary Service, complying to DIRECTIVE 2010/63/EU. Fifteen mature (6–8 months old) Romanov sheep of either gender were acquired in a local farm, where they spent most of the study period in the maternal herd under the

* Correspondence: viluskviesulaitis@yahoo.com
Lithuanian University of Health Sciences, Eivenių 2, LT-50161 Kaunas, Lithuania



© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

supervision of original owner and veterinary doctor, except during the perioperative period when they were tended in veterinary clinics.

Left thoracotomy was performed under the general anesthesia following standardized protocol from our previous study [4]: 0.1 mg/kg Xylazine was administered i.m. for sedation, and anesthesia initiated with 0.03 mg/kg of Midazolam i.m. and 2 mg/kg of Ketamine i.m. After intubation anesthesia was maintained with intravenous 5 µg/kg Phentanyl and ventilation with Halothane through a cyclic breathing system. Infusion of Ringer's solution was administered 15 mL/kg/h during the anesthesia. Pericardial space was opened and dorsal LA area revealed. An extensive RFA was performed covering area encircled by left and middle pulmonary, left azygos, coronary sinus and caudal vein. Left atrium dorsal and middle dorsal epicardial ganglionated subplexuses are located in this area. Together they contain about 40% of total epicardial ganglia of the ovine heart [3]. Standard 4 mm irrigated tip ablation catheters (*Biosense Webster, Thermocool, Diamond Bar*) irrigated with the isotonic solution were used. Ten to fifteen RF energy applications of 20 W power, 500 kHz frequency were applied for 30 s under direct visual control with the +50 °C tissue temperature safety cut-out. "Popping" phenomenon was avoided. Perioperative medication did not include any long-term neuroactive substances except those used for the anesthesia and antibiotic therapy. Thirteen sheep have survived. One animal died due to injury of the left coronary artery and resulting myocardial infarction immediately after the procedure, the second died due to pneumonia 2 months later. Remaining sheep were euthanized 1 year after the RFA.

All sheep underwent a 24 h ECG monitoring the day before the ablation. On the second day after the ablation a 24 h ECG was recorded again and repeated every month throughout a 12-month period. *SR-Medizintechnik Cardioscout recorder* hardware was used for the ECG monitoring. *Cardio Explorer version 3.2* software was used to process the monitoring data and artefacts were corrected manually. *Kubios HRV version 2.1* software was used to evaluate time, frequency and geometrical domain parameters of HRV. For the time domain we have chosen SDNN, RMSSD and a percentage of differences between successive normal to normal QRS intervals greater than 50 ms (pNN50). For the frequency domain we have chosen: very low frequency (VLF) band power (band range from 0.0033 to 0.04 Hz), LF band power (band range from 0.04 to 0.15 Hz), HF band power (band range from 0.15 to 0.4 Hz) and LF/HF ratio. HRV TI – an integral of the density distribution (count of all normal to normal QRS intervals) divided by the maximum of the density distribution was chosen as a geometrical method.

Histochemical evaluation of LA for acetylcholinesterase (AChE) was performed to determine whether the general structural organization of the left dorsal neural subplexus is altered by RFA after 12 months. Sheep hearts from control (no intervention) and experimental groups were perfused with cold phosphate buffered saline (pH 7.4) via coronary vessels and prefixed for 15 min at room temperature in 4% paraformaldehyde solution. The region of the left dorsal atrial subplexus on the coronary sinus was extirpated as it shown in the picture 1a. The extirpated tissue sample was stained histochemically for AChE [3]. Neural structures stained for AChE were examined and photographed using a stereo microscope Stemi 2000 CS (Carl Zeiss, Jena, Germany) applying a fiber optic light illuminator KL 2500 LCD (Schoot AG, Mainz, Germany). Images were captured using a digital camera Axiocam MRc5 (Zeiss, Göttingen, Germany).

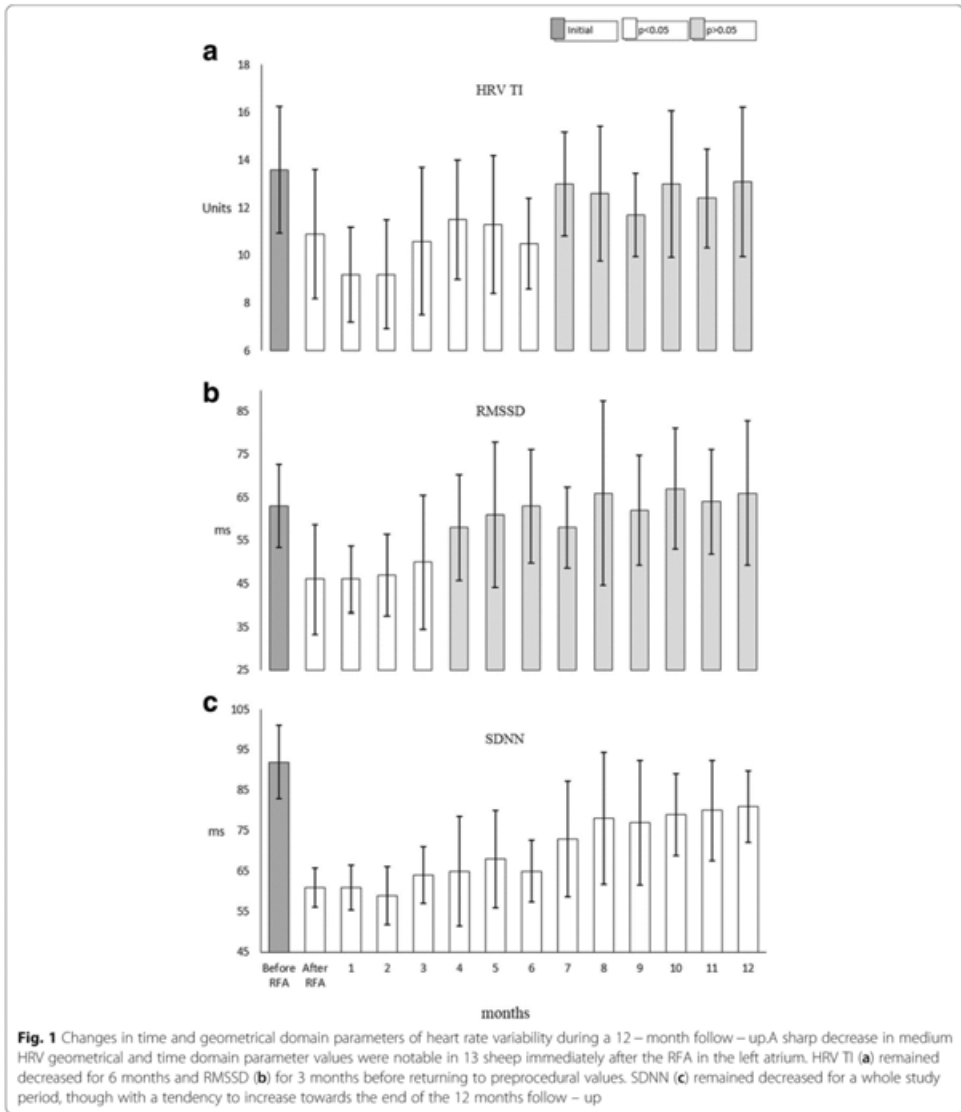
Immunohistochemistry for intrinsic neural structures was performed on tissue cryosections [3] using polyclonal primary mouse monoclonal anti-protein gene product 9.5 (PGP 9.5; dilution 1:1000; ab8189, Abcam, Cambridge, UK) and polyclonal rabbit anti-tyrosine hydroxylase (TH, dilution 1:1000, AB152, Chemicon International, Temecula, California, USA). The applied species specific secondary antibodies were conjugated, respectively, to Alexa Fluor 488 (dilution 1:500, A21202, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) and Cy3 (AP182C, Chemicon International, Temecula, California, USA). The immunohistochemically stained sections were analyzed and photographed using a confocal laser scanning microscope LSM 700 with the software package ZEN 2010 (Carl Zeiss, Jena, Germany).

Statistical data were processed using *SPSS 21.0* statistical package. Mean values of above-mentioned HRV components were calculated. Friedman and Wilcoxon nonparametric criteria were used to analyze the quantitative data. Data were considered significant at $p < 0.05$.

Results

Changes in HRV

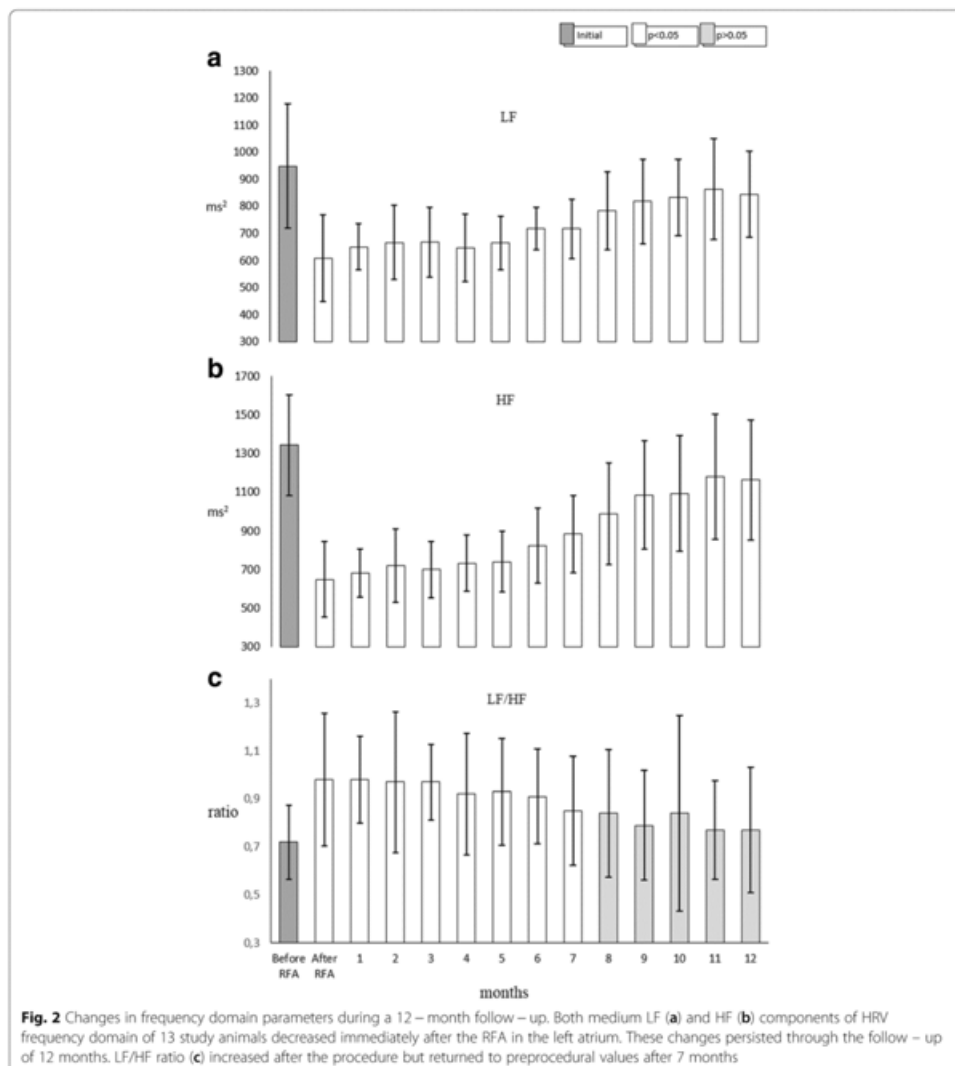
We did not find any statistically significant variations in heart rate of experimental animals. But significant changes in HRV parameters were notable immediately after the RFA. Time domain parameters have decreased immediately after the ablation (Fig. 1): mean SDNN before the RFA was 92.15 ± 9.13 ms and decreased to 60.41 ± 4.88 ms ($p < 0.05$), RMSSD was 62.63 ± 9.64 ms before and 44.30 ± 12.71 ms ($p < 0.05$) after the ablation. The decrease of mean pNN50 from $25.08 \pm 10.49\%$ to $21.98 \pm 8.08\%$ ($p = 0.475$) was statistically insignificant due to overall dispersion throughout the 12-month follow-up. HRV TI significantly decreased from 13.51 ± 2.67 to 10.55 ± 2.69 ($p < 0.05$) after the RFA.



Initial changes of HRV TI, SDNN and RMSSD persisted for different periods of the follow – up (Fig. 1a, b and c). Decrease of SDNN persisted for the whole period of the study. RMSSD returned to the values which were not significantly different from the preprocedural within 3 months after the RFA. HRV TI behaved similarly within

6 months of the follow – up. Both RMSSD and HRV TI remained stable after the normalization.

Frequency domain parameters were also affected by the ablation. LF and HF powers decreased significantly comparing to preprocedural values (Fig. 2a, b). LF component has decreased from $987 \pm 229 \text{ ms}^2$ to $603 \pm 159 \text{ ms}^2$ ($p < 0.005$) and



HF power - from $1386 \pm 259 \text{ ms}^2$ to $653 \pm 193 \text{ ms}^2$ ($p < 0.05$). The extent of decrease of both parameters was not proportional leading to the increase of LF/HF ratio (Fig. 2c) from 0.726 ± 0.155 to 0.963 ± 0.277 ($p < 0.05$). Both LF and HF components remained decreased during the whole study period, but LF/HF ratio gradually decreased and in 7 months there was no statistically significant difference comparing to preprocedural values. Though initially after the ablation VLF

power showed a numerical decrease from $2957 \pm 1855 \text{ ms}^2$ to $2285 \pm 1846 \text{ ms}^2$, no statistically significant change was observed comparing monthly results with preprocedural values through the study period.

Neurohistological observations

Histological AChE staining demonstrates that majority of epicardial nerves and ganglia in the left dorsal neural

subplexus were detectable in both the control and the ablated hearts (Fig. 3a-c). However, the epicardial nerves and ganglia on the dorsal left ventricle and coronary sinus from the control animal group were evidently sharper stained for AChE in comparison to the ablated hearts as staining of intrinsic neural structures of the latter hearts was manifestly obscure at the place below the RFA sites (Fig. 3a-b vs. Fig. 3c).

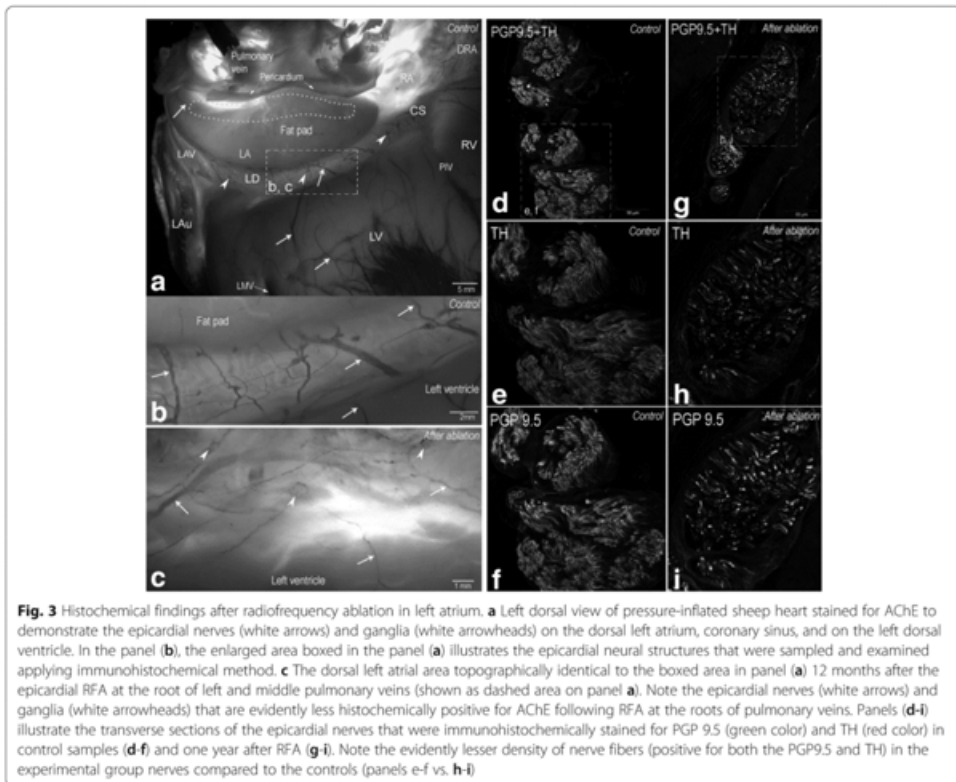
Immunohistochemistry for general neural marker protein gene product 9.5 (PGP 9.5) and adrenergic marker to tyrosine hydroxylase (TH) demonstrates staining both in the control and experimental animal groups. Control epicardial nerves from the left dorsal neural subplexus of all examined animals were densely and abundantly packed by nerve fibers that were evenly distributed in the transverse sections of the nerves (Fig. 3d-f). However, immunohistochemistry performed on the transverse nerve sections extirpated from the dorsal left atrial walls of the experimental animals demonstrates a sharp decrease in number and the patchy distribution of

axons positive for both the PGP9.5 and TH (Fig. 3g-i). These findings confirm that neural structures were affected by RFA of the dorsal left atrial neural structures in the group of experimental animals.

Discussion

Evidence of ANS being involved in the pathogenesis of AF naturally suggests many therapeutic insights and clinical applications. Straightforward ablation of GP is not yet accepted as a routine therapeutic tool for AF treatment. On the other hand, it should not be considered as purely experimental. Pulmonary vein isolation for the treatment of AF is an accepted routine procedure already. Because of the anatomical overlapping of the structures it also affects the GP densely situated around PV roots. And functional modulation of cardiac ANS is notable after the PV isolation. Thus, PV isolation can be considered as a GP ablation of limited extent.

A considerable number of studies have analyzed modification of ANS after PV isolation. HRV is a handy



noninvasive tool universally used for this purpose. Therefore, we have accepted it as a method of ANS evaluation in our study. Frequency and time domain components of the HRV reflect the fluctuations of the autonomic input to the heart. HF band power specifically represents the vagal tone as LF bands represent both vagal and sympathetic influence. Ratio between LF/HF mimics the autonomic balance between the vagal and sympathetic tones. It is important to acknowledge that HRV reflects the fluctuations of ANS without a quantitative ability [5, 6] and we could not speculate which component of ANS was modulated more in our study. On the other hand, ganglionated plexuses in the left atrium are of very intricate composition of sympathetic, parasympathetic and mixed nerves [2]. This makes the selective ablation almost impossible. So isolated effect on one of the systems cannot be expected. We could interpret that according to the increase in LF/HF ratio ablation affected more sympathetic nerve fibers. Though, as both frequencies decreased significantly it would be difficult to prove such a fact.

PV ablation procedures for paroxysmal AF in humans demonstrate an acute universal adjustment of HRV time domain parameters. Usually SDNN, RMSSD and pNN50 significantly decreases after the procedure [7–15]. Moreover, successful procedures (without recurrence of AF) have shown stronger effects of ablation on SDNN and RMSSD [7, 8, 10] compared to those with AF recurrence. This might reflect the extent and precision of the ablation on intracardiac structures of ANS. While we performed ablation on ovine heart, our results had similar trends as in human studies. It might suggest that autonomous modulation works similarly in both species. Thus, regarding autonomic innervation, ovine heart can be considered as a study object. Moreover, experimental approaches like histological evaluation otherwise inappropriate in human studies make this method particularly valuable. We recognize the limitation of our study as we did not control for possible acute effects of thoracotomy and pericardial sack opening on the HRV. But as thoracic and pericardial nerves have no direct interconnections with intracardiac nerves we did not expect a strong HRV response to the procedure.

There is a degree of disparity noted in studies concerning the changes in frequency domain parameters of the HRV after the PV isolation. Studies demonstrate significant decrease in LF and HF powers immediately after the procedure [7, 8, 12, 14, 16–19], which corresponds with our findings. Although changes in LF/HF ratio are more contradictory. As presented in different studies LF/HF ratio has either increased [12, 15, 18], did not change [14, 17, 19] or decreased [7, 8, 17]. Those data might discredit the LF/HF ratio as a proper parameter for evaluation of ANS tone as there were no obvious

differences between the study populations. Different techniques of PV isolation (segmental and circumferential approach) might had impact on that. However, K. Wang et al. [8] did not find any significant difference between these two techniques on ANS tone.

More GP ablation – focused studies when compared to PV isolation alone have demonstrated similar results. Kang KW with colleagues enhanced circumferential PV isolation adding additional lesion connecting highest septal aspect of superior v. cava with right atrial septum for additional effect on ANS [20]. This approach significantly decreased both time and frequency components of HRV compared to the circumferential PV isolation alone. C. Pappone has studied a group of patients after circumferential PV isolation with additional extensive vagal denervation procedure [21]. Additional increase of LF/HF along with usual effects of PV ablation on HRV was noted in this study. Some human studies of isolated GP ablation showed post procedural decrease in both HF and LF powers [22–24]. E. Pokushalov repeatedly confirmed increased LF and decreased HF powers along with increase in LF/HF ratio after GP ablation [25, 26]. Our study has also presented similar results. It shows that destruction of GP extensively modulates the autonomic regulation of the heart. Usually greater ANS modification expressed by the changes in HRV is noted in patients without AF recurrence. This observation complements the theory of ANS involvement in pathogenesis of AF and gives reason for further research.

Regardless the evident acute changes in cardiac autonomic regulation after the ablation, not all the effects seem to be permanent, which was observed in our study too. Existing data on the duration of changes of autonomic regulation are diverse. L. Callo presented data from the 19.7 ± 5.2 months' follow – up of the patients after the GP ablation [24]. Significant modification of HRV in patients without AF recurrence lasting up to 6 months was observed. Unfortunately, no data on further changes are available, thought the follow-up was significantly longer. In patients with AF recurrence, HRV returned to initial values earlier during the period between 3 and 6 months. E. Pokushalov also observed the normalization of HRV changes in 6 months after GP ablation [25]. C. Pappone has observed significant HRV changes up to 3 months after extensive vagal denervation along with circumferential PV isolation [21]. Ablation of parasympathetic vagal structures did not prolong the effect of PV isolation on the duration of the changes in HRV. Some other PV isolation studies demonstrate modification of ANS tone lasting up to 12 months after the procedure, unfortunately no longer-term follow-ups were documented [14, 18, 19]. Other studies presented even shorter follow – up periods of 3 to 6 months [7, 12, 17, 20].

It is difficult to point out the possible mechanisms of ANS activity normalization after the ablation and the different duration of this process. It remains unclear whether the normalization is a natural process or a flaw in the therapy. Properties of the study population, medications and different follow-up strategies probably have a solid impact on the outcome. It is probable that parts of ANS unaffected by the ablation are partially responsible for the normalization of some HRV parameters. Also, there are different opinions about the possibility of ANS reinnervation. Q. Y. Zhao has designed an animal study on dogs showing evidence of neural remodeling after GP ablation in the right atrium [27]. Another study on reablation for AF recurrence confirmed the absence of high frequency stimulation-induced vagal reflexes [28]. These data contradict the reinnervation. On the other hand, it could be explained by a relatively short mean period between the procedures, which was about 4 months. While it is unclear how long would it take for a hypothetical reinnervation of the heart, most studies observe normalization of ANS parameters in 6 months. Our previous study [4] on the ovine heart after GP ablation also demonstrated no histological evidence of neural regeneration. Though examination was also performed only 2–3 months after the ablation, the evidence of absent regeneration was strong. Further experiments on animal models might give greater insight into this problem.

Conclusions

After the epicardial RFA of GP on the ovine LA an immediate modification of geometrical, time and frequency domains of the HRV has occurred. Changes of SDNN, HF power and LF power persisted for 12 months' follow-up and may be considered as possible criteria of efficacy of AF ablation in a clinical practice. On the other hand, changes in parameters like RMSSD, HRV TI and LF/HF ratio were less persistent. They returned to values that were not significantly different comparing to pre-procedural in 3–7 months. This might hint of ANS of the heart regaining its functions over time.

Abbreviations

AChE: Acetylcholinesterase; AF: Atrial fibrillation; ANS: Cardiac autonomous nervous system; GP: Ganglionated plexuses; HF: High frequency; HRV: Heart rate variability; LA: Left atrium; LF: Low frequency; PGP 9.5: Protein gene product 9.5; pNNS0: A percentage of differences between successive normal to normal QRS intervals greater than 50 ms; PV: Pulmonary vein; RFA: Radiofrequency ablation; RMSSD: A square root of the mean of the squared differences between successive normal QRS intervals; SDNN: A standard deviation of all intervals between normal QRS; TH: Tyrosine hydroxylase; TI: Triangular index; VLF: Very low frequency

Acknowledgements

The authors are grateful to Mr. Vaclovas Eidukevicius for the supply of experimental animals and outstanding care for them through the study period.

Funding

Not applicable.

Availability of data and materials

The dataset supporting the conclusions of this article will be available any time on the request.

Authors' contributions

VK wrote the draft manuscript, made a literature review; was involved in RFA procedure, Holter monitoring and data analysis; AP, VZ, RZ, RV, ED and TK were involved in critical revision of the manuscript and RFA procedures; RV and ED were responsible for perioperative care, general anesthesia and thoracotomy; ED also attended study animals with any necessary veterinary support during the follow-up. VS, AS and RU were involved in perioperative care and Holter monitoring through the whole year period, performed Holter data analysis and manual corrections of raw data and participated in acquiring study animal hearts and preparing histological samples; RU also performed statistical analysis; KR, NP, DHP participated in the design of the study and critical revision of the manuscript, they also performed histological evaluation of ablation sites. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval

Study permission No.:33IV-62 was issued by the State Food and Veterinary Service after the approval of Lithuanian Ethics Committee on the use of laboratory animals under the State Food and Veterinary service. Animal supplier personally attended all the study stages and was informed and aware of all undergoing experimental procedures.

Consent for publication

Not applicable (animal study).

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 31 March 2017 Accepted: 4 December 2017

Published online: 12 December 2017

References

- Gordan R, Gwathmey JK, Xie L-H. Autonomic and endocrine control of cardiovascular function. *World J Cardiol.* 2015;7(4):204–14.
- Chen P-S, Chen LS, Fishbein MC, Lin S-F, Nattel S. Role of the autonomic nervous system in atrial fibrillation: pathophysiology and therapy. *Circ Res.* 2014;114(9):1500–15.
- Saburkina I, Rysevaitė K, Pauziene N, Mischke K, Schauerer P, Jalife J, Pauza DH. The Epicardial Neural Ganglionated Plexus of the Ovine Heart. Anatomical basis for experimental cardiac electrophysiology and nerve protective cardiac surgery. *Heart Rhythm.* 2010;7(7):942–50.
- Puodžiūkytis A, Kazakevičius T, Vaitkevičius R, Rysevaitė K, Jokubauskas M, Saburkina I, Sladkeviciute-Dirzinauskienė V, Dirzinauskas E, Zabiela V, Sileikis V, Plisiene J, Pauziene N, Zaliunas R, Jalife J, Pauza DH. Radiofrequency catheter ablation of pulmonary vein roots results in axonal degeneration of distal epicardial nerves. *Auton Neurosci.* 2012;167(1–2):61–5.
- Vaseghi M, Shivkumar K. The role of the autonomic nervous system in sudden cardiac death. *Prog Cardiovasc Dis.* 2008;50(6):404–19.
- Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing Electrophysiology. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *Circulation.* 1996;93:1043–65.
- Seaborn GE, Todd K, Michael KA, Baranchuk A, Abdollah H, Simpson CS, Akl SG, Redfeam DP. Heart rate variability and procedural outcome in catheter ablation for atrial fibrillation. *Ann Noninvasive Electrocardiol.* 2014;19(1):23–33.
- Wang K, Chang D, Chu Z, Yang Y, Gao L, Zhang S, Xia Y, Dong Y, Yin X, Cong P, Jia J. Denervation as a common mechanism underlying different pulmonary vein isolation strategies for paroxysmal atrial

- fibrillation: evidenced by heart rate variability after ablation. *Sci World J.* 2013;2013:559–64.
9. Verma A, Champagne J, Sapp J, Essebag V, Novak P, Skanes A, Morillo CA, Khaykin Y, Birnie D. Discerning the incidence of symptomatic and asymptomatic episodes of atrial fibrillation before and after catheter ablation (DISCERN AF): a prospective, multicenter study. *JAMA Intern Med.* 2013;173(2):149–56.
 10. Lin YJ, Chang SL, Lo LW, Hu YF, Suenari K, Li CH, Chao TF, Chung FP, Liao JN, Hartono B, Tso HW, Tsao HM, Huang JL, Kao T, Chen SA. A prospective, randomized comparison of modified pulmonary vein isolation versus conventional pulmonary vein isolation in patients with paroxysmal atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2012 Nov;23(11):1155–62.
 11. Higuchi K, Akkaya M, Koopmann M, Blauer JJ, Burgon NS, Damal K, Ranjan R, Kholmovski E, Macleod RS, Marrouche NF. The effect of fat pad modification during ablation of atrial fibrillation: late gadolinium enhancement MRI analysis. *Pacing Clin Electrophysiol.* 2013;36(4):467–76.
 12. Yoshida N, Yamada T, Murakami Y, Okada T, Ninomiya Y, Toyama J, Yoshida Y, Tsuboi N, Muto M, Inden Y, Hirai M, Murohara T. Vagal modification can also help prevent late recurrence of atrial fibrillation after segmental pulmonary vein isolation. *Circ J.* 2009;73(4):632–8.
 13. Oswald H, Klein G, Koenig T, Luesebrink U, Duncker D, Gardiwal A. Cryoballoon pulmonary vein isolation temporarily modulates the intrinsic cardiac autonomic nervous system. *J Interv Card Electrophysiol.* 2010;29(1):57–62.
 14. Yamada T, Yoshida N, Murakami Y, Okada T, Yoshida Y, Muto M, Inden Y, Murohara T. The difference in autonomic denervation and its effect on atrial fibrillation recurrence between the standard segmental and circumferential pulmonary vein isolation techniques. *Europace.* 2009;11(12):1612–9.
 15. Chen J, Wasmund S, Hamdan M, et al. Back to the future: the role of the autonomic nervous system in atrial fibrillation. *PACE.* 2006;29(4):413–21.
 16. De Ferrari GM, Crjns HI, Borggrefe M, Mlasić M, Smid J, Zabel M, Gavazzi A, Sanzo A, Dennert R, Kuschik J, Raspopovic S, Klein H, Swedberg K, Schwartz PJ, CardioFit Multicenter Trial Investigators. Chronic vagus nerve stimulation: a new and promising therapeutic approach for chronic heart failure. *Eur Heart J.* 2011;32:847–55.
 17. Kang KW, Kim TH, Park J, Uhm JS, Joung B, Hwang C, Lee MH, Pak HN. Long-term changes in heart rate variability after radiofrequency catheter ablation for atrial fibrillation: 1-year follow-up study with irrigation tip catheter. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2014;25(7):693–700.
 18. Yamaguchi Y, Kumagai K, Nakashima H, Saku K. Long-term effects of box isolation on sympathovagal balance in atrial fibrillation. *Circ J.* 2010;74(6):1096–103.
 19. Yamada T, Yoshida N, Murakami Y, Okada T, Yoshida Y, Muto M, Inden Y, Murohara T. Vagal modification can be a valid predictor of late recurrence of paroxysmal atrial fibrillation independent of the pulmonary vein isolation technique. *Circ J.* 2009;73(9):1606–11.
 20. Kang KW, Pak HN, Park J, Park JG, Uhm JS, Joung B, Lee MH, Hwang C. Additional linear ablation from the superior vena cava to right atrial septum after pulmonary vein isolation improves the clinical outcome in patients with paroxysmal atrial fibrillation: prospective randomized study. *Europace.* 2014;16(12):1738–45.
 21. Pappone C, Santinelli V, Manguso F, Vicedomini G, Gugliotta F, Augello G, Mazzone P, Tortorello V, Landoni G, Zangrillo A, Lang C, Tomita T, Mesas C, Mastella E, Alfieri O. Pulmonary vein denervation enhances long-term benefit after circumferential ablation for paroxysmal atrial fibrillation. *Circulation.* 2004;109:327–34.
 22. Sakamoto S, Fujii M, Watanabe Y, Hiramoto A, Ishii Y, Morota T, Nitta T. Exploration of theoretical ganglionated plexi ablation technique in atrial fibrillation surgery. *Ann Thorac Surg.* 2014;98(5):1598–604.
 23. Malcolm-Lawes LC, Lim PB, Wright I, Kojodjoko P, Koa-Wing M, Jamil-Copley S, Dehbi HM, Francis DP, Davies DW, Peters NS, Kanagaratnam P. Characterization of the left atrial neural network and its impact on autonomic modification procedures. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2013; 6(3):632–40.
 24. Calò L, Rebecchi M, Sciarra L, De Luca L, Fagagnini A, Zuccaro LM, Pitrone P, Dottori S, Porfiro M, de Ruvo E, Lloy E. Catheter ablation of right atrial ganglionated plexi in patients with vagal paroxysmal atrial fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2012;5(1):22–31.
 25. Pokushalov E, Romanov A, Artyomenko S, Turov A, Shirokova N, Katritsis DG. Left atrial ablation at the anatomic areas of ganglionated plexi for paroxysmal atrial fibrillation. *Pacing Clin Electrophysiol.* 2010;33(10):1231–8.
 26. Pokushalov E, Turov A, Shugayev P, Artyomenko S, Romanov A, Shirokova N. Catheter ablation of left atrial ganglionated plexi for atrial fibrillation. *Asian Cardiovasc Thorac Ann.* 2008;16:194–201.
 27. Zhao QY, Huang H, Zhang SD, et al. Atrial autonomic innervation remodeling and atrial fibrillation inducibility after epicardial ganglionic plexi ablation. *Europace.* 2010;12(6):805–10.
 28. Gatti PJ, Johnson JA, McKenzie J, Lauenstein JM, Gray A, Massari VJ. Vagal control of left ventricular contractility is selectively mediated by a cranioventricular intracardiac ganglion in the cat. *J Auton Nerv Syst.* 1997; 66:138–44.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



0000. An approach to 24-hour electrocardiogram monitoring in sheep experimental model

Vilius Kviesulaitis¹, Tomas Kazakevičius², Vytautas Zabiela³, Aras Puodžiukynas⁴

Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania

¹Corresponding author

E-mail: ¹viliuskviesulaitis@yahoo.com, ²kazakev@gmail.com, ³vytautas.zabiela@kaunoklinikos.lt,

⁴aras.puodziukynas@gmail.com

Received 22 March 2018; received in revised form 3 June 2018; accepted 14 June 2018

DOI <https://doi.org/xx.xxxxx/xxxx.xxxxx>

Copyright © 0000 Vilius Kviesulaitis, et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract. Sheep could be an excellent research subject for large animal experimental studies because of their heart structure and physiology have a lot similarity to the human. Long term ECG monitoring is a convenient tool for human and possibly veterinary clinical practice and research. Continuous ECG recording can be used to monitor and evaluate body physiological responses in various experimental conditions. Experience on sheep ECG monitoring techniques is sparse and mostly focused on short term ECG recordings. We developed a peculiar technique of 24-hour sheep ECG monitoring based on the available data on large mammal model, where we tried to share some insights and practical solutions working with this type of animals for ECG monitoring by using several commercially available ECG monitors also used for the human practice. Some producer specific hardware and software characteristic that we found important in daily practice were also discussed. In conclusion, sheep as big animal is relatively good object for Holter monitoring experimental studies: ECG monitoring is easily affordable, registered ECG signal is of similar quality as in human clinical practice, which is sufficient for the heart rhythm monitoring and arrhythmia and conduction disorder diagnostics. Additional effort might be needed for 24-hour heart rate variability calculations because manual revision of software ECG signal interpretations is requiring, but short-term calculations can be made easy.

Keywords: sheep, electrocardiogram, Holter monitoring, heart rate variability.

1. Introduction

Long term electrocardiogram (ECG) monitoring, historically known as Holter monitoring (after inventor Norman J. Holter), is an acknowledged tool for diagnostical, observational and experimental purposes. Holter monitoring is applicable on most mammals ranging from rat to horse. Sheep are considered amongst the most suitable large experimental animals as their heart resembles the human both anatomically and physiologically [1-5]. They are convenient to work with due their moderate weigh, which is similar to the average human, and together with calm nature this makes them more suitable for long term experiments, than other similarly available domestic animals, like porcine or large cattle. But data on long term sheep ECG monitoring and particularly the heart rate variability evaluation is sparse and is important yet. During our scientific practice we performed over 200 Holter monitoring's on sheep experimental model [6]. While short duration ECG is never a problem in any anesthetised or immobilised animal, but long-term ECG monitoring in big conscious animal can be challenging. In literature practically, there are no neat solutions to this problem, so we started with knowledge based on human practice and on other mammal ECG recordings which mostly focused on short term (5 min.) ECG monitoring [1, 5, 7-9]. This sometimes led to excessive measures and precautions prolonging the procedure and sometimes to unexpected flaws resulting in failed record or loss of equipment. In this study we want to represent and discuss our practical experience on repetitive 24-hour ECG monitoring approach using in sheep.

2. Animal choice and handling

ECG monitoring was performed on young mature subjects ranging from 6 to 18 months age. It varies from individual to individual, but more younger animals were founded easier to work with. Size and strength are crucial in terms of animal management, but mental background is also important. Lambs are more curious, cooperative and seem to experience less stress on repetitive monitoring. Whenever possible taming and luring with food is preferable to chasing and catching. In our case one hand fed lamb was almost willing to participate. A shepherd's crook is a handy tool if you manage a big herd. Works best, when the person animals are used to (usually a farmer) participates in all the tasks. It also helps to separate the experimental animals from the maternal herd some hours or the evening before the procedure.

Even if generally calm in nature, sheep are curious, so they are best kept in separate cages during monitoring. Even the breast-fed lambs try to snatch the parts of the equipment tangled under their mother so best is to keep the experimental animals separate from the herd. Walls of the cage should be over 1 meter in height with vertical fence bars, otherwise they will be climbed with all the possible consequences. Individuals who participate in the same process seem to mind their own business, and in cases when we had to place two monitored animals in one cage we had no incidents. But we strongly advise preventing the animal with a monitor on to roam free with the rest of the herd.

3. Animal preparation

Signal quality of any ECG recording crucially depends on electrode position and the contact with the skin. Even in human practice some cases can be challenging for an adequate long-term electrode fixation especially in sweaty, hairy individuals. In veterinary practice it gets even more challenging and sheep are not the easiest case model.

Most sheep are well handled by 2 persons when the process gets familiar. But 3 is an optimal number. In the beginning we universally administered short term sedatives to the animals before the procedure. In long term that proved unnecessary and even undesirable. Sedation might be useful only if one intends to do a short ECG record, but even in that case you need to catch and restrain the animal. During a long-term monitoring sedation usually prolongs the procedure which is not a desirable effect in multiple repetitive tasks. It takes time to wait for the effect of the sedative and animals need to be restrained until medication takes over. Sedation of multiple animals at once gives no advantage as they all need to be tended to. Also, it is not always easy to select the adequate dose for the variable duration of the procedure. That sometimes leads to additional doses and prolonged effect, which in turn prolongs the nursing after application of the recorder. In the end, we handled most of the animals without sedation well except maybe the large uncastrated males. General advice is to avoid unruly individuals for the experiment. Uncastrated lambs grow large and hard to handle if you plan a long term follow up (6-12 months) and some individuals are simply too lively. In smaller farms owner can help to identify the desirable qualities of the animals.

Preparing the skin for the electrodes is probably the most time-consuming part of the procedure. Axillar pits are relatively wool free and spacy enough to place the electrodes for short recordings, but fixation for longer periods can be difficult there. To alleviate the procedure animals should be sheared before the procedure. It is best made a day before the recording to shorten the procedure and stress impact on the recording. Shorter wool facilitates the fixation of the electrodes and in most cases, saves time. It also removes most dirt which composed with lanolin and humidity makes fixation of adhesive pad electrodes difficult. Clean and dry is always advised. Shearing is best done with professional electrical shears. It might be worth noting that short wool not always comes handy. It makes handling uncooperative individuals harder. And there is no real necessity to shear the whole animal. A circumferential stripe of some 15-20 cm width, just caudal from the anterior extremities is enough. It is usually enough to shear and moisture the wool for ECG

recording with crocodile electrodes but for long term monitoring we recommend the adhesive pad electrodes. For that reason, we strongly advise shaving the skin of remaining wool. Soap or shaving foam facilitate the process. Cut throat razor was the best option as a shaving tool for us. And animal is best laid on a side when doing that.

4. Electrode placement

All the monitors we used had 2 channels, and in total 4-5 electrodes. For best short-term ECG signal in literature are recommendations to place electrodes in sagittal axis or use of enhanced limb derivations [10-12]. Frontal plane placement is less preferable due to the position of the sheep heart. But it is more relevant for long term monitoring as it is easier to achieve the electrode stability here. We placed the electrodes slightly caudally (5-10 cm) from the frontal extremities, in a slightly ventral (precordial) position. Similarly, to the technique used by other authors for the cattle and dog Holter monitoring [13, 14]. A scheme of electrode placing is shown in Fig. 1.

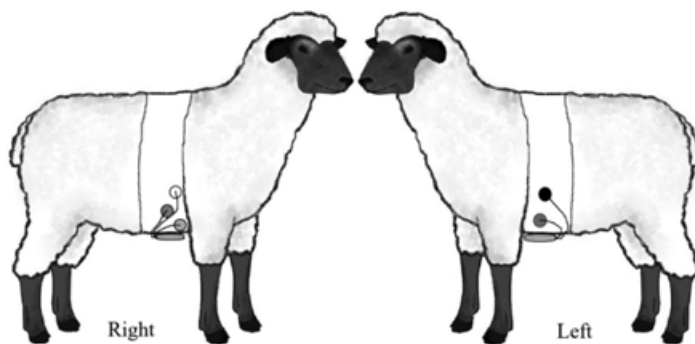


Fig. 1. Precordial lead placement. RED and BLACK electrodes are placed on the left side and WHITE, BROWN and GREEN on the right

We tried three types of the electrodes used in human practice: alligator type, intracutaneous electrodes and self-adherent pad argentum chloride electrodes. We also tried to apply suction electrodes just to check if they might work, but as expected it was with no success. Because of unacceptable probability of infection, we did not consider implanting permanent subcutaneous electrodes. Both alligator and intracutaneous vires were optimal for short term monitoring and provided good ECG signal in immobilised animals. Alligator type was superior because of reusability, ease of application and price. Initially we thought these electrodes would be good for long term monitoring too, but both types performed poorly. Both caused visible irritation of the application site and were hard to maintain in place for 24 hours, especially the alligator type. Animals were obviously trying to scratch and gnaw the application sites which resulted in poor quality and failed recordings. Stressed out animals were resisting subsequent procedures.

Next, which we tried was an adhesive pad electrode. It reproduced a good ECG signal, and clip fixation made it simple to connect to the ECG monitor without any additional modifications unlike the other electrode types. But it was problematic to keep them in place for a long time. Even if the skin was clean shaved and degreased with various types of solvents the pads did not adhere for long and tended to migrate and detach during the monitoring. But initial disappointment led to a solution to glue the electrode pads which was very effective. At first, we used surgical glue but later substituted it with regular 'super' glue for the same effect and a better price. Glue not only facilitated the procedure but made it possible. In more complicated cases animal skin can be additionally prepared with initial application of glue, but usually it is sufficient to glue the margins of the electrode pads (except the electrode itself). Pads can be stuck immediately after the preparation of the skin even if the skin is still wet, which is useful if you prepare the animal laid

on one side. This way you do not need to roll over it avoiding the dirt sticking to the site of preparation. We did not observe any irritation of the skin and removal of the electrodes was a simple effort. Sometimes signal quality was good enough for a second day of recording. In cases where the electrode pad would stick to firm, it just needs couple days for it to catch some moisture and lanolin to remove easily.

Size of the electrode has some significance too. We found 30 mm diameter electrode pads the most suitable. Where was no sense to use larger pads as they do not improve the signal quality nor adherence and require clearing additional space, which prolongs the procedure especially if you need to reallocate the electrode.

Gluing the electrode is not enough and it needs additional protection and support. Initially we tried various techniques including improvised harness and rubber belts for multiple reuse. Both did not prove effective enough. Harness got dirty and needed maintenance after a single use. Some different materials than a cotton fabric might work better than it did for us. But still, it is cumbersome to make, and animals are of different size, so several harnesses are needed. Rubber belt was not as convenient as expected too. It was hard to adjust to the conical shape of the sheep chest. It was hard to adjust desirable pressure to the electrodes and belt tended to slide off the electrodes or even dislocate them or pressed the chest too much and caused discomfort to the animal.

Finally, medical plaster tapes of 10-15 cm width proved to be the most suitable for the electrode support to the chest. The wider tape the better, as it is needed less circles to cover the electrodes which not always lined up in a narrow line. We plastered the monitor along with the electrodes and leads too. Additionally, we used some extra wrapping for the monitor, to avoid plaster adherent and dirt sticking to it. Usually we used a simple rubber glove or a plastic bag. Plaster does not adhere well to the wool, but it does to itself. So, two layers of plaster are needed to achieve the stability and desired support. A second circular layer of continuous plaster holds firm enough to sustain for 24 hours and is usually enough. It also adjusts to any shape of the chest. Additional taping can be made crossing the chest between the legs for further support. Plaster with some elastic properties is the best. If excess humidity is expected an additional layer of a duct tape can be applied on top of the plaster. It is well advised to tape the area of around 10 cm both sides from the electrodes as the margins of the taping tend to twist and roll slightly which can expose the electrodes.

5. Monitoring

A good signal quality for a surface ECG recording is a relatively easy task, but it is much more complicated to maintain the quality for 24 hours. Industry supplies multitude of ECG monitors with varying features that can affect the procedure. When choosing the machine for multiple recordings we think it is important to pay attention to durability, availability of replaceable parts and easy data processing.

We had experience with 3 different devices while monitoring sheep ECG. We do not intend to market the features of any producer, and all the considerations made here are purely practical to point out the desirable features of the Holter monitor for animal experiments. We used Schiller MT-101, SR-Medizinelektronik Cardio Scout recorder, and Custo Cor-3. Schiller MT-101 could be distinguished from the other two by extra-long leads (80-100 cm). Being able to encircle the whole chest with electrodes is a welcome feature when working with large animals. Both Schiller MT-101 and Custo Cor-3 came with larger hardware box (almost 3 times the size of Cardio Scout) and a glass screen, and interface buttons, which needed more protection from physical damage and were prone to accumulate dirt during multiple reuse. Cardio Scout on the other hand had short leads (30 cm) but a small and durable box, without any other features on it. Instead it had a Bluetooth connection to a software station (laptop computer) with approximate signal coverage of at least 20 m which was a notable improvement in means of comfort and durability. It was not a necessary feature in our case, but machine also had an option to monitor several devices online at

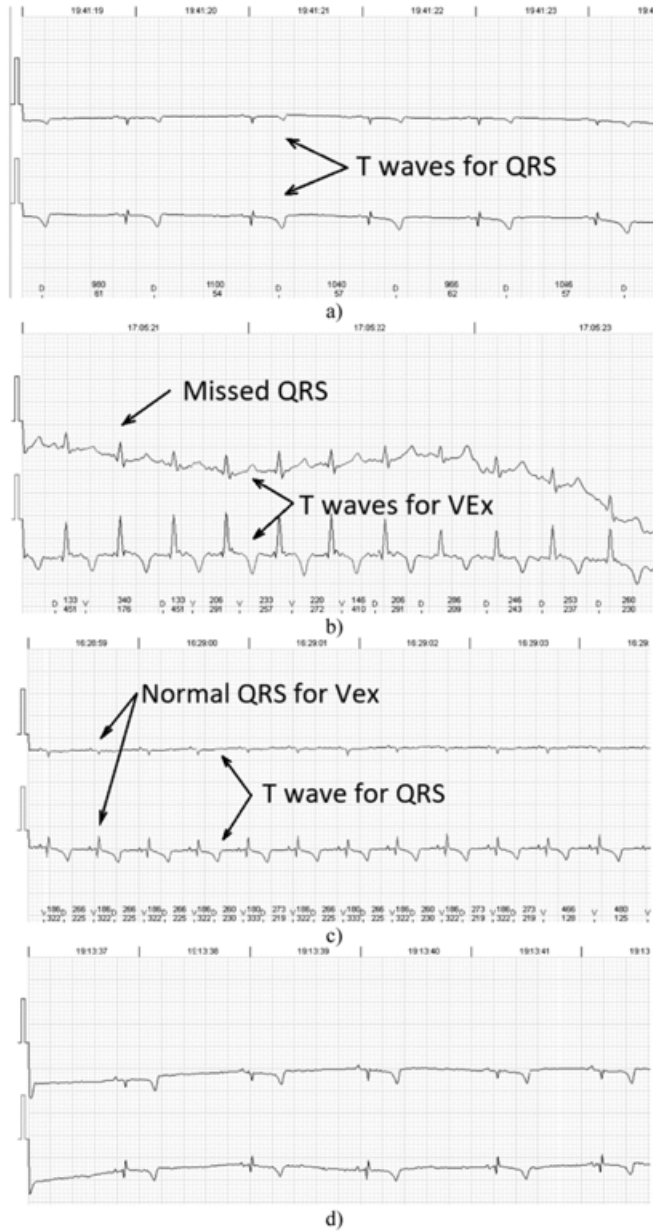


Fig. 3. Errors of the automated analysis leading to false arrhythmia or heart rate variability parameter calculations if not corrected manually. a) Demonstrates a case of rather low wave amplitudes leading to relatively 'deep' T wave being considered as a QRS complex, marked as 'D' (defined event); b) shows a case of a single unidentified QRS complex and several T waves marked as ventricular extrasystole (VEx), marked as 'V' (ventricular event); c) a combination of errors where normal QRS complexes are defined as VEx and T waves defined as QRS; d) software failed to detect a sequence of several low amplitude QRS complexes

6. Conclusions

With appropriate preparation and some basic tools sheep are relatively easy and good experimental model to perform a 24-hour ECG monitoring. ECG signal of similar quality as in human practice can be achieved which is sufficient for the heart rhythm monitoring and arrhythmia and conduction disorder diagnostic. Human ECG monitoring devices are relevant for sheep monitoring. Sufficient signal quality can be achieved for the heart rate variability calculations. This makes 24-hour ECG monitoring a good tool for the large animal experiments as base heart rate values along with the heart rate variability can be used as physiological markers for a wide spectrum of experimental conditions. Additional manual and automated processing is required in some cases.

References

- [1] **Ebhart Von Borel, et al.** Heart rate variability as a measure of autonomic regulation of cardiac activity for assessing stress and welfare in farm animals – a review. *Physiology and Behavior*, Vol. 92, 2007, p. 293-316.
- [2] **Segar J. L.** Ontogeny of the arterial and cardiopulmonary baroreflex during fetal and postnatal life. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, Vol. 273, 1997, p. 457-471.
- [3] **Woods Jr J. R., Danadavino A., Murayama K., Brinkman C. R., Assali N. S.** Autonomic control of cardiovascular functions during neonatal development in adult sheep. *Circulation Research*, Vol. 40, 1977, p. 401-407.
- [4] **Kimura Y., Okamura K., Watanabe T., Murotsuki J., Suzuki T., Yano M., et al.** Power spectral analysis for autonomic influences in heart rate and blood pressure variability in fetal lambs. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, Vol. 271, 1996, p. 1333-1339.
- [5] **Scheer P., Svoboda P., Sepsi M., Janeckova K., Doubek J.** The electrocardiographic Holter monitoring in experimental veterinary practice. *Physiological Research*, Vol. 59, 2010, p. 59-64.
- [6] **Kviesulaitis V., Puodziukynas A., Pauza D. H., Zabiela V., Kazakevicius T., Vaitkevicius R., Diržinauskas E., Semaška V., Strazdas A., Unikaite R., Rysevaite K., Pauziene N., Zaliunas R.** Heart rate variability after radiofrequency ablation of epicardial ganglionated plexuses on the ovine left atrium. *BMC Cardiovascular Disorders*, Vol. 17, Issue 1, 2017, p. 292.
- [7] **Reefmann N., et al.** Physiological expression of emotional reactions in sheep. *Physiology and Behavior*, Vol. 98, 2009, p. 235-241.
- [8] **Konold Timm, Bone Gemma E.** Heart rate variability analysis in sheep affected by transmissible spongiform encephalopathies. *BMC Research Notes*, Vol. 4, 2011, p. 539.
- [9] **Torío R., Cano M., Montes A., Prieto F., Bedito J. L.** Comparison of two methods for electrocardiographic analysis in Gallega sheep. *Small Ruminant Research*, Vol. 24, 1997, p. 239-246.
- [10] **Koether K., et al.** The normal electrocardiograms in the conscious newborn lambs in neonatal period and its progression. *BMC Physiology*, Vol. 16, 2016, <https://doi.org/10.1186/s12899-016-0020-5>.
- [11] **Rezakhani A., Ejtehadi M.** Some electrocardiographic parameters of the fat tailed sheep. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe A*, Vol. 27, Issue 2, 1980, p. 152-156.
- [12] **Mir S. A., Nazki A. R., Raina R.** Comparative electrocardiographic studies and differing effects of pentazocine on ECG, heart and respiratory rates in young sheep and goats. *Small Ruminant Research*, Vol. 37, 2000, p. 13-7.
- [13] **Frese D. A., et al.** Twenty-four hour Holter monitoring in finishing cattle housed outdoors. *Journal of Veterinary Cardiology*, Vol. 19, 2017, p. 153-159.
- [14] **Jean Paul Petrie** Practical application of Holter monitoring in dogs and cats. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, Vol. 20, 2005, p. 173-181.
- [15] **Jafrin Ara Ahmed, Sagar Sanyal** Electrocardiographic studies in goral sheep and black Bengal goats. *Research Journal of Cardiology*, Vol. 1, 2008, p. 1-8.

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/medici>

Original Research Article

Evaluation of atrial fibrillation management and cardiovascular risk profile in atrial fibrillation patients: A cross-sectional survey

Gediminas Račkauskas^{a,1,*}, Vytautas Zabiela^{b,1}, Germanas Marinskis^a, Arvydas Baranauskas^a, Deimilė Balkutė^a, Justina Alunderytė^a, Aras Puodžiūkytas^b, Tomas Kazakevičius^b, Vilius Kviesulaitis^b, Audrius Aidietis^a

^a Centre for Cardiology and Angiology, Department of Cardiovascular Diseases, Vilnius University, Vilnius, Lithuania

^b Department of Cardiology, Medical Academy, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 July 2015

Received in revised form

25 January 2017

Accepted 26 January 2017

Available online 20 February 2017

Keywords:

Atrial fibrillation

Risk scores

Anticoagulation

ABSTRACT

Objective: The aim of this study to investigate the most frequent risk factors of atrial fibrillation (AF), co-morbidities, complications associated with AF and the use of anticoagulants and other medications in patients who were referred to university hospitals in Lithuania.

Materials and methods: This cross-sectional study enrolled consecutive inpatients and outpatients with AF presenting to cardiologists in the two biggest Lithuanian university hospitals from November 2013 to May 2014. AF diagnosis was confirmed by a 12-lead ECG or 24-h Holter with an episode duration of >30 s.

Results: A total number of 575 patients were recruited, and complete data on clinical subtype were available for 515 patients (mean age of 70.7 years; 48.5% of women). Permanent AF was the most frequent type of AF (46.6%). Common comorbidities were hypertension (85.8%), heart failure (77.9%) and coronary artery disease (51.8%). Amiodarone was the most common antiarrhythmic agent used in 14.6% of the patients, while beta-blockers and digoxin were the most often used rate control drugs (59.6% and 10.7%, respectively). Oral anticoagulants were used by 53.3% of the patients; of them, 95.6% used vitamin K antagonists, while non-vitamin K antagonist were used by only 4.4%. The INR within a therapeutic range (2.0–3.0) was documented in 19.2% of the patients. Other antithrombotic drugs such as aspirin and clopidogrel were used in 13.7% and 2.0% of the patients, respectively; dual antiplatelet treatment was administered in 6.2% of the patients. Of the entire cohort, the mean CHA₂DS₂-VASc score was 3.97 ± 1.6 and the mean HAS-BLED score was 2.25 ± 1.0.

Conclusions: Compliance with the treatment guidelines remains suboptimal and further patient education is needed.

© 2017 The Lithuanian University of Health Sciences. Production and hosting by Elsevier Sp. z o.o. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Corresponding author at: Centre for Cardiology and Angiology, Department of Cardiovascular Diseases, Vilnius University, Santariškių 2, 08661 Vilnius, Lithuania.

E-mail address: gediminas.rackauskas@santa.lt (G. Račkauskas).

¹ These authors contributed equally to this work.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.medici.2017.01.005>

1010-660X/© 2017 The Lithuanian University of Health Sciences. Production and hosting by Elsevier Sp. z o.o. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Atrial fibrillation (AF) is the most common sustained cardiac rhythm disorder in clinical practice [1]. Its prevalence increases with age from 0.1% in people younger than 55 years to more than 9% in 80 years old. More than 6 million Europeans suffer from this arrhythmia [2,3]. The recent projections estimate that the number of adults older than 55 years with AF in the European Union will double from 2010 to 2060 [4].

The social and economic burden of AF is steadily increasing in Western countries [5]. Atrial fibrillation is independently associated with increased risk of a variety of adverse outcomes, including 5-fold risk of stroke, 3-fold incidence of congestive heart failure, and 2-fold risk of death [2,6,7]. Only antithrombotic therapy has been shown to reduce AF-related death [8]. AF-related stroke is often more devastating and results in long-term disability comparing to other stroke etiology [2]. The cardiac failure or dysfunction, hypertension, age ≥ 75 [doubled], diabetes, stroke [doubled]-vascular disease, age 65–74, and sex category [female] (CHA₂DS₂-VASc) score is a validated tool to estimate the annual risk of stroke or systemic embolism, ranging from <1% to approximately 20% in the absence of oral anticoagulants [9].

Moreover, AF impairs quality of life and results in significant indirect nonmedical costs due to lost work ability and productivity [10]. With these premises, achieving a definite cure for this arrhythmia is highly desirable, and this would have profound social and economic implications. Therefore, it is important to diagnose AF in time, to control risk factors, prevent complications, and provide adequate treatment.

Recent guidelines on the management of AF have been published and updated by the European Society of Cardiology to facilitate the choice of the treatment strategy [2]. Considering the disease relevance and the need of therapy assessment, we investigated the most frequent AF risk factors, comorbidities, AF-associated complications and the use of anticoagulants and other medications of patients who were referred to the two biggest hospitals in Lithuania.

2. Materials and methods

A cross-sectional study was conducted in two tertiary-care university hospitals in Lithuania (Vilnius University Hospital Santariškių Klinikos and Hospital of Lithuanian University of Health Sciences Kauno Klinikos) between November 2013 and May 2014. The study protocol was approved by the Ethics Committee of Vilnius University Hospital Santariškių Klinikos, and all patients provided written informed consent before enrolment. Consecutive inpatients and outpatients were screened for eligibility on arrival to the hospital. Patients with a diagnosis of AF were included, when the AF episode was present in a 12-lead ECG or episode >30 s in duration was recorded on 24-h Holter. The qualifying episode of AF should have occurred within the last year, before enrolment to the registry. No exclusion criteria were defined in order to minimize selection bias.

2.1. Statistical analysis

Univariate analysis was applied to both continuous and categorical variables. Continuous variables are expressed as a mean (standard deviation). Comparison between groups was made by using the non-parametric Kruskal–Wallis test. Categorical variables are reported in percentages. Comparison between categorical groups was made by using the chi-squared or Fischer exact tests if any expected cell count was <5. For all tests, a P value of less than 0.05 was considered to be significant. Statistical analysis was performed using SPSS 20 software.

3. Results

A total of 575 patients were enrolled, although complete data on the clinical subtype of AF were available for 515 patients (mean age, 70.7 years; mean body mass index, 29.4 kg/m²; 48.5% were female). As displayed in Table 1, 25.4% of the patients had paroxysmal AF; 25.2%, persistent AF; and 46.6%, permanent AF. 2.7% of the patients had first-time documented AF. There were no significant sex differences comparing the AF subtypes, but patients with paroxysmal AF were younger compared with those with permanent AF (mean age 68 vs. 73 years, $P < 0.05$).

3.1. Associated risk factors, comorbidities and prior interventions

Cardiac risk factors and comorbidities were frequent, irrespective of AF. The most common associated comorbidities were hypertension (85.8%), heart failure (77.9%), and coronary artery disease (CAD) (51.8%) (Table 1). Previous stroke was reported in 19.4% of the whole cohort. Chronic liver or kidney disease was reported in 19.1% (Table 2). Patients with permanent AF more often tended to have had previous embolism, hemorrhagic events, and hypercholesterolemia ($P < 0.05$) comparing with other AF type groups. Pacemaker implantation was performed in 22.4% of the whole group.

3.2. Drug therapy

Patients received therapy that was prescribed by a cardiologist, an internal medicine doctor, or general practitioners. Antithrombotic strategies are summarized in Table 3. Oral anticoagulants (OACs) were used by 53.3% of the patients; vitamin K antagonists (VKAs), most often (95.6%). At the time of inclusion to the survey, anticoagulation therapy in the therapeutic range (international normalized ratio value between 2.0 and 3.0) was documented only in 19.2% of the patients. Non-vitamin K antagonists were used in a minority of patients (dabigatran 2.4%, rivaroxaban 2.0%, and apixaban 0%). Dual antiplatelet therapy was administered to 6.2% of the entire cohort. Aspirin was used in 13.7% and the combination of an OAC and antiplatelet (aspirin or clopidogrel) therapy in 5.4% of the patients. None of the patients received triple therapy.

Amiodarone (14.6%) and propafenone (5.8%) were the most often prescribed antiarrhythmic drugs (AADs) (Table 3). Only 0.5% of the patients used dronedarone. Beta-blockers (59.6%)

Table 1 - Clinical characteristics of the study population.

Characteristic	Whole cohort (n = 515, 100%)	First detection (n = 14, 2.7%)	Paroxysmal AF (n = 131, 25.4%)	Persistent AF (n = 130, 25.2%)	Permanent AF (n = 240, 46.6%)	P value
Demographics						
Age, mean (SD), years	70.7 (11)	68.4 (18)	68.0 (12)	69.2 (11)	73.0 (10)	<0.05
Female gender	48.5	50	52.7	46.2	47.5	NS
Concomitant disease						
Hypertension	85.8	71.4	85.4	86.8	86.7	NS
Coronary artery disease	51.8	42.9	50	54.3	51.7	NS
Myocardial infarction	23.9	42.9	20	21.7	25.4	NS
Pacemaker implantation	22.4	14.2	19.2	22.5	24.6	NS
PTCA	18.5	21.4	20	16.3	18.8	NS
CABG	9.2	-	8.5	5.4	12.1	NS
Chronic heart failure	77.9	53.8	74.6	77.3	81.3	NS
Heart failure NYHA III/IV	64.7	85.7	61.9	60.6	67.6	NS
Valvular disease	33.7	50	35.7	33.3	31.8	NS
Cardiovascular risk factors						
Hypercholesterolemia	40.3	21.4	50.8	39.5	36.1	<0.05
Current smoking or history of smoking	22	28.6	17.8	25.8	21.8	NS
Diabetes mellitus	20	7.1	13	20.8	24.2	<0.05
COPD	8.2	7.1	6.9	6.2	10	NS
Hypothyroidism	7.4	7.1	9.2	6.9	6.7	NS
Hyperthyroidism	6.6	7.1	7.6	5.4	6.7	NS
Co-morbidities						
Hemorrhagic events	13	21.4	5.3	13.1	16.7	<0.05
Malignancy	12.3	14.3	11.5	10	13.8	NS
Physical examination						
BMI, mean (SD), kg/m ²	29.4 (6.3)	28.4 (4.7)	28.3 (6.0)	30.0 (6.0)	29.6 (6.6)	NS
Systolic BP, mean (SD), mmHg	133 (22)	130 (14)	136 (22)	131 (23)	132 (22)	NS
Diastolic BP, mean (SD), mmHg	79 (12)	79 (9)	81 (12)	78 (12)	78 (12)	NS
Heart rate, mean (SD), beats per min	81 (31)	91 (48)	77 (35)	86 (31)	80 (28)	NS

Values are percentage unless otherwise indicated. PTCA, percutaneous transluminal coronary angioplasty; CABG, coronary artery bypass grafting; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; BMI, body mass index; BP, blood pressure; AF, atrial fibrillation.

Table 2 - Stroke and bleeding risk factors.

Risk factor	Whole cohort (n = 515, 100%)	First detection (n = 14, 2.7%)	Paroxysmal AF (n = 131, 25.4%)	Persistent AF (n = 130, 25.2%)	Permanent AF (n = 240, 46.6%)	P value
Stroke						
Chronic heart failure	77.9	53.8	74.6	77.3	81.3	NS
Hypertension	85.8	71.4	85.4	86.8	86.7	NS
Age >75 years	41.4	42.9	31.3	35.4	50.0	<0.05
Diabetes mellitus	20	7.1	13.0	20.8	24.2	<0.05
Stroke/TIA	19.4	14.3	13.7	19.2	22.9	<0.05
Age 65-74 years	31.8	7.1	35.8	28.5	32.9	NS
Female gender	48.5	50	52.7	46.2	47.5	<0.05
CHA ₂ DS ₂ -VASC, mean (SD), score	3.97 (1.7)	3.43 (2.4)	3.59 (1.6)	3.78 (1.8)	4.33 (1.6)	<0.05
Bleeding						
Hypertension	85.8	71.4	85.4	86.8	86.7	NS
Liver and/or kidney disease	19.1	14.3	13.0	16.1	24.2	NS
Previous stroke	19.4	14.3	13.7	19.2	22.9	<0.05
Labile INRs	9.3	0	5.3	12.3	10.4	NS
Elderly (age >65 years)	73.4	57.1	66.4	65.4	82.5	<0.05
Alcohol use	9.8	14.3	14.7	5.4	9.2	NS
HAS-BLED, mean (SD), score	2.25 (1.0)	1.71 (0.8)	1.96 (0.9)	2.17 (1.2)	2.5 (1.1)	<0.05

Values are percentage unless otherwise indicated. TIA, transient ischemic attack; INR, international normalized ratio; AF, atrial fibrillation.

Table 3 – Treatment of the study population.

Treatment	Whole cohort (n = 515, 100%)	First detection (n = 14, 2.7%)	Paroxysmal AF (n = 131, 25.4%)	Persistent AF (n = 130, 25.2%)	Permanent AF (n = 240, 46.6%)	P value
Antithrombotic treatment						
VKA	48.9	28.0	26.0	59.0	45.0	<0.05
INR, 2-3	19.2	0	8.6	20.8	22.2	<0.05
INR, <2	67.4	100	80.0	62.3	65.7	0.05
INR, >3	13.4	0	11.4	16.9	12.0	NS
ASA	13.7	21.4	26.9	13.3	5.0	<0.05
Clopidogrel	2.0	0	2.3	1.6	2.1	NS
Dual antiplatelet treatment	6.2	0	10.8	3.9	5.5	NS
Dabigatran	2.4	0	0	11.3	0.8	-
Rivaroxaban	2.0	0	1.0	5.6	1.5	-
Apixaban	0	0	0	0	0	-
Low-molecular weight heparin	8.0	21.4	8.4	6.9	7.5	NS
Unfractionated heparin	1.7	0	3.8	1.5	0.8	NS
Antiarrhythmic treatment						
Antiarrhythmic	20.9	21.4	32.1	28.1	10.8	<0.05
Amiodarone	14.6	21.4	19.8	18.8	9.2	<0.05
Propafenone	5.8	0	11.5	8.6	1.7	<0.05
Dronedarone	0.5	0	0.8	0.8	0	-
Other treatments						
BAB	59.6	42.9	61.8	57.0	60.8	NS
ACE inhibitors	53.0	35.7	58.0	55.4	50.0	NS
Diuretics	49.7	14.3	34.4	49.2	60.4	<0.05
ARBs	23.9	28.6	24.4	16.9	27.1	NS
Statin	18.8	14.3	27.5	19.2	14.2	<0.05
Calcium channel blockers	16.3	14.3	16.8	16.9	15.8	NS
Digoxin	10.7	7.1	3.8	4.6	17.9	<0.05

Values are percentages. VAK, vitamin K antagonist; INR, international normalized ratio; ASA, acetylsalicylic acid; ACE, angiotensin-converting enzyme; ARB, angiotensin II receptor blocker; AF, atrial fibrillation.

and non-dihydropyridine calcium-channel blockers (16.3%) were used more often as rate control agents than digoxin (10.7%).

3.3. Stroke and bleeding risk factors

Table 2 summarizes the most common risk factors for stroke and bleeding as well as the stroke and bleeding risk profile of

the study population. The mean CHA₂DS₂-VASc score was 3.97 (SD, 1.6) and the mean HAS-BLED was 2.25 (SD, 1.0), with the highest risk observed in patients with permanent AF. More than 10% of the patients experienced bleeding complications.

The proportions of OAC use by the CHA₂DS₂-VASc score are shown in Fig. 1, which shows VKA use in more than 50%, with each score pointed between CHA₂DS₂-VASc 1 and 8. Only 25% of the patients with a CHA₂DS₂-VASc score of 9 used VKA,

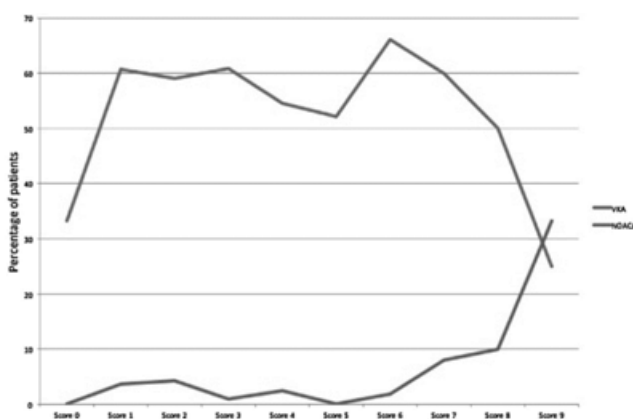


Fig. 1 – Proportions of patients treated with antithrombotic drugs by CHA₂DS₂-VASc score.

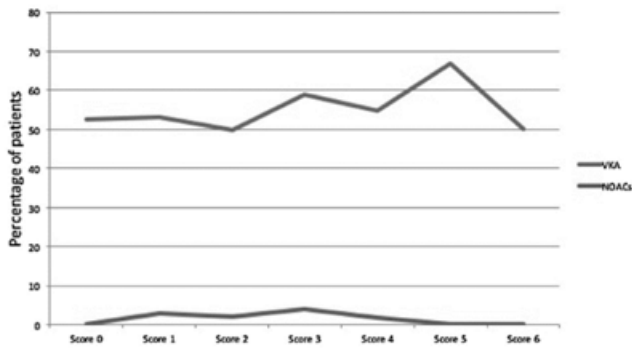


Fig. 2 – Proportions of patients treated with anticoagulant drugs by HAS-BLED score.

whereas the use of a non-vitamin K antagonist was more frequent in those patients.

Fig. 2 displays OAC use according to the HAS-BLED score. There were no particular differences in OAC usage between the groups respective to the bleeding score.

4. Discussion

Our survey provides an important and contemporary view of AF epidemiology and management for the AF population in Lithuania. Data derived from this survey can be used as a baseline for outcome analysis at follow-up, and as a benchmark for future studies.

Patients enrolled in this survey were comparable according to the age of patients in the ATRIUM survey (71.9 ± 9.2 years), Euro Heart Survey (69 ± 10 years), or AFNET study (67 ± 13 years). A large proportion (46.6%) of our patients had permanent AF, which was higher than in the ATRIUM (43%), AFNET (33%), and Euro Heart Survey (29%), and the results were quite different compared to the EORP-AF registry, where the majority (30.3%) of patients suffered from first-time detected AF [9–13].

AF is an arrhythmia that is generally associated with many other cardiac and noncardiac disorders. Based on data from other surveys and registries, hypertension is established as the most common cardiovascular disease [9]. Our data show that hypertension, chronic heart failure (CHF), and coronary heart disease remain common comorbidities in patients with AF. The most frequent cardiovascular risk factors were current or previous smoking, hypercholesterolemia, and diabetes mellitus. The close relationship of AF with concomitant diseases and cardiovascular risk factors is also evident and was noted in the Euro-Heart survey, ATRIUM, AFNET, and EORP-AF registries [10–13].

The data from our survey showed that amiodarone was the most commonly used AAD (14.6%), followed by propafenone (5.8%). Similar data have been found in the AFNET registry [10]. Interestingly, that except from a very small group of patients

who were taking dronedarone (0.5%), there was no single patient receiving Class III agent sotalolol, probably because this agent is not presented in Lithuania due to marketing reasons despite recommendations and antiarrhythmic effects. The great majority of patients received rate control agents. The type of rate control therapy was similar with the EORP-AF survey, where nearly two-thirds of patients received beta-blockers and as much as 10.0% received digitalis [9].

The ESC Guidelines advocate the initial identification of “truly low-risk” patients for stroke and bleeding risk assessment based on (CHA₂DS₂-VASc) and (HAS-BLED) clinical scores. For patients with a CHA₂DS₂-VASc score of 0, who are at low risk, with none of the risk factors, no antithrombotic therapy is recommended, whereas patients with a CHA₂DS₂-VASc score ≥ 2 should be anticoagulated taking into account a HAS-BLED risk score [14]. Most of the guidelines recommend that when oral anticoagulation is indicated, a non-vitamin K antagonist should be considered instead of VKAs, given the greater efficacy, safety, and convenience of a non-vitamin K antagonist compared with VKAs [15]. Our registry showed that anticoagulants were used in 53.3% of the patients and this is much less than in EORP-AF registry where anticoagulants were used in 80%. The low VKA usage is difficult to explain, considering that the mean CHA₂DS₂-VASc risk evaluation score was 3.97 and the mean HAS-BLED risk score of 2.25, whereas the CHA₂DS₂-VASc and HAS-BLED risk scores in EORP-AF registry were 3.24 and 1.37, respectively. It is also worth noting that just a small proportion (19.2%) of the patients had an international normalized ratio (INR) value within the therapeutic range between 2.0 and 3.0.

According to the current AF treatment guidelines, aspirin usage for stroke prevention is weak, with potential for harm [16,17]; therefore, it is not recommended regardless of stroke risk [2]. Meanwhile, results from our study showed that only a minority from our patients were treated with aspirin. A large proportion of patients (one third) received dual antiplatelet treatment. This drug combination has additional efficacy compared with aspirin monotherapy, but also has an additional risk for major bleeding [18]. Anticoagulants signif-

cantly reduce the risk of stroke compared to placebos. An adjusted dose of VKA was associated with the relative risk reduction of ischemic strokes in 67% of patients. Moreover, the all-cause mortality was significantly reduced (26%) by adjusted-dose VKA vs. control [8].

4.1. Study limitations

The current snapshot of AF epidemiology and management might be prone to bias due to the absence of randomization. Due to the survey design, only patients after primary selection and coming to biggest university hospitals were included, and consequently, they could differ from the primary population with AF subjected to the treatment in regional hospitals and outpatient institutions. According to our data, which are only instant picture of patients with AF, it would be difficult to speculate about follow-up, progression of paroxysmal type AF to persistent and permanent AF, continuous usage of anticoagulants or the thromboembolism event rate in inadequately treated patients. Moreover, this observational study did not include data of medical or electrical cardioversion, likewise AF ablations. Also there are no scientific papers about data in Lithuania concerning how many patients with AF are under OACs. A special dedicated registry should be implemented to answer this kind of questions.

5. Conclusions

Our study showed that non-vitamin K antagonists are rarely used drugs. However, when the patient has a high thromboembolic risk score, the incidence of non-vitamin K antagonist usage is going to increase. Probably, while these drugs will not be compensated for by local health institutions, it would be unrealistic to expect higher usage of those drugs.

Also it is worth noting that the HAS-BLED score is still not a popular bleeding risk assessment score among primary and secondary health care specialists. As we can see from the data of our study, in everyday clinical practice, there is no difference in OACs usage in different bleeding risk score groups.

Compliance with the current guidelines remains suboptimal in Lithuania. Therefore, better education is needed for both physicians and patients in order to achieve better treatment results.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

We would like to thank all the departments that participated in this survey, and all the patients who gave their consent to participate.

REFERENCES

- [1] Rosamond W, Flegal K, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, et al. American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics—2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2008;117:e25–146.
- [2] Kirchhof P, Benussi S, Kotecha D, Ahlsson A, Atar D, Casadei B, et al. 2016 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS. The Task Force for the management of atrial fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association (EHRA) of the ESC. Endorsed by the European Stroke Organisation (ESO). *Eur J Cardiothorac Surg* 2016; ezw313.
- [3] Fuster V, Ryden LE, Cannom DS, Crijns HJ, Curtis AB, Ellenbogen KA, et al. American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for the Management of Patients with Atrial Fibrillation: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2001 Guidelines for the Management of Patients With Atrial Fibrillation): developed in collaboration with the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. *Circulation* 2006;114:e257–354.
- [4] Krijthe BP, Kunst A, Benjamin EJ, Lip GY, Franco OH, Hofman A, et al. Projections on the number of individuals with atrial fibrillation in the European Union, from 2000 to 2060. *Eur Heart J* 2013. <http://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/eh280>
- [5] Braunwald E. Shattuck lecture—cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and opportunities. *N Engl J Med* 1997;337:1360–9.
- [6] Wolf PA, Abbott RD, Kannel WB. Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: the Framingham Study. *Stroke* 1991;22(8):983–8.
- [7] Hylek EM, Go AS, Chang Y, Jensvold NG, Henault LE, Selby JV, et al. Effect of intensity of oral anticoagulation on stroke severity and mortality in atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2003;349(11):1019–26.
- [8] Hart RG, Pearce LA, Aguilar MI. Meta-analysis: antithrombotic therapy to prevent stroke in patients who have nonvalvular atrial fibrillation. *Ann Intern Med* 2007;146(12):857–67.
- [9] Thrall G, Lane D, Carroll D, Lip GY. Quality of life in patients with atrial fibrillation: a systematic review. *Am J Med* 2006;119(5): 448–e1.
- [10] Kirchhof P, Lip GY, Van Gelder IC, Bax J, Hylek E, Kaab S, et al. Comprehensive risk reduction in patients with atrial fibrillation: emerging diagnostic and therapeutic options—a report from the 3rd Atrial Fibrillation Competence NETwork/European Heart Rhythm Association consensus conference. *Europace* 2012;14:8–27.
- [11] Lip GY, Laroche C, Dan GA, Santini M, Kalarus Z, Rasmussen LH, et al. A prospective survey in European Society of Cardiology member countries of atrial fibrillation management: baseline results of EURObservational Research Programme Atrial Fibrillation (EORP-AF) Pilot General Registry. *Europace* 2014;16:308–19.
- [12] Nieuwlaar R, Capucci A, Camm AJ, Olsson SB, Andresen D, Davies DW, et al. Atrial fibrillation management: a prospective survey in ESC member countries: the

- Euro Heart Survey on atrial fibrillation. *Eur Heart J* 2005;26:2422-34.
- [13] Meinerz T, Kirch W, Rosin L, Pittrow D, Willich SN, Kirchhof P. Management of atrial fibrillation by primary care physicians in Germany: baseline results of the ATRIUM registry. *Clin Res Cardiol* 2011;100(10):897-905.
- [14] Camm AJ, Lip GY, De Caterina R, Savelieva I, Atar D, Hohnloser SH, et al. 2012 focused update of the ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation. *Eur Heart J* 2012;33(21):2719-47.
- [15] Banerjee A, Lane DA, Torp-Pedersen C, Lip GY. Net clinical benefit of new oral anticoagulants (dabigatran, rivaroxaban, apixaban) versus no treatment in a 'real world' atrial fibrillation population: a modelling analysis based on a nationwide cohort study. *Thromb Haemost* 2012;107:584-9.
- [16] Haïssaguerre M, Jaïs P, Shah DC, Takahashi A, Hocini M, Quiniou G, et al. Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. *N Engl J Med* 1998;339(10):659-66.
- [17] Fox CS, Parise H, D'Agostino Sr RB, Lloyd-Jones DM, Vasan RS, Wang TJ, et al. Parental atrial fibrillation as a risk factor for atrial fibrillation in offspring. *JAMA* 2004;291(23):2851-5.
- [18] Chen YH, Xu SJ, Bendahhou S, Wang XL, Wang Y, Xu WY, et al. KCNQ1 gain-of-function mutation in familial atrial fibrillation. *Science* 2003;299(5604):251-4.

SUMMARY

BACKGROUND

Cardiac intrinsic autonomic nervous system (ANS) is a ganglionated plexus (GP) similar to those found in other organs. It consists of 7 ganglionated sub plexuses located at functionally crucial parts of the heart. More than a half of all the neural ganglia in the heart are located in the left atrium (LA), especially the posterior wall. Cardiac intrinsic ANS regulates all the physiological processes of the heart. It also plays a part in the pathogenesis of atrial fibrillation (AF). Pulmonary vein (PV) root isolation is a routine procedure to treat AF. GP and neural pathways are affected inevitably during the procedure as they anatomically overlap the sites of ablation which can affect the course of the disease. The effects of the ablation on the function and structure of the cardiac intrinsic ANS are not clear. The purpose of the study was to investigate these changes. We chose a sheep model to bypass the restrictions for structural evaluation of the human heart.

AIM OF THE STUDY

The purpose of the study was the evaluation the functional and structural changes undergoing in the cardiac intrinsic ANS of the sheep after the RFA of cardiac ganglionated plexuses of the left atrium during the 12-month follow-up.

Study goals:

1. Evaluation of basic HRV time (Heart rate, SDNN, RMSSD, pNN50, HRV TI) and frequency (HF, LF, VLF, LF/HF) domain parameter values for the sheep.
2. Perform the epicardial radiofrequency ablation in the LA at the PV roots of the sheep heart.
3. Evaluation of the cardiac intrinsic nervous system functional changes immediately after the procedure (2–3 days) and during the 12-month follow-up.
4. Evaluation of the structural changes of the cardiac intrinsic ANS after the RFA in sheep heart.

METHODS

The study was conducted under the permission (No.: 33IV-62) issued by the National Food and Veterinary Department and complying to DIRECTIVE 2010/63/EU. Fifteen mature (6-8 months old) Romanov sheep of either gender were acquired in a local farm. There they spent most of the study period in the maternal herd, under the supervision of original owner and veterinary doctor, except during the perioperative period when they were tended in veterinary clinics.

Radiofrequency ablation procedure

Left thoracotomy was performed under the general anaesthesia following standardized protocol from our previous study: 0.1 mg/kg Xylazine was administered i.m. for sedation, and anaesthesia initiated with 0.03 mg/kg of Midazolam i.m. and 2 mg/kg of Ketamine i.m. After intubation anaesthesia was maintained with intravenous 5 µg/kg Phentanyl and ventilation with Halothane through a cyclic breathing system. Infusion of Ringer's solution was administered 15 mL/kg/h during the anaesthesia. Subcutaneous fractionated heparin was administered to avoid thromboembolic complications.

Pericardial space was opened, and dorsal LA area revealed. An extensive RFA was performed covering area encircled by left and middle pulmonary, left azygos, coronary sinus and caudal vein. Left atrium dorsal and middle dorsal epicardial ganglionated subplexuses are located in this area. Together they contain about 40% of total epicardial ganglia of the ovine heart. Standard 4 mm irrigated tip ablation catheters (*Biosense Webster, Thermocool, Diamond Bar*) irrigated with the isotonic solution were used. Ten to fifteen RF energy applications of 20 W power, 500 kHz frequency were applied for 30 s under direct visual control with the +50°C tissue temperature safety cut-out. "Popping" phenomenon was avoided. Perioperative medication did not include any long-term neuroactive substances except those used for the anaesthesia and antibiotic therapy. Thirteen sheep have survived. One animal died due to injury of the left coronary artery and resulting myocardial infarction immediately after the procedure, the second died due to pneumonia 2 months later. Remaining sheep were euthanized 1 year after the RFA.

ECG monitoring

All sheep underwent a 24-hour ECG monitoring the day before the ablation. On the second day after the ablation a 24-hour ECG was recorded again and repeated every month throughout a 12-month period. *SR-Medizintechnik Cardioscout recorder* hardware was used for the ECG monitoring. *Cardio Explorer version 3.2* software was used to process the monitoring data and artefacts were corrected manually. *Kubios HRV version 2.1* software was used to evaluate time, frequency and geometrical domain parameters of HRV. For the time domain we have chosen SDNN, RMSSD and a percentage of differences between successive normal to normal QRS intervals greater than 50 ms (pNN50). For the frequency domain we have chosen: very low frequency (VLF) band power (band range from 0.0033 to 0.04 Hz), LF band power (band range from 0.04 to 0.15 Hz), HF band power (band range from 0.15 to 0.4 Hz) and LF/HF ratio. HRV TI – an integral of the density distribution (count of all normal to normal QRS intervals) divided by the maximum of the density distribution was chosen as a geometrical method.

Additionally, Holter monitoring was analysed for any undergoing arrhythmia during all the 12-month follow-up. Atrial fibrillation, atrial flutter, atrial tachycardia, atrioventricular nodal and ventricular tachycardias were considered as significant rhythm disturbances to monitor for. Sporadic extrasystole and sinus tachycardia were not considered as arrhythmia.

Histological evaluation

After the 12-month follow-up sheep were euthanised according to the study protocol. Hearts were taken for the neurohistological evaluation. A control of 3 intact sheep was performed.

Histochemical evaluation of LA for acetylcholinesterase (AChE) was performed to determine whether the general structural organization of the left dorsal neural subplexus is altered by RFA after 12 months. Sheep hearts from control (no intervention) and experimental groups were perfused with cold phosphate buffered saline (pH 7.4) via coronary vessels and prefixed for 15 min at room temperature in 4% paraformaldehyde solution. The region of the left dorsal atrial subplexus on the coronary sinus was extirpated as it shown in the Fig. 1a. The extirpated tissue sample was stained histochemically for AChE. Neural structures stained for AChE were examined and photographed using a stereo microscope Stemi 2000 CS (Carl Zeiss, Jena, Germany) applying a fibre optic light illuminator KL 2500 LCD (Schot AG, Mainz, Germany). Images were captured using a digital camera Axiocam MRc5 (Zeiss, Gottingen, Germany).

Immunohistochemistry for intrinsic neural structures was performed on tissue cryosections using polyclonal primary mouse monoclonal anti-protein gene product 9.5 (PGP 9.5; dilution 1:1000; ab8189, Abcam, Cambridge, UK.) and polyclonal rabbit anti-tyrosine hydroxylase (TH, dilution 1:1000, AB152, Chemicon International, Temecula, California, USA). The applied species specific secondary antibodies were conjugated, respectively, to Alexa Fluor 488 (dilution 1:500, A21202, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) and Cy3 (AP182C, Chemicon International, Temecula, California, USA). The immunohistochemically stained sections were analyzed and photographed using a confocal laser scanning microscope LSM 700 with the software package ZEN 2010 (Carl Zeiss, Jena, Germany).

RESULTS

Analysis of arrhythmia

Two brief (up to 94 seconds) atrial fibrillation paroxysms were monitored during the RFA procedure. Both ceased spontaneously with no additional interventions needed.

No arrhythmia was documented in sheep during the 12 months follow-up. Most common rhythm disorders registered during Holter monitoring were sporadic supraventricular and ventricular extrasystole. These were not considered as arrhythmia during the study.

Analysis of HRV

We did not find any statistically significant variations in heart rate of experimental animals. But significant changes in HRV parameters were notable immediately after the RFA. Time domain parameters have decreased immediately after the ablation (*fig. 1*): mean SDNN before the RFA was 92.15 ± 9.13 ms and decreased to 60.41 ± 4.88 ms ($p < 0.05$), RMSSD was 62.63 ± 9.64 ms before and 44.30 ± 12.71 ms ($p < 0.05$) after the ablation. The decrease of mean pNN50 from $25.08 \pm 10.49\%$ to $21.98 \pm 8.08\%$ ($p = 0.475$) was statistically insignificant due to overall dispersion throughout the 12-month follow-up. HRV TI significantly decreased from 13.51 ± 2.67 to 10.55 ± 2.69 ($p < 0.05$) after the RFA.

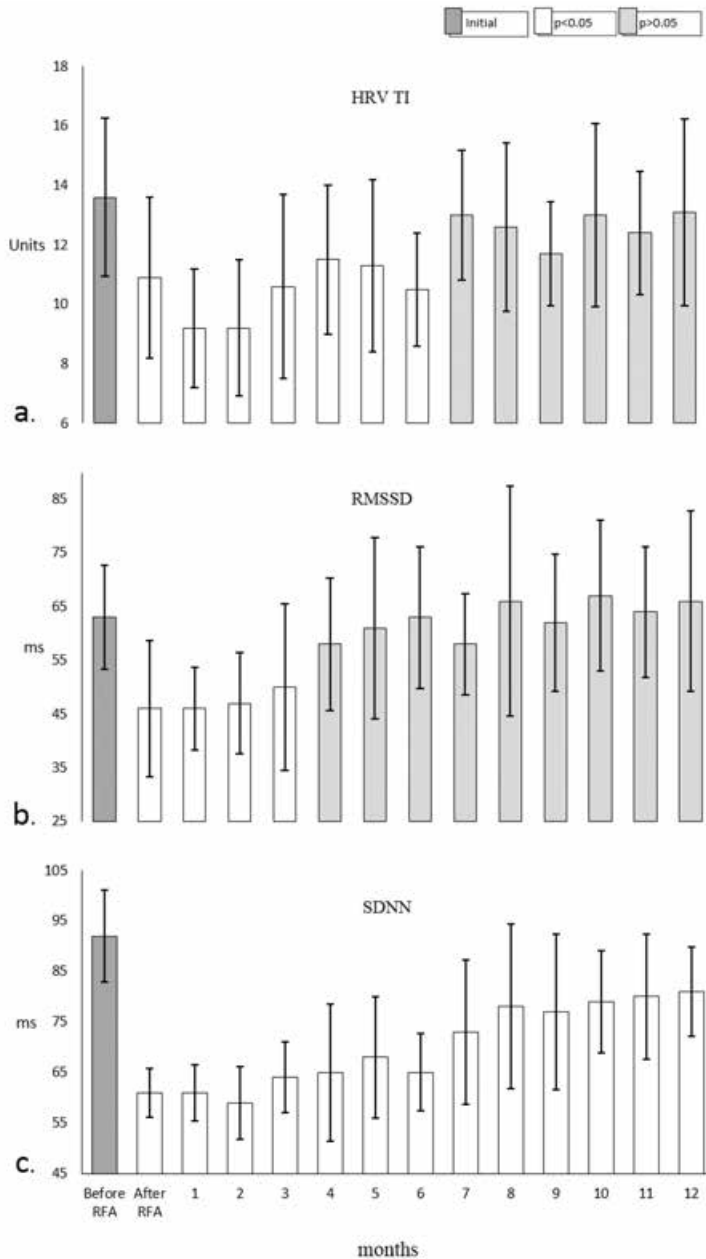


Fig. 1. Changes in time and geometrical domain parameters of heart rate variability during a 12-month follow-up

A sharp decrease in medium HRV geometrical and time domain parameter values were notable in 13 sheep immediately after the RFA in the left atrium. HRV TI (a.) remained decreased for 6 months and RMSSD (b.) for 3 months before returning to preprocedural values. SDNN (c.) remained decreased for a whole study period, though with a tendency to increase towards the end of the 12 months follow-up.

Initial changes of HRV TI, SDNN and RMSSD persisted for different periods of the follow-up (Fig. 1: a, b and c). Decrease of SDNN persisted for the whole period of the study. RMSSD returned to the values which were not significantly different from the preprocedural within 3 months after the RFA. HRV TI behaved similarly within 6 months of the follow-up. Both RMSSD and HRV TI remained stable after the normalization.

Frequency domain parameters were also affected by the ablation. LF and HF powers decreased significantly comparing to preprocedural values (Fig. 2: a, b). LF component has decreased from $987 \pm 229 \text{ ms}^2$ to $603 \pm 159 \text{ ms}^2$ ($p < 0.005$) and HF power – from $1386 \pm 259 \text{ ms}^2$ to $653 \pm 193 \text{ ms}^2$ ($p < 0.05$). The extent of decrease of both parameters was not proportional leading to the increase of LF/HF ratio (Fig. 2c) from 0.726 ± 0.155 to 0.963 ± 0.277 ($p < 0.05$). Both LF and HF components remained decreased during the whole study period, but LF/HF ratio gradually decreased and in 7 months there was no statistically significant difference comparing to preprocedural values. Though initially after the ablation VLF power showed a numerical decrease from $2957 \pm 1855 \text{ ms}^2$ to $2285 \pm 1846 \text{ ms}^2$, no statistically significant change was observed comparing monthly results with preprocedural values through the study period.

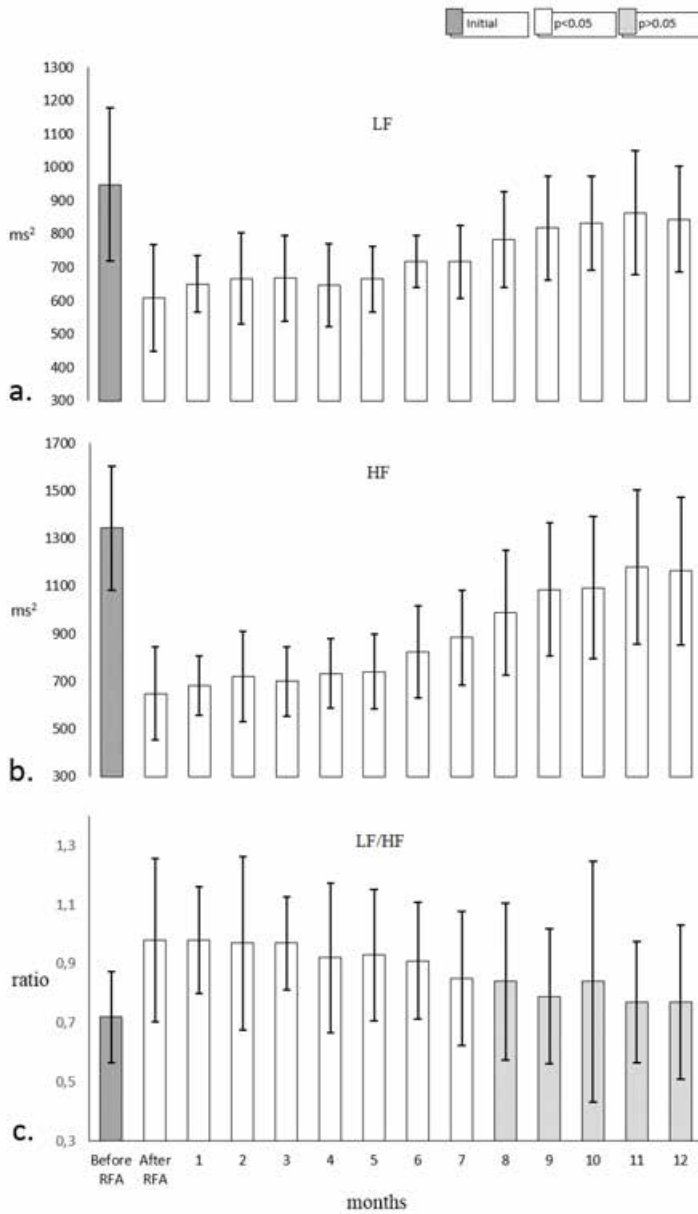


Fig. 2. Changes in frequency domain parameters during a 12-month follow-up

Both medium LF (a.) and HF (b.) components of HRV frequency domain of 13 study animals decreased immediately after the RFA in the left atrium. These changes persisted through the follow-up of 12 months. LF/HF ratio (c.) increased after the procedure but returned to preprocedural values after 7 months.

Neurohistological observations

Histological AChE staining demonstrated that majority of epicardial nerves and ganglia in the left dorsal neural subplexus were detectable in both the control and the ablated hearts (Fig. 3 a–c). However, the epicardial nerves and ganglia on the dorsal left ventricle and coronary sinus from the control animal group were evidently sharper stained for AChE in comparison to the ablated hearts as staining of intrinsic neural structures of the latter hearts was manifestly obscure at the place below the RFA sites (Fig. 3 a-b vs. Fig. 3 c).

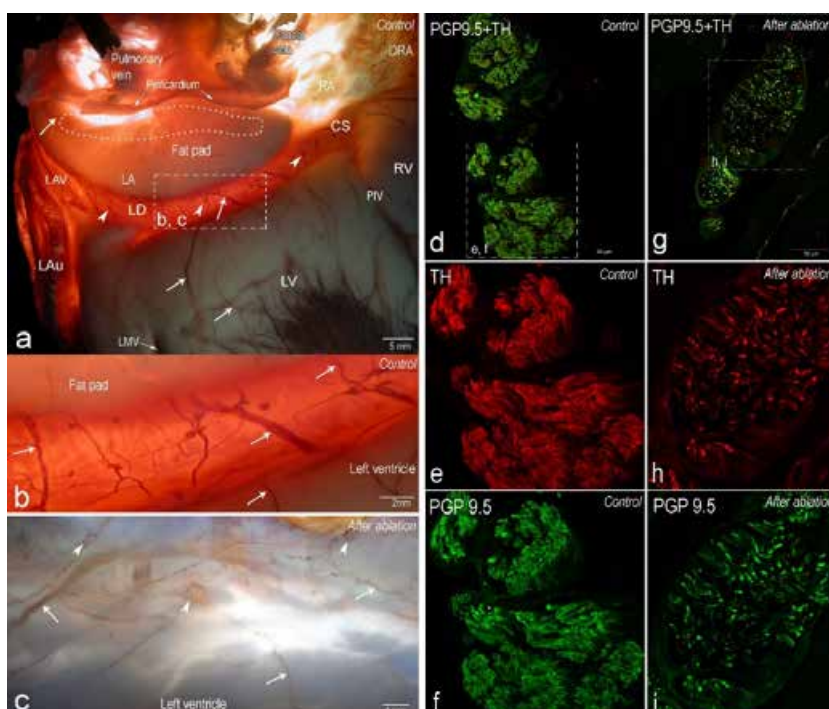


Fig. 3. *Histochemical findings after radiofrequency ablation in left atrium*
a) Left dorsal view of pressure-inflated sheep heart stained for AChE to demonstrate the epicardial nerves (white arrows) and ganglia (white arrowheads) on the dorsal left atrium, coronary sinus, and on the left dorsal ventricle. In the panel (b), the enlarged area boxed in the panel (a) illustrates the epicardial neural structures that were sampled and examined applying immunohistochemical method. (c) The dorsal left atrial area topographically identical to the boxed area in panel (a) 12 months after the epicardial RFA at the root of left and middle pulmonary veins (shown as dashed area on panel a). Note the epicardial nerves (white arrows) and ganglia (white arrowheads) that are evidently less histochemically positive for AChE following RFA at the roots of pulmonary veins. Panels d-i illustrate the transverse sections of the epicardial nerves that were immunohistochemically stained for PGP 9.5 (green colour) and TH (red colour) in control samples (d-f) and one year after RFA (g-i). Note the evidently lesser density of nerve fibres (positive for both the PGP9.5 and TH) in the experimental group nerves compared to the controls (panels e-f vs. h-i).

Immunohistochemistry for general neural marker protein gene product 9.5 (PGP 9.5) and adrenergic marker to tyrosine hydroxylase (TH) demonstrates staining both in the control and experimental animal groups. Control epicardial nerves from the left dorsal neural subplexus of all examined animals were densely and abundantly packed by nerve fibres that were evenly distributed in the transverse sections of the nerves (Fig. 3 d–f). However, immunohistochemistry performed on the transverse nerve sections extirpated from the dorsal left atrial walls of the experimental animals demonstrates a sharp decrease in number and the patchy distribution of axons positive for both the PGP9.5 and TH (Fig. 3 g–i).

Relative nerve fibre density in myocardium was calculated in both the control and the RFA hearts. Mean values were compared and results revealed a sharp decrease in relative nerve fibre density in one year after the RFA (Table 1). There was a statistically significant reduction ($p < 0,001$) of more than 20% in all the types of fibres packing the dorsal left ventricle epicardial nerves. Cholinergic denervation was most pronounced and nerve density decreased almost by half. But, compared to adrenergic, the total amount of parasympathetic fibres was very low in the areas of interest. Neural degeneration was notable even in the distal apical regions of the dorsal left ventricle. These findings confirm that neural structures were affected by RFA of the dorsal left atrial neural structures in the group of experimental animals. No signs of nerve regeneration or proliferation were observed in immunohistological samples of experimental animals.

Table 1. *Relative cardiac nerve density in control and experimental animals*

Left ventricle zone		Control group (n=3)			RFA group (n=6)		
		Base	Middle	Apex	Base	Middle	Apex
Relative nerve fibre density	Marker						
	TH	55,94±1,35 (n=90)	54,52±1,35 (n=61)	52,68±2,44 (n=42)	37,72±1,68 (n=115)	37,52±1,09 (n=171)	37,94±2,06 (n=55)
	PGP9,5	63,93±1,54 (n=58)	63,62±1,10 (n=58)	58,16±2,08 (n=45)	46,31±1,31 (n=122)	46,86±1,32 (n=155)	44,62±1,53 (n=91)
	ChAT	0,96±0,06 (n=83)	0,907±0,08 (n=63)	0,999±0,11 (n=30)	0,658±0,09 (n=97)	0,444±0,05 (n=156)	0,531±0,11 (n=45)

DISCUSSION

Evidence of ANS being involved in the pathogenesis of AF naturally suggests many therapeutic insights and clinical applications. Straightforward ablation of GP is not yet accepted as a routine therapeutic tool for AF treatment. On the other hand, it should not be considered as purely experimental. Pulmonary vein isolation for the treatment of AF is an accepted routine procedure already. Because of the anatomical overlapping of the structures it also affects the GP densely situated around PV roots. And functional modulation of cardiac ANS is notable after the PV isolation. Thus, PV isolation can be considered as a GP ablation of limited extent.

A considerable number of studies have analysed modification of ANS after PV isolation. HRV is a handy non-invasive tool universally used for this purpose. Therefore, we have accepted it as a method of ANS evaluation in our study. Frequency and time domain components of the HRV reflect the fluctuations of the autonomic input to the heart. PV ablation procedures for paroxysmal AF in humans demonstrate an acute universal adjustment of HRV time domain parameters. Usually SDNN, RMSSD and pNN50 significantly decreases after the procedure. Moreover, successful procedures (without recurrence of AF) have shown stronger effects of ablation on SDNN and RMSSD compared to those with AF recurrence. This might reflect the extent and precision of the ablation on intracardiac structures of ANS.

Changes in HRV frequency domain parameters also suggest a similar conclusion. Considering that HF band power specifically represents the vagal tone and LF bands represent both vagal and sympathetic influence, the ratio between LF/HF can mimic the autonomic balance between the vagal and sympathetic tones. There is a degree of disparity noted in studies concerning the changes in frequency domain parameters of the HRV after the PV isolation. Studies demonstrate significant decrease in LF and HF powers immediately after the procedure, which corresponds with our findings. The changes in LF/HF ratio are more contradictory. As presented in different studies LF/HF ratio has either increased, did not change or decreased. Those data might discredit the LF/HF ratio as a proper parameter for evaluation of ANS. More GP ablation–focused studies when compared to PV isolation alone have demonstrated similar results. Kang KW with colleagues enhanced circumferential PV isolation adding additional lesion connecting highest septal aspect of superior v. cava with right atrial septum for additional effect on ANS. This approach significantly decreased both time and frequency components of HRV compared to the circumferential PV isolation alone. C. Pappone has studied a group of patients after

circumferential PV isolation with additional extensive vagal denervation procedure. Additional increase of LF/HF along with usual effects of PV ablation on HRV was noted in this study. Some human studies of isolated GP ablation showed post procedural decrease in both HF and LF powers. E. Pokushalov repeatedly confirmed increased LF and decreased HF powers along with increase in LF/HF ratio after GP ablation. It shows that destruction of GP extensively modulates the autonomic regulation of the heart. Usually greater ANS modification expressed by the changes in HRV is noted in patients without AF recurrence. This observation complements the theory of ANS involvement in pathogenesis of AF and gives reason for further research. Our study results compare well with the data presented in literature as most of the HRV parameters have changed immediately after the procedure. This fact alone suggests that cardiac intrinsic ANS was affected during the procedure.

Regardless the evident acute changes in cardiac autonomic regulation after the ablation, not all the effects are permanent, which was observed in our study too. Existing data on the duration of changes of autonomic regulation are diverse. L. Callo presented data from the 19.7 ± 5.2 months' follow-up of the patients after the GP ablation. Significant modification of HRV in patients without AF recurrence lasting up to 6 months was observed. Unfortunately, no data on further changes are available, thought the follow-up was significantly longer. In patients with AF recurrence, HRV returned to initial values earlier during the period between 3 and 6 months. E. Pokushalov also observed the normalization of HRV changes in 6 months after GP ablation. C. Pappone, has observed significant HRV changes up to 3 months after extensive vagal denervation along with circumferential PV isolation. Ablation of parasympathetic vagal structures did not prolong the effect of PV isolation on the duration of the changes in HRV. Some other PV isolation studies demonstrate modification of ANS tone lasting up to 12 months after the procedure, unfortunately no longer-term follow-ups were documented. Other studies presented even shorter follow-up periods of 3 to 6 months. It is difficult to point out the possible mechanisms of ANS activity normalization after the ablation and the different duration of this process. It remains unclear whether the normalization is a natural process or a flaw in the therapy. Properties of the study population, medications and different follow-up strategies probably have a solid impact on the outcome. It is probable that parts of ANS unaffected by the ablation are partially responsible for the normalization of some HRV parameters. Also, there are different opinions about the possibility of ANS reinnervation. Q. Y. Zhao has designed an animal study on dogs showing evidence of neural remodelling after the GP ablation in the right atrium. Another study on reablation

for AF recurrence confirmed the absence of high frequency stimulation-induced vagal reflexes. These data contradict the reinnervation. On the other hand, it could be explained by a relatively short mean period between the procedures, which was about 4 months. While it is unclear how long would it take for a hypothetical reinnervation of the heart, most studies observe normalization of ANS parameters in 6 months. Our previous study on the ovine heart after GP ablation also demonstrated no histological evidence of neural regeneration. Though examination was also performed only 2–3 months after the ablation and functional status of cardiac intrinsic ANS was not monitored. Most important HRV parameters like SDNN, LF and HF values remained decreased through all the follow-up period in our study. But the tendency for a gradual shift towards the preprocedural values was notable and the study duration might have not been sufficient to deny it. An early normalisation of HRV TI and RMSSD also suggests the theory of cardiac intrinsic ANS functional reestablishment. But we did not find any signs of nerve regeneration during the histological evaluation. This hint of existing alternative mechanisms, such as intact neural structures overtaking the role of the damaged ones, or insufficient amount of the ablation to destroy the structures responsible for neural functionality.

Ganglionated plexuses in the left atrium are of very intricate composition of sympathetic, parasympathetic and mixed nerves. This makes the selective ablation almost impossible and isolated effect on one of the systems cannot be expected. It is also important to acknowledge that HRV reflects the fluctuations of ANS without a real quantitative ability. According to the changes in HRV parameters respective to both parts of the ANS they both were affected. But we could speculate whether the sympathetic or parasympathetic component of the ANS was affected more in our study. Considering that the changes in SDNN value in our study persistent over the whole follow-up period compared to only transient decrease in RMSSD values it suggests a more pronounced RFA effect on sympathetic innervation of the heart. The fact that LF/HF ratio was above the 1,0 the whole study, also shows the parasympathetic dominance, despite the doubt of the accuracy of this criterium. And these findings can be explained. Cholinergic innervation in the LA is sparse, which was also notable during the histological examination. This way they were damaged less than abundant adrenergic fibres during the RFA resulting in more expressed sympathetic denervation.

Histological evaluation of the heart after the RFA allows us to exclude any speculations about the effectiveness of the procedure. Nerve degeneration proves the effect of the RFA and excludes the possible effect of the thoracotomy on the HRV changes which would have been transient. Observed degeneration of the nerves in the apex of left ventricle, which is very

distal from the site of the ablation, shows the possibly large area of the effect of perceptibly small area of direct impact. Denervation persisting through the 12-month follow-up suggests the process being irreversible and needs further investigation of the long-term effects of extensive ablation in such conditions as a heart failure.

While we performed ablation on the ovine heart, our results had similar trends as in human studies. It might suggest that autonomous modulation works similarly in both species. Thus, regarding autonomic innervation, ovine heart can be considered as a study object. Moreover, experimental approaches like histological evaluation otherwise inappropriate in human studies make this method particularly valuable. We recognize the limitation of our study as we did not control for possible acute effects of thoracotomy and pericardial sack opening on the HRV. But as thoracic and pericardial nerves have no direct interconnections with intracardiac nerves we did not expect a strong HRV response to the procedure.

As we did not monitor any important arrhythmia during the follow-up, so it was not possible to compare the results with the disease epidemiology in humans.

CONCLUSIONS

1. The heart of the sheep is morphologically and physiologically similar to the human heart. This makes heart rate and respiratory rate along with HRV parameters similar between the species. Considering this, sheep are relevant for both short and long-term animal experiments.
2. Histological and functional changes that were observed in our study after the epicardial RFA procedure prove, that this procedure does affect the function and structure of the cardiac intrinsic nervous system.
3. Even a small volume RFA procedure in the heart results in the degeneration of the nerve terminals distal to the ablation site.
4. Statistically significant decrease in heart rate variability parameter like SDNN, HF and LF band power values, persistent over 12 months follow-up after the epicardial RFA suggest of an irreversible nature of these changes.
5. The early normalisation of RMSSD and HRV TI and tendency of SDNN, LF and HF band power to increase towards the preprocedural values suggest of the existing compensatory mechanisms, that partially restore the function of the intrinsic cardiac autonomous nervous system. This can be associated with AF recurrence after the interventional treatment. No signs of nerve regeneration were observed during the

immunohistochemical evaluation suggesting the compensatory mechanisms of different nature.

6. According to the HRV changes after the procedure sympathetic tone was reduced in greater scale than parasympathetic.

CURRICULUM VITAE

Name Surname	Vilius Kviesulaitis
Date of birth	11/11/1981
Current employer and contacts	Lithuanian University of Health Sciences Kauno klinikos, Eivenių 2, Kaunas, Lithuania Tel.: +37065770732 E-mail: viliuskviesulaitis@yahoo.com
Work qualification, license	Doctor cardiologist, License nm.: MPL-17039
Scientific degree	Magister of medicine in 2006 06 20, Kaunas University of Medicine
Education: Date of qualification and institution	Doctor cardiologis qualification 2011 07 01, Lithuanian Ministry of Health
Current employment	2011–2016 Doctor cardiologist at the Lithuanian University of Health Sciences Kauno klinikos, Clinics of Cardiology since 2011. Current position as doctor electrophysiologist
Publications for 5 years	Added in the manuscript
Course of good clinical practice in last 5 years	2015
Attended clinical trials	Panorama 2 (2012–2017)

PADĖKA

Dėkoju Vaclovui Eidukevičiui už nuoširdų bendradarbiavimą tyrimo metu. Reiškiu jums nuoširdžią padėką už pagalbą įsigyjant ir rūpinimasi eksperimente dalyvavusiais gyvūnais viso tyrimo eigoje.

Dėkoju veterinarijos gydytojui Evaldui Diržinauskui už pagalbą atliekant chirurginę tyrimo dalį ir veterinarinę gyvūnų priežiūrą tyrimo eigoje.

Taip pat dėkoju Augustinui Bieliniui ir Viktorijai Vilkickaitei bei visiems dalyvavusiems tyrime už pagalbą atliekant sunkų ir kruopštų darbą.