

Summary

Even though direct mortality from acute myocardial infarction has dropped from 15% to 3,5-5%, cardiovascular disease remains the main cause of mortality in Europe. Over the last century many therapeutic advances have been made that have successfully improved not only mortality but also morbidity. Still there is room for further improvement.

Percutaneous coronary intervention can deliver brisk reperfusion which reduces ischemic time and therefore the extent of cell death. However, reperfusion has also shown to induce extra cell death called reperfusion injury. So while it is essential to achieve reperfusion, the process also has an unfavorable side effect. Therefore a lot of research focusses on preventing reperfusion injury. Because of the complex pathophysiology of reperfusion injury there has not been much success in finding a solution. One of the factors that complicates this research is that a reliable marker for reperfusion injury is not yet available.

In this thesis we analyze the potential of reperfusion arrhythmias as a marker for reperfusion injury. In **chapter 2** we analyzed whether the presence of a burst of ventricular arrhythmias (VA) was associated with larger myocardial infarction using cardiac MRI. For this purpose 196 patients from the PREPARE and MAST studies who had 24-hour, continuous, 12-lead Holter registration, started before primary percutaneous coronary intervention were analyzed. All patients had brisk TIMI (thrombolysis in myocardial infarction) 3 flow and stable ST-recovery. VA bursts were identified against subject-specific background VA rates using a previously published statistical outlier method. Infarct size was assessed using DE-CMR. VA bursts were present in 154/196 (79%) of patients. VA bursts were associated with significantly larger infarct size in the population as a whole (median 11.3% vs 5.3%; $p=0.001$) and also when divided in non-anterior (median 9.9% vs 4.9%; $p=0.003$) and anterior myocardial infarction (median 21.4% vs 12.0%; $p = 0.48$), the latter not reaching statistical significance due to the small subset of patients. From this we concluded that beyond the classical markers of "optimal" reperfusion such as TIMI 3 flow and stable ST-segment recovery, VA bursts occurring during the reperfusion phase are an early electrobiomarker of larger Infarct size.

After this we sought to analyze whether this relation was caused by suboptimal microvascular reperfusion. In **chapter 3** we analyzed if VA burst's association with larger infarct size remained if we excluded patients who had a suboptimal myocardial blush grade (MBG) of 2 or less. A total of 126 STEMI patients were studied with 24 h continuous, 12-lead Holter monitoring. MBG was determined and VA bursts were identified against subject-specific background VA rates. Delayed-enhancement cardiovascular magnetic resonance imaging was used to determine infarct size. In the group with MBG 3 no significant differences were found for baseline characteristics between burst versus no burst (102 vs. 24). In those with optimal epicardial and microvascular reperfusion (TIMI 3, stable ST-recovery, and MBG 3), VA burst was associated with larger infarct size ($N = 102/126$; median 11.0 vs. 5.1%; $p = 0.004$). In the event of MBG 3, VA bursts were associated with significantly larger infarct size.

Chapter 4 further analyzed whether VA bursts remained associated with larger infarct size in the setting of optimal microvascular reperfusion determined by microvascular obstruction (MVO) on cardiac MRI. All 65 STEMI patients from the Maastricht ST elevation (MAST) study with brisk epicardial flow (TIMI 3) and complete ST recovery post-percutaneous coronary intervention were included. Using 24-hour Holter registrations from the time of admission, VA bursts were again identified against subject-specific Holter background VA rates using a statistical outlier method. MVO and final infarct size were determined using delayed enhancement cardiac MRI. MVO was present in 37/65 (57%) of patients. Infarct size was significantly smaller in the group without MVO (median 9.4% vs. 20.5%; $p < 0.001$). Infarct size in the group with MVO did not differ depending on VA burst ($n = 28/37$; median 20.8% vs. 19.7%; $p = 0.64$). However, in the group without MVO, VA burst was associated with significantly larger IS ($n = 17/28$; median 10.5% vs. 4.1%; $p = 0.037$). In multivariable analyses, VA burst as well as anterior infarct location remained independent predictors of larger infarct size. Therefore we concluded that in the presence of suboptimal reperfusion with MVO by CMR, VA burst does not further define MI size. However, with optimal TIMI 3 reperfusion and optimal microvascular perfusion (i.e. no MVO), VA burst is associated with larger IS, indicating that VA burst is a marker of additional cell death.

Another explanation for the relation of VA burst with larger infarct size besides being a marker of reperfusion injury could have been that VA bursts are a sign of larger area at risk. Therefore in **chapter 5** we analyzed whether there was a difference in area at risk between the group with VA burst versus the group without VA burst. Included were 68 patients with ST-elevation myocardial infarction from the MAST study with 24-hour, continuous, 12-lead Holter monitoring initiated prior to primary percutaneous coronary intervention (PCI) resulting in TIMI 3 flow post PCI. VA bursts were again identified against subject-specific background VA rates using a previously validated statistical outlier method. Infarct size, and infarct endocardial surface area (ESA) were obtained using cardiac MRI at mean 4.9 days after admission. ESA is a method to determine area at risk. VA bursts were present in 69% (45/65) of patients. Infarct size was significantly smaller in the group without VA bursts (median 9.3% vs 17.0%; $p = 0.025$). Infarct ESA did not significantly differ between the population with and without VA burst; median 24.3% vs 20.0%; $p = 0.15$. As a result we concluded that VA bursts are a marker for larger infarct size independent of area at risk, assessed by surrogate markers. These findings support the hypothesis that VA bursts are a marker of reperfusion damage occurring downstream at myocellular level.

To further support our hypothesis that VA burst is a marker of reperfusion injury we reviewed the pathophysiology of reperfusion arrhythmias and their relation with pathophysiology of reperfusion injury. While both conditions are seen as separate processes, recent research has shown that reperfusion arrhythmias are related to larger infarct size. The pathophysiology of fatal reperfusion injury revolves around intracellular calcium overload and reactive oxidative species inducing apoptosis by opening of the mitochondrial protein transition pore. The pathophysiological basis for reperfusion arrhythmias is the same intracellular calcium overload as the one causing fatal

reperfusion injury. Therefore both conditions should not be seen as separate entities but as one and the same process resulting in two different visible effects. Reperfusion arrhythmias could therefore be seen as a potential marker for fatal reperfusion injury.

Samenvatting

Ondanks dat mortaliteit als een direct gevolg van een acuut hartinfarct is afgenomen van 15% naar 3,5-5% blijven hart- en vaatziekten de nummer 1 doodsoorzaak in Europa. De laatste eeuw zijn er veel ontwikkelingen geweest, waardoor niet alleen de mortaliteit maar ook de morbiditeit als gevolg van een hartinfarct zijn verbeterd. Er is desondanks nog zeker ruimte voor verbetering.

Het openen van een afgesloten kransslagader met een katheter tijdens de acute fase van een hartinfarct (ook wel percutane coronaire interventie of dotteren genoemd), zorgt voor snelle reperfusie (herstel van de doorstroming) van het eerdere ischemische (door afsluiting van de toevoerende kransslagader van zuurstof verstoken) gebied waardoor de ischেমieduur afneemt en daardoor de hoeveelheid cellen die als een gevolg hiervan dood gaan. Echter is ook aangetoond dat reperfusie extra celdood kan veroorzaken, wat reperfusieschade wordt genoemd. Dus ondanks dat het essentieel is om reperfusie te verkrijgen, heeft dit proces ook een negatieve kant. Daarom is er veel onderzoek gaande om het heropenen van de kransslagader te combineren met farmaca of technieken waarmee reperfusieschade voorkomen kan worden. Vanwege de complexe pathofysiologie van reperfusieschade is er nog niet veel succes geweest op dit gebied. Een van de factoren die het onderzoek bemoeilijkt is dat er nog geen goede marker (meetbaar biologisch signaal) is voor reperfusieschade.

In dit proefschrift onderzoeken we de waarde van reperfusie aritmieën om als marker voor reperfusieschade te dienen. Tijdens het opengaan van het bloedvat treden namelijk bij het merendeel van de patiënten impulsen op uit het weer vers doorstroomde gebied in de hartkamers (ventrikels), die op het electrocardiogram zichtbaar zijn als ventriculaire ritmen. Het betreft alleen optredende impulsen (ventriculaire extrasystolen) en in reeksen optredend en in een versneld tempo (geacceleerde ventriculaire ritmen). Deze doven meestal na een aantal minuten weer uit en worden daarom een ontlading (burst) van ventriculaire aritmieën genoemd. In een eerdere studie van onze groep werd een statistische methode ontwikkeld om zo een burst te identificeren door deze te onderscheiden van willekeurig optredende ventriculaire ritmestoonissen.

In **hoofdstuk 2** staat ons onderzoek beschreven naar het verband tussen het optreden van een burst van ventriculaire aritmieën en grotere hartinfarcten. Hiertoe werden 196 patiënten van zowel de PREPARE trial als de MAST studie geïnccludeerd. Dezen hadden een 24 uren holter met continue 12-afleidingen registratie die was gestart voor het ontstaan van reperfusie door middel van percutane coronaire interventie. Alle patiënten hadden snelle goed herstelde doorstroming van de afgesloten kransslagader (TIMI 3 flow) en een stabiel herstel van de ischemische tekenen op het electrocardiogram (ST-elevatie). De infarctgrootte werd bepaald met behulp van magnetische beeldvorming van het hart (cardiale MRI of CMR). Burst van ventriculaire aritmieën waren aanwezig bij 154 van de 196 (79%) patiënten. Het optreden van bursts van ventriculaire aritmieën ging gepaard met grotere infarcten dan bij patiënten waarbij geen bursts optraden. Dit gold zowel voor de gehele populatie (mediaan 11.3% vs 5.3%; $p=0.001$), als voor de subgroepen met niet-voorwand infarcten (mediaan 9.9% vs 4.9%;

$p=0.003$) en infarcten van de voorwand (mediaan 21.4% vs 12.0%; $p = 0.48$). Bij de voorwandinfarcten werd geen significant resultaat bereikt omdat het een kleine populatie betrof. Op basis van deze resultaten concludeerden we dat naast de klassieke markers van optimale reperfusie, zoals TIMI 3 flow en stabiel ST-segment herstel, bursts van ventriculaire aritmieën die ontstaan gedurende de reperfusie fase een vroege electrobiomarker zijn voor een groter hartinfarct.

Na dit onderzoek hadden we als doel om verder te analyseren of de relatie van een burst van ventriculaire aritmieën met een groter infarct misschien kwam doordat meer stroomafwaarts de kleine bloedvaatjes in de hartspier niet voldoende doorstroomd werden na heropening van de kransslagader (suboptimale microvasculaire reperfusie). Dit zou kunnen gebeuren door bv ischemische schade van deze microvasculatuur of door versleping van stolsels vanaf de afsluitingsplek meer stroomafwaarts. Dit kan zichtbaar gemaakt worden met röntgenfilms tijdens de dotterprocedure als het niet verschijnen van röntgencontrast in het gereperundeerde gebied (afwezigheid van myocardiale blush, geclassificeerd als blush graad ≤ 2). In **hoofdstuk 3** onderzochten we of het verband tussen bursts van ventriculaire aritmieën en grotere infarcten bleef als we alle patiënten met een suboptimale myocardiale blush score (MBG) van 2 of minder excludeerden. Hiervoor werden 126 patiënten geïncludeerd. Cardiale MRI werd gebruikt om infarctgrootte te bepalen. In de groep met MBG 3 (intacte microvasculatuur) werden geen significante verschillen gevonden voor basiskarakteristieken tussen de groepen met en zonder burst (102 vs. 24 patiënten). In de groep met optimale epicardiale en microvasculaire reperfusie (TIMI 3, stabiel ST-segment herstel en MBG 3, was er een verband tussen het optreden van bursts van ventriculaire aritmieën en grotere hartinfarcten ($N = 102/126$; mediaan 11.0 vs. 5.1%; $p = 0.004$). Hieruit concludeerden we dat in de aanwezigheid van optimale MBG score (MBG =3) burst van ventriculaire aritmieën waren geassocieerd met significant grotere infarcten. Dit betekent dus dat de oorzaak van ventriculaire aritmieën dus verder stroomafwaarts gezocht moest worden, d.w.z. ter hoogte van de hartspiercellen zelf.

Suboptimale microvasculaire reperfusie kan nog nauwkeuriger bepaald worden met behulp van cardiale MRI. Het wordt daar zichtbaar onder de naam microvasculaire obstructie (MVO). In **hoofdstuk 4** wordt onderzocht of in de afwezigheid van MVO (intacte microvasculatuur) het optreden van bursts van ventriculaire aritmieën gepaard gaat met grotere hartinfarcten.. Alle 65 patiënten van de Maastricht ST-elevation (MAST) studie met snelle volledige epicardiale reperfusie (TIMI 3) en volledig ST-segment herstel na percutane coronaire interventie werden geïncludeerd. Zoals in de voorgaande studies werd met behulp van 24 uren holter registraties, die werden gestart vanaf opname in het ziekenhuis, bursts van ventriculaire aritmieën herkend. MVO was aanwezig in 37 van de 65 patiënten (57%). Hartinfarcten waren significant kleiner in de groep zonder MVO (mediaan 9.4% vs. 20.5%; $p < 0.001$). In de groep met MVO maakte het voor de grootte van het hartinfarct niet uit of er wel of niet een burst van ventriculaire aritmieën was ($n = 28/37$; mediaan 20.8% vs. 19.7%; $p = 0.64$). In de groep zonder MVO daarentegen was er wel sprake van een significant verschil, waarbij de infarcten groter waren als er een burst van ventriculaire aritmieën was ($n = 17/28$; mediaan 10.5% vs. 4.1%; $p = 0.037$). Bij multivariaat analyse bleven een burst van ventriculaire aritmieën en ook de

aanwezigheid van een voorwandinfarct onafhankelijke voorspellers van een groter hartinfarct. Op basis van deze resultaten concludeerden we dat in de aanwezigheid van suboptimale reperfusie, waarbij MVO zichtbaar is op MRI afbeeldingen, een burst van ventriculaire aritmieën geen verdere aanwijzingen geeft over de grootte van het infarct. Echter, als er zowel optimale epicardiale reperfusie (TIMI 3) als optimale microvasculaire reperfusie is (geen MVO), dan gaat de aanwezigheid van burst van ventriculaire aritmieën gepaard met een groter hartinfarct. Bursts als marker voor een groter infarct worden dus niet verklaard door beschadigde microvasculatuur, maar moeten hun oorzaak dus meer stroomafwaarts hebben; d.w.z. op het niveau van de hartspiercellen zelf.

Een andere verklaring voor de relatie van een burst van ventriculaire aritmieën en grotere hartinfarcten kan zijn dat het optreedt bij een groter ischemisch gebied dat gereperfundeerd wordt. Om dit te onderzoeken hebben we in **hoofdstuk 5** bepaald of er een verschil is in de grootte van het ischemische gebied (het risicogebied) tussen de groepen met en zonder een burst van ventriculaire aritmieën. Hiervoor werden 65 patiënten geïncludeerd van de MAST studie. Ook hier weer werden continue 12 afleidingen, 24-uurs holter registraties gemaakt startend voor de percutane coronaire interventie. Alle patiënten hadden volledige epicardiale reperfusie na de interventie (TIMI 3 flow) het aanvankelijke risicogebied (area at risk) en de uiteindelijke infarctgrootte (final infarct size) werden bepaald met cardiale MRI. De area at risk werd bepaald door de grootte van de ischemische binnenwand te bepalen omdat daar het infarct begint (endocardial surface area (ESA)). Bursts van ventriculaire aritmieën waren aanwezig bij 69% (45/65) van de patiënten. De infarctgrootte was zoals eerder significant kleiner in de groep zonder bursts van ventriculaire aritmieën (mediaan 9.3% vs 17.0%; $p = 0.025$). Infarct ESA verschilde echter niet significant tussen beide groepen met en zonder bursts van ventriculaire aritmieën; mediaan 24.3% vs 20.0%; $p = 0.15$. Op basis van deze resultaten concluderen wij dat bursts van ventriculaire aritmieën niet een uiting zijn van een aanvankelijk groter ischemisch gebied (area at risk), en omdat ze optreden bij een geopende kransslagader en intacte microvasculatuur dus een marker zijn van schade die in de hartspiercellen (op myocellulair niveau) zelf plaatsvindt.

Om onze hypothese dat bursts van ventriculaire aritmieën een marker zijn van reperfusie schade verder te ondersteunen, hebben we een review geschreven over de pathofysiologische relatie tussen reperfusie-aritmieën en reperfusieschade op basis van bestaande literatuur. Beide processen werden voorheen gezien als gescheiden processen, maar recent onderzoek van onze groep heeft laten zien dat reperfusie-aritmieën gerelateerd zijn aan grotere hartinfarcten. De pathofysiologische basis van reperfusie- schade draait om een overbelasting van intracellulair calcium in combinatie met oxidatieve stress waardoor de mitochondriale eiwittransitie porie open gaat en er apoptose (geprogrammeerde celdood) ontstaat. De pathofysiologische basis van reperfusie-aritmieën wordt door dezelfde intracellulaire overbelasting van calcium gevormd. Om deze reden kunnen reperfusie-schade en reperfusie-aritmieën niet als twee gescheiden entiteiten gezien worden, maar als hetzelfde proces dat zich op twee verschillende manieren uit. Daarom kunnen reperfusie-aritmieën gezien worden als een marker van reperfusieschade.

