

Zawał mięśnia sercowego u myszy – jak stworzyć dobrze funkcjonujący model doświadczalny

Myocardial infarction in mice – tips and pitfalls on the surgical and echocardiographic techniques

Joanna Śliwka¹, Bartłomiej Kumasza², Marcin Garbac², Sławomir Paku², Karolina Nowak², Maciej Domagała², Tomasz Jaźwiec², Mateusz Zandecki², Tomasz Cichoń³, Jerzy Nożyński¹, Ryszard Smolarczyk³, Stanisław Szala³, Marian Zembala¹, Michał Zembala¹

¹Katedra i Oddział Kliniczny Kardiologii i Transplantologii Śląskiego Centrum Chorób Serca w Zabrzu

²Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Oddziale Klinicznym Kardiologii i Transplantologii Śląskiego Centrum Chorób Serca w Zabrzu

³Zakład Biologii Molekularnej Centrum Onkologii – Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Gliwicach

Kardiologia i Torakochirurgia Polska 2012; 2: 243–251

Streszczenie

Doświadczenia przedkliniczne na zwierzętach eksperymentalnych są nieodzownym elementem badania skuteczności i bezpieczeństwa zarówno nowych technologii medycznych i farmakologicznych, jak i procedur leczniczych. Model niedokrwienia mięśnia sercowego u myszy, którego istotą jest selektywne, chirurgiczne zamknięcie gałęzi zstępującej lewej tętnicy wieńcowej, jest modelem znanym, jednakże w dostępnym piśmiennictwie metoda ta nie jest opisywana na tyle dokładnie, aby podczas pierwszych doświadczeń uzyskać zamierzony efekt. Techniczne aspekty są często pomijane lub opisane bardzo enigmatycznie, uniemożliwiając osiągnięcie powtarzalnego wyniku. Dlatego też celem niniejszego opracowania jest opisanie technicznych zagadnień przeprowadzenia zabiegu podwiązania LAD u myszy wraz ze wskazaniem błędów, powikłań oraz trudności chirurgicznych.

Słowa kluczowe: zawał mięśnia sercowego, zwierzęcy model doświadczalny.

Abstract

Cardiovascular research on myocardial physiology is often based on animal models of heart ischaemia. The model of left anterior descending (LAD) ligation in the mouse has been widely used to test various experimental hypotheses. However, there are significant discrepancies among studies not only in terms of technical aspects of the model, but more importantly, in early and late outcomes. Moreover, there is no step-by-step guide on how to create the model, avoid difficulties, pitfalls and technical hazards, and thus minimize early and late mortality. This paper is intended to serve as a reference for cardiovascular laboratories wishing to successfully start and maintain a reliable and reproducible model of LAD ligation in mice.

Key words: myocardial infarct, research animal model.

Wstęp

Doświadczenia przedkliniczne na zwierzętach eksperymentalnych są nieodzownym elementem badania skuteczności i bezpieczeństwa zarówno nowych technologii medycznych i farmakologicznych, jak i procedur leczniczych. Na przestrzeni lat opracowano wiele modeli zwierzęcych imitujących patologię człowieka po to, by móc sprawnie i wiarygodnie ocenić efekt nowo wprowadzanej terapii. W chorobach serca i naczyń wykorzystywane są zarówno

duże zwierzęta doświadczalne (świnia, owca), szczególnie przydatne w modelach stworzonych na potrzeby testowania nowych technologii medycznych (urządzenia wspomagające pracę lewej komory, zastawki serca), jak i małe zwierzęta doświadczalne (szczury, myszy). Małe zwierzęta doświadczalne oferują niezwykle szerokie możliwości badawcze, począwszy od doświadczeń z farmakoterapii poprzez modele cukrzycy, hipercholesterolemii aż do genetycznie modyfikowanych zwierząt pozwalających na zaawansowane

Adres do korespondencji: lek. med. Joanna Śliwka, Katedra i Oddział Kliniczny Kardiologii i Transplantologii, Śląskie Centrum Chorób Serca, ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 41-800 Zabrze; tel. +48 32 373 36 04, e-mail: jsliwka@scs.pl

transgeniczne przeszczepy tkanek i narządów. Ponadto oczywistą zaletą pozostanie nieskomplikowana i relatywnie niskokosztowa hodowla, a także krótki okres rozrodczy (10 tygodni) oraz tylko 19-dniowy czas rozrodu.

Na potrzeby doświadczeń związanych z naprawą i odbudową niedokrwionego mięśnia sercowego materiałem biologicznym pochodzącym od człowieka, konieczne jest zastosowanie skutecznego i powtarzalnego modelu zawału serca u zwierzęcia genetycznie zmodyfikowanego. Model myszy, którego istotą jest selektywne, chirurgiczne zamknięcie gałęzi zstępującej lewej tętnicy wieńcowej, jest modelem uznanym, o potwierdzonej wielokrotnie efektywności [2–15]. Jednakże w dostępnym piśmiennictwie metoda ta nie jest opisywana na tyle dokładnie, aby podczas pierwszych doświadczeń uzyskać zamierzony efekt. Techniczne aspekty są często pomijane lub opisane bardzo enigmatycznie, uniemożliwiając osiągnięcie powtarzalnego wyniku. Dlatego też celem niniejszego opracowania jest opisanie technicznych zagadnień przeprowadzenia zabiegu podwiązania LAD u myszy wraz ze wskazaniem błędów, powikłań oraz trudności chirurgicznych. Uwagi o szczególnym znaczeniu oznaczono graficznie (UWAGA →), wskazując jednocześnie sposób rozwiązania problemu.

Materiał i metody

Doświadczenie przeprowadzono zgodnie z Ustawą o doświadczeniach na zwierzętach z dnia 21 stycznia 2005 r. i za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach. W doświadczeniach wykorzystano samce myszy szczepu C57BL/6 (masa ciała średnio 21,5 g). Wstępnie zwierzęta znieczulano wziewnie przy użyciu izofluranu w stężeniu 3,5% w komorze do znieczuleń (VevoAnesthesia System – VAS). Komora VAS jest prostym urządzeniem, zbudowanym z przezroczystego materiału z podajnikiem gazu anestezjologicznego. VevoAnesthesia System jako element systemu Vevo jest wygodnym w zastosowaniu udogodnieniem umożliwiającym bezstresowe dla zwierzęcia, szybkie wprowadzenie w stan znieczulenia. Jednakże w przypadku ograniczonego budżetu możliwe jest wykonanie podobnego urządzenia samodzielnie.

Intubacja

Intubacja myszy nie nastręcza trudności, gdy opanowane zostaną jej podstawy. Konieczna jest mała, zakrzywiona pęseta (jako laryngoskop) oraz wenflon o rozmiarze 20G, najlepiej przycięty do długości ok. 2,5 cm (rurka intubacyjna). Dobrze mieć także stępną igłę do tegoż wenflonu (20G), która służyć będzie jako prowadnica rurki intubacyjnej. Rurkę intubacyjną nakładano na prowadnicę tak, aby końcówka igły nieznacznie wystawała.

Znieczuloną mysz układano na grzbiecie, opierając jej potylicę na zwiniętym gaziku celem odgięcia głowy. Rozwierano jamę gębową palcami i utrzymywano ją w tej pozycji, zakładając za górne siekacze umocowaną do stołu operacyjnego gumkę. Skierowywano światło lampy na szyję myszy. Uwidocznienie wejścia do krtani uzyskiwano

poprzez odsunięcie języka na bok pęsetą anatomiczną utrzymaną w jednej dłoni. Jednocześnie stosowano lekki ucisk szyi palcem tej samej dłoni. W momencie rozwarcia szpary głośni wprowadzano do tchawicy utrzymaną w drugiej dłoni prowadnicę z rurką intubacyjną. Koniec rurki powinien się znajdować ok. 0,5 cm poniżej wejścia do krtani.

Kolejnym krokiem było podłączenie do rurki intubacyjnej zestawu do wentylacji i sprawdzenie, poprzez obserwację ruchów klatki piersiowej, czy jej położenie jest prawidłowe. UWAGA → Ze względu na krótki czas działania izofluranu istotne jest wcześniejsze skompletowanie zestawu intubacyjnego i odpowiednie jego ułożenie – laryngoskop po jednej, a prowadnica z rurką intubacyjną po drugiej stronie stolika operacyjnego. Takie ustawienie narzędzi pozwala operatorowi na swobodne ich pobieranie i odkładanie bez konieczności odrywania wzroku od myszy. UWAGA → Zaraz po weryfikacji położenia rurki intubacyjnej trzeba ją zabezpieczyć, przyklejając do stołu operacyjnego, by nie uległa przypadkowemu przesunięciu podczas zabiegu chirurgicznego.

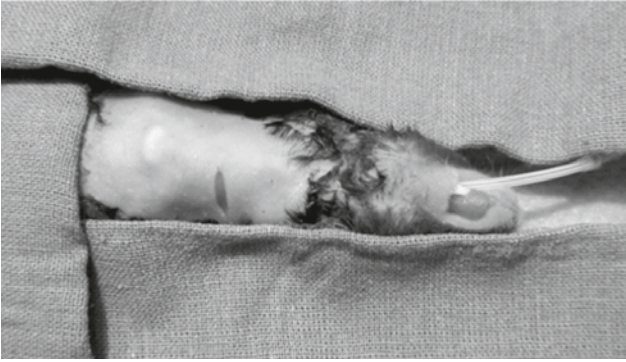
Wentylacja

Sztuczną wentylację prowadzono przy użyciu systemu MiniVent Model 845 (Harvard Apparatus, USA), z standardowymi parametrami częstości oddechów 120/min i objętości oddechowej 200–250 μ l, z zastosowaniem wziewnego znieczulenia izofluranem w stężeniu 1,5%. Aparat MiniVent pozwala na prowadzenie mechanicznej wentylacji małych zwierząt (mysz, szczur) z objętością wdechową 30–350 μ l z częstością 60–400 oddechów/min.

Tak przygotowane zwierzę spoczywa na stoliku operacyjnym, najlepiej podgrzewanym, by utrzymać temperaturę ciała na poziomie $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Stoły operacyjne dla małych zwierząt doświadczalnych znajdują się w ofercie wielu znanych producentów (Harvard Apparatus, Holliston, USA). Jednakże ze względów ekonomicznych postanowiliśmy zlecić wykonanie takiego urządzenia firmie polskiej na podstawie opracowanych przez nasz zespół specyfikacji. Tak powstały produkt w zupełności spełnia oczekiwania, ponieważ umożliwia przeprowadzanie operacji na małych zwierzętach (mysz, szczur) z możliwością regulacji temperatury w zakresie $20\text{--}80^\circ\text{C}$ oraz regulacji pochylenia platformy roboczej we wszystkich kierunkach.

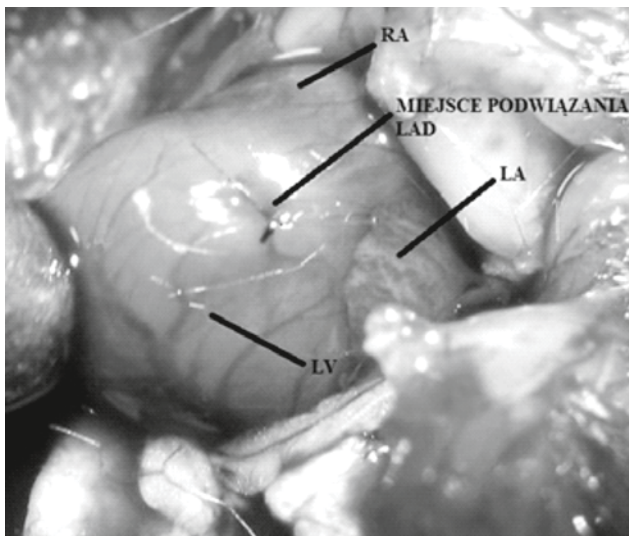
Zabieg chirurgiczny

Po wcześniejszym wygoleniu lewej strony klatki piersiowej w odległości ok. 2 mm od mostka wykonywano skośne cięcie o dł. 8 mm w kierunku lewego barku na wysokości 3. lub 4. przestrzeni międzybrowej (ryc. 1.) Po uwidocznieniu dużego, powierzchownego naczynia żylnego przebiegającego równolegle do mostka, ok. 3 mm od jego lewej krawędzi, a także powięzi (przezroczystej, cienkiej błonki) wraz z mięśniem piersiowym większym, preparowano okolicę, oddzielając tenże mięsień w kierunku bocznym, nie nacinając go, co pozwalało na mało traumatyczne dotarcie do głębszej warstwy mięśni klatki piersiowej. Kolejno,



Ryc. 1. Zaintubowana mysz przygotowana do zabiegu chirurgicznego podwiązania LAD (miejsce nacięcia skóry)

delikatnymi ruchami pęsetą anatomiczną, nad górnym brzegiem 3. lub 4. żebra docierano do opłucnej ściennej, którą nożyczkami chirurgicznymi przecinano, wchodząc bezpośrednio do lewej jamy opłucnej. Opłucną nacinano na odcinku ok. 5 mm, kierując się przyśrodkowo do lewego brzegu mostka (uwaga na tętnicę piersiową wewnętrzną lewą). Do odsuwania żeber i dobrego wglądu w jamę klatki piersiowej używano rozwieracza do naczyń wieńcowych stosowanego u ludzi (Coronary Artery Retraction Clip, Surge Cardiovascular, USA). Po odnalezieniu i odsunięciu do dołu lewego płuca, lekko z zewnątrz uciskając klatkę piersiową, uwidaczniano przednio-boczną ścianę lewej komory otoczoną cienkim, przezroczystym workiem osierdziowym. W celu dokładnej lokalizacji gałęzi zstępującej przedniej (ang. *left anterior descending* – LAD) istotne było odnalezienie uszka lewego przedsionka, spod którego wyraźnie widoczny był proksymalny odcinek LAD. Gałąź zstępującą przednią uwidaczniano na przedniej powierzchni serca jako pulsującą jasną smugę, biegnącą pośrodkowo w kierunku koniuszka serca. W kolejnym etapie, po względnym ustabi-



Ryc. 2. Serce myszy po podwiązaniu LAD, kontrolne podanie kontrastu *in vivo*; RA – prawy przedsionek, LA – lewy przedsionek, LV – lewa komora

lizowaniu serca pomiędzy palcami operatora, podktuowano i podwiązywano LAD 1–2 mm poniżej uszka lewego przedsionka przy użyciu nici polipropylenowej (Prolene 8-0, Ethicon). Potwierdzeniem całkowitego zamknięcia naczynia była natychmiastowa zmiana koloru (zblednięcie) obszaru lewej komory zaopatrywanego przez LAD (ryc. 2.). Jamę klatki piersiowej dokładnie osuszano z krwi gazikami, odmę niwelowano, uciskając klatkę piersiową i niejako „wyciskając” powietrze w niej zawarte. Zaniechanie tych czynności skutkowało pojawianiem się dużych artefaktów w późniejszym kontrolnym badaniu echokardiograficznym. Ścianę klatki piersiowej zamykano poprzez zbliżenie 3. i 4. żebra dwoma szwami (Prolene 5-0, Ethicon). Warstwę mięśni zamykano standardowo przy użyciu polipropylenowego szwu (Prolene 8-0, Ethicon). Miejscowo znieczulano mięśnie i tkankę podskórną 1-procentowym roztworem lignokainy (ok. 1–2 krople). Skórę zszywano pojedynczymi, 5 lub 6 szwami tego samego rozmiaru. Zwierzę wybudzano i po uzyskaniu pewności powrotu własnego oddechu ekstubowano. Średni czas trwania zabiegu wyniósł 20 min.

Okres pooperacyjny

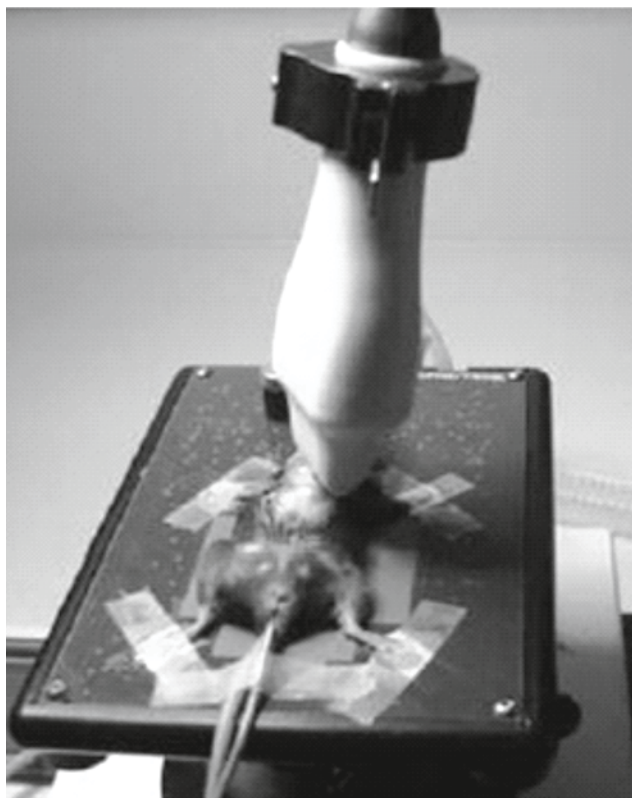
W okresie pooperacyjnym umieszczano zwierzę w osobnej klatce z pełnym dostępem do pokarmu i wody do czasu powrotu pełnej ruchomości zwierzęcia.

Ocena ultrasonokardiograficzna

Zwierzęta poddawano 21-dniowej obserwacji, w czasie której wykonywano przezklatkowe badanie echokardiograficzne wg schematu: 7, 14 i 21 dnia po zabiegu.

Niestety, wykonanie badania echokardiograficznego u przytomnego zwierzęcia jest niemożliwe, dlatego też przed jego wykonaniem zwierzęta znieczulano izofluranem o stężeniu 3% w komorze do znieczuleń (VevoAnesthesia System), a następnie umieszczano na platformie VAS z możliwością odczytu EKG i kontynuowano wziewne znieczulenie izofluranem w stężeniu 1,5% (ryc. 3.). Platforma VAS jest integralnym elementem systemu VAS i pozwala na bezpieczne wykonanie badania echokardiograficznego u małych zwierząt doświadczalnych (należy uważać przy zakupie – są dwie wersje w zależności od gatunku zwierząt). Platforma jest podgrzewana i wyposażona w elektrody do odczytu EKG. Jest ona również zespólna z ramieniem podtrzymującym głowicę echokardiograficzną, co umożliwia odpowiednie ustawienie zwierzęcia, wykonanie precyzyjnych pomiarów podczas badania ultrasonograficznego oraz eliminuje efekt drżenia ręki badacza. Podczas badania monitorowana jest również temperatura zwierzęcia przy użyciu sondy doodbytniczej.

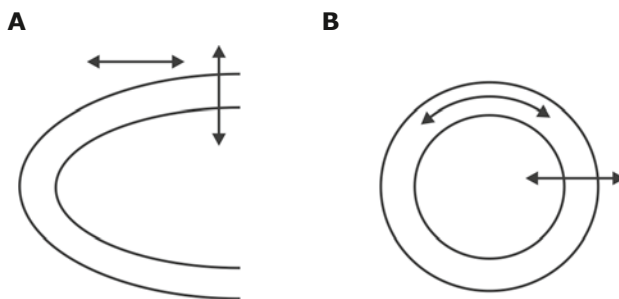
Badanie echokardiograficzne wykonywano za pomocą aparatu Vevo® 2100 Imaging System (VisualSonics, Toronto, Kanada) wyposażonego w głowicę MS400 o rozdzielczości 30 MHz. Klatkę piersiową oczyszczano z sierści, aby zminimalizować zakłócenia sygnału. Po 15-minutowym okresie adaptacji układu krążenia wykonywano badanie echokardiograficzne. Z uwagi na charakter doświadczenia wykonywano konwencjonalne (B-mode oraz M-mode) pomiary



Ryc. 3. Platforma do wykonywania badania UKG z możliwością odczytu EKG z odprowadzeń kończynowych

funkcji i wymiarów lewej komory serca (ang. *left ventricle* – LV) w projekcji przymostkowej w osi długiej (ang. *parasternal long axis view* – PLAX) i oznaczono wymiar wewnętrzny lewej komory w skurczu (ang. *left ventricle internal diameter in systole* – LVIDs) oraz w rozkurczu (ang. *left ventricle internal diameter in diastole* – LVIDd). W osi krótkiej (ang. *parasternal short axis view* – PSAX) oznaczono LVIDd, LVIDs oraz dodatkowo grubość ściany przedniej LV w skurczu (ang. *left ventricle anterior wall in systole* – LVAWs) oraz w rozkurczu (ang. *left ventricle anterior wall in diastole* – LVAWd). Za pomocą specjalistycznego oprogramowania VevoStrain oceniano również prędkość (ang. *velocity*), odkształcenie (ang. *strain*), przemieszczenie (ang. *displacement*) oraz tempo odkształcenia (ang. *strainrate*) w trzech kierunkach deformacji mięśnia sercowego: w przekroju podłużnym wzdłuż osi długiej (ang. *longitudinal*) oraz wzdłuż promienia (ang. *radial*) (ryc. 4A), a w przekroju poprzecznym wzdłuż promienia (ang. *radial*) oraz wzdłuż obwodu (ang. *circumferential*) (ryc. 4B). Dla każdej wielkości zapisywano wynik w postaci obrazu, pliku wideo oraz wykresu (ryc. 5).

Wykorzystując funkcję oprogramowania *time to peak* (z ang. czas potrzebny do uzyskania maksymalnej wartości), oceniano synchroniczną zmianę długości, średnicy oraz grubości ściany miokardium w 6 różnych segmentach w przekroju poprzecznym (1 – ściana przednia, 2 – ściana boczna, 3 – ściana tylna, 4 – ściana dolna, 5 – tylna część przegrody międzykomorowej, 6 – przednia część przegrody międzykomorowej) i podłużnym lewej komory (ściana tyl-



Ryc. 4A–B. Kierunki deformacji mięśnia sercowego. A. Przekrój podłużny LV. B. Przekrój poprzeczny LV

na: 1 – część przypodstawna, 2 – część środkowa, 3 – część koniuszkowa; ściana przednia: 4 – część przypodstawna, 5 – część środkowa, 6 – część koniuszkowa) (ryc. 6A–B). Dla każdego segmentu oceniano 4 parametry: prędkość (ang. *velocity*), przemieszczenie (ang. *displacement*), odkształcenie (ang. *strain*) oraz tempo odkształcenia (ang. *strainrate*) i zapisywano w formie tabeli, diagramu i wykresu (ryc. 7).

Ocena histopatologiczna

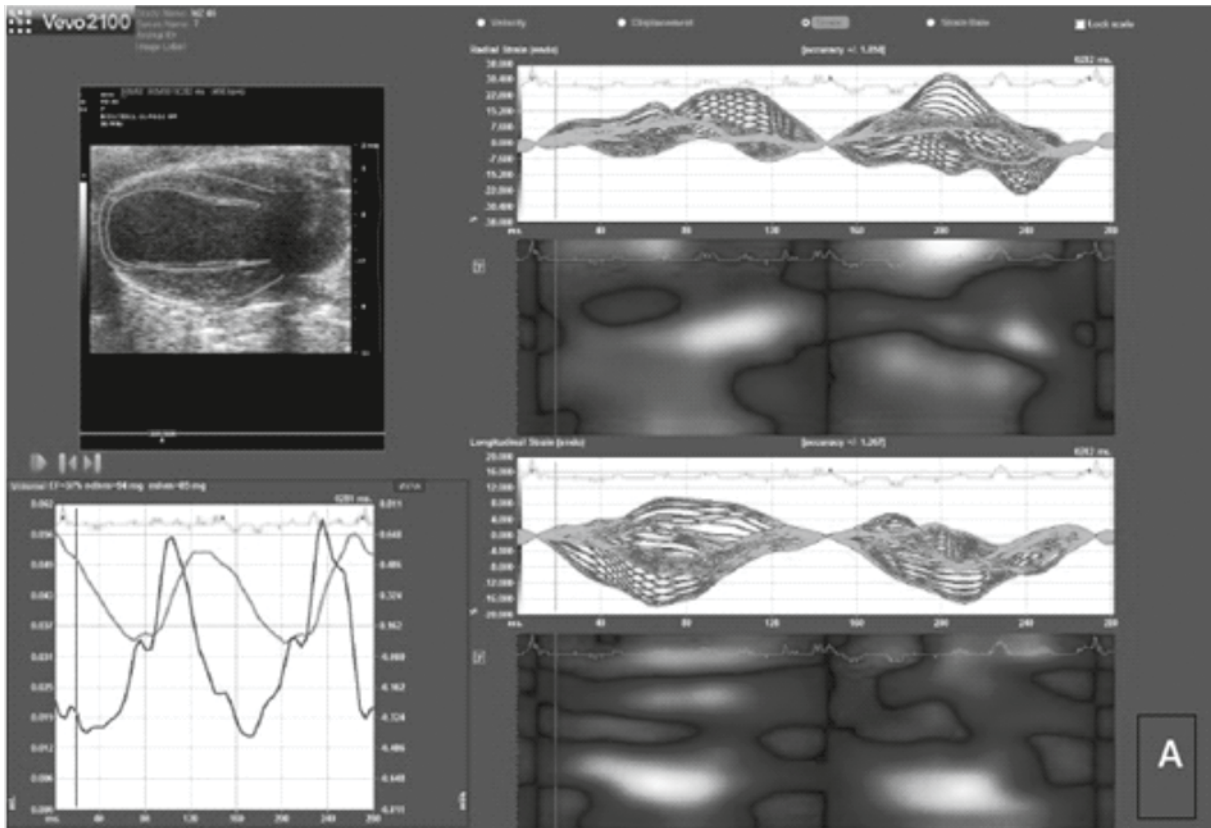
W 28. dobie zwierzęta poddawano eutanazji i eksplantowano serca. Przed pobraniem serca wstępnie perfundowano 1-procentowym roztworem formaliny poprzez wsteczne bezpośrednie podanie do aorty piersiowej przy użyciu dożylnego cewnika o rozmiarze 24G. Wykonane preparaty wybarwiano standardowo hematoksyliną i eozyną (H+E) oraz wykonywano barwienie trójbarwne zrębu łącznotkankowego wg Massona.

Wyniki

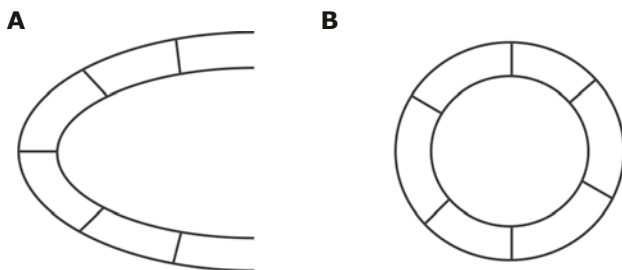
Wykonano łącznie 77 zabiegów podwiązania LAD u myszy. Początkowo wysoką śmiertelność (90%) w ciągu pierwszych 3 miesięcy wiązano z brakiem doświadczenia w wykonywaniu intubacji oraz procedur mikrochirurgicznych. W kolejnych miesiącach śmiertelność spadła do 40%.

Ocena ultrasonokardiograficzna

W badaniu UKG potwierdzono upośledzenie kurczliwości mięśnia lewej komory w regionie dystrybucji gałęzi zstępującej przedniej zarówno w przekroju podłużnym, jak i poprzecznym. Obserwowano obniżanie frakcji wyrzutowej lewej komory (ang. *left ventricular ejection fraction* – LVEF) z 47% do 33% (> 10% wyjściowej wartości) i ścięczenie przedniej ściany oraz okolicy koniuszka lewej komory. W projekcji B-mode w przekroju podłużnym obserwowano poszerzenie jamy LV i powstawanie tętniaka okolicy koniuszka LV zależne od czasu obserwacji (ryc. 8.) oraz obniżanie grubości wolnej ściany LV z towarzyszącym kompensacyjnym przerostem miokardium nieobjętego zawładem w przekroju poprzecznym LV. W analizie odkształceń wykazano zmiany stopnia odkształcenia, tempa odkształcenia, prędkości i przemieszczenia segmentów przykoniuszkowych w osi podłużnej LV, co świadczy o asynchronii skurczu



Ryc. 5. Odształcenie dla poszczególnych segmentów LV w przekroju podłużnym



Ryc. 6A–B. Podział LV na segmenty. A. Przekrój podłużny LV. B. Przekrój poprzeczny LV

segmentów komory objętych niedokrwieniem. Analiza *time to peak* również potwierdziła zmiany zachodzące w segmentach przykoniuszkowych i wolnej ściany lewej komory.

Ocena histopatologiczna

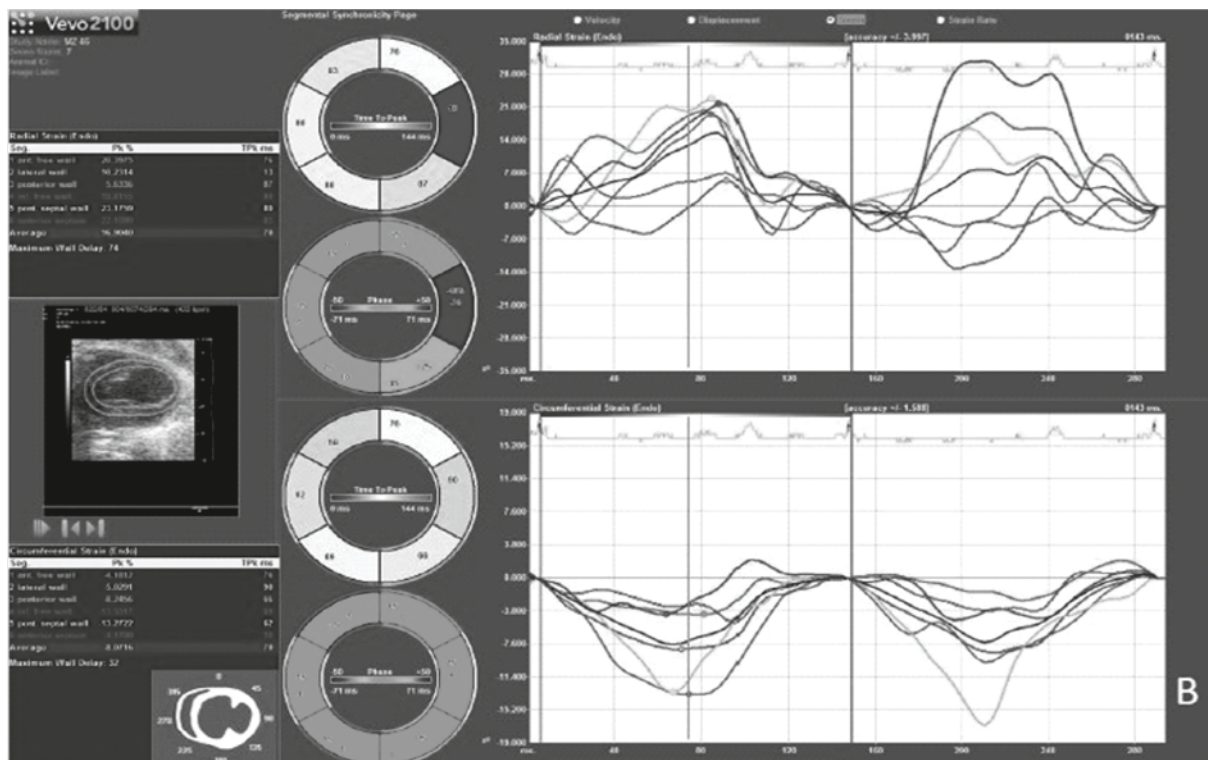
Przebadano histopatologicznie 25 serc mysich. Po 28 dniach od chirurgicznej okluzji tętnicy wieńcowej uwidoczniono cechy przebytego zawału, zapalenia mięśnia sercowego oraz wczesnej kardiomiopatii niedokrwiennej. W interpretacji brano pod uwagę obecność blizny łącznotkankowej (ryc. 9. i 10.), waskularyzacji, nacieków zapalnych (ryc. 11.) oraz przerostu kardiomiocytów. W 14 przypadkach potwierdzono przebytego zawału, w 6 nie znaleziono cech zawału. W 5 przypadkach włóknienie powierzchowne i naciek zapalny nasierdza mogą świadczyć o podwiązaniu

jednej z mniejszych gałęzi tętnicy przedniej zstępującej. Skuteczność wywołania zawału potwierdzona w badaniu histopatologicznym wynosiła 56%.

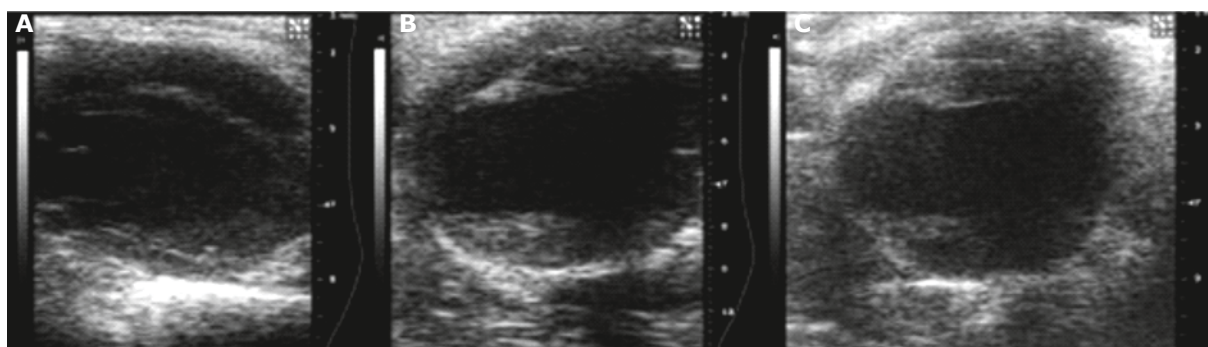
Dyskusja

Koncepcja modelu pozawałowej niewydolności serca u myszy powstała już w latach 70. ubiegłego wieku [18] i była doskonalona indywidualnie przez różnych badaczy przez lata. Obecnie brakuje kursów doskonalących dla chirurgów wykonujących doświadczenia na zwierzętach, a w obszernym piśmiennictwie [2, 3, 5, 6, 9–12, 14–16, 18] nie podano opisu każdego kolejnego etapu wykonywania procedury zamknięcia LAD na tyle dokładnego, aby pierwsze próby wykonania eksperymentu zakończyły się sukcesem.

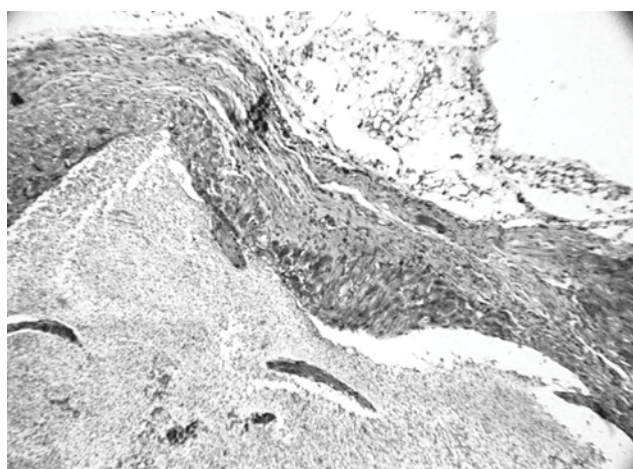
Ze względu na małe rozmiary, łatwość hodowli, krótki okres rozrodczy i krótki okres ciąży w doświadczeniach długoterminowych najczęściej wykorzystywane są szczury i myszy. Istotną przewagą myszy nad szczurami jest większa możliwość pozyskiwania szczepów transgenicznych [16]. Obecnie dostępnych jest wiele szczepów tych laboratoryjnych zwierząt, a chów wsobny pozwala uniknąć różnic wynikających z naturalnej zmienności pomiędzy osobnikami, co zapewnia powtarzalność i wiarygodność wyników. Szczep C57BL/6 jest najbardziej rozpowszechnionym szczepem wsobnym. Myszy tego szczepu wykorzystywane są do celów doświadczalnych w pracach badawczych dotyczących rozwoju, zmian sercowo-naczyniowych, cukrzycy,



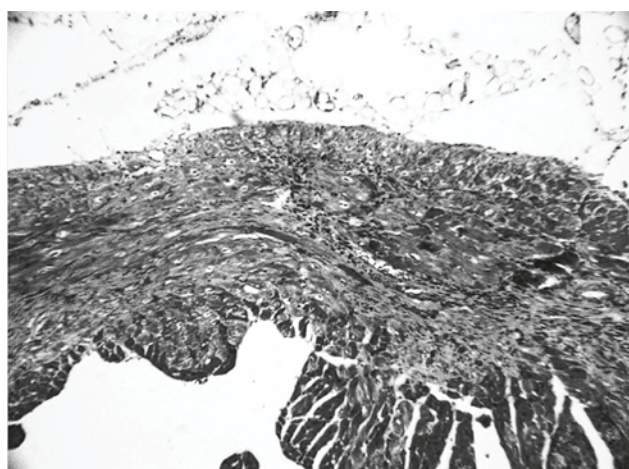
Ryc. 7. Funkcja *time to peak* dla odkształcenia LV w przekroju poprzecznym



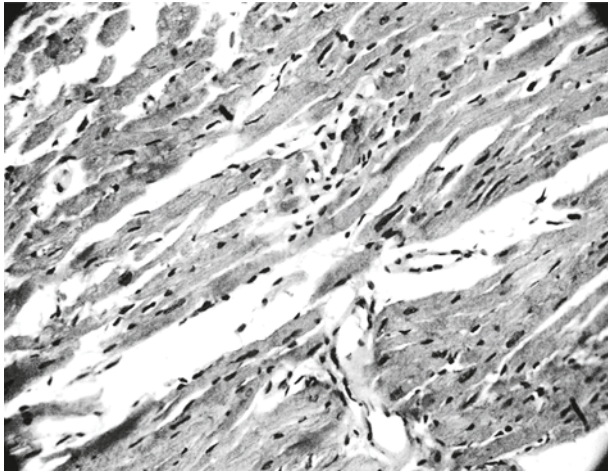
Ryc. 8. Obraz UKG przekroju podłużnego LV: A – stan wyjściowy, B – 3. doba po podwiązaniu LAD, C – 21. doba po podwiązaniu LAD



Ryc. 9. Obraz histopatologiczny przekroju poprzecznego LV; pełnościenne blizna łącznotkankowa; pow. 10x, Masson



Ryc. 10. Obraz histopatologiczny przekroju poprzecznego LV; blizna łącznotkankowa z wytworzeniem tętniaka LV; pow. 20x, Masson



Ryc. 11. Obraz histopatologiczny przekroju poprzecznego LV; nacieki zapalne; pow. 40x, H+E

otyłości, genetyki, immunologii, neurobiologii oraz zaburzeń czuciowo-nerwowych, ponieważ mają podobny do ludzkiego układ rozrodczy, nerwowy, sercowo-naczyniowy i cierpią z powodu takich samych chorób, np. nowotworów czy cukrzycy. Hodowla tego odpornego na powstawanie guzów nowotworowych szczepu nie jest wymagająca, charakteryzuje się również niskimi kosztami utrzymania w porównaniu z innymi gatunkami. Ponadto opisywana długość życia tych zwierząt przekracza przeciętną dla obu płci (> 600 dni w standardowych warunkach). Jest to szczep wykorzystywany także jako baza do pozyskiwania innych szczepów zarówno z wyindukowanymi, jak i spontanicznymi mutacjami [17]. Mysz stanowi dobry model procesów chorobowych ludzi również ze względu na bardzo podobną budowę DNA i podobną ekspresję genów, gdyż 98% genów obecnych u ludzi ma swoje odpowiedniki u myszy.

Już na etapie przygotowania zwierzęcia do zabiegu chirurgicznego należy zwrócić uwagę na kilka elementów. Jednym z bardziej istotnych jest utrzymanie stałej temperatury ciała na poziomie $36 \pm 1^\circ\text{C}$, gdyż myszy źle tolerują temperatury $< 35^\circ\text{C}$ (bradykardia), zwłaszcza że podczas procedury pozbawiamy zwierzęta ich naturalnego izolatora na ok. 20% powierzchni ciała.

Kolejnym etapem jest znieczulenie. Należy rozróżnić znieczulenie dootrzewnowe i wziewne. Tutaj rodzaj i dawki leków powinny być optymalizowane dla danego laboratorium badawczego, ponieważ w dostępnym piśmiennictwie nie ma ustalonej jednej, powtarzalnej dawki dla ketaminy, ksylazyny i pentobarbitalu (najczęściej używanych leków podawanych dootrzewnowo), a rozpiętość dawki leku w mg na kg m.c. jest na tyle duża (dla ketaminy 50–150 mg/kg m.c., dla ksylazyny 5–20 mg/kg m.c. [19], a dla pentobarbitalu 33–100 mg/kg m.c. [2, 5, 6, 20, 21]), że na etapie wyboru, przed jakim staje badacz, decyzja może być trudna. W przypadku znieczulenia wziewnego dawka izofluranu została ustalona na 3,5–4% w komorze do znieczuleń oraz 1–2% po intubacji dotchawiczej [3, 7, 9, 16, 22]. Rozpiętość dawek leków wynika nie tylko z rodzaju procedury diagnostycznej

lub chirurgicznej i przewidywanego czasu jej trwania (np. krótkie ok. 10-minutowe znieczulenie do badania echokardiograficznego i dłuższe, trwające 20–30 min, do zabiegów na otwartej klatce piersiowej), ale jest także uzależniona od różnej wrażliwości na leki poszczególnych szczepów myszy i wywołanego efektu znieczulenia bądź jedynie unieruchomienia. W naszym laboratorium w początkowym etapie podawano ketaminę i ksylazynę w dawce odpowiednio 80 mg/kg m.c. i 5 mg/kg m.c., obserwowano jednak ich silne działanie kardiodepresyjne (spadek akcji serca z 350–400/min nawet do 150/min), dlatego w kolejnych doświadczeniach leki te podawane były dopiero po wykonaniu badania echokardiograficznego, chroniąc w ten sposób serce przed ich negatywnym działaniem. Po zaintubowaniu dodatkowo podawano wziewnie izofluran o stężeniu 1,5%, uzyskując zarówno unieruchomienie, jak i brak reakcji na bodźce bólowe. Ze względu na efekt kardiodepresyjny w kolejnych doświadczeniach zrezygnowano z podawania ketaminy z ksylazyną, pozostając podczas całej procedury tylko przy znieczuleniu wziewnym z zadawalającym efektem.

Metoda intubacji wcześniej opisywana przez Tarnawskiego [2] i Browna [23], mimo że zawierała dokładny opis, nie uchroniła nas od błędów. Najczęściej dochodziło do powstawania odmy opłucnowej przez zbyt głębokie położenie rurki lub intubacji przetyku. Doświadczenie wynikające z wielu prób, w połączeniu z dobrze przygotowanym zestawem narzędzi, pozwalało na sprawne i skuteczne przeprowadzenie intubacji. Sposób intubacji tchawicy pod kontrolą wzroku opisywany przez Kido [7] wymagał wykonania krótkiego nacięcia skóry szyi i uwidocznienia tchawicy, co wiązało się z przedłużeniem procedury i wprowadzeniem kolejnego miejsca potencjalnej infekcji oraz możliwości uszkodzenia struktur anatomicznych tej okolicy ciała. Metoda intubacji przy użyciu narzędzi imitujących laryngoskop (pęseta, szpatułka) wydaje się bezpieczniejsza, a przede wszystkim szybsza [23].

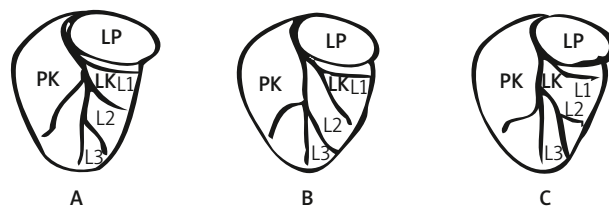
Otwarcie klatki piersiowej w 4. przestrzeni międzyżebrowej przeprowadzano w sposób opisywany wcześniej [2], natomiast kluczowe okazało się unikanie przecinania mięśnia piersiowego większego, dzięki któremu podczas zamykania klatki piersiowej możliwe jest utrzymanie jej stabilności i szczelności.

Model indukowanej niedokrwieniem przewlekłej niewydolności serca poprzez podwiązanie LAD jest szeroko stosowany w pracach dotyczących nie tylko poznania mechanizmów powstawania [24] i zapobiegania przebudowie mięśnia sercowego [4, 7, 25], lecz także prób jej odwrócenia [22]. Inne metody, wykorzystujące niskie temperatury [9] do wywołania krótkotrwałego niedokrwienia mięśnia sercowego, stosuje się raczej do badania nie tyle przewlekłej przebudowy mięśnia, ile jego reakcji na czasowe niedokrwienie i tzw. proces uszkodzenia poreperfuzyjnego [2, 5, 9]. Podwiązanie LAD powoduje trwałe, postępujące i nieodwracalne zmiany funkcjonalne (obniżenie frakcji wyrzutowej, powiększenie jamy LV) oraz strukturalne (ścienienie ściany LV, powstawanie łącznotkankowej blizny) będące następstwem remodelingu. Należy pamiętać, że naczynia wieńcowe u myszy po-

łożone są głębiej w mięśniówce LV, z tego powodu wyznacza się na sercu tzw. markery, czyli punkty będące wskaźnikiem położenia LAD. W modelu mysim markerem położenia LAD jest uszko lewego przedsionka. Ze względu na brak standaryzacji nazw gałęzi tętnicy wieńcowej lewej Ahn i wsp. [10] ujednoliciли nazewnictwo i ustalili 3 typy zmienności anatomicznej: I typ – trzy niezależne (L1, L2, L3) gałęzie lewokomorowe (41,5%), II typ – pierwsze dwie (L1–L2, L3) gałęzie odchodzące wspólnym pniem (35,8%) oraz III typ – druga i trzecia (L1, L2–L3) gałąź odchodzą wspólnym pniem (15,1%) oraz odległości L1 ok. 2 mm od ujścia LTW (ryc. 12A–C). W przypadku 47,2% myszy obserwowano również obecność gałęzi prawokomorowej odchodzącej od LTW. Poznanie zmienności anatomicznej lewej tętnicy wieńcowej pozwoliło ustalić optymalne miejsce podkłucia LAD, które z jednej strony spowoduje ostre, ograniczone niedokrwienie mięśnia sercowego, a z drugiej nie przyczyni się do wstrząsu kardiogenego i natychmiastowej śmierci zwierzęcia. Ustalono, że podwiązanie LAD w odległości ok. 2 mm od uszka lewego przedsionka powinno wywołać zawał obejmujący 40–50% mięśniówki lewej komory [2]. Niepowodzenie procedury i/lub wysoką śmiertelność okołoperacyjną można wiązać zarówno ze zbyt wysokim podwiązaniem LAD i wywołaniem zawału obejmującego ponad 50% masy lewej komory, jak i zbyt dystalnym podwiązaniem skutkującym z kolei powstaniem zawału o małej powierzchni (< 30% powierzchni LV) bądź podwiązaniem tylko drobnych odgałęzień LAD w miejscu mylnie utożsamianym z przebiegiem LTW. Odsetek wywołanych zawałów w naszym materiale na poziomie 56% wynikał najpewniej z krzywej uczenia, czego potwierdzeniem jest większa skuteczność wywołania zawału i przeżywalność zwierząt w ostatnich 2 miesiącach wykonywania procedur. Najczęstszym obserwowanym powikłaniem okołoperacyjnym pozostawały zaburzenia rytmu i kurczliwości. Dwie myszy, które po zabiegu podwiązania LAD wybudzono i umieszczono w klatkach, znaleziono martwe w 2. dobie po zabiegu, najprawdopodobniej doznały rozległego zawału. Oceniono, że już po 24 godzinach od podwiązania LAD w mięśniówce LV dochodzi do widocznych w badaniu histopatologicznym zmian morfologicznych (ścienienia wolnej ściany lewej komory), po tygodniu można zaś wykazać obecność pełnościennej blizny z obecnością włókien kolagenowych [11]. Powodzenie eksperymentu uzależnione jest nie tylko od znajomości anatomii i teoretycznego przygotowania, ale także od cierpliwości i doświadczenia operatora, ponieważ ze względu na rozmiary zwierzęcia zabieg chirurgiczny musi być przeprowadzany w krótkim czasie, delikatnie, ale precyzyjnie, bez zbędnych, nerwowych ruchów.

Istotnym postępowaniem w trakcie zamykania klatki piersiowej okazało się staranne oczyszczanie jamy opłucnej z nagromadzonej krwi i powietrza, które mogą stać się przyczyną powstawania artefaktów podczas pooperacyjnego badania echokardiograficznego.

Po zamknięciu klatki piersiowej ważną pozostaje ciągła obserwacja zwierzęcia aż do powrotu własnego oddechu i często spontanicznej ekstubacji. Ze względu na występowanie wśród gryzoni zjawiska kanibalizmu należy pamiętać



Ryc. 12A–C. Zmienność anatomiczna przebiegu i odgałęzień lewej tętnicy wieńcowej. A. Typ I. B. Typ II. C. Typ III

o umieszczeniu myszy w osobnej klatce do czasu powrotu pełnej świadomości.

W okresie przed- i pooperacyjnym, nieinwazyjnym i łatwo dostępnym badaniem monitorującym zmiany zachodzące w uszkodzonym mięśniu sercowym pozostaje echokardiografia przezklatkowa. Mimo że jest to ogólnie dostępna metoda oceniająca funkcję mięśnia sercowego, konwencjonalne pomiary nie wykrywają wczesnych zmian funkcjonalnych lewej komory. Istotna zmiana struktury i funkcji lewej komory oceniana na podstawie UKG jest manifestacją późnych zmian chorobowych. Pomiary LVEF w modelu niewydolności serca często bywają w granicach normy. Dostępne konwencjonalne techniki (echokardiografia dwu- i trójwymiarowa, dopplerowska i tkankowa) pozwalają ocenić funkcję i morfologię uszkodzonego niedokrwieniem serca. Natomiast wprowadzona nowatorska technika obrazowania (ang. *strain analysis*), u podstawy której leży analiza odkształceń, znacząco poprawiła ocenę funkcji LV, ponieważ umożliwia wykrycie zmian wcześniej niż analiza konwencjonalna [1, 26]. Oprogramowanie VevoStrain Software pozwala monitorować dyskretne zmiany funkcji serca i postęp remodelingu w modelu niedokrwiennej niewydolności serca, umożliwiając ocenę zarówno globalnego, jak i regionalnego ruchu wykonywanego przez ścianę LV. Ocena odkształcenia może dotyczyć wyznaczonego, pojedynczego punktu wsierdzia lub nasierdza, pojedynczego segmentu bądź lewej komory jako całości.

Należy pamiętać, że istnieje wiele czynników, które mogą istotnie wpływać na jakość badania echokardiograficznego. Pierwszy i zarazem najistotniejszy czynnik to sprzęt, który powinien być przystosowany do pracy z małymi zwierzętami laboratoryjnymi. Serce myszy wielkości ziarenka kawy waży ok. 2–3 g, bije z częstością 480–720 uderzeń/min i choć te wartości różne są dla płci, wielkości czy nawet szczepu, wskazują, że rozdzielczość aparatu musi być na tyle wysoka, aby umożliwić dokładne zbadanie zmian morfologicznych i czynności serca tych małych zwierząt. Zgodnie z zasadą większa częstotliwość to także większa rozdzielczość, do badania serc mysich zastosowano głowicę MS400 o rozdzielczości 30 MHz, która jest integralną częścią aparatu Vevo® 2100 Imaging System (VisualSonics, Toronto, Kanada) (dla porównania u ludzi wykorzystuje się głowice o częstotliwościach 5–15 MHz).

Podobnie jak w przypadku wykonywania procedur chirurgicznych ocena echokardiograficzna wymaga od badacza doświadczenia. Syed i wsp. [27] podają, że wykonanie co najmniej 75–100 badań pozwala uzyskać obrazy powtarzalne pod względem jakościowym. Pomocne wydaje się szkolenie nie tylko w pracowni echokardiograficznej, lecz

także udział w szkoleniach praktycznych i teoretycznych organizowanych przez producenta sprzętu.

Metodą obrazowania, która jakością, obiektywnością, dokładnością oceny budowy i funkcji serca oraz powtarzalnością przewyższa badanie echokardiograficzne, pozostającą nadal „złotym standardem”, jest rezonans magnetyczny (ang. *nuclear magnetic resonance* – NMR) [1]. Wykonanie tego badania nie jest obciążone wysokim ryzykiem powikłań, choć wymaga dostępu do żyły, znieczulenia zwierzęcia i jest czasochłonne (15–30 min). [15] Wysoki koszt, konieczność posiadania wielkogabarytowej aparatury oraz złożoność procedury powodują, że badanie to jest trudno dostępne dla większości badaczy.

Wnioski

Zaprezentowany model zawału mięśnia sercowego pozwala uzyskać pewny, ograniczony obszar martwicy przy stosunkowo niskim ryzyku niepowodzenia. Sukces eksperymentu w dużym stopniu uzależniony jest od doświadczenia operatora i rzetelnego teoretycznego przygotowania nie tylko chirurgicznego, lecz także w dziedzinie opieki anestezjologicznej śród- i pooperacyjnej.

Wdrożenie metody oraz wprowadzenie nowoczesnych metod monitorowania zmian zachodzących w niedokrwionym mięśniu umożliwi opracowanie skutecznej i bezpiecznej metody naprawy niewydolnego, uszkodzonego niedokrwieniem serca z wykorzystaniem nowych, optymalnych i zindywidualizowanych rozwiązań terapeutycznych mających wpływ na zmniejszenie się wskaźnika śmiertelności z powodu chorób serca i układu krążenia.

Źródło finansowania

Badanie powstało w ramach projektu pt. „SERCOWE KOMÓRKI MACIERZyste I PROGENITOROWE – nowa metoda regeneracji uszkodzonego serca”, realizowanego przez Śląskie Centrum Chorób Serca we współpracy z Centrum Onkologii – Instytutem im. Marii Skłodowskiej-Curie, oddział w Gliwicach oraz Fundacją Rozwoju Kardiologii z Zabrze.

Projekt „SERCOWE KOMÓRKI MACIERZyste I PROGENITOROWE – nowa metoda regeneracji uszkodzonego serca” jest współfinansowany ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, 2007–2013.

Piśmiennictwo

1. Szymczak E, Lipiec P, Kurpisz M, Krzemińska-Pakuła M, Kasprzak JD. Zaawansowane metody echograficznej oceny funkcji mięśnia sercowego u myszy z indukowanym zawałem mięśnia sercowego. *Pol Prz Kardiol* 2009; 11: 189-194.
2. Tarnavski O, McMullen JR, Schinke M, Nie Q, Kong S, Izumo S. Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies. *Physiol Genomics* 2004; 16: 349-360.
3. Takagawa J, Zhang Y, Wong ML, Sievers RE, Kapasi NK, Wang Y, Yeghiazarians Y, Lee RJ, Grossman W, Springer ML. Myocardial infarct size measurement in the mouse chronic infarction model: comparison of area- and length-based approaches. *J Appl Physiol* 2007; 102: 2104-2111.
4. Roubille F, Combes S, Leal-Sanchez J, Barrère C, Cransac F, Sportouch-Dukhan C, Gahide G, Serre I, Kupfer E, Richard S, Hueber AO, Nargeot J, Piot C, Barrère-Lemaire S. Myocardial expression of a dominant-negative form of Daxx decreases infarct size and attenuates apoptosis in an in vivo mouse model of ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 2007; 116: 2709-2717.
5. Redel A, Jazbutyte V, Smul TM, Lange M, Eckle T, Eltzschig H, Roewer N, Kehl F. Impact of ischemia and reperfusion times on myocardial infarct size in mice in vivo. *Exp Biol Med* 2008; 233: 84-93.
6. Lutgens E, Daemen MJ, de Muinck ED, Debets J, Leenders P, Smits JF. Chronic myocardial infarction in the mouse: cardiac structural and functional changes. *Cardiovasc Res* 1999; 41: 586-593.
7. Kido M, Du L, Sullivan CC, Li X, Deutsch R, Jamieson SW, Thistlethwaite PA. Hypoxia-inducible factor 1-alpha reduces infarction and attenuates progression of cardiac dysfunction after myocardial infarction in the mouse. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46: 2116-2124.
8. Hoit BD, Ball N, Walsh RA. Invasive hemodynamics and force-frequency relationships in open- versus closed-chest mice. *Am J Physiol* 1997; 273 (5 Pt 2): H2528-2533.
9. van den Bos EJ, Mees BM, de Waard MC, de Crom R, Duncker DJ. A novel model of cryoinjury-induced myocardial infarction in the mouse: a comparison with coronary artery ligation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289: H1291-1300.
10. Ahn D, Cheng L, Moon C, Spurgeon H, Lakatta EG, Talan MI. Induction of myocardial infarcts of a predictable size and location by branch pattern probability-assisted coronary ligation in C57BL/6 mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286: H1201-1207.
11. http://cardiogenomics.med.harvard.edu/projects/p1/education/MI/cvgen_anim.html.
12. Du XJ, Gao XM, Ramsey D. Surgical methods of inducing transverse aortic stenosis and myocardial infarction in the mouse. *Asia Pacific Heart J* 1998; 7: 187-192.
13. Gao XM, Dart AM, Dewar E, Jennings G, Du XJ. Serial echocardiographic assessment of left ventricular dimensions and function after myocardial infarction in mice. *Cardiovasc Res* 2000; 45: 330-338.
14. Patten RD, Aronovitz MJ, Deras-Mejia L, Pandian NG, Hanak GG, Smith JJ, Mendelsohn ME, Konstam MA. Ventricular remodeling in a mouse model of myocardial infarction. *Am J Physiol* 1998; 274 (5 Pt 2): H1812-820.
15. Yang Z, Berr SS, Gilson WD, Toufektsian MC, French BA. Simultaneous evaluation of infarct size and cardiac function in intact mice by contrast-enhanced cardiac magnetic resonance imaging reveals contractile dysfunction in noninfarcted regions early after myocardial infarction. *Circulation* 2004; 109: 1161-1167.
16. Springer ML, Sievers RE, Viswanathan MN, Yee MS, Foster E, Grossman W, Yeghiazarians Y. Closed-chest cell injections into mouse myocardium guided by high-resolution echocardiography. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289: H1307-1314.
17. <http://jaxmice.jax.org/strain/000664.html>.
18. Zolotareva AG, Kogan ME. Production of experimental occlusive myocardial infarction in mice. *Cor Vasa* 1978; 20: 308-314.
19. <http://www.aalas.org/>.
20. <http://www.iacuc.ucsf.edu/Proc/awMouseFrm.asp>.
21. Buitrago S, Martin TE, Tetens-Woodring J, Belicha-Villanueva A, Wilding GE. Safety and efficacy of various combinations of injectable anesthetics in BALB/c mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2008; 47: 11-17.
22. Lutz M, Rosenberg M, Kiessling F, Eckstein V, Heger T, Krebs J, Ho AD, Katus HA, Frey N. Local injection of stem cell factor (SCF) improves myocardial homing of systemically delivered c-kit + bone marrow-derived stem cells. *Cardiovasc Res* 2008; 77: 143-150.
23. Brown RH, Walters DM, Greenberg RS, Mitzner W. A method of endotracheal intubation and pulmonary functional assessment for repeated studies in mice. *J Appl Physiol* 1999; 87: 2362-2365.
24. Bialik S, Geenen DL, Sasson IE, Cheng R, Horner JW, Evans SM, Lord EM, Koch CJ, Kitsis RN. Myocyte apoptosis during acute myocardial infarction in the mouse localizes to hypoxic regions but occurs independently of p53. *J Clin Invest* 1997; 100: 1363-1372.
25. Li Q, Li B, Wang X, Leri A, Jana KP, Liu Y, Kajstura J, Baserga R, Anversa P. Overexpression of insulin-like growth factor-1 in mice protects from myocyte death after infarction, attenuating ventricular dilation, wall stress, and cardiac hypertrophy. *J Clin Invest* 1997; 100: 1991-1999.
26. Bauer M, Cheng S, Jain M, Ngoy S, Theodoropoulos C, Trujillo A, Lin FC, Liao R. Echocardiographic speckle-tracking based strain imaging for rapid cardiovascular phenotyping in mice. *Circ Res* 2011; 108: 908-916.
27. Syed F, Diwan A, Hahn HS. Murine echocardiography: a practical approach for phenotyping genetically manipulated and surgically modeled mice. *J Am Soc Echocardiogr* 2005; 18: 982-990.