

**UNIVERZITET U KRAGUJEVCU  
MEDICINSKI FAKULTET  
DOKTORSKE AKADEMSKE STUDIJE**

**Smer: Kardiologija**

**Predmet: Metodologija istraživanja u biomedicinskim naukama**

**Kurs: Metode istraživanja in vivo i in vitro**

**Mentor: Prof. dr Snežana Živančević- Simonović**

# **EKSPERIMENTALNI MODELI AKUTNOG INFARKTA MIOKARDA**

**Kandidat  
Dr Sladjana Raković  
Index broj: 2006/62**

**Maj, 2007 godine**

Akutni infarkt miokarda je oblik ishemijske bolesti srca (IBM), u čijoj je osnovi neadekvatan odnos potrebe i snabdevenosti miokarda krvlju..

Najčesći uzrok ishemijske bolesti srca ( u 90% slučajeva) jeste ateroskleroza koronarnih arterija, proces koji dovodi do postepenog sužavanja velikih (subepikardijalnih) koronarnih arterija, uglavnom na mestima bifurkacija. Na taj način se stvara mehaničko, fiksno suženje, a kasnije je to osnova dinamičkog suženja, odnosno spazma koronarne arterije.

Ostali, redji uzroci ishemije su stanja u kojima postoji smanjeno snabdevanje miokarda ( pojava embolusa, tromba, retko kongenitalne anomalije koronarnih arterija), stanja kod kojih su potrebe za snabdevanjem povećane( hipertrofija leve komore kod različitih oboljenja) kao i određena stanja koja potenciraju ishemiju (anemija, hipertireoza).

Ateroskleroza, kao najčesći etiološki faktor, nastaje u procesu starenja organizma, a faktori rizika ubrzavaju i potenciraju njen razvoj. Kao najznačajniji faktori rizika navode se: hipertenzija, hiperlipidemija, pušenje, šećerna bolest, određene genetske karakteristike.

Patofiziološki supstrat akutnog infarkta miokarda predstavlja nestabilni i komplikovani aterosklerotični plak, što podrazumeva fisuru, rupturu ili ulceraciju endotela sa posledičnim stvaranjem tromba koji u potpunosti okludira koronarnu arteriju. Ishemija koja nastaje je ireverzibilnog toka, tako da uzrokuje definitivno oštećenje srčanog mišića i gubitak srčanog tkiva. U ovakvim uslovima nastaju najpre metaboličke promene u srčanom mišiću, zatim hemodinamske, elektrokardiografske i kliničke promene.

Znajući da predstavlja najčešći uzrok smrti i da pogadja uglavnom radno sposobni deo populacije (izmedju 45. i 55. godine) ,proučavanje i poznavanje ovog oboljenja je od velikog medicinskog i socijalnog znacaja.

Brojni eksperimentalni animalni modeli akutnog infarkta miokarda korišćeni su u cilju proučavanja mehanizma procesa ishemija/ reperfuzija kao i proučavanju faktora koji bi mogli biti od značaja u terapiji i dijagnostici ovog oboljenja.

### ***Laboratorijske životinje***

Životinje koje su često korišćene u eksperimentalnim modelima su outbred-ni švajcarski miševi, CD1 miševi, pacovi (Sprague- Dawley rats), gvinejske svinje i bele svinje.

### ***Indukcija procesa ishemija/ reperfuzija***

U naučnim eksperimentima uglavnom su korišćena dva mehanizma indukcije:

1. indukcija mehaničkim putem
2. indukcija hemijskim putem.

### ***Eksperimentalni protokoli***

Jedan od zanimljivih primera u kom je ishemija/ reperfuzija indukovana mehaničkim putem, je projekat koji je grupa naučnika izvela u cilju ispitivanja kardioprotektivnog dejstva GLP-1 (glukagonu sličan peptid). Amal K. Bose i saradnici (1).

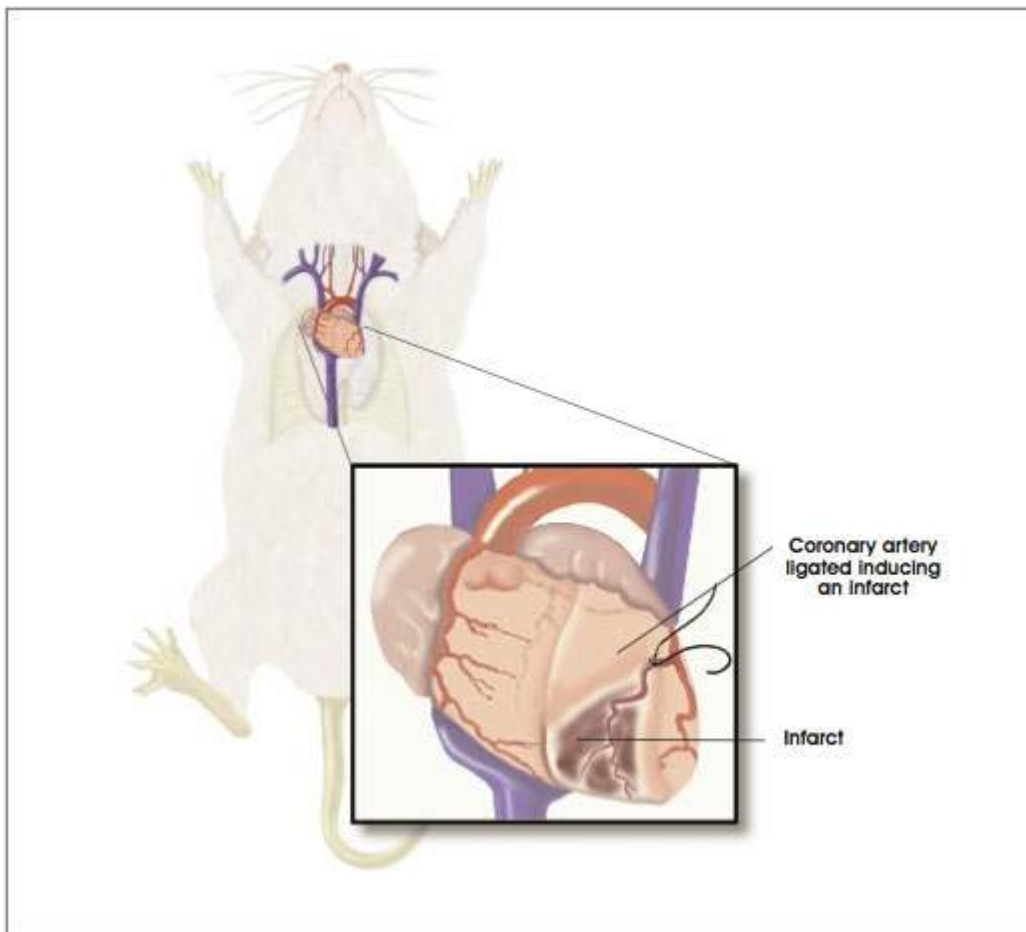
GLP-1 je intestinalni hormon koga luče enteroendokrine ćelije creva u prisustvu hrane. Poznata su brojna dejstva GLP-1: stimuliše lučenje insulina, utiče na

sekreciju mitogen aktivne protein kinaze, na sekreciju fosfoinozimid 3- kinaze(PI3K) u beta ćelijama pankreasa, za koje je poznato da deluju kardioprotektivno (2). Receptori za GLP-1 nalaze se u GIT-u, u mozgu, bubrezima, plućima i srcu. (3). Receptor je G protein koji pripada porodici glukagon- sekretin receptora, a dalji efekti u ćeliji ostvaruju se promenom nivoa cAMP (4).

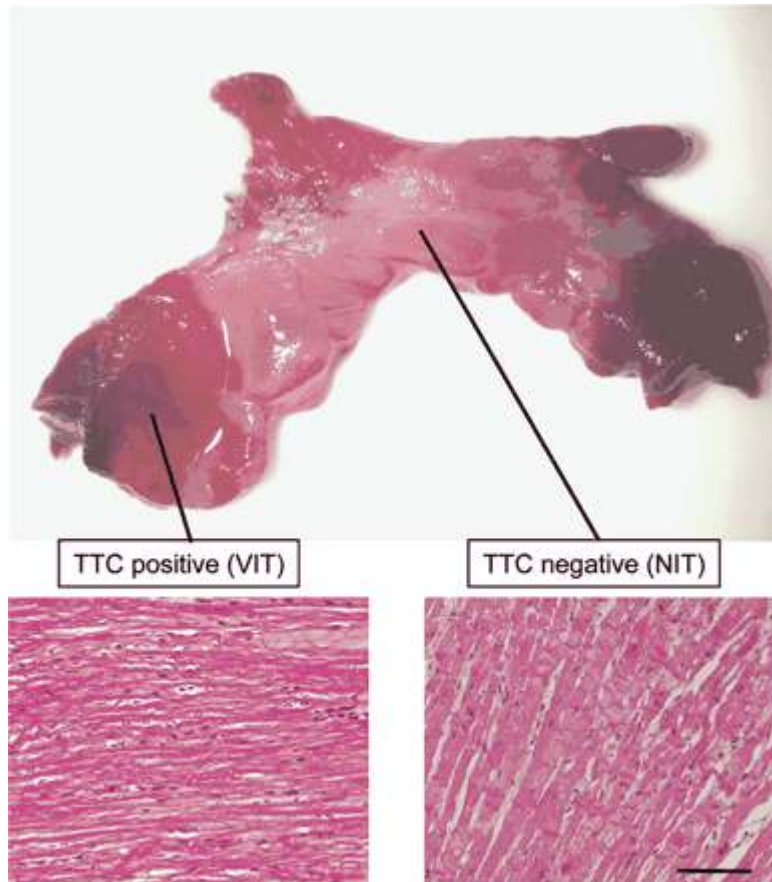
Kao eksperimentalne životinje su korišćeni pacovi muškog pola, težine 300-450 gr. Nakon što su anestetizirani midazolamom (5mg/ml) i fentanilom (0.315 mg/ml), plasiran je endotrahealni tubus, da obezbedi ventilaciju smešom gasova koja imitira fiziološke uslove ( pH 7.35-7.45, pCO<sub>2</sub> 4.7-6.4 kPa, pO<sub>2</sub> 11.1-14.4 kPa).

Torakotomijom, omogućen je pristup srcu, a ishemija u trajanju od 30 min. indukovana postavljanjem suture oko prednje descedentne grane leve koronarne arterije. Popuštanjem suture, pomoću posebne zamke, omogućena je reperfuzija u trajanju od 120 min.(slika 1)(5).

Da bi definisali zonu rizika od zone zdravog miokardnog tkiva, kroz aortu je infundovan rastvor Evans plavog, koji *zdravo tkivo boji u plavo*, a *zona rizika (RZ) ostaje nebojena*. Po definisanju, od tkiva RZ pravljene su iseći debljine 2 mm, gde je ponovo bilo potrebno razlikovati vijabilno (očuvano) miokardno tkivo (VIT) od nekrotičnog (NIT). Tkivni iseći su inkubirani sa 1% TTC ( trifenil tetrazolin-hlorid) u fosfatnom puferu (pH= 7.34, t=37°C) u trajanju od 12 min. *Očuvano miokardno tkivo* predela RZ obojeno je *crveno*, a nekrotično belo ( slika 2) (6). Uzorci su fiksirani u 4% formalinu u trajanju od 24 h.



Slika 1.



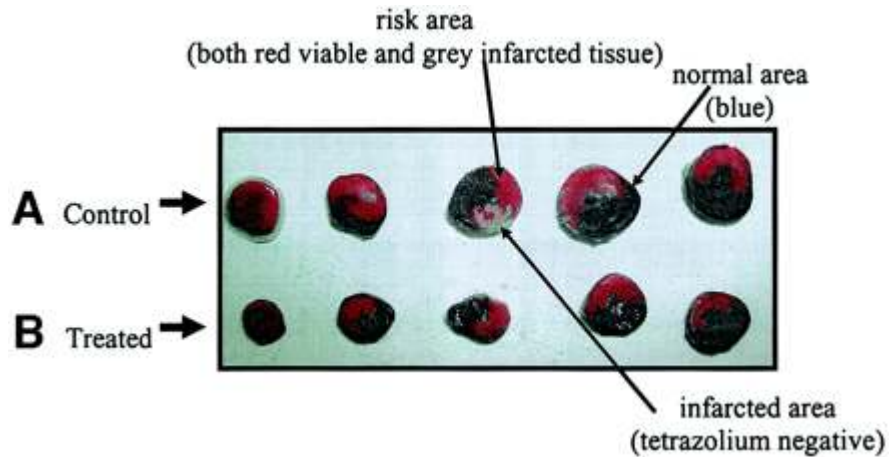
Slika 2.

In vivo ispitivanja obuhvatala su tri grupe:

- kontrolna grupa ( životinje kod kojih je samo indukovana ishemija/reperfuzija I/R)
- VP- kontrolna grupa ( životinje izložene I/R, kojima je ubrizgan VP- valin pirolidid u dozi 20 mg/kg, da spreči brzu razgradnju GLP-1 )(3).
- GLP-1+VP- eksperimentalna grupa( životinje izložene I/R, VP je dat s.c., a GLP-1 i.v. putem u dozi 4.8 pmol/ kg/min, kontinuirano tokom procedure .

Od parametara su praćeni vrednosti tenzije i srčane frekvence, direktnim putem preko kanile plasirane u levu karotidnu arteriju, a nakon ekspozicije srca i preparacije isečaka, procena volumena infarktne zone determinisana je

komputerizovanom planimetrijom (slika 3)(1). Srca kod kojih je zona rizika bila manja od 0.4 cm ili veća od 0.7 cm, isljučena su iz daljeg postupka.



Slika 3.

Za in vitro ispitivanja, formirano je sedam grupa kod kojih je indukcija I/R vršena na isti način, a razlikovale su se po vrsti i kombinaciji faktora kojima su pojedine grupe tretirane.

1. Kontrolna grupa (životinje kod kojih je indukovana I/R)
2. VP grupa (životinje su dobijale 20mg/l VP)
3. GLP-1 (0.3 nmol) + VP (20mg/l)
4. GLP-1 (0.3 nmol) + VP (20 mg/l) + PI3K inhibitor LY24002 (15  $\mu$ mol/l)
5. GLP-1 (0.3 nmol) + VP (20mg/l) + p44/42 inhibitor UO126 (10 $\mu$ mol/l)
6. GLP-1 (0.3 nmol) + VP (20mg/l) + cAMP inhibitor Rp-cAMP (1.5  $\mu$ mol/l)
7. GLP-1 (0.3 nmol) + VP (20mg/l) + GLP-1 R antagonist exendin (3 nmol/l).

Da bi dobili proteinske uzorke, isečke tkiva zone rizika su homogenizovali i centrifugirali 10 min. na 4°C. Ekstrakcija proteina je vršena tako što su proteinski markeri odvojeni pomoću SDS-PAGE i naneti na hemiluminiscentnu nitroceluloznu membranu. Potom su membrane inkubirane sa

fosfospecifičnim poliklonskim antitelima (phospho-BAD), a zatim sa sekundarnim antitelima (anti-rabbit). Proteini su detektovani Western- blott analizom, na osnovu povećanja hemiluminiscence.

U drugim eksperimentalnim modelima indukcija I/R je vršena po sličnom protokolu.

Kao jednu od modifikacija u načinu indukcije ishemije, navodim eksperiment u kom je ispitivano dejstvo DXS (dextran-sulfat), analoga glukosaminoglikana, na veličinu zone infarkta odnosno na veličinu reperfuzionog oštećenja (6).

Od parametara koji su bili indikatori miokardnog oštećenja, a koji su istovremeno bili u korelaciji sa kardioprotektivnim dejstvom DXS- a, praćeni su:

- markeri ishemije – nivo troponina 1 i kreatinin- kinaze (CK- MB frakcija)
- aktivnost sistema komplementa, kao pokazatelja vaskularne inflamacije tokom reperfuzionog oštećenja
- koagulaciona kaskada

Kao eksperimentalne životinje korišćeno je 20 belih svinja, težine 30 (2kg). Nakon premedikacije i mehaničke ventilacije, preko obezbedjene venske linije administriran je visokomolekulski heparin (2500 IU) u bolusu I merene su njegove bazne vrednosti pre početka ishemije. Prednja descedentna grana leve koronarne arterije okludirana je naduvavanjem balona PCI katetera, čime je omogućena ishemija u trajanju od 60 min. Lokalizacija i stanje inflacije balona je kontrolisana angiografski. Pet min. pre početka reperfuzije, 10 ml. DXS ubrizgano je intrakoronarno u područje rizika u toku dva minuta. Reperfuzija je omogućena izduvavanjem balona katetera posle tri min. i predviđeno je da traje 2h.

Randomizaciju životinja su izvršili pre početka serije eksperimenata u dve grupe, koristeći kod randomizacije:

- PBS kontrolna grupa=0, u kojoj su životinje dobijale PBS( phospat buffer saline)
- DXS eksperimentalna grupa=1.

Iz periferne venske krvi uzeti su uzorci za dalje analize, koji su čuvani na ledu ( -70°C) do centrifugiranja.

Za razlikovanje kritične zone 60 ml metilenskog plavog je ubrizgano intravenozno. Životinje su žrtvovane intravenskim bolusom kalijum-hlorida, a od tkiva leve komore ( koje je u zoni ishemije ostalo nebojeno) pravljeni su preseći debljine 3mm od apeksa do baze.

Bojenjem preparata sa TTC-om (tehnikom koja je spomenuta u prethodno navedenom primeru) dobili su tri vrste tkiva čija težina je merena i izražena u gramima:

- metilensko plavo pozitivno- zdravo miokardno tkivo
- crveno obojeno, vitalno tkivo kritične zone
- nekrotično miokardno tkivo – nebojeno.

Težina kritične zone odgovarala je zbiru težine nekrotičnog i vitalnog tkiva.

Dobijene podatke su prikazali kao ukupnu masu leve komore (LV), masu kritične zone, masu kritične zone kao procenat mase LV, masu nekrotičnog tkiva (NIT), masu NIT kao procenat mase kritične zone.

Iz uzoraka periferne venske krvi, nakon centrifugiranja, vršene su analize sistema komplementa i koagulacionog sistema.

Klasični put aktivacije komplementa definisan je At obeleženim eritrocitima ovce.

Kao globalni parametar funkcije koagulacionog sistema merene su vrednosti APTT- a.

Nivo troponina 1 i CK- MB odredjivali su ELISA testom, pri čemu su oba ELISA testa bila senzitivna i specifična za miokardno oštećenje kod svinja.

U četiri naredna eksperimenta životinjama su umesto DXS-a ubrizgavali fluoresceinom obeleženi DXS (koji ima gotovo identična biohemijska svojstva kao neobeležni molekul), da bi kasnije na preparatima pratili tkivnu distribuciju i vezivanje DXS-a.

Prethodni eksperimentalni modeli uglavnom su bazirani na ispitivanju faktora koji bi u okviru procesa I/R, a posebno u okviru reperfuzionog oštećenja mogli delovati na smanjenje veličine infarktne zone, odnosno terapijski.

Eksperimentalni model baziran na ispitivanju pojedinih proteinskih molekula u kardiomiocitima u toku procesa I/R i nakon toga, je jedan od primera koji bi mogao dovesti do novih znanja u oblasti dijagnostike IM (7).

Tačnije, u eksperimentu je ispitivana **lokalizacija** proteina citoplazme i membrane (ukupno 32 proteina, među kojima je troponin T i anexin), kao i **nivo ekspresije** ovih proteina u pojedinim fazama procesa I/R.

U eksperimentu su korišćeni outbred-ni mužjaci švajcarskih miševa, stari 7-9 nedelja, težine 35-40 gr. Životinje su podeljene u dve grupe:

- IR (ishemija/ reperfuzija) grupa- proces je indukovao mehaničkim putem pomoću polipropilenske ligature na način već opisan u prethodnim primerima. Ishemija je trajala 30 min., a potom reperfuzija 180 min.
- PI grupa (permanentna ishemija), indukovana u trajanju od 210 min.
- Za obe grupe su postojale kontrolne grupe.

Nakon definisanja kritične zone i pripreme, iseći tkiva su zamrznuti tečnim azotom i čuvani na  $-80^{\circ}\text{C}$ . Za dalje proteinske analize smrznuti preparati su homogenizovani pomoću smeše enzima (DN-ase, RN-ase i kompleks inhibitora proteaza). Razdvajanje membranske frakcije proteina od solubilne citosolne frakcije, vršeno je tehnikom sedimentacija/ centrifugiranje velike brzine. Nakon uklanjanja supernatanta, talog proteina je rastvoren u Trišovom rastvoru (urea, thiourea).

Nadalje je za detekciju proteina korišćena metoda dvodimenzionalne gel elektroforeze. Separacija membranskih i citoplazmatskih proteina za IR i PI grupu, kao i za njihove kontrolne grupe vršena je na osnovu njihove molekulske težine, pri čemu su dobijene gel trake (8).

Za identifikaciju i analizu proteina koristili su PDQuest software.

Vrednosti proteinske ekspresije za IR, PI i kontrolne grupe poredjene su medjusobno kao i sa odgovarajućim referentnim vrednostima (i za membranske i

za citosolne frakcije). Koristeći ovaj softwere, određivan je i koeficijent korelacije između vrednosti proteina u gelu i odgovarajućih referentnih vrednosti.

Jedan od zanimljivih projekata u kom je I/R indukovana **hemijskim putem** je eksperimentalni model na kome su ispitivani elektrofiziološki efekti relevantnih koncentracija morfijuma na parametre AP (akcionog potencijala), kao i na incidencu pojave spontanih aritmija u normalnoj i ishemičnoj zoni (9).

U kliničkoj praksi, morfijum se obično koristi u kupiranju bola kod infarkta miokarda (10).

Kao eksperimentalne životinje su korišćene gvinejske svinje, oba pola, težine 300-400 gr.

Ispitivanja su vršena **in vitro** na preparatima tkiva desne komore.

Isečki tkiva su potopljeni u kadu sa dve komore razdvojene lateks membranom. Na taj način su imitirani uslovi normalne zone (NZ) i ishemične zone (IZ). Obe komore su perfundovane aktivnom pumpom.

U prvoj fazi eksperimenta u obe komore nalazio se **Tirodov rastvor**, koji sadrži: (u mM) 135Na, 4 K, 1.8 Ca, 1.8 H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 HCO<sub>3</sub>, 117.8 Cl i 5.5 glukoze ; pH=7.35, a temperatura je održavana na 36.5°C

Preparati su stimulisani u obe zone pomoću dve bipolarne silikonom presvučene elektrode fr=1 Hz. Stimulator (model SMP 310) je proizvodio pulseve pravougaonog oblika (1-2 V), u trajanju od 2 ms, koji su izazivali depolarizaciju. U toku protokola sa stimulacijom je prekidano svaki put kada bi se javila spontana aritmija.

Akcioni potencijali su registrovani digitalnim osciloskopom.

Od parametara akcionog potencijala pratili su:

- mirovni membranski potencijal- MMP
- amplitude akcionih potencijala
- akcioni potencijal u trajanju 50% od pune repolarizacije
- akcioni potencijal u trajanju 90% od pune repolarizacije

- maksimalnu brzinu akcionih potencijala.

U drugoj fazi eksperimenta, ishemija u trajanju od 30 min., u jednoj od komora indukovana je pomoću **modifikovanog Tirodovog rastvora**. Povećana je konc. K sa 4 na 12 mmol/l, smanjena konc. HCO<sub>3</sub> sa 25 na 9 mmol/l, što je dovelo do pada pH sa 7.35 na 6.90. pO<sub>2</sub> je smanjen tako što je smeša u prvobitnom rastvoru- 95%O<sub>2</sub> i 5% CO<sub>2</sub>, zamenjena sa 95% N i 5% CO<sub>2</sub>. Sve ovo je obezbedilo uslove hipoksije, hiperkaliemije, acidoze i deficita hranljivih materija.

Nakon ishemije, period reperfuzije omogućen je ponovnom zamenom smeša gasova u Tirodovom rastvoru i trajao je 30 min.

Tokom indukovanih procesa I/R, ponovo su registrovani AP, ali i poremećaji sprovodjenja, kao što su:

- blok u sprovodjenju
- spontane aritmije nezavisne od stimulacije (1 ili 2 ES, izostali kompleksi)
- gubitak odgovora na stimulaciju konstantnog intenzitet.

U završnoj fazi eksperimenta korišćen je Tirodov rastvor sa 0.01 i 0.1 µmol **morfijuma**, nakon čega su u obe komore, odnosno u NZ i IZ pratili efekte morfijuma na parametre AP i na spontanu pojavu aritmija.

Proučavanje akutnog infarkta miokarda na animalnim modelima je od neprocenjive važnosti, kako za razumevanje mehanizma procesa ishemija/reperfuzija, tako i za sagledavanje novih mogućnosti koje bi mogle biti primenjene u oblasti dijagnostike i terapije ovog oboljenja, u smislu rane dijagnostike, započinjanja terapije u što ranijoj fazi i smanjenja reperfuzionog oštećenja.

## ***Literatura***

1. Amal K. Bose, Mihaela M. Mocanu, Richard D. Carr, Christian L. Brand, Derek M. Yellon. Glucagon-like peptide 1 can directly protect the heart against ischemia/ reperfusion injury 2005
2. Buteau J, Roduit R, Susini, S, Prentki M: Glucagon-like peptide-1 promotes DNA synthesis, activates phosphatidylinositol 3-kinase and increases transcription factor pancreatic and duodenal homeobox gene 1 (PDX-1) DNA binding activity in beta (INS-1)-cells. *Diabetologia*42 :856 –864,1999[[Medline](#)]
3. Deacon CF, Hughes TE, Holst JJ: Dipeptidyl peptidase IV inhibition potentiates the insulinotropic effect of glucagon-like peptide 1 in the anesthetized pig. *Diabetes*47 :764 –769,1998[[Abstract](#)]
4. Holz GG, Leech CA, Habener JF: Activation of a cAMP-regulated Ca(2+)-signalling pathway in pancreatic beta-cells by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1. *J Biol Chem*270 :17749 –17757,1995
5. Terese Winslow, Lydia Kibiuk: Rodent Model of Myocardial Infarction 2001
6. Yara Banz, Otto M. Hess, Simon C. Robson, Daniel Mettler, Pascal Meier, Andre Haerberli, Eva Csizmadia, Elena Y. Korchagina, Nicolai V. Bovin, Robert Rieben. Locally targeted cytoprotection with dextran sulfate attenuates experimental porcine myocardial ischemia/ reperfusion injury 2005
7. Tijl De Celle, Frank Vanrobaeys, Peter Lijnen, W. Matthijs Blanckesteijn, Sylvia Heeneman, Jozef Van Beeumen, Bart Devreese, Jos F. Smits, Ben J. Janssen. Alterations in mouse cardiac proteome after in vivo myocardial infarction: permanent ischaemia versus ischaemia- reperfusion 2005
8. Pasquali C, Fialka I & Huber LA (1997). Preparative two-dimensional gel electrophoresis of membrane proteins. *Electrophoresis* **18**, 2573–2581
9. A. Yvon, J.-L. Hanouz, X. Terrien, Ducouret, R. Rouet, H. Bricard, J.-L. Gerard. Electrophysiological effects of morphine in an vitro model of the " border zone" between normal and ischaemic- reperfused guinea-pig myocardium 2002
10. Mangano DT, Browner WS, Hollenberg M, London MJ, Tubau JF, Tateo IM and the Study of Perioperative Ischemia Research Group. Association of perioperative myocardial ischemia with morbidity and mortality in men undergoing noncardiac surgery. *N Engl J Med* 1990;323: 1781-8