



Ocena przydatności nowoczesnych technik echokardiograficznych wykorzystujących technikę śledzenia markerów akustycznych w warunkach pracowni doświadczalnej na przykładzie modelu ostrej choroby niedokrwiennej u myszy

Evaluation of usefulness of modern echocardiographic techniques using speckle tracking echocardiography, in experimental laboratory conditions, on example model of acute ischemic disease in mice

Marcin A. Garbacz¹, Tomasz Niklewski¹, Tomasz Jaźwiec¹, Joanna Śliwka¹, Maciej Domagała², Marcin Kaczmarczyk¹, Mateusz Garbacz², Karol Froń², Michał Zembala¹, Marian Zembala¹

¹Katedra i Oddział Kliniczny Kardiologii, Transplantologii, Chirurgii Naczyniowej i Endowaskularnej, Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

²Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Oddziale Klinicznym Kardiologii, Transplantologii, Chirurgii Naczyniowej i Endowaskularnej, Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

STRESZCZENIE

W ostatnich latach myszy stały się najczęściej wykorzystywanymi zwierzętami laboratoryjnymi w badaniach przedklinicznych. Wraz z rosnącym ich wykorzystaniem także w badaniach układu krążenia (zarówno w terapiach komórkowych regenerujących mięsień sercowy po zawale, leczeniu niewydolności serca, jak i w ocenie kardiotoksyczności leków) konieczne stało się opracowanie dokładnej metody oceny funkcji serca, która rzetelnie mogłaby określić skuteczność i bezpieczeństwo badanych terapii. Przeniesienie techniki śledzenia markerów akustycznych (*speckle tracking echocardiography* – STE) do warunków echokardiografii doświadczalnej pozwala na bardziej rzetelną i wiarygodną ocenę ich skuteczności i bezpieczeństwa. Pomiary regionalnej deformacji serca uzyskiwane tą metodą są dużo bardziej czułe i specyficzne niż parametry klasycznej echokardiografii.

Technika STE wydaje się bardzo atrakcyjną metodą, nie jest jednak pozbawiona wad i ograniczeń. Analiza obrazów 2D techniką STE jest bardzo wrażliwa na artefakty, które zacierając granice wsierdzia, uniemożliwiają prawidłowe śledzenie markerów akustycznych. Uzyskanie powtarzalnych obrazów o dobrej jakości jest wciąż dużym wyzwaniem, szczególnie w warunkach echokardiografii doświadczalnej. W dostępnym piśmiennictwie techniczne i praktyczne aspekty tego badania są często pomijane lub opisane bardzo enigmatycznie, a nierzadko to właśnie one są podstawą do

Received: 26.03.2017

Revised: 17.10.2017

Accepted: 17.10.2017

Published online: 14.09.2018

Adres do korespondencji: Lek. med. Marcin A. Garbacz, Katedra i Oddział Kliniczny Kardiologii, Transplantologii, Chirurgii Naczyniowej i Endowaskularnej, Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Śląskie Centrum Chorób Serca, ul. M. Curie-Skłodowskiej 9, 41-800 Zabrze, tel. + 48 32 479 34 73, e-mail: m.garbacz@sccs.pl

Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

www.annales.sum.edu.pl



uzyskania zadowalających nas obrazów. Dlatego też celem niniejszego opracowania jest zarówno ocena przydatności nowoczesnych technik echokardiograficznych w warunkach pracowni doświadczalnej, jak i opisanie technicznych oraz praktycznych zagadnień przeprowadzenia badania echokardiograficznego u myszy.

SŁOWA KLUCZOWE

echokardiografia, technika śledzenia markerów akustycznych, zwierzęcy model doświadczalny

ABSTRACT

In recent years, mice have become the most commonly used laboratory animals in preclinical studies. With the increase in their use also in the study of the cardiovascular system (in heart muscle cell regenerating therapies after a heart attack, heart failure or assessing the cardiotoxicity of drugs), there was a need to develop accurate methods for assessing cardiac function, which could reliably determine the efficacy and safety of the studied treatments. The transfer of speckle tracking technology to echocardiography experimental conditions, allows a more reliable and credible assessment of the effectiveness of the studied treatments. Measurements of regional deformation of the heart obtained by this method are much more sensitive and specific than the parameters of classical echocardiography. Speckle tracking echocardiography (STE) seems to be a very attractive method but it is not devoid of drawbacks and limitations. Analysis of the 2D STE technique is very sensitive to artifacts, blurring the boundaries that prevent proper endocarditis tracking speckle. Therefore, obtaining reproducible images of good quality is still a major challenge, particularly in experimental echocardiography. In the available literature, the technical and practical aspects of this study are often overlooked or described very enigmatically, and often it is those aspects that are essential to achieve satisfactory images. Therefore, the aim of this study is to evaluate the usefulness of both modern echocardiographic techniques in experimental conditions in the laboratory and to describe the technical and practical issues of conducting echocardiography in mice.

KEY WORDS

echocardiography, speckle tracking echocardiography, experimental animal model

WSTĘP

Postęp w medycynie dokonany w ciągu ostatnich lat zawdzięczamy szczególnie eksperymentom przeprowadzonym na zwierzętach. Dzięki dynamicznemu rozwojowi szeroko rozumianych nauk biologicznych wiele chorób udało się wyindukować u zwierząt laboratoryjnych, otrzymując odpowiednie modele zwierzęce, a wieloletnie badania nad patofizjologią, objawami, naturalnym przebiegiem choroby czy wreszcie leczeniem przyczyniły się do lepszego zrozumienia istoty wielu schorzeń i stały się fundamentem aktualnego stanu wiedzy. Zwierzęce modele poszczególnych chorób, których celem jest symulacja patologii występujących u człowieka, stały się więc podstawą badań przedklinicznych. Prowadząc badania nad nowymi metodami naprawy i odbudowy niedokrwionego mięśnia sercowego, pracowaliśmy na dobrze funkcjonującym, powtarzalnym, mysim modelu choroby niedokrwiennej serca, polegającym na chirurgicznym zamknięciu gałęzi przedniej zstępującej (GPZ) przez dostęp z torakotomii bocznej. Jest to tani i stosunkowo prosty w wykonaniu model, którego efektywność potwierdzono już wielokrotnie [1,2,3].

Korzystanie z mysiego modelu wiąże się oczywiście z pewnymi ograniczeniami i trudnościami (o których będzie mowa w dalszej części artykułu), wynikającymi m.in. z małych rozmiarów myszy oraz ich odmienności anatomicznych i fizjologicznych. Należy jednak pamiętać, że modele zwierzęce wykorzystywane są w badaniach nie dlatego, że idealnie odzwierciedlają procesy fizjologiczne i patofizjologiczne, lecz ze względu na łatwość ich użycia – myszy laboratoryjne są relatywnie tanie i nieskomplikowane w hodowli, mają krótki czas rozrodu (16–22 dni) i liczne potomstwo (6–12), ich genom jest bardzo podobny do ludzkiego, a procesy biologiczne u myszy i człowieka są na tyle podobne, że można je porównywać.

Dzięki rozwojowi biologii molekularnej, która pozwoliła na ingerencję w myszy genom, powstały szczepy transgeniczne, oferujące niezwykle szerokie możliwości badawcze. Doskonale nadają się do badań chorób metabolicznych, biologii nowotworów, farmakoterapii czy terapii komórkowych odbudowujących mięśniówkę serca. Dlatego myszy stały się najczęściej wykorzystywanymi zwierzętami laboratoryjnymi w badaniach przedklinicznych [4]. Wraz z rosnącym wykorzystaniem myszy transgenicznych także w badaniach układu krążenia (zarówno w terapiach komórkowych



regenerujących mięsień sercowy po zawale, leczeniu niewydolności serca, jak i ocenie kardiotoxycywności leków) powstała konieczność opracowania dokładnej i wiarygodnej metody oceny funkcji serca, która rzetelnie mogłaby określić skuteczność i bezpieczeństwo badanych terapii.

W badaniu histopatologicznym możemy, co prawda, monitorować postępujący remodeling serca po indukcji niedokrwienia (obserwowany jako strukturalne zmiany lewej komory, tj. rozstrzeń komory czy ścięczenie ściany w obszarze niedokrwienia [5,6]), ale ocena kurczliwości serca opiera się tylko na silnej, dodatniej korelacji między wielkością zawału (mierzoną zarówno polem powierzchni blizny, jak i długością blizny) a ciężkością dysfunkcji skurczowej [7] (im większa długość/pole powierzchni blizny, tym dysfunkcja skurczowa większa). Badanie histopatologiczne wciąż pozostaje cennym narzędziem oceny morfologicznej serca, umożliwiającym dodatkową ocenę np. gęstości kapilar czy stopnia zwłóknienia, trzeba jednak pamiętać, że nie jest to badanie przeżyciowe, co uniemożliwia porównywanie tego samego serca przed i po terapii.

Badanie echokardiograficzne jest obecnie podstawową metodą obrazowania układu sercowo-naczyniowego. Szerokie zastosowanie tego badania wynika przede wszystkim z jego nieinwazyjnego charakteru (niejonizacyjny charakter fali ultradźwiękowej, brak konieczności podawania kontrastu), łatwości dostępu, olbrzymiego potencjału czy relatywnie niskiej ceny. Ponadto badanie to bardzo dynamicznie się rozwija, wciąż powstają nowe aparaty i głowice z coraz lepszą zdolnością rozdzielczą i czułością w wykrywaniu poszczególnych patologii. W ostatnich latach powstały także nowe techniki obrazowania, takie jak obrazowanie za pomocą dopplera tkankowego (*color doppler myocardial imaging* – CDMI) czy techniki śledzenia markerów akustycznych (*speckle tracking echocardiography* – STE), które umożliwiają bardzo dokładną ocenę kurczliwości serca.

Technika STE jest nową, nieinwazyjną metodą obrazowania ultrasonograficznego (USG), umożliwiającą obiektywną ocenę globalnej i regionalnej funkcji serca. Opiera się na analizie przemieszczenia przestrzennego (śledzeniu) markerów, pikseli (*speckles*), które powstają na ekranie w wyniku interakcji fali ultrasonograficznej z włóknami mięśnia sercowego w rutynowym dwuwymiarowym (2D) badaniu USG. Za pomocą skomplikowanych algorytmów oprogramowanie analizuje odkształcenie (*strain*), prędkość (*velocity*) i przemieszczenie (*displacement*) tych markerów w trzech kierunkach deformacji mięśnia sercowego, dając obiektywne, ilościowe informacje o regionalnej kurczliwości serca [8,9,10].

W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie wykorzystaniem techniki STE we wczesnej diagnostyce chorób układu sercowo-naczyniowego, gdyż zaobserwo-

wano, że często pierwszymi manifestacjami tych chorób są subkliniczne, regionalne zaburzenia kurczliwości serca, wykrywane m.in. za pomocą STE. Zainteresowanie to ma odzwierciedlenie w rosnącej liczbie publikacji opisujących kliniczne wykorzystanie tej nowej metody we wczesnej diagnostyce zaburzeń kurczliwości serca w przebiegu nadciśnienia tętniczego, cukrzycy czy choroby wieńcowej [11,12,13]. Przed wprowadzeniem nowoczesnych technik echokardiograficznych tylko badanie serca w rezonansie magnetycznym (*magnetic resonance imaging* – MRI) umożliwiało tak dokładną analizę parametrów deformacji charakteryzujących dynamikę mięśnia sercowego. Badanie MRI jest wprawdzie uznane za „złoty standard” w tej dziedzinie, jednak rutynowe stosowanie go w badaniach przedklinicznych jest ograniczone ze względu na wysokie koszty, słabą dostępność, konieczność stosowania u zwierząt silnej sedacji, a także względną złożoność i czasochłonność analizowania obrazów [14,15]. Ciągły rozwój techniki STE polegający na tworzeniu coraz lepszych, dokładniejszych algorytmów, spowodował, że czułość techniki STE w wykrywaniu zmian kurczliwości serca jest obecnie porównywalna z czułością MRI [16,17].

Dzięki wielu zaletom badanie echokardiograficzne stało się podstawowym narzędziem oceny układu sercowo-naczyniowego w badaniach doświadczalnych na modelach małych zwierząt [18]. Naukowcy wykorzystując je w doświadczeniach przedklinicznych, często ograniczają się tylko do oceny zmian strukturalnych (wielkości komory, grubości mięśniówki) i globalnych zaburzeń kurczliwości serca (frakcji wyrzutowej – *ejection fraction*, EF; frakcji skracania – *fractional shortening*, FS).

Należy pamiętać, że te parametry „klasycznej” echokardiografii odzwierciedlają remodeling serca i raczej nie są obserwowane we wczesnych okresach choroby [19], a ocena kurczliwości serca za pomocą tych parametrów jest subiektywna, globalna i półilościowa, stąd potrzeba, a nawet konieczność wykorzystania nowych technik obrazowania echokardiografii w badaniach sercowo-naczyniowych u małych zwierząt. Przeniesienie techniki STE do warunków echokardiografii doświadczalnej pozwala na bardziej rzetelną i wiarygodną ocenę skuteczności terapii. Pomiar regionalnej deformacji serca uzyskiwane za pomocą tej metody są dużo bardziej czułe i specyficzne niż parametry klasycznej echokardiografii (EF, FS) [20].

Technika STE wydaje się bardzo atrakcyjną metodą, nie jest jednak pozbawiona wad i ograniczeń. Analiza obrazów 2D techniką STE jest bardzo wrażliwa na artefakty, które zacierając granice wsierdzia, uniemożliwiają prawidłowe śledzenie markerów akustycznych. Zdaniem niektórych autorów, od 6% do nawet 21% badanych segmentów lewej komory (*left ventricular* – LV) nie nadaje się do analizy [21,22,23]. Dlatego uzyskanie powtarzalnych obrazów o dobrej jakości



jest wciąż dużym wyzwaniem, szczególnie w warunkach echokardiografii doświadczalnej. W dostępnym piśmiennictwie techniczne i praktyczne aspekty tego badania są często pomijane lub opisane bardzo enigmatycznie, a nierzadko to właśnie one są kluczowe do uzyskania zadowalających nas obrazów.

Celem niniejszego opracowania jest zarówno ocena przydatności nowoczesnych technik echokardiograficznych w warunkach pracowni doświadczalnej, jak i opisanie technicznych oraz praktycznych zagadnień przeprowadzenia badania echokardiograficznego u myszy.

MATERIAŁ I METODY

Wszystkie doświadczenia na zwierzętach opisywane w niniejszym artykule zostały przeprowadzone za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej SUM w Katowicach (uchwała nr 68/2013 z dnia 14.10.2013 r.) i zgodnie z zasadami zawartymi w Interdisciplinary Principles and Guidelines for the Use of Animals in Research, Testing and Education, wydany przez New York Academy of Sciences' Ad hoc Committee on Animal Research.

Model choroby niedokrwiennej serca u myszy

Myszy wstępnie sedowano wziewnie, z użyciem izofluranu w stężeniu 3,5% w komorze do znieczuleń (*VevoAnesthesia System* – VAS), następnie przenoszono na podgrzewaną platformę zabiegową i intubowano wenflonem o rozmiarze 20G. Sztuczną wentylację prowadzono przy użyciu systemu *MiniVent Model 845* (Harvard Apparatus, USA), ze standardowymi parametrami częstości oddechów 120/min i objętości oddechowej 200–250 μL , z zastosowaniem ciągłego wziewnego znieczulenia izofluranem w stężeniu 2%. Po ogoleniu klatki piersiowej, zdezynfekowaniu pola operacyjnego i obłożeniu myszy sterylnym materiałem, z torakotomii bocznej uwidaczniano serce (ryc. 1A), podkłuwano i podwiązywano gałąź międzykomorową przednią lewej tętnicy wieńcowej (GPZ; *left anterior descending* – LAD)¹, używając nici polipropylenowej (ryc. 1B). Śródoperacyjnym potwierdzeniem zamknięcia naczynia było natychmiastowe zblednięcie obszaru lewej komory zaopatrywanego przez podwiązane naczynie, któremu często towarzyszyły zaburzenia rytmu serca.

Ścianę klatki piersiowej zamykano warstwowo, znieczulając miejscowo mięśnie i tkankę podskórną 1% roztworem lignokainy. Zwierzę wybudzono i po powrocie własnego oddechu ekstubowano. Po zabiegu umieszczano je w osobnej klatce, w osłonie leków przeciwbólowych, z pełnym dostępem do pokarmu oraz wody i poddawano 7-dniowemu okresowi obserwacji. Wskazówki, zagadnienia techniczne i szczegółowy opis, jak stworzyć dobrze funkcjonujący model doświadczalny, znajdują się w naszej wcześniejszej publikacji [3].

Ocena echokardiograficzna

Badania echokardiograficzne wykonano aparatem do ultrasonografii doświadczalnej *Vevo*[®]2100 Imaging System, wyposażonym w głowicę MS400 30-MHz. Badanie USG przeprowadzono przed zabiegiem podwiązania GPZ i w 7 dobie po zabiegu.

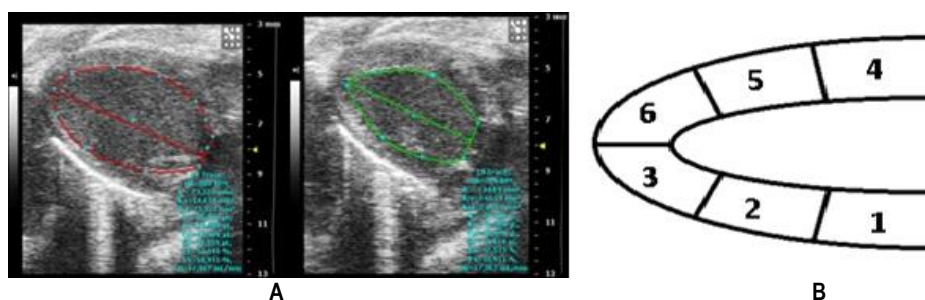
Zwierzęta po zakończonej indukcji znieczulenia (izofluranem w stężeniu 3,5% w komorze do znieczuleń VAS) przenoszono na podgrzewaną platformę do badania (wyposażoną w elektrody do zapisu EKG), gdzie stężenie izofluranu regulowano w taki sposób, aby uzyskać odpowiednią głębokość sedacji z częstością akcji serca (*heart rate* – HR) 400–500/min. Z projekcji przymostkowej obrazowano serce w osi długiej (*parasternal long axis* – PLAX), monitorując jednocześnie parametry fizjologiczne (EKG i częstość oddechów). Klasycznymi metodami echokardiograficznymi (*B-mode* oraz *M-mode*) mierzono objętość, wymiar wewnętrzny, frakcję skracania i frakcję wyrzutową lewej komory serca oraz długość blizny pozawałowej. Analizę frakcji wyrzutowej lewej komory (*left ventricular ejection fraction* – LVEF) przeprowadzono na objętościowym pakiecie obliczeniowym LV-Trace systemu *Vevo*[®]2100 (ryc. 2A). Wyniki przedstawiono na wykresie (ryc. 5).

Techniką śledzenia markerów akustycznych oceniano regionalną kurczliwość mięśnia sercowego za pomocą parametrów: odkształcenia (*strain*), prędkości (*velocity*) i przemieszczenia (*displacement*), analizowanych w dwóch kierunkach deformacji mięśnia sercowego: w przekroju podłużnym wzdłuż osi długiej (*longitudinal*) oraz wzdłuż promienia (*radial*) (ryc. 3A i 3B). Analizę kurczliwości regionalnej techniką śledzenia markerów akustycznych wykonano używając oprogramowania *VEVO Strain*[®]. Wyniki przedstawiono w tabelach i na wykresach (ryc. 6 i 7).

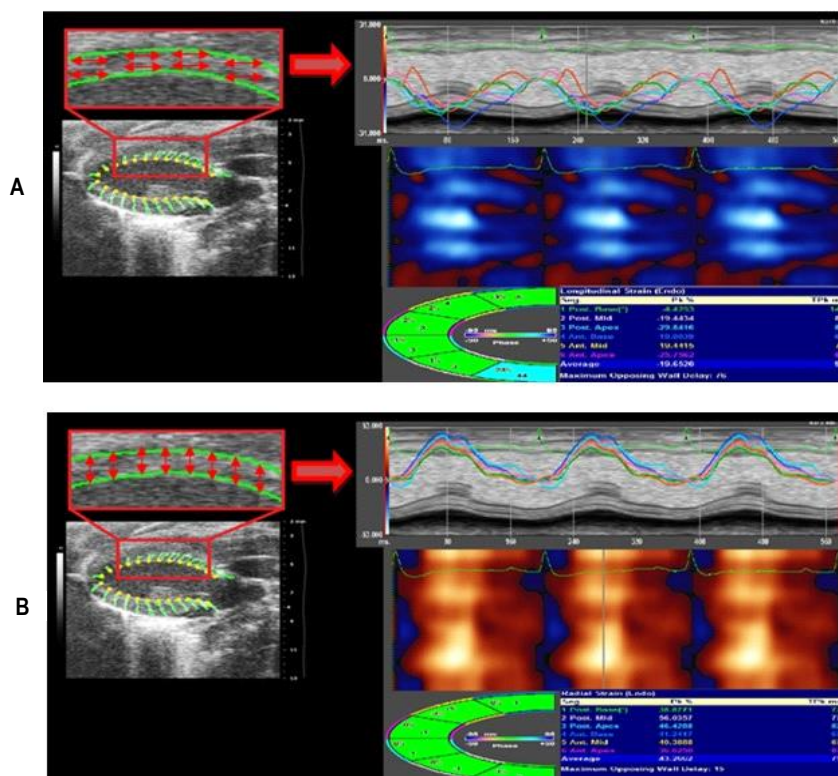
¹ U myszy odpowiednikiem gałęzi przedniej zstępującej lewej tętnicy wieńcowej (GPZ) jest gałąź międzykomorowa przystożkowa (*ramus interventricularis paraconalis*), która jest przedłużeniem lewej tętnicy wieńcowej, a jej przebieg i zakres unaczynienia jest podobny do GPZ, dlatego dla zachowania przejrzystości w dalszej części jest ona nazywana GPZ.



Ryc. 1. A – Ułożenie myszy do zabiegu i uwidocznienie serca z dostępu z torakotomii bocznej; B – podkucie i podwiązanie tętnicy GPZ szwem 8–0.
Fig. 1. A – Placement of mouse for surgery and exposure of heart from lateral thoracotomy access; B – underpinning and ligation of LAD artery with 8–0 suture.



Ryc. 2. A – Echokardiogramy przedstawiające pomiar LVEF za pomocą pakietu LV-Trace systemu VEVO®; B – schematyczny podział mięśniówki lewej komory na segmenty z numeracją jak w programie VEVO®. 1 – seg. podstawny tylny, 2 – seg. środkowy tylny, 3 – seg. koniuszkowy tylny, 4 – seg. podstawny przedni, 5 – seg. środkowy przedni, 6 – seg. koniuszkowy przedni.
Fig. 2. A – Echocardiograms depicting measurement of LVEF using LV-Trace package of VEVO® B system; B – Schematic division of left ventricular muscles into segments with numbering as in VEVO® program. 1 – seg. basal inferior, 2 – seg. mid inferior, 3 – seg. apical inferior, 4 – seg. basal anterior, 5 – seg. mid anterior, 6 – seg. apical anterior.



Ryc. 3. Analiza regionalnej kurczliwości techniką śledzenia markerów akustycznych.
Fig. 3. Regional contractility analysis using speckle tracking technique.



Ocena funkcji skurczowej lewej komory metodą klasyczną i STE

W klasycznym badaniu echokardiograficznym najbardziej popularnym parametrem używanym do oceny funkcji lewej komory jest LVEF. Z definicji jest to odsetek objętości końcoworozkurczowej, wyrzucany na obwód w czasie skurczu lewej komory (jest to w zasadzie parametr hemodynamiczny).

Aby klasycznym badaniem echokardiograficznym 2D obliczyć objętość komory, która jest strukturą trójwymiarową, korzystamy z różnych metod (metoda Teichholza czy zmodyfikowana metoda Simpsona), ponieważ kształtu lewej komory nie da się opisać za pomocą wzorów opisujących powszechnie znane figury geometryczne. Wymienione metody różnią się pewnymi geometrycznymi założeniami i uproszczeniami (z tego powodu możliwe są spore błędy w przypadku powiększonej czy zmniejszonej w trakcie remodelingu LV).

Parametr ten daje informacje jedynie o globalnej czynności skurczowej lewej komory i ma niewielką czułość w wykrywaniu regionalnych zaburzeń kurczliwości. W klasycznej echokardiografii ocena kurczliwości regionalnej jest trudna do analizy i opiera się na wzrokowej obserwacji ruchu mięśnia lewej komory w kierunku prostopadłym do osi długiej komory (w osi długiej), jest to jednak metoda jakościowa i subiektywna z dużą zmiennością między wynikami różnych obserwatorów [24,25]. Dodatkowo potrzebne jest spore doświadczenie echokardiograficzne, aby zauważyć nieprawidłowości w kurczliwości regionalnej, a mimo to małe subtelne zmiany są praktycznie niewykrywalne nawet dla doświadczonego badacza.

Warto zauważyć, że wizualna ocena ruchu ściany w klasycznej 2D echokardiografii ocenia tylko promieniowe odkształcenie mięśnia sercowego (pogru-

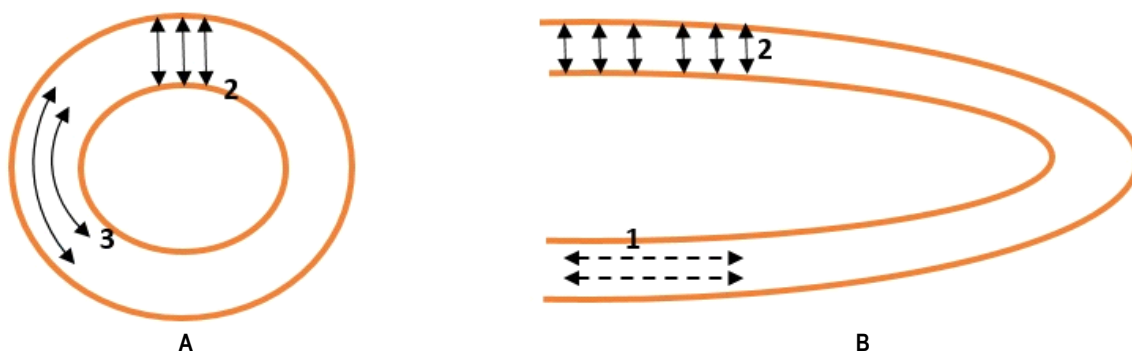
bienie), a wiadomo, że serce kurczy się w 3 wymiarach: na skurcz składa się zarówno skrócenie (1), pogrubienie (2), jak i skręcenie (3) mięśnia [8] (ryc. 4).

Technika STE pozwala śledzić położenie markerów akustycznych podczas trwania całego cyklu sercowego STE (klatka po klatce), umożliwiając ocenę deformacji i ruchu *myocardium* w trzech różnych kierunkach: podłużnym, promieniowym i okrężnym (ryc. 4). Półautomatyczny charakter tej analizy gwarantuje dobrą powtarzalność [26].

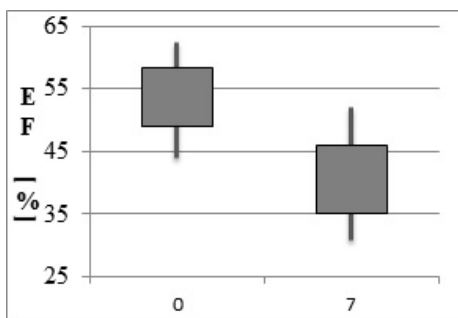
WYNIKI

W badaniu przeanalizowano echokardiogramy 28 samców myszy szczepu C57Bl/6NCr1 (8–10-tygodniowe) przed i po zabiegu podwiązania tętnicy wieńcowej $n = 28$; z analizowanych 336 segmentów serca odrzucono 26 z powodu artefaktów zaburzających poprawną ich analizę (7,7%). Wyniki przedstawiono na rycinach 5, 6 i 7.

W naszym badaniu dużą czułość techniki STE obserwowaliśmy u myszy z wydukuwanym niedokrwieniem o bardzo małym zasięgu (długość blizny pozawałowej ok. 1 mm, ryc. 8B). Wartość frakcji wyrzutowej mierzonej 7 dni po podwiązaniu GPZ praktycznie nie uległa u nich zmianie (mechanizmy kompensacyjne, takie jak zmiana geometrii komory czy poszerzenie komory, mogą utrzymać EF w granicach normy nawet w przypadku widocznej w obrazie echokardiograficznym niewielkiej blizny pozawałowej). U tych samych myszy analiza regionalnej deformacji serca techniką STE (ryc. 8C) wykazała istotny spadek wartości odkształcenia w obszarze objętym niedokrwieniem.

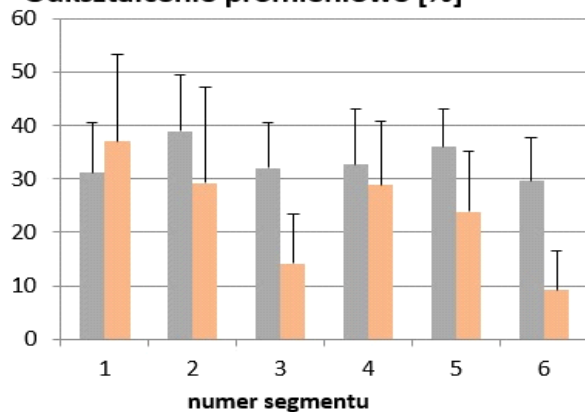


Ryc. 4. Schemat serca: A – w osi krótkiej (SAX); B – w osi długiej (PLAX).
Fig. 4. Heart diagram: A – short axis (SAX); B – parasternal long axis (PLAX).



Ryc. 5. Wykres wartości frakcji wyrzutowej lewej komory (EF).
Fig. 5. Graph depicts left ventricular ejection fraction value (EF).

Odształcenie promieniowe [%]

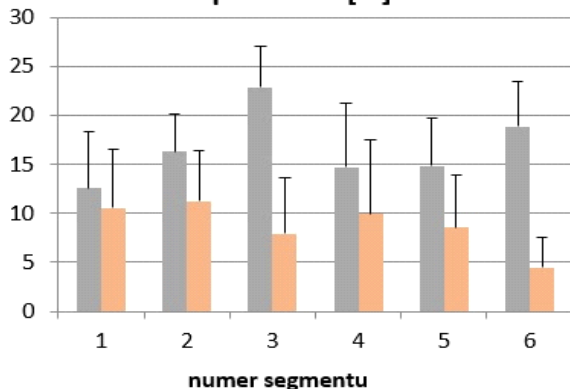


Nr segmentu	1	2	3	4	5	6
Odształcenie promieniowe-wartości wyjściowe	31,1	38,9	32	32,6	36	29,6
Odształcenie promieniowe-7 dni po indukcji niedokrwienia	37	29,3	14,1	28,9	23,9	9,2

Ryc. 6. Wykres odkształcenia promieniowego (*radial strain*) poszczególnych segmentów serca (opis ryc. 3B): kolor szary – myszy zdrowe n = 28 (*baseline*), kolor czerwony – myszy w 7 dni po indukcji niedokrwienia n = 28. W tabeli przedstawiono średnie wartości odkształcenia promieniowego dla danego segmentu.

Fig. 6. Graph presents radial strain of individual heart segments (description in Figure 3B): gray – healthy mice n = 28 (*baseline*), red – mice 7 days after induction of ischaemia n = 28. Table shows mean radial strain values for a given segment.

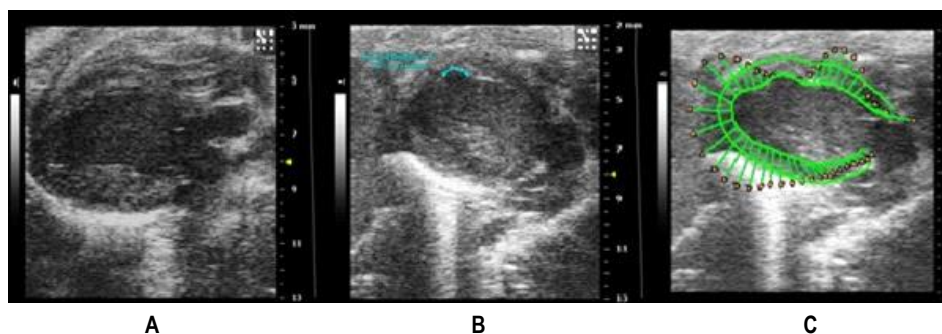
Odształcenie podłużne [%]



Nr segmentu	1	2	3	4	5	6
Odształcenie podłużne-wartości wyjściowe	12,5	16,3	22,9	14,7	14,8	18,8
Odształcenie podłużne -7 dni po indukcji niedokrwienia	10,6	11,3	7,9	9,9	8,6	4,5

Ryc. 7. Wykres odkształcenia podłużnego (*longitudinal strain*) poszczególnych segmentów serca (opis ryc. 3B): kolor szary – myszy zdrowe n = 28 (*baseline*), kolor czerwony – myszy w 7 dni po indukcji niedokrwienia n = 28. W tabeli przedstawiono średnie wartości odkształcenia podłużnego dla danego segmentu.

Fig. 7. Graph depicts longitudinal strain of individual heart segments (description in Figure 3B): gray – healthy mice n = 28 (*baseline*), red – mice 7 days after induction of ischaemia n = 28. Table shows mean values of longitudinal strain for a given segment.



Ryc. 8. Obrazy echokardiograficzne: A – serca zdrowego (przed podwiązaniem GPZ); B – serca w 7 dobie po zabiegu podwiązania GPZ (zaznaczono linią małą bliznę pozawałową o dł. 1 mm); C – tego samego serca po analizie techniką STE, wartość odkształcenia przedstawiono graficznie za pomocą wektorów.

Fig. 8. Figure depicts echocardiographic images of: A – healthy heart (before LAD ligation); B – heart on 7th day after LAD ligation (marked with small post-infarction 1 mm length line); C – same heart after STE analysis, deformation value graphically represented by vectors.

WNIOSKI

Badanie echokardiograficzne jest podstawowym i bardzo przydatnym narzędziem oceny układu sercowo-naczyniowego w badaniach doświadczalnych na modelach małych zwierząt. Umożliwia ono nieinwazyjną ocenę morfologii i funkcji serca, a dodatkowo – dzięki zastosowaniu techniki STE – także ilościową, dokładną ocenę regionalnej kurczliwości serca. Pomiar regionalnej deformacji serca uzyskiwane dzięki technice STE są dużo bardziej czułe niż parametry klasycznej echokardiografii (jak podaje wielu autorów, czułość badania STE jest porównywalna z badaniem MRI), co istotnie podnosi wiarygodność uzyskanych danych i pozwala w sposób bardziej rzetelny oceniać wpływ terapii na kurczliwość serca.

Ocena deformacji *myocardium* techniką STE wymaga obrazów echokardiograficznych bardzo dobrej jakości. W warunkach pracowni doświadczalnej dobre i powtarzalne obrazowanie serca jest zadaniem niełatwym i wymaga echokardiograficznego doświadczenia.

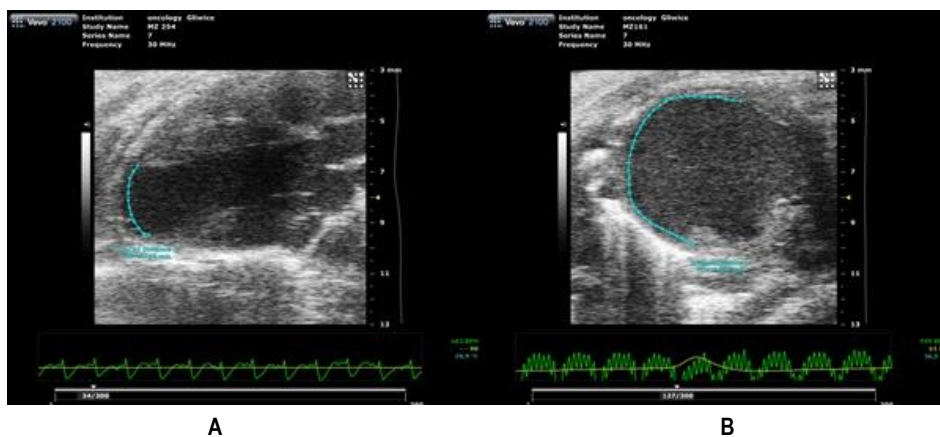
Badanie echokardiograficzne okazało się także bardzo przydatne przy doborze zwierząt do badania. Wykonane po zabiegu indukcji niedokrwienia, było nie tylko bezpośrednim dowodem na dokonane niedokrwienie, ale także podstawą do zróżnicowania ciężkości uszkodzenia serca, dając unikatową możliwość stworzenia jednorodnej grupy badanej.

DYSKUSJA

Wykorzystując myszy w modelu choroby niedokrwiennej serca, należy pamiętać, że anatomia naczyń

wieńcowych mysiego serca jest inna niż u człowieka. System naczyń, który widzimy po otwarciu klatki piersiowej myszy, to żyłne naczynia wieńcowe. Tętnice wieńcowe są znacznie trudniejsze do zaobserwowania nawet przy mocnym świetle i powiększeniu, dlatego nierzadko tętnica przednia zstępująca podwiązana jest „na ślepo”. Lewa tętnica wieńcowa jest tętnicą dominującą, a gałąź okalająca lewej tętnicy wieńcowej (GO), która u człowieka jest dużą gałęzią lewej tętnicy wieńcowej, u myszy jest niewielkim naczyniem i pojawia się raczej jako zanikowe, co podnosi rolę GPZ w unaczynieniu lewej komory. Skutkuje to tym, że w grupie myszy z podwiązaną GPZ znajdują się zarówno myszy z małym jedno-segmentowym zawałem, jak i z bardzo rozległym zawałem obejmującym 4–5 segmentów (ryc. 9) w zależności od tego, jak wysoko podwiązana została GPZ [1,27]. Oczywiście w tej już niejednorodnej grupie znajdują się również myszy, u których nie udało się wywołać zawału z powodu „nietrafienia” w GPZ podczas operacji, w naszym badaniu to około 20%. Inną ważną cechą w unaczynieniu serca myszy jest bardzo duża osobnicza zmienność przebiegu i układu naczyń wieńcowych [1,27], co także utrudnia stworzenie jednorodnej grupy badanej.

Z tego względu w prowadzonych przez nas badaniach na mysim modelu choroby niedokrwiennej echokardiografia okazała się także bardzo przydatna przy doborze myszy do badania. Badanie echokardiograficzne wykonane w 7 dobie po zabiegu było nie tylko bezpośrednim dowodem na dokonane niedokrwienie (uwidocznienie blizny pozawałowej, akineza niedokrwionych segmentów, spadek EF), ale także podstawą kwalifikacji myszy zależnie od np. ciężkości uszkodzenia serca (EF) czy długości blizny, dając możliwość stworzenia bardziej jednorodnej grupy badanej.



Ryc. 9. Obrazy mysich serc w 7 dni po zabiegu podwiązania GPZ na różnych poziomach: A – obraz serca z małym ograniczonym koniuszkowym zawałem (długość blizny 3,1 mm), spadek frakcji wyrzutowej z 64% do 43%; B – obraz serca z rozległym zawałem obejmującym wiele segmentów (długość blizny 10,4 mm), spadek frakcji wyrzutowej z 57% do 23%.

Fig. 9. Pictures above depict images of mouse hearts on 7th day after LAD ligation but at different levels: A – image of heart with small limited apical myocardial infarction (scar length 3.1 mm) decreases ejection fraction from 64% to 43%; B – image of heart with large infarction covering many segments (scar length 10.4 mm) decrease in ejection fraction from 57% up to 23%.

Echokardiografia doświadczalna

Największym problemem w naszym doświadczeniu było uzyskanie powtarzalnych obrazów o bardzo dobrej jakości, które są niezbędne do poprawnej analizy parametrów regionalnej kureczliwości metodą STE. Wykorzystując to badanie do oceny serca małych zwierząt w warunkach pracowni doświadczalnej, należy pamiętać o kilku zagadnieniach, które istotnie wpływają na jakość obrazów echokardiograficznych.

1. Sprzęt

Mysie serce wielkością odpowiada ziarenku kawy, dlatego aby je dobrze zobrazować, potrzebna jest głowica o dużej rozdzielczości, dużo większej niż głowice używane w klinice do badań ludzi. Zdolność rozdzielcza, czyli minimalna wielkość patologicznej zmiany zauważalnej przez aparat, zależy dodatkowo od częstotliwości ultradźwięków używanych do badania. Zależność taka rodzi pytanie, czy można w nieskończoność zwiększać częstotliwość fali, uzyskując coraz to większą zdolność rozdzielczą? Obecnie głównym ograniczeniem zdolności rozdzielczej w USG są właściwości fizyczne samej fali ultradźwiękowej. Nie można do woli zwiększać jej częstotliwości, ponieważ przenikliwość, a więc głębokość docierania (penetracji) wiązki ultradźwiękowej, jest do częstotliwości odwrotnie proporcjonalna.

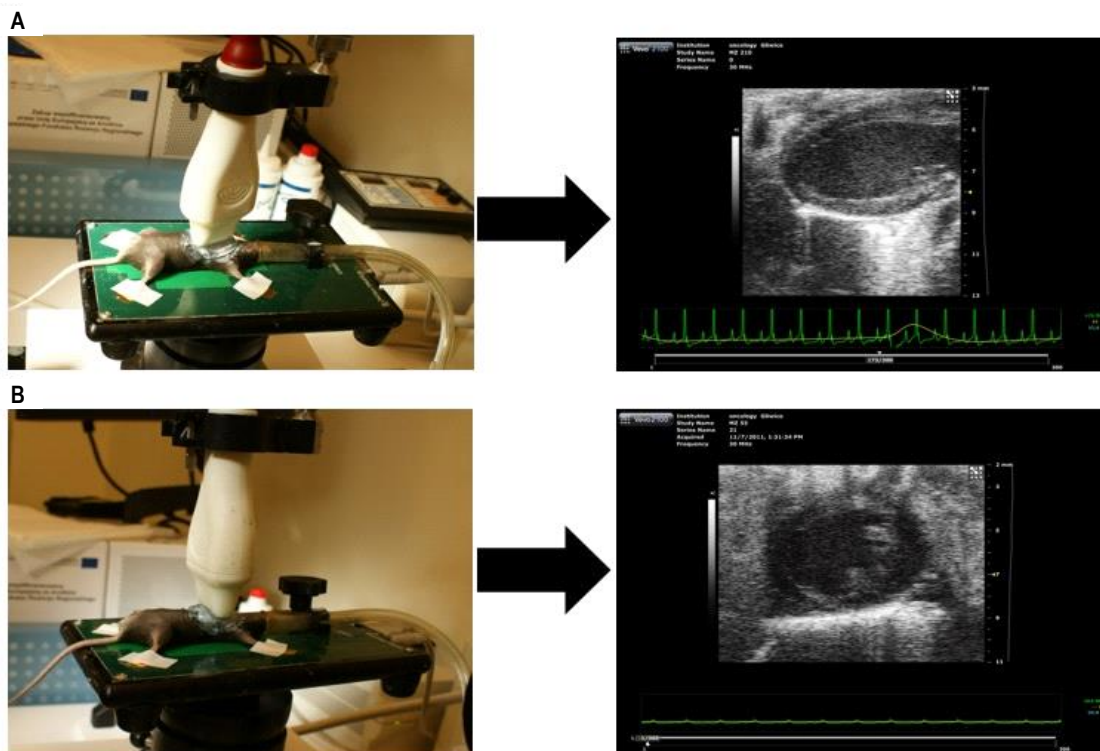
↑ częstotliwości fali = ↑ rozdzielczości obrazu
↑ częstotliwości fali = ↓ przenikliwości fali

W naszym badaniu wykorzystaliśmy głowicę MS400 o częstotliwości 18–38 MHz (w badaniu u ludzi stosuje się głowice o częstotliwości 2,5–3,5 MHz).

Niezmiernie ważnym parametrem podczas badania myszy jest szybkość odwzorowania ultrasonograficznego, czyli częstość powtarzania obrazów (*frame rate* – FR). Innymi słowy, jak dużo klatek na sekundę zapisuje aparat USG w postaci filmu. Mysie serce obserwowane w USG jest strukturą ruchomą, bije z częstością około 500 uderzeń/min. W technice STE analiza parametrów deformacji jest możliwa dzięki śledzeniu pikseli klatka po klatce, dlatego aby poprawnie zanalizować cały cykl serca, konieczna jest częstość powtarzania min. rzędu 300FR (300 klatek na sekundę).

2. Projekcje i obrazowanie serca

Oceniając mysie serce w badaniu echokardiograficznym, najczęściej korzysta się z dwóch projekcji: w osi długiej serca – PLAX (ryc. 10A) i w osi krótkiej (*short axis* – SAX; ryc. 10B). Możliwe jest także zobrazowanie serca w innych projekcjach (np. projekcja koniuszkowa czterojamowa, projekcja nadmostkowa czy projekcja obrazująca łuk aorty), jednak jest to trudne i rzadko przydatne.



Ryc. 10. Przygotowana do badania mysz (ufiksowane na elektrodach do EKG kończyny, inhalacja izofluranem) i ustawienie głowicy USG w celu uzyskania odpowiednich projekcji.

Fig. 10. Mouse prepared for examination (ECG electrodes fixed on limbs, inhalation with isoflurane) is presented and ultrasound transducer is set up to obtain appropriate projections.

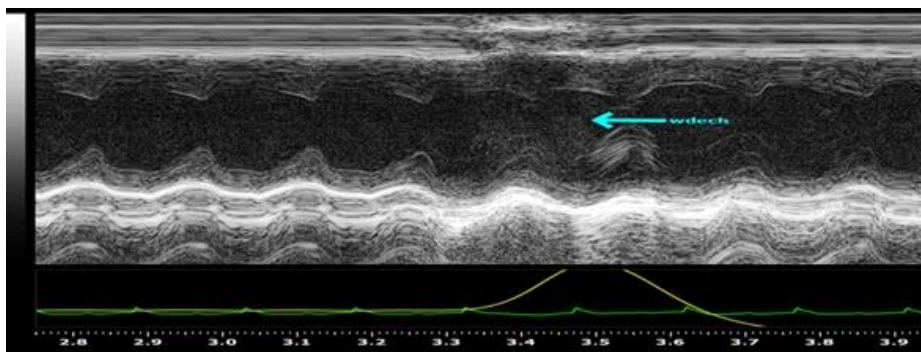
3. Znieczulenie myszy do badania

Znieczulenie myszy do badania, konieczne do zapewnienia spokoju i bezruchu zwierzęcia, jest zawsze kompromisem między głębokością sedacji a depresją układu krążenia. Zbyt płytka sedacja uniemożliwia wykonanie badania i wywołuje u myszy niepotrzebny stres (wzrasta HR), natomiast zbyt głęboka sedacja powoduje depresję układu krążenia (spadek HR), co może istotnie zaburzyć nasze wyniki. W naszych badaniach stosowaliśmy izofluran, wziewny środek do znieczulenia ogólnego najczęściej stosowany w badaniu echokardiograficznym myszy [28]. Charakteryzuje się on szybkim początkiem działania i krótkim czasem eliminacji, a głębokość znieczulenia zwierzęcia zmienia się szybko w zależności od stężenia izofluranu

w mieszaninie gazowej (dzięki tym właściwościom, regulując stężenie izofluranu, możemy w prosty sposób ustalić stały poziom sedacji przy minimalnej depresji układu krążenia).

4. Ruchy oddechowe

Analiza ruchu i odkształcenia *myocardium* w technice STE może zostać zaburzona przez dodatkowe ruchy klatki piersiowej spowodowane oddychaniem (ryc. 11), co może przełożyć się na nieprawidłowe wyniki. Dlatego też techniką STE należy analizować tylko te cykle pracy serca, na które nie nakłada się oddech. Można to zrobić automatycznie za pomocą oprogramowania (bramkowanie oddechów) albo usuwać je ręcznie przed każdą analizą.



Ryc. 11. M-mode przekrój poprzeczny przez mięśniówkę lewej komory; linia zielona – zapis EKG; linia żółta – zapis czynności oddechowej; strzałką zaznaczono zaburzenie (artefakt) w obrazie USG spowodowane oddechem myszy.

Fig. 11. M-mode cross section through left ventricular muscles; green line – ECG recording; yellow line – respiratory function recording; arrow indicates disorder (artifact) in ultrasound image caused by breathing of mouse.

5. Umiejętności, praktyka

Jakość i powtarzalność uzyskiwanych obrazów echokardiograficznych wzrasta wraz z doświadczeniem osoby badającej. Według naszych obserwacji, dopiero około 50–80 badań wykonanych samodzielnie (ale pod nadzorem osoby doświadczonej) gwarantuje powtarzalność dobrej jakości obrazów.

6. Wychłodzenie

Myszy mają niekorzystny stosunek powierzchni ciała do objętości, dlatego są bardzo podatne na wychłodzenie. Podczas badania konieczne jest monitorowa-

nie temperatury ciała zwierzęcia (np. sondą doodbytniczą), aby nie spadła poniżej 35°C. Głównymi czynnikami powodującymi wychłodzenie są: brak sierści na klatce piersiowej myszy i używanie zimnego żelu do USG. Aby temu zapobiec, korzystamy z podgrzewanej platformy, na której znajduje się badana mysz, podgrzewacza do żelu USG, a w razie konieczności dogrzewamy mysz lampą grzejącą z żarówką emitującą podczerwień.

Praca powstała dzięki grantowi Śląskiego Uniwersytetu Medycznego nr KNW-1-169/N/3/0.

Author's contribution

Study design – M.A. Garbacz, T. Niklewski, J. Śliwka, M. Zembala, M. Zembala
Data collection – M.A. Garbacz, T. Jaźwiec, J. Śliwka, M. Domagała, M. Garbacz, K. Froń
Data interpretation – M.A. Garbacz, T. Niklewski, M. Kaczmarczyk
Statistical analysis – M.A. Garbacz, M. Kaczmarczyk
Manuscript preparation – M.A. Garbacz, T. Niklewski
Literature research – M.A. Garbacz, M. Kaczmarczyk, M. Zembala, M. Zembala

PIŚMIENNICTWO:

1. Ahn D., Cheng L., Moon C., Spurgeon H., Lakatta E.G., Talan M.I. 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(3): H1201–1207, doi: 10.1152/ajpheart.00862.2003.
2. Bayat H., Swaney J.S., Ander A.N., Dalton N., Kennedy B.P., Hammond H.K., Roth D.M. Progressive heart failure after myocardial infarction in mice. *Basic Res. Cardiol.* 2002; 97(3): 206–213.
3. Śliwka J., Kumasza B., Garbacz M., Pakuło S., Nowak K., Domagała M., Jaźwiec T., Zandecki M., Cichoń T., Nożyński J., Smolarczyk R., Szala S., Zembala M., Zembala M. Zawał mięśnia sercowego u myszy – jak stworzyć dobrze funkcjonujący model doświadczalny. *Kardiochir. Torakochir. Pol.* 2012; 9(2): 243–251.
4. Baumans V. Use of animals in experimental research: an ethical dilemma? *Gene Ther.* 2004; 11(S1): S64–66, doi: 10.1038/sj.gt.3302371.
5. Lutgens E., Daemen M.J., de Muinck E.D., Debets J., Leenders P., Smits J.F. Chronic myocardial infarction in the mouse: cardiac structural and functional changes. *Cardiovasc. Res.* 1999; 41(3): 586–593.
6. Patten R.D., Aronovitz M.J., Deras-Mejia L., Pandian N.G., Hanak G.G., Smith J.J., Mendelsohn M.E., Konstam M.A. Ventricular remodeling in a mouse model of myocardial infarction. *Am. J. Physiol.* 1998; 274(5 Pt 2): H1812–1820.
7. Takagawa J., Zhang Y., Wong M.L., Sievers R.E., Kapasi N.K., Wang Y., Yeghiazarians Y., Lee R.J., Grossman W., Springer M.L. Myocardial infarct size measurement in the mouse chronic infarction model: comparison of area- and length-based approaches. *J. Appl. Physiol. Bethesda. Md.* 1985. 2007; 102(6): 2104–2111, doi: 10.1152/jappphysiol.00033.2007.
8. Perk G., Tunick P.A., Kronzon I. Non-Doppler two-dimensional strain imaging by echocardiography—from technical considerations to clinical applications. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* 2007; 20(3): 234–243, doi: 10.1016/j.echo.2006.08.023.
9. Blessberger H., Binder T. Two dimensional speckle tracking echocardiography: basic principles. *Heart* 2010; 96(9): 716–722, doi: 10.1136/hrt.2007.141002.
10. Dandel M., Lehmkuhl H., Knosalla C., Suramashvili N., Hetzer R. Strain and Strain Rate Imaging by Echocardiography – Basic Concepts and Clinical Applicability. *Curr. Cardiol. Rev.* 2009; 5(2): 133–148, doi: 10.2174/157340309788166642.
11. Kang S.J., Lim H.S., Choi B.J., Choi S.Y., Hwang G.S., Yoon M.H., Tahk S.J., Shin J.H. Longitudinal strain and torsion assessed by two-



- dimensional speckle tracking correlate with the serum level of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1, a marker of myocardial fibrosis, in patients with hypertension. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* 2008; 21(8): 907–911, doi: 10.1016/j.echo.2008.01.015.
12. Ng A.C., Delgado V., Bertini M., van der Meer R.W., Rijzewijk L.J., Shanks M., Nucifora G., Smit J.W., Diamant M., Romijn J.A., de Roos A., Leung D.Y., Lamb H.J., Bax J.J. Findings from left ventricular strain and strain rate imaging in asymptomatic patients with type 2 diabetes mellitus. *Am. J. Cardiol.* 2009; 104(10): 1398–1401, doi: 10.1016/j.amjcard.2009.06.063.
13. Choi J.O., Cho S.W., Song Y.B., Cho S.J., Song B.G., Lee S.C., Park S.W. Longitudinal 2D strain at rest predicts the presence of left main and three vessel coronary artery disease in patients without regional wall motion abnormality. *Eur. J. Echocardiogr.* 2009; 10(5): 695–701, doi: 10.1093/ejehocardiography/jep041.
14. Mondillo S., Galderisi M., Mele D., Cameli M., Lomoriello V.S., Zacà V., Ballo P., D'Andrea A., Muraru D., Losi M., Agricola E., D'Errico A., Buralli S., Sciomer S., Nistri S., Badano L. Speckle-tracking echocardiography: a new technique for assessing myocardial function. *J. Ultrasound Med.* 2011; 30(1): 71–83.
15. Götte M.J., Germans T., Rüssel I.K., Zwanenburg J.J., Marcus J.T., van Rossum A.C., van Veldhuisen D.J. Myocardial strain and torsion quantified by cardiovascular magnetic resonance tissue tagging: studies in normal and impaired left ventricular function. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2006; 48(10): 2002–2011, doi: 10.1016/j.jacc.2006.07.048.
16. Amundsen B.H., Helle-Valle T., Edvardsen T., Torp H., Crosby J., Lyseggen E., Støylen A., Lima J.A., Smiseth O.A., Slørdahl S.A. Noninvasive myocardial strain measurement by speckle tracking echocardiography: validation against sonomicrometry and tagged magnetic resonance imaging. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2006; 47(4): 789–793, doi: 10.1016/j.jacc.2005.10.040.
17. Kylmälä M.M., Antila M.K., Kivistö S.M., Lauerma K., Vesterinen P.H., Hänninen H.A., Toivonen L., Laine M.K. Tissue Doppler strain-mapping in the assessment of the extent of chronic myocardial infarction: validation using magnetic resonance imaging. *Eur. J. Echocardiogr.* 2008; 9(5): 678–684, doi: 10.1093/ejehocardiography/jen127.
18. Hoit B.D. Echocardiographic characterization of the cardiovascular phenotype in rodent models. *Toxicol. Pathol.* 2006; 34(1): 105–110, doi: 10.1080/01926230500369535.
19. Borg A.N., Ray S.G. A unifying framework for understanding heart failure? Response to “Left Ventricular Torsion By Two-Dimensional Speckle Tracking Echocardiography in Patients With Diastolic Dysfunction and Normal Ejection Fraction” by Park SJ et al. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* 2009; 22(3): 318–320; 321–322, doi: 10.1016/j.echo.2008.11.026.
20. Cottrell C., Kirkpatrick J.N. Echocardiographic strain imaging and its use in the clinical setting. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* 2010; 8(1): 93–102.
21. Hurlburt H.M., Aurigemma G.P., Hill J.C., Narayanan A., Gaasch W.H., Vinch C.S., Meyer T.E., Tighe D.A. Direct ultrasound measurement of longitudinal, circumferential, and radial strain using 2-dimensional strain imaging in normal adults. *Echocardiography* 2007; 24(7): 723–731, doi: 10.1111/j.1540-8175.2007.00460.x.
22. Marwick T.H., Leano R.L., Brown J., Sun J.P., Hoffmann R., Lysyansky P., Becker M., Thomas J.D. Myocardial strain measurement with 2-dimensional speckle-tracking echocardiography: definition of normal range. *JACC Cardiovasc. Imaging* 2009; 2(1): 80–84, doi: 10.1016/j.jcmg.2007.12.007.
23. Lipiec P., Szymczyk E., Michalski B., Stefańczyk L., Woźniakowski B., Rotkiewicz A., Szymczyk K., Kasprzak J.D. Echokardiograficzna ocena żywotności mięśnia sercowego w spoczynku techniką śledzenia markerów akustycznych – porównanie z echokardiografią obciążeniową. *Pol. Prz. Kardiol.* 2010; 12(4): 281–286.
24. Hoffmann R., Lethen H., Marwick T., Arnese M., Fioretti P., Pingitore A., Picano E., Buck T., Erbel R., Flachskampf F.A., Hanrath P. Analysis of interinstitutional observer agreement in interpretation of dobutamine stress echocardiograms. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1996; 27(2): 330–336.
25. Kvitting J.P., Wigström L., Strotmann J.M., Sutherland G.R. How accurate is visual assessment of synchronicity in myocardial motion? An in vitro study with computer-simulated regional delay in myocardial motion: clinical implications for rest and stress echocardiography studies. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* 1999; 12(9): 698–705.
26. van Dalen B.M., Soliman O.I., Vletter W.B., Kauer F., van der Zwaan H.B., ten Cate F.J., Geleijnse M.L. Feasibility and reproducibility of left ventricular rotation parameters measured by speckle tracking echocardiography. *Eur. J. Echocardiogr.* 2009; 10(5): 669–676, doi: 10.1093/ejehocardiography/jep036.
27. Yoldas A., Ozmen E., Ozdemir V. Macroscopic description of the coronary arteries in Swiss albino mice (*Mus musculus*). *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 2010; 81(4): 247–252.
28. Pachon R.E., Scharf B.A., Vatner D.E., Vatner S.F. Best anesthetics for assessing left ventricular systolic function by echocardiography in mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2015; 308(12): H1525–1529, doi: 10.1152/ajpheart.00890.2014.