

EKSPERIMENTIŠKAI SUKELTAS MIOKARDO INFARKTAS, KOMPLIKACIJOS IR TROPONINO I KONCENTRACIJOS POKYČIAI TRIUŠIŲ KRAUJYJE

Vilius Skipskis^{1,2}, Vaidas Vysockas², Ieva Antanavičiūtė², Juozas Kvalkauskas¹, Albina Aniulienė³

¹*Neužkrečiamųjų ligų katedra, Veterinarijos akademija, Lietuvos sveikatos mokslų universitetas
Tilžės g. 18 LT-47181 Kaunas; tel. +370 37 36 28 81; el. paštas: skipskis@lva.lt*

²*Kardiologijos institutas, Lietuvos sveikatos mokslų universitetas; Sukilėlių pr. 17 LT-3007 Kaunas*

³*Užkrečiamųjų ligų katedra, Veterinarijos akademija, Lietuvos sveikatos mokslų universitetas
Tilžės g. 18 LT-47181 Kaunas*

⁴*Vytauto Didžiojo universitetas, K. Donelaičio g. 58, LT-44248 Kaunas*

Santrauka. Tyrimo tikslas – eksperimentiškai sukelti miokardo infarktą (MI) laboratoriniams triušiams; išsiaiškinti dažniausias pooperacines komplikacijas; nustatyti troponino I (TnI) rodiklius sveikų Naujosios Zelandijos triušių kraujyje prieš ir praėjus 10–12 val. po MI sukėlimo operacijos. Eksperimentui panaudoti 29 sveiki N. Zelandijos triušiai. Perrišant priekinės tarpškilvelinės kairiosios vainikinės arterijos šaką ties viduriniu segmentu, triušiams buvo dirbtinai sukeltas miokardo infarktas. Iš visų eksperimentui naudotų triušių tinkamai operacija pavyko 62 proc., 38 proc. operacijų buvo nesėkmingos. Dažniausiai pasitaikančios komplikacijos po operacijos buvo ūmus respiracinis distreso sindromas, širdies tamponada ir širdies nepakankamumas. TnI koncentracija nustatyta septyniems triušiams greitu kiekybiniu imunofluorescentiniu metodu Triage Cardiac, Biosite Diagnostics, MI slenkstinė diagnostinė TnI koncentracija kraujyje yra 1,0 ng/ml. Ją viršijus diagnozuojamas miokardo infarktas. Tyrimo metu nustatėme, kad prieš MI triušio kraujyje TnI koncentracija buvo 0 ng/ml–0,1 ng/ml, po MI TnI padidėjo nuo 2,1 iki 13,3 ng/ml.

Raktažodžiai: miokardo infarktas, troponinas I, laboratoriniai triušiai.

EXPERIMENTAL DEVELOPMENT OF MYOCARDIAL INFARCTION, COMPLICATIONS AND INCREASE OF THE CARDIAC TROPONIN I LEVEL IN THE RABBITS BLOOD

Vilius Skipskis^{1,2}, Vaidas Vysockas², Ieva Antanavičiūtė², Juozas Kvalkauskas¹, Albina Aniulienė³

¹*Department of Non-infectious Diseases, Veterinary Academy of Lithuanian University of Health Sciences
Tilžės str. 18 LT-47181, Kaunas, Lithuania; Phone +370 37 36 28 81; E-mail: skipskis@lva.lt*

²*Institute of Cardiology of Lithuanian University of Health Sciences
Sukilėlių str. 17 LT-3007, Kaunas, Lithuania*

³*Department of Infectious Diseases, Veterinary Academy of Lithuanian University of Health Sciences
Tilžės str. 18 LT-47181, Kaunas, Lithuania*

⁴*Vytautas Magnus University, K. Donelaičio str. 58, LT-44248, Kaunas, Lithuania*

Abstract. The purpose of this study is to induce the experimental myocardial infarction (M/I) in laboratory rabbits to examine most common post-operation complications and to evaluate the cardiac troponine I (TnI) level in the blood of healthy N. Zealand rabbits before M/I operation and 10–12 hours after it. Twenty nine healthy N. Zealand rabbits were used for the experiment. The myocardial infarction was induced closing the frontal left artery branch beside the middle segment. 62% of experimental myocardial infarction (M/I) operations were successful, the other 38% operations had surgical complications such as: acute respiratory distress syndrome, cardiac tamponade, and cardiac insufficiency. The level of the cardiac TnI was determined using the rapid immunofluorescence assay Triage Cardiac, Biosite Diagnostics. During the examination of the rabbit blood, we established that before M/I the TnI concentration in the blood was within the range 0 ng/ml–0.1 ng/ml, however, 12 hours after M/I operation the TnI level increased from 2.1 ng/ml to 13.3 ng/ml. The TnI levels in the blood exceeding 1.0 ng/ml indicate the M/I.

Keywords: myocardial infarction, troponine I, laboratory rabbit.

Įvadas. Miokardo infarktu (*infarctus myocardii*) (MI) pagal Pasaulio Sveikatos Organizacijos (PSO) ekspertų rekomendacijas vadinamas dėl ūmiai sumžėjusios arba visiškai nutrūkusios regioninės kraujo perfuzijos susidaręs 0,5 cm ar didesnio skersmens koaguliacinės nekrozės židynys.

Lietuvos sveikatos apsaugos statistikos duomenimis, apie 25 tūkst. žmonių kasmet suseraga išemine širdies liga. Kiekvienais metais pirmą kartą liga diagnozuojama apie 18 tūkst. žmonių. Aterosklerozinės plokštelės sukelia vainikinių arterijų spindžio susiaurėjimą, dėl to sutrinka deguonies ir maisto medžiagų transportas į širdį. Ūmus

miokardo infarktas kasmet ištinka 5000–6000 žmonių.

Išeminė širdies liga yra dažniausia mirties priežastis išsivysčiusiose šalyse (Hu et al., 2010). Nustatyta, kad 1,2 milijono amerikiečių turi pirmą ar pasikartojantį koronarinį širdies sindromą, o mirtingumas siekia beveik pusę milijono kas metai (Lloyd-Jones et al., 2009). Taigi širdies ligos tampa vis svarbesne medicinos problema, reikalaujančia didelių investicijų ligonių hospitalizacijai, gydymui ir slaugai.

Pastaraisiais metais mokslininkai įrodė, kad širdis turi kamienines ląsteles, kurios gali formuoti širdies raumens struktūras. Plėtojama ląstelinė kardiomioplastika – tai *in*

situ ląstelių implantacija, siekiant indukuoti naujų raumeninių skaidulų augimą ir angiogenezę pažeistame miokarde (Seeger et al., 2007; Kolossov et al., 2006; Herreros et al., 2003).

Šiuo metu itin aktualus klausimas – kurios ląstelės tinkamiausios miokardui regeneruoti. Iki šiol tirtos *ex vivo* arba implantuotos į miokardą ląstelės širdies miogenezėi (skersaruožių raumenų mioblastai, lygiųjų raumenų ląstelės, kaulų čiulpų multipotentinės pirminės ląstelės, embrioninės ląstelės, vaisiaus kardiomiocitai ir širdies raumens kamieninės ląstelės) bei ląstelės angiogenezėi (endotelinės ląstelės iš arterijų ar venų intimos, cirkuliuojančios kraujyje kamieninės ląstelės) sukelti (Bearzi et al., 2007; Seeger et al., 2007; Kolossov et al., 2006; Ozbaran et al., 2004; Copeland et al., 2004; Rastan, Walther, 2005; Kofidis, Akhyari, 2002).

Moksliniai tyrimai širdies ligoms ir miokardo išemijai tyrinėti atliekami su laboratoriniais gyvūnais, dažniausiai – su triušiais (Verdouw et al., 1998; Hu et al., 2010; Saba et al., 2008; Shiomi et al., 2003). Literatūroje yra nemažai publikacijų apie eksperimentus, kurių metu naudojami laboratoriniai gyvūnai, apie eksperimentiškai sukeltą miokardo infarktą triušiams, taip pat apie ląstelių ir audinių transplantavimą, kamieninių ląstelių panaudojimą norint pakeisti arba regeneruoti pažeistą miokardą. Tačiau yra mažai duomenų apie išsamią operacinę techniką dirbtinai sukeltam MI bei naudojant triušio širdį kaip modelį (Hu et al., 2010) ir praktiškai nėra duomenų apie pooperacines komplikacijas. Lietuvoje tokių tyrimų atlikta labai mažai.

Šiame darbe aprašome naudotą MI sukėlimo operacinę techniką triušiams, perrišant širdies tarpškilvelinės kairiosios vainikinės arterijos šaką. Vėliau šiems triušiams buvo implantuotos kamieninės ląstelės, tačiau implantacijos rezultatų šiame straipsnyje napateikiame.

Dirbtinai sukeltam MI patvirtinti, be elektrokardiogramos (EKG) ir vizualaus širdies pokyčių įvertinimo, pirmą kartą taikytas troponino I testas, taikomas žmonių MI diagnozei patvirtinti. Literatūros duomenimis, imunofermentiniai testai, taikomi žmogaus TnI koncentracijos kraujo plazmoje nustatyti, yra gana veiksmingi ir daugeliui kitų žinduolių, nes įvairių gyvūnų rūšių kardiopspecifinių baltymų troponinų struktūra ir funkcijos yra labai panašios (O'Brien et al., 2006; Apple et al., 2008). Įvykus miokardo nekrozei, dėl pažeisto ląstelių membranos vientisumo į tarpląstelinę terpę ir kraujotaką išsiskiria struktūriniai baltymai ir kitos ląstelėje esančios miocitų makromolekulės.

Miokardo nekrozės biocheminiai žymenys – troponinas I ir T (TnI ir TnT), kreatinkinazė (CK), mioglobinas, laktatdehidrogenazė ir kt. Širdies troponinų radimasis periferinėje kraujotakoje visada rodo miokardo pažeidimą (Landesberg et al., 2001; O'Brien et al., 2006). Ūminiam miokardo infarktui diagnozuoti kaip biocheminiai žymenys dažnai naudojami kardiopspecifiniai kontraktilinės sistemos baltymai – troponinas T (TnT) ir troponinas I (TnI). Taigi troponino kiekio padidėjimas kraujyje yra pirmos eilės žymuo nustatant miokardo pažeidimą dėl jo didesnio jautrumo ir specifiškumo palyginti su kitais šiuo metu naudojamais žymenimis. Širdinio TnT ir TnI

izoformos yra būdingos tik širdies miocitams ir skiriasi nuo esančių skeleto raumenyse. Nustatant troponinus, gaunama mažiau klaidingai teigiamų rezultatų, pavyzdžiui, kai kartu yra skeleto raumenų pažeidimas po traumos ar chirurginės operacijos (Lehrke et al., 2004).

Tyrimo tikslas – eksperimento būdu sukelti laboratoriniams triušiams miokardo infarktą, nustatyti dažniausiai pasitaikančias pooperacines komplikacijas, įvertinti eksperimentinės infarkto sukėlimo procedūros saugumą, nustatyti biocheminio miokardo pažeidimo žymens TnI kiekį N. Zelandijos triušių kraujyje prieš ir po MI, įvertinti jo informatyvumą.

Medžiagos ir metodai. *Tyrimo modelis.* Tyrimas atliktas su N. Zelandijos baltaisiais triušiais (n=29), kurių amžius svyravo nuo 18 iki 24 savaičių, jie svėrė 4,0±0,5 kg. Tyrimai atlikti Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Veterinarijos akademijos vivariume, Patologijos centre, Dr. L. Kriaučeliūno smulkiųjų gyvūnų klinikose ir Medicinos akademijos Kardiologijos institute.

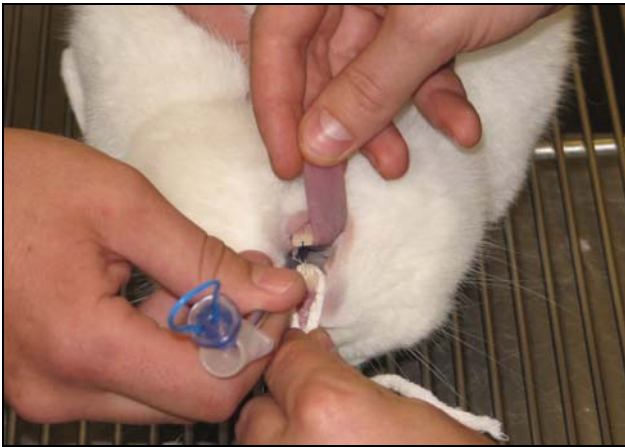
Bandymas atliktas vadovaujantis laboratorinių gyvūnų naudojimo etikos reikalavimais „Gyvūnų, skirtų eksperimentams ir kitiems mokslo tikslams, laikymo, priežiūros ir naudojimo reikalavimų“, patvirtintų LR valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos direktoriaus 2008 m. gruodžio 18 d. įsakymu Nr. B1 – 639 (Žin., 2009, Nr. 8-287). Gautas leidimas laboratorinius gyvūnus naudoti mokslo tiriamajam projektui Nr. 0198, 2009-12).

Triušio sedacija ir paruošimas operacijai. Prieš sukeltam miokardo infarktą, gyvūnas 24 val. buvo nešertas.

Triušio sedacija atlikta priešoperacinėje patalpoje. Sedacijos pradžioje triušiu į užpakalinės kojos raumenis (*M. quadriceps*) sušvirkšta ksilazino (5 mg/kg) ir ketamino (50 mg/kg). Visiška nejautra pasireiškė praėjus 10–15 min. Nejautriam gyvūnui į priekinės kojos veną (*V. brachialis*) įstatytas mėlynos spalvos kateteris ir pritvirtintas pleistru. Kateteris reikalingas kraujo mėginiui paimti į vakuuminius violetinius 3,0 ml mėgintuvėlius (K2E 5,4 mg) ir skysčių infuzijoms atlikti. Paruoštas operacijos laukas, krūtinės ląstos kairiojo šono plaukai nukirpti elektrine kirpimo mašinėle „Oster“.

Triušio intubacija. Triušio intubacijai naudotas 3,5 mm vidinio skersmens intubacinis vamzdelis. Anestezuotas triušis paguldytas ant nugaros, galva atlošta, o kaklas šiek tiek patemptas. Kadangi triušiu neturi reikštingo krūtinės refleksas, kad intubacijos metu nebūtų pažeistas intubacinis vamzdelis, asistentas, pražiodęs triušį pirštais, fiksavo liežuvį. Tubusas įstatytas akluoju būdu. Intubuota švelniai manevruojant intubaciniu vamzdeliu, kad nebūtų pažeistos balso stygos. Tinkamai intubavus ir tubusui patekus į trachėją, intubacinis vamzdelis ima rasoti, triušiu pasireiškia kosėjimo refleksas. Tinkamai intubacijai patvirtinti palpuota krūtinės ląsta, intubaciniu vamzdeliu klausyta oro cirkuliacija (1 pav.).

MI sukėlimo operacija. Intubuotas triušis perkeltas į operacinę, kurioje palaikoma 25±1°C temperatūra. Plaučiai ventiliuoti „Engtrem“ (LDK Medical ABER311) dirbtinio kvėpavimo aparatu, palaikant 1,2 L minutinį tūrį, kvėpavimo dažnį 40 k./min., oro ir deguonies mišinio 50/50proc. įpūtimo slėgį apie 30 mm Hg.



1 pav. Intubacinio vamzdelio įstatymas

Tolesnė triušio anestezija palaikyta holotano dujomis. Kojų ir krūtinės laštos srityje prijungti elektrokardiografijos elektrodai gyvybiniams duomenims stebėti.

Visos operacijos metu atliktas EKG stebėjimas pagal „Kaunas–Krūvis“ analizuojančią programą. Gyvybiniai duomenys stebėti monitoriuje.

Operacijai paruošta triušio kairioji krūtinės laštos pusė apdorota spiritiniu jodo tirpalu. Triušis uždengtas sterilia paklode, pritvirtinta spaustukais, paliekant atvirą operacinį lauką. Operacijai atlikti naudoti 3,5 karto didinantys chirurginiai akiniai.

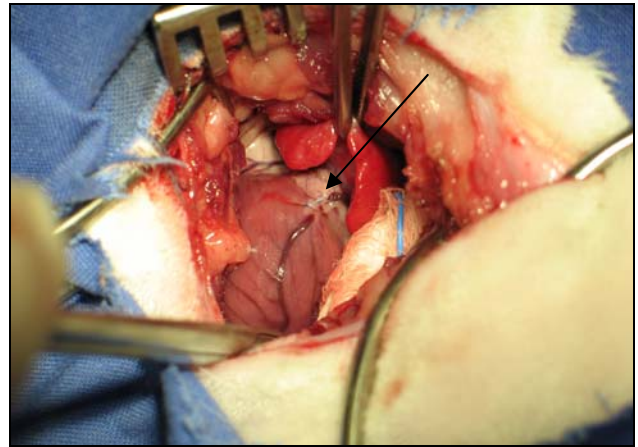
Pirmiausia palpuojant surastas 4–5 tarpšonkaulinis tarpas, ties kuriuo skalpeliu darytas 4–5 cm pjūvis ir prapjauta oda. Kraujavimas stabdytas steriliais vatos tamponais. Poodinis slauksnis atskirtas bukuoju būdu naudojant žirkles. Krūtinės raumenys (*M. latissimus dorsi* ir *M. serratus anterior*) preparuoti ir atskirti stengiantis jų neperpjauti.

Surastas 4–5 tarpšonkaulinis tarpas atsargiai, nepažeidžiant plaučių, prakirptas žirklutėmis. Plėstuvais atsargiai išplėstas tarpšonkaulinis tarpas, kad geriau būtų matyti širdis. Fiziologiniame tirpale suvilgytu sterilios marlės tamponu pridengti ir tamponuoti plaučiai, kurie pastumti giliau į krūtinės laštą. Taip pagerintas vainikinių arterijų matomumas. Smulkiu smailiu pincetu suimtas širdies perikardas ir, nepažeidžiant prieširdžio, atsargiai prakirptas.

Atlikta šoninė torakotomija. Vizualiai netoli širdies viršūnės surasta priekinė tarpškilvelinė kairiosios vainikinės arterijos šaka ties viduriniu segmentu. Perišimui naudota chirurginė adata su 7–0 „Prolen“ („Ethicon“) siūlu. Pincetu fiksuota širdis, tuo pat metu adata durta į miokardą, ir arterija apjuosta siūlu. Siūlas 2–3 kartus surištas paprastuoju mazgu (2 pav.).

Operacijos metu fiksuoti pakitimai elektrokardiogramoje (EKG), ir nustatyta atsiradusi išemija. Išemija taip pat įvertinta vizualiai, vainikinės arterijos okliuzijos metu stebint miokardo blyškumą ir akineziją. Patvirtinus susidariusį MI, žaizda pasluoksniui susiūta.

Žaizda susiūta „Vicryl“ („Ethicon“) 3–0 siūlais, kateetriu su švirkštu arba paliekant dreną, prijungtą prie vakuumo, pašalinus iš kairiosios pleuros liekamąjį orą. Oda siūta subkutanine siūle su 4–0 tirpiu siūlu.



2 pav. Perrišta kairioji vainikinė arterija ties viduriniu segmentu (mėlynos spalvos siūlu)

Likus iki operacijos pabaigos 5–10 min., nutrauktas halotano dujų tiekimas. Operacijos metu pooperaciniam skausmui malšinti į raumenis sušvirkšti analgetikai, vaisitai nuo uždegimo ir bakterijų. Operacinėje triušis ekstubuotas, 10–15 min. stebėtas jo kvėpavimas vėliau, gyvūnas paguldytas stacionare pooperaciniam stebėjimui. Pirmą parą po operacijos triušio narvas šildytas infraraudonųjų spindulių lempa.

Infekcijos profilaktikai tris paras po operacijos švirkstas antibakterinis vaistas „Enroxil 50“ (0,5 ml 1xd. 5 dienas iš eilės į raumenis) ir vaistas nuo uždegimo „Rapidexon“ (0,4 ml 1xd. 3 dienas iš eilės į raumenis). Pooperaciniam skausmui malšinti 2008 m. naudotas analgetikas „Ketofen 1%“ (0,6 ml 1xd. 3 dienas iš eilės į raumenis), 2009–2010 m. – „Novasul“ (1 ml 2xd. 3 dienas iš eilės į raumenis).

Visos chirurginės procedūros gyvūnams atliktos visiškos anestezijos sąlygomis, kaip to reikalauja Lietuvos Respublikos gyvūnų globos, laikymo ir naudojimo įstatymas bei poįstatyminiai aktai, reglamentuojantys darbą su laboratoriniais gyvūnais.

Praėjus 12–14 valandų po sukkelto MI, neanestezuotam gyvūnui pagal tą pačią metodiką dar kartą paimtas kraujo mėginys TnI kiekiui nustatyti. Po 24 val. triušis perkeltas į vivariumą tolesniam stebėjimui ir gydymui.

Klinikiniai ir morfologiniai triušių tyrimai. Po operacijos triušiai buvo stebimi, tiriami kliniškai, vertinamas jų kvėpavimas ir širdies darbas. Nugaišę buvo skrodžiami morfologiniams pokyčiams organuose ir audiniuose įvertinti pagal priimtą metodiką.

Kraujo ėmimas biocheminiams tyrimams. Kraujas tyrimams imtas sveiko anestezuoto triušio prieš MI ir neanestezuoto triušio – po sukkelto MI praėjus 12–14 valandų. Kraujas iš priekinės kojos venos (*V. brachialis*) imtas į vakuuminius violetinius 3,0 ml mėgintuvėlius (K2E 5,4 mg).

Troponino I nustatymas. Biocheminis miokardo pažeidimo žymuo TnI nustatytas LSMU MA Kardiologijos instituto Hemostazės ir miokardo pažeidimo žymenų tyrimo grupėje.

TnI tyrimams kraujas imtas į mėgintuvėlius su EDTA (etilendiamintetraacetatu). TnI koncentracija nustatyta

greitu kiekybiniu imunofluorescentiniu metodu „Triage Cardiac, Biosite Diagnostics“. Kraujo ląstelės aparate atskirtos nuo plazmos specialiu filtru. Reikiamas kiekis plazmos, patekęs į reakcijos kamerą, sąveikauja su antikūnais, konjuguotais su fluorescuojančia medžiaga. Po inkubacijos mišinys patenka į detekcijos zoną, kur matuojamas fluorescencijos intensyvumas kompleksų, susidariusių tarp analitės ir fluorescuojančia medžiaga žymėtų antikūnų. Išmatuotas fluorescencijos intensyvumas yra tiesiogiai proporcingas TnI koncentracijai kraujo plazmo-

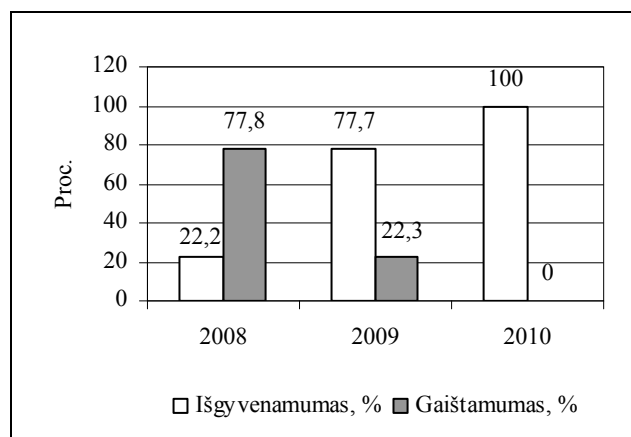
je. Šiuo metodu rezultatai gauti per 15 min.

Tyrimų rezultatai.

Eksperimento metu 2008–2010 metais N. Zelandijos triušiams atliktos 29 miokardo infarkto sukėlimo operacijos. Sėkmingai atlikta 18 operacijų. Vienuolika triušių dėl operacijos arba pooperacinių komplikacijų nugaišo. Komplikacijas pagal įvykio laiką suskirstėme į įvykusias miokardo infarkto sukėlimo metu ir per ankstyvą pooperacinį periodą (1 lentelė, 3 pav.).

1 lentelė. Triušių išgyvenamumas po sukkelto MI 2008–2010 m.

Iš viso sukelta MI	n=29	Proc.	Išgyventų dienų skaičius			
			Vidurkis	Daugiausia	Mažiausia	Vidutiniškai
Išgyvenusių triušių skaičius	n=18	62	181±85	330	50	160
Nugaišusių triušių skaičius	n=11	38	1,7±1,1	3	0	1,85



3 pav. MI sukėlimo operacijų rezultatai 2008–2010 m.

MI sukelti eksperimento būdu panaudoti 29 triušiai. 2008 m. tokios operacijos atliktos devyniems triušiams. Iš jų tik du triušiai išgyveno ilgai.

Miokardo infarkto sukėlimo operacija komplikavosi septyniems triušiams, iš kurių vienas nugaišo operacijos metu, kitas, manoma, – dėl perdozuotų anestetikų, du – dėl širdies tamponados po operacijos praėjus 1–2 paroms, veikiausiai dėl to, kad per aukštai buvo perrišta vainikinė arterija.

Trys triušiai po operacijos išgyveno tris paras ir staiga nugaišo. Per išgyventą laikotarpį gyvūnai neėdė ir nesituštinė. Įtariama, kad visų trijų triušių gaišimo priežastis galėjo būti pooperacinis skausmas dėl nepakankamo analgetinių vaistų poveikio. Skausmui malšinti 2008 m. naudotas analgetikas „Ketofen 1%“ (0,6 ml 1xd. 3 dienas iš eilės į raumenis).

2009 m. operuota 18 triušių; 14 operacijų buvo sėkmingos. Pooperacinės komplikacijos ištiko keturis triušius. Trys triušiai nugaišo dėl ūmaus respiracinio distreso sindromo (ŪRDS). Viena nesėkmė ištiko dėl techninių kliūčių: vienas triušis neišgyveno dėl operacijos metu gedusio dirbtinio kvėpavimo aparato. 2010 m. operuoti du triušiai; abu sėkmingai išgyveno.

TnI kiekio triušių kraujyje įvertinimas prieš ir po su-

kelto MI operacijos. Septyniems eksperimentiniams gyvūnams imti 3 ml veninio kraujo mėginiai troponino I (TnI) kiekiui nustatyti. MI patvirtinti ir netiesioginei MI apimčiai nustatyti tyrėme TnI kiekį sveikų triušių kraujyje prieš sukeliant MI ir praėjus 12 val. po operacijos. Prieš operaciją TnI kiekis triušių kraujyje buvo 0 ng/ml–0,1 ng/ml. Tik vieno triušio kraujyje nustatyta didesnė nei nulinė TnI koncentracija. Sukėlus MI, TnI padidėjo iki 2,1–13,3 ng/ml. Vieno triušio kraujo mėginys po sukkelto MI buvo hemolizuotas, todėl troponino I reikšmė buvo nulinė. Trijų triušių TnI kiekis po sukkelto infarkto buvo nedidelis ir siekė nuo 2,1 iki 3,4 ng/ml (vidutiniškai 2,8 ng/ml). Vieno triušio kraujyje TnI buvo 6,3 ng/ml, dviejų triušių – 12,9 ir 13,3 ng/ml (vidutiniškai 13,1 ng/ml). Didžiausia TnI koncentracija (13,3 ng/ml) nustatyta kraujyje triušio, kurio ir prieš sukeliant MI rasta ne nulinė TnI koncentracija (0,1 ng/ml).

2 lentelė. Pooperacinės MI komplikacijos

Gaišimo priežastis	Skaičius	Procentai
Iš viso:	14	100
MI operacijos metu	1	7,1
ŪRDS	3	21,4
Širdies tamponada	2	14,3
Gerklų spazmai	3	21,4
Pooperacinis skausmas	3	21,4
Uždusimas	1	7,1
Anestetikų perdozavimas	1	7,1

3 lentelė. TnI kiekis sveiko triušio kraujyje ir po MI

Triušio NR.	Troponino I koncentracija ng/ml	
	Prieš MI	Po MI
F1	0	2,9
R2	0	12,9
F2	0	0 (hemolizė)
F3	0	2,1
F4	0,1	13,3
R4	0	3,4
R5	0	6,3

Rezultatų aptarimas ir išvados. Mūsų atliktas darbas buvo dalis projekto, kurio pagrindinė idėja buvo kamieninių ląstelių panaudojimo galimybė miokardo infarkto reparacijai. Eksperimentinių operacijų metu, modeliuojant klinikinę ūmaus miokardo infarkto būklę, eksperimentinių gyvūnų N. Zelandijos triušių organizme buvo planuoti ląstelių terapijos tyrimai (projektas Nr. 0198).

Prieš pradėdant eksperimentus su kamieninėmis ląstelėmis, reikėjo sukelti dirbtinį MI triušio organizme ir ši modelį naudoti tolimesniems tyrimams.

Sukelti miokardo infarktą eksperimentiškai – labai sudėtingas procesas. Dėl triušio anatomicinės ir fiziologinės struktūros, atliekant kiekvieną procedūrą, būtina triušiui sukelti neįtraukiamą, kad būtų galima gauti patikimus duomenis. Be to, dėl ypatingos triušių kvėpavimo takų anatomijos sudėtinga ir komplikantuota intubuoti operacijos metu. Taigi būtina išanalizuoti visas tokių eksperimentų metu įvykusias rimtesnes pooperacines komplikacijas bei operacijos ypatumus.

Tiksli operacinė technika, atidumas perrišant triušio širdies kairiąją vainikinę arteriją, teisingas vaistų nuo skausmo naudojimas leidžia išvengti gyvūnų gaišimo, ir MI sukėlimo operacija pasiekama gana gerų rezultatų (Hu et al., 2010).

Analizuodami mūsų atveju įvykusias pooperacines komplikacijas padarėme išvadas, jog pagrindinės eksperimentui naudotų triušių gaišimo priežastys buvo šios:

- a) pradžioje eksperimento – operacinės technikos tikslumo stoka sukeliama MI (2008 m. rezultatai);
- b) per aukštai perrišta vainikinė arterija (proksimalinio segmento perrišimas), todėl išsivystė stiprus širdies nepakankamumas bei širdies tamponada;
- c) kai kuriais atvejais per stipri plaučių ventilacija operacijos metu sukėlė ŪRDS;
- d) netinkamas pooperacinis gydymas, veikiausiai per menkas analgetinių vaistų poveikis (2008 m. rezultatai).

Operuodami susidūrėme su triušio intubacijos, kuri iš esmės buvo sudėtinga, problema. Triušių intubacija yra vienas sunkiausių ir pavojingiausių operacijos etapų dėl gyvūno anatominių kvėpavimo takų ypatumų – giliai esančių gerklų ir siauro trachėjos spindžio. K. L. Stasiak ir kiti mokslininkai (2003) triušio intubaciją siūlo atlikti tik patirties turintiems specialistams, o gerklų spazmams pašalinti naudoti vietinius anestetikus. Literatūroje pateikiama duomenų, kad triušių intubacija yra vienas svarbiausių sėkmingos operacijos etapų, ir net 30 proc. triušių gaisa dėl netinkamai atliktos intubacijos (Hu et al., 2010). Mūsų tyrimų metu įvyko trys nesėkmės dėl intubacijos komplikacijų, po kurių dėl gerklų spazmų gyvūnai nustojo kvėpuoti.

21,4 proc. nesėkmių įvyko dėl intubacijos. Neseniai pasirodžiusioje publikacijoje (Hu et al., 2010) aprašyta, kaip mokslininkai šią problemą sprendė naudodami deguonies kaukę, vos tik buvo pastebėtas intubuojamo triušio kvėpavimo sutrikimas. Intubacija būdavo tęsiama, kai tik kvėpavimas susireguliuodavo. Literatūroje yra siūlymų MI sukėlimo operacijos metu netaikyti endotrachėjinės intubacijos, jei tik yra galimybė. Tas leidžia išvengti iki 30 proc. nesėkmių (Fujita et al., 2004). Tačiau atliekant endotrachėjinę intubaciją lengviau kontroliuoti triušio

anesteziją.

Literatūroje taip pat yra duomenų, kad, naudojant intraveninius anestetikus, vaistai dažniau perdozuojami (Feng et al., 2009).

Kitas svarbus anestezijos etapas yra plaučių ventilavimas operacijos metu atvėrus krūtinės ląstą. Per stiprus deguonies ir oro mišinio ipūtimas į plaučius gali sukelti ūmų respiratorinį distreso sindromą.

Išanalizavę mūsų nesėkmingų operacijų atvejus padarėme išvadą, kad, dirbtinai sukeliama MI triušiams, net 21,4 proc. pooperacinių komplikacijų išsivystė galbūt dėl silpno analgetinių vaistų poveikio.

Nepaisant plataus triušių panaudojimo moksliniams tyrimams, pooperacinio skausmo malšinimo ir pooperacinių komplikacijų įvertinimo duomenų literatūroje nėra daug (Cooper et al., 2009; Leach et al., 2009; Lipman et al., 2008). Pooperacinis skausmas turi būti griežtai kontroliuojamas. Gyvūnai turi būti sistemingai stebimi 48 val. po operacijos, didelis dėmesys turi būti skiriamas gyvūno elgsenai: domėjimusi maistu, tuštinimuisi, širdies darbui, kvėpavimui (Stasiak et al., 2003; Anil et al., 2002; Paul-Murphy et al., 2004; Harcourt-Brown, 2002). Naujausioje literatūroje tyrėjai siūlo jau likus 12 val. iki operacijos ir 48 val. po operacijos triušiams naudoti Fetanilio pleistrą (25 mg/val.), kuris efektyviai malšina pooperacinį skausmą. Jei pleistras nenaudojamas, dar prieš triušio sedaciją reikia švirkšti buprenorfino – 0,06 mg/kg į raumenis (Hu et al., 2010).

Buvo atliktas tyrimas, kurio metu pooperacinis skausmas triušiams buvo malšinamas trimis skirtingais analgetikais – buprenorfinu (0,02 mg/kg), fentaniliu (25 mg/kg) ir ketoprofenu (1 mg/kg), bet didesnio vaistų poveikio skirtumo nenustatyta (Weaver et al., 2010). Kaip vieną iš paprastų skausmo įvertinimo metodų L. A. Weaver (2010) siūlo stebėti triušio išmatų, šlapimo kiekį, atidžiai vertinti suvartojamo pašaro ir vandens kiekį.

Pooperacinių žaizdų infekcijų prevencijai naudojome „Enroxil 50“ mg/ml injekcinį tirpalą. Nė vienam triušiui pooperacinių komplikacijų dėl infekcijos sukėlėjų neįvyko.

Miokardo infarktas diagnozuojamas pagal pokyčius elektrokardiogramoje (EKG), širdies inotropijos sutrikimus, nustatytais echoskopuojant, ir miokardo pažeidimui būdingų biocheminių žymenų kraujyje padidėjimu. Vertinti EKG atsiradusius pakitimus reikia kritiškai, nes S-T segmento dislokacija po širdies operacijų gali atsirasti dėl perikardito ar tiesioginės chirurginės traumos, todėl jie ne visada būdingi miokardo išemijai (Ramasay et al., 2005).

Troponinai yra vienas iš šiuo metu patikimesnių ir gana plačiai naudojamų žymenų MI patvirtinti (Alpert et al., 2000). Šiuo metu TnI nustatyti sukurta ir sėkmingai taikoma nemažai imunoflorescencinių metodų – Roche cTnT, Roche High sensitive cTnT, Siemens cTnI-Ultra, Abbott Architect cTnI – kai skirtingus diagnostikos metodus kuriančios kompanijos naudoja skirtingus reagentus, todėl atskirais atvejais gali skirtis jautrumas (Reiter et al., 2011). Neseniai literatūroje pasirodė publikacija, kur siūlomas naujas TnI nustatymo metodas MA-MEF (microwave-accelerated ir metal-enhanced fluorescence), kai taikomos nanotechnologijos. Metodas paremtas žemos

galios mikrobangų ir sidabro nanodalelių sustiprintos fluorescencijos principu, kai TnI specifinį baltymą 0,005 ng/ml jautrumo lygyje galima nustatyti tiesiai iš kraujo lašelio pavyzdžio maždaug per 1 min. Palyginti su imunofermentiniu metodu šis kur kas greitesnis ir jautresnis (Aslan, Greil, 2011).

Nepaisant daugelio įmanomų diagnostikos metodų, nėra nė vieno visiškai universalus, todėl, norint tiksliai diagnozuoti MI, reikia taikyti keletą metodų ir lyginti jų rezultatus. Troponino tyrimas, kaip greitas ir pakankamai jautrus metodas, dabar plačiai taikomas medicininėje diagnostikoje įtariant širdies ligą, tačiau apie pritaikymą modeliniams tyrimams su gyvūnais dirbtinio infarkto atveju duomenų praktiškai nėra. Todėl šio bandymo metu buvo padaryta keletas TnI tyrimų dirbtinai sukeltam MI patvirtinti (EKG, vizualus širdies raumens pakitimų įvertinimas), ir TnI nustatymo metodas, mūsų nuomone, yra informatyvus MI sukėlimo tyrimams naudojant laboratorinius triušius.

Išvados.

1. Nustatyta, kad pagrindinės pooperacinės MI sukėlimo komplikacijos laboratoriniams gyvūnams, naudojamiems kaip eksperimentinis modelis kamieninių ląstelių bandymams, buvo ūmus respiracinio distreso sindromas ir širdies tamponada.

2. Norint išvengti pooperacinių komplikacijų dirbtinai sukeltam MI triušiams, svarbu tinkamoje vietoje (ties viduriniu segmentu) perrišti kairiąją vainikinę arteriją, tinkamai prižiūrėti po operacijos ir gydyti.

3. Vienas svarbesnių etapų, eksperimentiškai sukeltam MI, yra tinkamas triušio paruošimas operacijai ir anestezija.

4. Troponino I kiekio nustatymo metodas tinka eksperimento būdu triušiams sukeltam miokardo infarktui (MI) patvirtinti. TnI kiekis kraujyje po eksperimentiškai sukeltam MI siekė 2,1–13,3 ng/ml (prieš MI – 0–0,1).

Literatūra

1. Alpert J. S., Thygesen K., Antman E., Bassand J. P. Myocardial infarction redefined – a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*; 2000. Vol. 36. P. 959–69.

2. American Heart Association. Heart attack and angina statistics: 2006 update. – [žiūrėta 2010- 01- 06]. – Internetė: <http://www.americanheart.org/>

3. Anil S. S., Anil L., Deen J. Challenges of pain assessment in domestic animals. *J Am Vet Med Assoc*; 2002. Vol. 220. P. 313–319.

4. Apple F. S., Murakami M. M., Walker R. D., York M. Analytical characteristics of commercial cardiac troponin I and T immunoassay in serum from rats, dogs and monkeys with induced acute myocardial injury. *American Association for Clinical Chemistry Inc.*, 2008. Vol. 54. P. 1982–1989.

5. Aslan K., Greil T. A. Rapid and sensitive detection of Troponin I in human whole blood samples by using

silver nanoparticle films and microwave heating. *Clin. Chem.*, 2011. PubMed.

6. Bearzi C., Rota M., Hosoda T. Human cardiac stem cells [serial online]; 2007. – [žiūrėta 2010- 01- 10]. – Internetė: <http://www.pnas.org/content/104/35/14068/suppl/DC1>

7. Cooper C. S., Metcalf-Pate K. A., Barat C. E., Cook J. A., Scorpio D. G. Comparison of side effects between buprenorphine and meloxicam used postoperatively in Dutch belted rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *J Am Assoc Lab Anim Sci*; 2009. Vol. 48. P. 279–285.

8. Copeland J. G., Smith R. G., Arabia F. A., Nolan P. E., Sethi G. K., Tsau P. H. Cardiac replacement with a total artificial heart as a bridge to transplantation. *N.Engl J Med*; 2004. Vol. 351. P. 859–886.

9. Feng Y., Xie Y., Wang H., Chen F., Ye Y., Jin L., Marchal G., Ni Y. A modified rabbit model of reperused myocardial infarction for cardiac MR imaging research. *Int J Cardiovasc Imaging*; 2009. Vol. 25. P. 289–298.

10. Fujita M., Morimoto Y., Ishihara M., Shimizu M., Takase B., Maehara T., Kikuchi M. A new rabbit model of myocardial infarction without endotracheal intubation. *J Surg Res*; 2004. Vol. 116. P. 124–128.

11. Harcourt-Brown F. *Textbook of rabbit medicine*. Reed Educational and Professional Publishing Ltd; 2002.

12. Herreros J., Prosper F., Perez A., Gavira J. J., Gracia-Velloso M. J., Barba J. Autologous intramyocardial injection of cultured skeletal muscle-derived stem cells in patients with non-acute myocardial infarction. *Eur Heart J*; 2003. Vol. 24. P. 2012–2020.

13. Hu N., Straub C. M., Garzarelli A. A., Sabey K. H., Yockman J. W., Bull D. A. Ligation of the left Circumflex Coronary Artery with subsequent MRI and histopathology in rabbits. *J. Am. Assoc Lab. Anim. Sci*; 2010. Vol. 49 (6). P. 838–844.

14. Kofidis T., Akhyari P. A novel bioartificial myocardial tissue and its prospective use in cardiac surgery. *Eur. J. Cardiothorac. Surg*; 2002. Vol. 22. P. 238–243.

15. Kolossov E. Engraftment of engineered ES cell-derived cardiomyocytes but not BM cells restores contractile function to the infarcted myocardium. *J. Exp. Med*; 2006. Vol. 203. P. 2315–2327.

16. Landesberg G., Mosseri M., Zahger D. Myocardial infarction following vascular surgery: the role of prolonged, stress-induced, ST-depression-type ischemia. *J Am Coll Cardiol*; 2001. Vol. 37. P. 1858–1863.

17. Leach M. C., Allweiler S., Richardson C., Roughan J. V., Narbe R., Flecknell P. A. Behavioural effects of ovariectomy and oral administration of meloxicam in laboratory-housed rabbits. *Res Vet Sci*;

2009. Vol. 87. P. 336–347.

18. Lehrke S., Steen H., Sievers H. H., Peters H., Opitz A., Muller-Bardorff M., Wiegand U. K. H., Katus H. A., Giannitsis E. Cardiac troponin T for prediction of short-and long-term morbidity and mortality after elective open heart surgery. *Clin Chem*; 2004. Vol. 50. P. 1560–1567.

19. Lipman N. S., Marini R. P., Flecknell P. A. Anesthesia and analgesia in rabbits. Fish R. E., Brown M. J., Danneman P. J., Karas A. Z., editors. *Anesthesia and analgesia in laboratory animals*, 2nd ed Boston (MA): Academic Press. 2008. P. 299–333.

20. Lloyd-Jones D., Adams R., Carnethon M., De Simone G., Ferguson T. B., Flegal K., Ford E., Furie K., Go A., Greenlund K., Haase N., Hailpern S., Ho M., Howard V., Kissela B., Kittner S., Lackland D., Lisabeth L., Marelli A., McDermott M., Meigs J., Mozaffarian D., Nichol G., O'Donnell C., Roger V., Rosamond W., Sacco R., Sorlie P., Stafford R., Steinberger J., Thom T., Wasserthiel-Smoller S., Wong N., Wylie-Rosett J., Hong Y. American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics—2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*; 2009. Vol. 119. P. 21–182.

21. Ramsay J., Sherman S., Fitch J., Finnegan P., Todaro T., Filloon T., Nussmeier N. A. Increased creatine kinase MB level predicts postoperative mortality after cardiac surgery independent of new Q waves. *J Thorac Cardiovasc Surg*; 2005. Vol. 129. P. 300–307.

22. Rastan A. J., Walther T. Morphological, electrophysiological and coupling characteristics of bone marrow-derived mononuclear cells—an in vitro-model. *Eur. J. Cardiothorac. Surg*; 2005. Vol. 27. P. 104–110.

23. Reiter M., Twerenbold R., Reichlin T., Haaf P., Peter F., Meissner J., Hochholzer W., Stelzig C., Freese M., Heinisch C., Breidhardt T., Freidank H., Winkler K., Campodvare I., Gea J., Muller C. Early diagnosis of acute myocardial infarction in the elderly using more sensitive cardiac troponin assays. *Eur. Heart J*, 2011.

24. O'Brien P. J., Smith D. C., Knechtel T. J., Marchak M. A., Priumboom-Brees I., Brees D. J., Spratt D. P. O., Archer F. J., Butler P., Potter A. N., Provost J. P., Richard J., Snyder P. A. and Reagan W. J. Cardiac troponin I is a sensitive, specific biomarker of cardiac injury in laboratory animals. *Laboratory animals*; 2006. Vol. 40. P. 153–171.

25. Ozbaran M., Omay S. B. Autologous peripheral stem cell transplantation in patients with congestive heart failure due to ischemic heart disease. *Eur. J. Cardiothorac. Surg*; 2004. Vol. 25. P. 342–350.

26. Paul-Murphy J., Ludders J. W., Robertson S. A., Gaynor J. S., Hellyer P. W., Wong P. L. The need for

a cross-species approach to the study of pain in animals. *J Am Vet Med Assoc*; 2004. Vol. 224. P. 692–697.

27. Saba S., Mathier M. A., Mehdi H., Gursoy E., Liu T., Choi B., Salamaand G. B., London B. Prevention of adverse Electrical and Mechanical Remodeling with Bi-ventricular passing in a rabbit model of myocardial infarction. *Herth Rhythm.*, 2008. Vol. 5 (1). P. 124–130.

28. Seeger F.H., Tonn T., Krzossok N., Zeiher A.M., Dimmeler S. Cell isolation procedures matter: a comparison of different isolation protocols of bone marrow mononuclear cells used for cell therapy in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J*; 2007. Vol. 28. P. 766–772.

29. Shiomi M., Ito T., Yamada S., Kawashima S., Fan J. Development of an animal model for spontaneous myocardial infarction (WHHLMI Rabbit). American Heart Association, Inc., *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*; 2003. Vol. 23. P. 1239.

30. Stasiak K. L., Maul D., French E., Hellyer P. W., Vandewoude S. Species-specific assessment of pain in laboratory animals. *Contemp Top*; 2003. Vol. 42. P. 13–9.

31. Verdouw P. D., Doel M. A. van den., Zeeuw S. and D. J. Duncker. Animal models in the study of myocardial ischaemia and ischaemic syndromes. *Cardiovasc Res*; 1998. Vol. 39. P. 121–135.

32. Weaver L. A., Blaze C. A., Linder D. E., Andrutis K. A., Karas A. Z. A model for clinical evaluation of perioperative analgesia in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *J Am Assoc Lab Anim Sci.*; 2010. Vol. Nov; 49 (6). P. 51–845.

Gauta 2011 06 08

Priimta publikuoti 2012 04 13