

ZMĚNY EKG U POTKANA S INDUKOVANOU REMODELACÍ MYOKARDU: OPTIMALIZACE, VÝZNAM A KOMPLEXNOST ANIMÁLNÍCH EXPERIMENTŮ

Tibor Stračina¹, Michal Laška¹, Jaroslav Nádeníček¹, Michal Hendrych²,
Marie Nováková¹

¹Fyziologický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno

²l. ústav patologie, Fakultní nemocnice u sv. Anny a LF MU, Brno

ABSTRAKT

Díky technologickému pokroku a dostupnosti výpočetních kapacit prochází biomedicínský výzkum v posledních deseti letech rapidním rozvojem. Přestože matematické modely nabízejí nové perspektivy, experimenty s využitím pokusných zvířat zůstávají nezastupitelnými nástroji pro zkoumání komplexních biologických jevů. Tato práce se zaměřuje na model remodelace srdce u potkana pomocí tlakově-objemového přetížení s mineralokortikoidní stimulací (DOCA/salt model). Klíčovým aspektem tohoto modelu je jeho robustnost a spolehlivost, avšak i dynamika progresivních změn je důležitá. Práce se zaměřuje na dva cíle: popis elektrokardiografických změn u potkanů s indukovanou srdeční remodelací a analýzu vlivu množství soli na remodelaci v DOCA/salt modelu. Práce prezentuje pouze dílčí výsledky, neboť studie stále probíhá. Výsledky naznačují, že remodelace srdce je spojena s prodloužením vedení elektrické depolarizace na komorách. Modifikace modelu snížením množství soli nevede k plně uniformním změnám, avšak naznačuje cestu k omezení nepříznivých efektů. Tato práce poukazuje na důležitost animálních experimentů pro lepší pochopení komplexních biologických procesů. Zároveň zdůrazňuje potřebu optimalizace animálních modelů s ohledem na cíl experimentální práce.

KLÍČOVÁ SLOVA

elektrokardiografie, remodelace srdce, biomodel, potkan, fibróza

ÚVOD

V posledních deseti letech prochází biomedicínský výzkum obdobím nevídaného rozmachu. Technologický pokrok přinesl nejenom výkonnější a citlivější měřicí přístroje, ale díky dostupnosti výpočetní kapacity, nástrojů strojového učení a umělé inteligence také možnost rychlého zpracování obrovských objemů dat. Na první pohled by se mohlo zdát, že matematické modely budou rychle nahrazovat práci v laboratoři a experimenty budou probíhat především virtuálně na počítači. Avšak dosavadní poznatky naznačují, že přes veškerý pokrok stále nedokážeme matematickými modely plně popsat biologickou komplexitu mnohobuněčných organismů. [1] Právě zde vstupují do hry pokusy s využitím pokusných zvířat, které i nadále hrají nezastupitelnou roli v experimentálním výzkumu.

Tato práce se zaměřuje na model remodelace srdce u potkana. Byl zvolen model *DOCA/salt*, který kombinuje tlakově-objemové přetížení s mineralokortikoidní stimulací. [2] Klíčovým přínosem tohoto modelu je jeho robustnost a spolehlivost. Ovšem je také třeba zdůraznit jeho dynamiku – příznaky srdečního selhání se vyvinou již za 21-28 dní od zásahu. Velká rychlost rozvoje regresivních změn myokardu může být v některých aplikacích nevýhodná, zejména pokud jde o studium iniciálních změn struktury a funkce srdce. Další nevýhodou se zdá být výrazný sklon k otokům související s akumulací tekutin a rychlým nárůstem krevního tlaku.

V rámci neustále se rozvíjejících technologií je nezbytné vést diskuzi o významu, komplexnosti a optimalizaci animálních experimentů. Tyto experimenty zůstávají klíčovým prvkem v našem úsilí porozumět biologickým jevům a lépe se přiblížit k jejich celistvému pochopení. Na pozadí této diskuse se prezentovaná práce zaměřuje na dva konkrétní cíle: (1) popis změn elektrokardiogramu (EKG) u potkanů s indukovanou srdeční remodelací se zvláštním důrazem na šířku QRS komplexu; (2) popis závislosti nežádoucích projevů srdeční remodelace na množství soli v pitné vodě u *DOCA/salt* modelu. Uvedené cíle vychází z hypotéz: (1) remodelace myokardu komor prodlouží dobu vedení elektrické depolarizace, co se projeví jako rozšíření QRS komplexu na EKG; (2) snížení množství soli přidávané v pitné vodě bude vést k menší akumulaci tekutin v organismu pokusných zvířat, čímž se sníží riziko tkáňového otoku, současně se sníží úroveň přetížení myokardu a zpomalí se tak progres myokardiální remodelace.

Následující odstavce popisují metody a výsledky experimentu, který tvoří jeden blok probíhající studie s blokovým designem. Uvedené počty zvířat ve skupinách nepředstavují konečné počty zvířat pro celou studii. Tento fakt rovněž limituje statistické zpracování a interpretaci výsledků.

METODY

Pokusy na zvířatech byly prováděny podle schváleného projektu pokusů v souladu se zákonem č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů, a v souladu s platnými standardy péče o pokusná zvířata

Do studie bylo zahrnuto celkem 14 samců potkana kmene Sprague-Dawley ve věku 7 týdnů. Zvířata byla ustájená ve skupinách v standardních chovných nádobách s obohaceným prostředím v akreditované místnosti Fyziologického ústavu LF MU. V místnosti byla kontrolována teplota a vlhkost vzduchu, byl monitorovaný atmosférický tlak a světelný režim byl nastaven na 12 hodin světla (6:00 – 18:00) a 12 hodin tmy (18:00 – 6:00). Zvířata byla krmena standardní krmnou směsí pro potkany. Krmení i vodu měli zvířata přístupnou *ad libitum*. Po odběru z chovného zařízení Lékařské fakulty MU byla zvířata adaptována na nové prostředí a denní manipulaci po dobu 7 dnů.

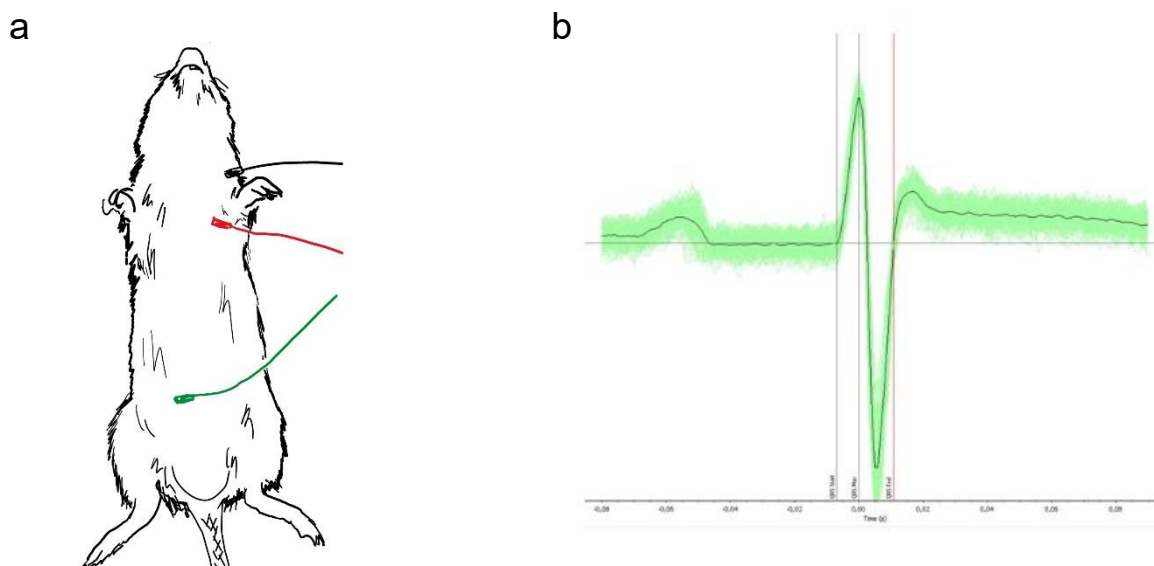
Tab. 1 Množství solí NaCl a KCl přidávané na 1 litr pitné vody a počet zvířat, kterým byla takto upravena voda podávána.

Hmotnost NaCl + KCl [g] přidávané na 1 litr vody	Počet zvířat (n)
9 + 3	6
3 + 1	2
0 + 0	2

Následně byla u 10 zvířat indukována remodelace srdce pomocí *DOCA/salt* modelu (skupina FIB). [2] V celkové anestezii (isofluran, 5 % indukce, 2,5 – 3,5 % udržování) byla u zvířat provedena jednostranná nefrektomie. Jednou týdně po dobu následujících tří týdnů byl zvířatům subkutánně aplikován deoxykortikosteron acetát (DOCA; 20 mg) rozpuštěný v arašídovém oleji (0,2 ml). U některých zvířat byla navíc přidávána do pitné vody sůl (Tab. 1).

Zbylá 4 zvířata sloužila jako kontrolní. U nich byla v celkové isofluranové anestezii provedena *sham* operace – inspekce dutiny břišní bez nefrektomie. Následně byl zvířatům jednou týdně po dobu 3 týdnů subkutánně aplikován arašídový olej (0,2 ml). Těmto zvířatům nebyla do pitné vody přidávána žádná sůl.

Tři týdny po nefrektomii (resp. *sham* operaci) byla zvířata uvedena do celkové anestezie (isofluran, 5 % indukce, 2,5 % udržování) a bylo u nich zaznamenáno EKG v jednom svodu. Pro snímání byly použity vpichové elektrody zavedené pod kůži (Obr. 1a). Záznam byl pořízen akvizičním systémem PowerLab 16/35 se zesilovačem Bio Amp (AD Instruments, USA). Celkem patnáctiminutový záznam byl pořízen v softwarovém prostředí LabChart 8 Pro (AD Instruments, USA).

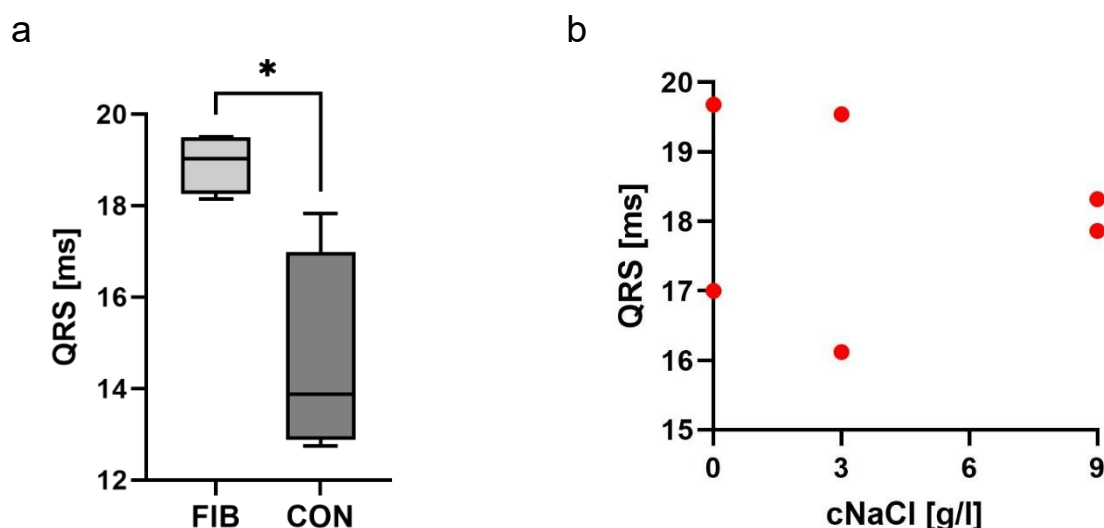


Obr. 1 (a) Schéma zapojení elektrod u anestezovaného potkana. Černá představuje negativní elektrodu, červená pozitivní elektrodu a zelená zemnicí elektrodu. (b) QRS komplex vzniklý průměrováním celkem 100 po sobě následujících komplexů ze záznamu EKG u potkana s indikovanou remodelecí srdce. Vertikální linie označují začátek a konec QRS komplexu a vrchol R kmitu.

Po ukončení snímání EKG bylo zvíře usmrceno předávkováním anestetika. Srdce zvířete bylo rychle vyjmuto z hrudníku, promyto od krve a vloženo do fixačního roztoku neutrálního formalínu. Po 24hodinové fixaci byly pomocí řezu kolmého k dlouhé ose srdce odděleny srdeční komory a tyto dále zpracovány standardními postupy do parafinových bloků (tzv. FFPE). Histopatologické vyšetření myokardu bylo provedeno na řezech barvených hematoxylinem a eosinem a speciálním barvením Goldnerovou zelení. Remodelace srdce byla hodnocena podle doporučení Evropské kardiologické společnosti. [3] Rozsah fibrózy myokardu byl kvantifikován manuální anotací, které prováděl zkušený patolog v softwarovém prostředí QuPath. [4]

Záznam EKG byl hodnocen off-line v prostředí softwaru LabChart 8 Pro (AD Instruments, USA). K analýze byly využity nástroje plug-in nástrojů ECG Analysis (AD Instruments, USA). Pro analýzu byl zvolen 5minutový úsek záznamu, ve kterém mělo zvíře stabilní tělesnou teplotu a nebyly detekovány žádné poruchy srdečního rytmu. Byla provedena automatická detekce vrcholů R kmitů. Dále bylo využito průměrování, pro které se použilo vždy 100 po sobě následujících komplexů. Takto bylo vytvořeno pro každý hodnocený úsek záznamu 11-19 zprůměrovaných QRS komplexů (Obr. 1b). V nich byl automaticky detekován začátek a konec QRS komplexu, který byl následně zkontrolován a případně upraven manuálně. Z takto rozměřených komplexů byla určena průměrná šířka QRS komplexu pro všechny záznamy.

Statistická analýza výsledků byla provedena v programu GraphPad Prism 9 (GraphPad Software). Rozložení dat bylo testováno Shapiro-Wilk testem. Pro porovnání rozdílů ve sledovaných parametrech mezi skupinami byl použit nepárový t-test. Jako statisticky významný byl hodnocen rozdíl při hodnotě $p < 0,05$.



Obr. 2 (a) Zprůměrované šířky QRS komplexů u potkanů s indukovanou remodelací myokardu (FIB; $n=6$) a kontrolních zvířat (CON; $n=4$). Hranice krabicového grafu znázorňují 25. resp. 75. percentil, horizontální čára představuje medián, fousy pak představují minimální a maximální hodnotu. Symbol

* značí $p < 0,05$. (b) Průměrná šířka QRS komplexu u potkanů s indukovanou remodelací myokardu ($n=6$) v závislosti na koncentraci solí podávaných v pitné vodě. Na grafu je vynesena pouze koncentrace NaCl, do vody byl ale přidán i KCl v odpovídající koncentraci (viz Tab. 1).

VÝSLEDKY

U potkanů s indukovanou remodelací (skupina FIB; $QRS\ 18,93 \pm 0,67\ ms$) byl detekován signifikantně širší QRS komplex než u kontrolních zvířat (skupina CON; $14,58 \pm 2,28\ ms$; $p=0,0107$). Zprůměrované šířky QRS komplexů u zvířat obou skupinu znázorňuje Obr. 2a. Nebyla zjištěna závislost šířky QRS na koncentraci solí, které byly přidávány zvířatům ze skupiny FIB do pitné vody (Obr. 2b).

Histologické vyšetření srdečního svalu prokázalo regresivní a reparativní změny myokardu u všech zvířat skupiny FIB. Histologické změny byly vesměs fokální a zahrnovaly ložiska nekrózy a fibrózní změny různého stádia rozvoje.

ZÁVĚR

Tlakově-objemové přetížení s mineralokortikoidní stimulací (*DOCA/salt* model) u potkanů spolehlivě vyvolává histologicky detekovatelné změny v myokardu. Tyto změny jsou fokální a nerovnoměrně rozmístěny. Remodelace se projeví prodloužením vedení elektrické depolarizace na komorách.

V rámci této studie byla rovněž provedena modifikace modelu s redukcí množství solí ve vodě. Zajímalo nás, zda tato modifikace povede ke zvýšení uniformity funkčního dopadu srdeční remodelace. Zde je důležité zdůraznit, že předkládané výsledky jsou pouze dílčí. Studie, ve které byl tento experiment začleněn, stále pokračuje.

Na základě hypotézy, že různá množství solí mohou významně ovlivnit rozsah a rychlost vývoje remodelace myokardu, zaměříme se v budoucí fázi studie na identifikaci optimálních podmínek pro provádění tohoto modelu. Klíčovým cílem bude nalezení způsobů, jak minimalizovat nepříznivé dopady, jako jsou tkáňové otoky, a současně maximalizovat reprodukovatelnost výsledků. Věříme, že tato část našeho výzkumu přispěje k lepšímu chápání faktorů ovlivňujících srdeční remodelaci a poskytne podněty pro další zlepšení experimentálních postupů.

PODĚKOVÁNÍ

Práce byla podpořena projektem specifického výzkumu číslo MUNI/A/1343/2022.

LITERATURA

- [1] FORESTIERO, Saverio. The historical nature of biological complexity and the ineffectiveness of the mathematical approach to it. *Theory in Biosciences* [online]. 2022, **141**(2), 213-231 [cit. 2023-08-22]. ISSN 1431-7613. Dostupné z: doi:10.1007/s12064-022-00369-7
- [2] FUJISAWA, Genro, Rodney DILLEY, Meryl J. FULLERTON a John W. FUNDER. Experimental Cardiac Fibrosis: Differential Time Course of Responses to Mineralocorticoid-Salt Administration. *Endocrinology* [online]. 2001, **142**(8), 3625-3631 [cit. 2023-06-29]. ISSN 0013-7227. Dostupné z: doi:10.1210/endo.142.8.8339
- [3] DE BOER, Rudolf A., Gilles DE KEULENAER, Johann BAUERSACHS, et al. Towards better definition, quantification and treatment of fibrosis in heart failure. A scientific roadmap by the Committee of Translational Research of the Heart Failure Association (HFA) of the European Society of Cardiology. *European Journal of Heart Failure* [online]. 2019, **21**(3), 272-285 [cit. 2023-06-29]. ISSN 1388-9842. Dostupné z: doi:10.1002/ejhf.1406
- [4] BANKHEAD, Peter, Maurice B. LOUGHREY, José A. FERNÁNDEZ, et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Scientific Reports* [online]. 2017, **7**(1) [cit. 2023-06-29]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-17204-5