

Otrzymano: 2004.07.01
Zaakceptowano: 2004.11.20

The study of an angiography technique on rat coronary arteries

Technika angiografii tętnic wieńcowych szczura

Stanisław Skrzewski¹, Tadeusz F. Krzemiński², Konstanty Ślusarczyk³,
Jerzy Nożyński², Agnieszka Kędzia², Maurycy Porc²

¹ Katedra i Zakład Radiologii Lekarskiej i Radiodiagnostyki w Zabrzu Śląskiej Akademii Medycznej, Katowice, Polska

² Katedra i Zakład Farmakologii w Zabrzu Śląskiej Akademii Medycznej, Katowice, Polska

³ Katedra i Zakład Anatomii Opisowej i Topograficznej w Zabrzu Śląskiej Akademii Medycznej, Katowice, Polska

Adres autora: dr hab. n. med. St. Skrzewski, Katedra Radiologii, ul. 3 Maja 15, 41-800 Zabrze,
e-mail: roenzab@slam.katowice.pl

Summary

Background:

Experimental cardiology investigations carried out on rat hearts involve problems with the anatomy and physiology of the coronary arteries. Coronarography is an imaging method of the coronary arteries which can be performed intravitaly as well as postmortem. The aim of the study was to present our own radiological method of postmortem imaging of the rat's coronary arteries.

Material/Method:

The investigation was done on anatomical preparations of the hearts of rats of the Sprague-Dawley® and Wistar® strains. In total, 69 arteriograms were obtained. The coronary arteries were filled with contrast medium consisting of 60% barium sulfate and a 10% solution of gelatin in a proportion of 3:2. Images of contrasted arteries were presented on X-ray film and, in some groups of rats, by a digital image converter. X-rays were performed using an apparatus we designed ourselves. This enabled image fixing of the arteries during full rotation of the heart about its axis.

Results:

The described method of contrasting and image presentation of the rat's coronary arteries was able to show consecutively the shape and topography of the arteries in a precise, spatial way in repeatable experiments. The authors demonstrated the existence of anatomical and topographic differences in the images of the investigated arteries in the rat compared with the human heart. They pointed out the presence of arterioarterial anastomoses.

Conclusions:

The authors suggest further research to gain a better understanding of the anatomy and physiology of the coronary circulation of the rat.

Key words:

rat • coronary arteries • angiography

PDF file:

http://www.polradiol.com/pub/pjr/vol_70/nr_1/5876.pdf

Wstęp

Szczur jest jednym z podstawowych zwierząt, wykorzystywanych w kardiologii doświadczalnej. Badania dotyczące patofizjologii niedokrwienia mięśnia sercowego muszą obejmować aspekt zarówno anatomii tętnic wieńcowych szczura, jak i ich fizjologii w korelacji ze zmianami niedokrwieniami mięśnia sercowego i następstwami hemodynamicznymi w przebiegu ostrego lub przewlekłego niedokrwienia, prowadzącego ostatecznie do kardiomiopatii niedokrwiennej [1–4].

Uznana zarówno w angioradiologii, kardiologii, jak i anatomii patologicznej metodą obrazującą tętnice wieńcowe jest badanie angiograficzne – koronarografia, wykonywana tak przyżyciowo, jak i na narządzie pozyskanym pośmiertnie z wykorzystaniem kontrastu optycznego (np. tusz chiński), fluorescencyjnego lub radiologicznego [5–7]. W dostępnym piśmiennictwie nie napotkano doniesień, szczegółowo i całościowo opisujących rentgenowską technikę koronarografii u szczura. Celem niniejszej pracy jest przedstawienie własnej, radiologicznej metody pośmiertnego obrazowania tętnic wieńcowych szczura.

Materiał i metoda badania

Badania przeprowadzono na 69 szczurach, w tym 33 osobnikach szczepu Sprague-Dawley® (31 samców i 2 samice) i 36 szczurów szczepu Wistar® (29 samców i 7 samic). Masa ciała badanych szczurów wahała się od 320 do 700 g ($503,97 \pm 101,9$). Wszystkie szczury pochodziły z Centralnej Zwierzętni SAM w Katowicach. Odżywiane były kontrolną dietą ze swobodnym dostępem do poidełek z wodą i utrzymywane w 12 godzinnym cyklu dziennie-nocnym. Na przeprowadzenie poniższych doświadczeń uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Katowicach (L.dz. NN-013-2-36/2000).

Szczurom przed badaniem serca podawano heparynę (500 I.U./100g m.c. *i.p.*) i usypiano pentobarbitalem (60 mg/kg m.c. *i.p.*). Następnie wycinano narządy klatki piersiowej i perfundowano (metoda Langendorff, płyn Krebs-Henseleit; pO_2 520 mmHg; pod stałym ciśnieniem 60 mmHg) przez minutę po uprzednim odcięciu płuc i podwiązaniu naczyń płucnych celem wypłukania z krwi naczyń oraz komór serca. Po wykonaniu perfuzji do pozostawionego (nie odciętego) wstępującego odcinka łuku aorty wprowadzano kaniulę z kranikiem. Kaniulę szczelnie podwiązywano na naczyniu. Tak przygotowane serce zawieszano na statywie. Do kaniuli podłączano 10 ml strzykawkę ze środkiem cieniującym. Po otwarciu kranika, układ naczyniowy wypełniano zawiesiną barytu o temperaturze 36–40°C przygotowaną *ex tempore* pod ciśnieniem wytwarzanym przez słup mieszaniny kontrastowej zawartej w strzykawce. Skład mieszaniny kontrastowej ustalono po dokonaniu szeregu prób z siarczanem baru i uropoliną, oraz gumą arabską i żelatyną. [6, 8–10]. Stosowana przez nas mieszanina kontrastująca zawierała 60% zawiesinę zdekantowanego

i zmikronizowanego w homogenizatorze szklanym siarczanu baru oraz 10% roztwór żelatyny, połączone w proporcji objętościowej 3:2. Perfuzję prowadzono pod kontrolą wzroku, aż do wypełnienia się (zabarwienia na kolor biały, kolor mieszaniny kontrastującej) sieci drobnych naczyń podnadsierdziowych. Czas trwania perfuzji wynosił 40 minut. Następnie zamykano połączenie (kranik) pomiędzy strzykawką zawierającą mieszaninę kontrastującą a kaniulą wprowadzoną do aorty wstępującej. Po kolejnych 60 minutach wstępnego schłodzenia w warunkach pokojowych, serce zanurzano w 6% roztworze zbuforowanego formaldehydu na okres doby. Zdjęcia rentgenowskie zakontrastowanych naczyń wieńcowych wykonywano po upływie 24 godzin przy użyciu aparatu pierwotnie przeznaczonego do badań stomatologicznych i zaadaptowanego do potrzeb prowadzonego eksperymentu radio-farmakologicznego. Efektywne ognisko lampy rentgenowskiej o rozmiarze 0,3 mm. Odległość ogniska lampy od anatomicznego preparatu szczurzego serca – 1 m. Warunki ekspozycji – 50 kV, 20 mAs. Obrazy rejestrowano na standardowych, „zębowych” kliszach rentgenowskich o wymiarach 4 x 3 cm, a u części szczurów również za pomocą cyfrowego przetwornika obrazu CCD. Zastosowana aparatura rentgenowska oraz pomieszczenie badawcze spełniało wymogi ochrony radiologicznej.

Przed wykonaniem zdjęć radiologicznych serce stabilizowano w urządzeniu własnego pomysłu, umożliwiającym dokonanie pełnego obrotu badanego obiektu wokół własnej osi (schemat 1). Sterowany silnikiem elektrycznym i elektronicznie kontrolowany obrót serca był możliwy dzięki przeprowadzeniu przez światło kaniuli, lewą komorę i mięsień serca w okolicy jego koniuszka wykonanej z drewna osi o średnicy około 1 mm. Materiał osi dobrał tak, aby nie dawał cienia na zdjęciach rentgenowskich. Aby zapewnić stabilne i sztywne połączenie preparatu serca z osią, oś i serce zespalano klejem cianoakrylowym. Zdjęcia tętnic wieńcowych wykonywano w projekcjach stosowanych w diagnostyce angiologicznej: tylnoprzodniej, bocznej i skośnej lewej. Dodatkowo celem uzyskania wyczerpujących informacji anatomicznych na temat kształtu i przebiegu obrazowanych tętnic, wykonywano serie od 24 do 60 zdjęć przy kontrolowanym obrocie preparatu anatomicznego o 360°, co 6 do 15°. Uzyskane na kliszach rentgenowskich obrazy serca skanowano. Wszystkie obrazy (analogowe – skanowane klasyczne zdjęcia radiologiczne oraz cyfrowe – zarejestrowane dzięki użyciu przetwornika CCD) zapisywano przy pomocy dostępnego oprogramowania komputerowego w pliku filmowym, umożliwiającym płynne oraz poklatkowe śledzenie uwidocznionych naczyń.

Wyniki

Ilustrację uzyskanych wyników stanowić mogą załączone arteriogramy, obrazujące tętnice wieńcowe szczurów szczepu Sprague-Dawley® i Wistar® (ryc. 1, 2 i 3). Spostrzegane różnice anatomiczne i topograficzne tętniczego unaczynienia serca szczura w porównaniu z sercem ludzkim wyrażają się następująco:

- 1) tętnice wieńcowe przebiegają wzdłuż prawego i lewego brzegu serca,

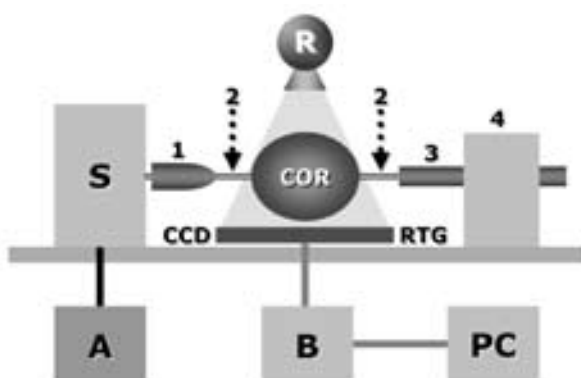


Diagram 1. Construction of the equipment for obtaining radiograms. Legend: R – X-ray tube; COR – heart of the rat; S – electric motor; A – digital motor control circuit; CCD and RTG – drawer for the sensor or X-ray film; B – digital circuit of the image sensor; PC – computer; 1 – axle; 2 – axle; 3 – axle; 4 – axle fixture support.

Schemat 1. Budowa urządzenia do wykonywania zdjęć rentgenowskich. Oznaczenia: R – lampa rentgenowska; COR – serce szczura; S – silnik elektryczny; A – cyfrowy obwód sterowania silnikiem elektrycznym; CCD i RTG – szuflada na cyfrowy przetwornik obrazu lub kliszę rentgenowską; B – cyfrowy obwód przetwornika obrazu; PC – komputer; 1 – mocowanie osi; 2 – drewniana oś; 3 – uchwyt osi; 4 – podpora uchwyty osi.

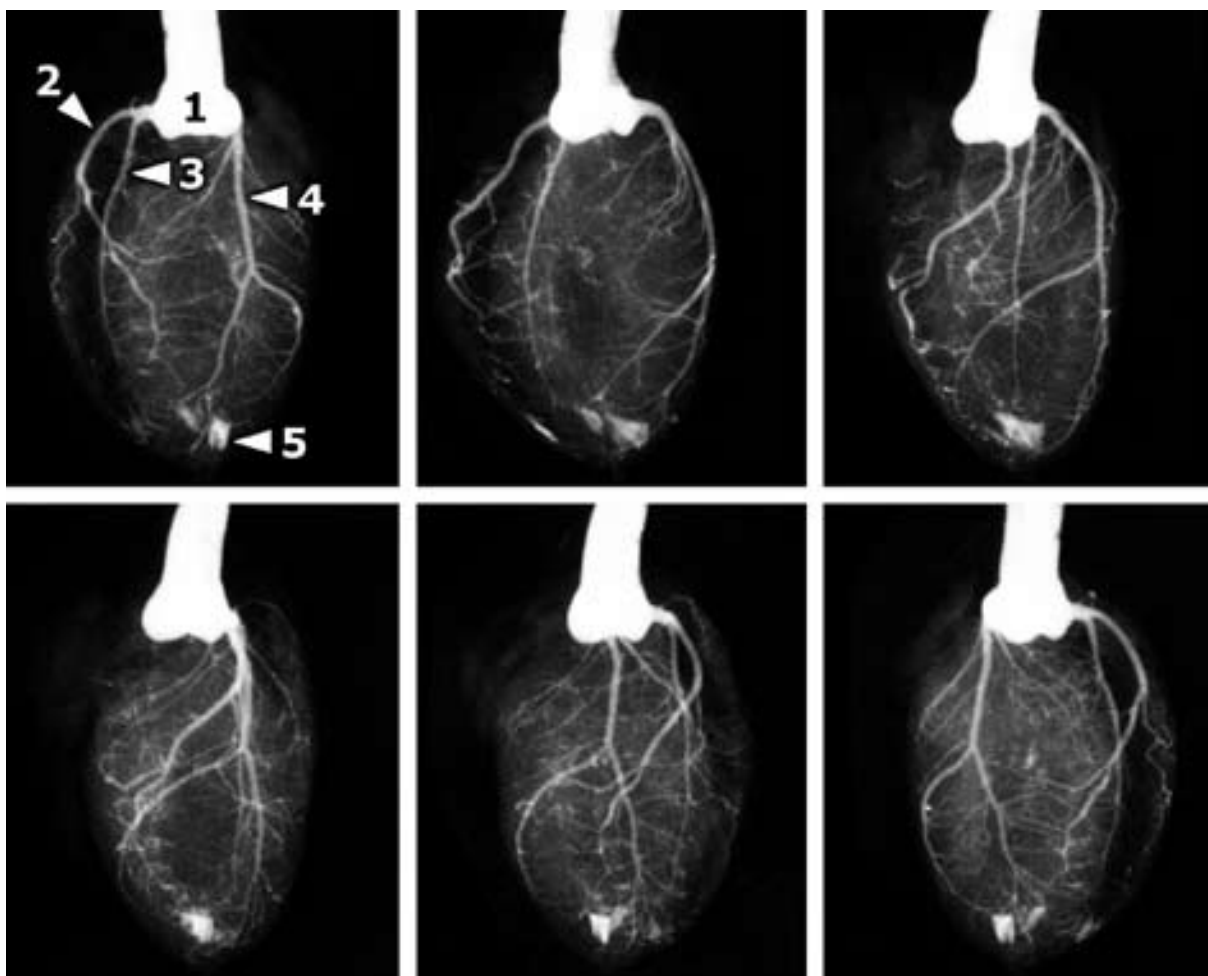


Figure 1. X-ray image of the coronary vessels of a rat of the Sprague-Dawley® strain, female, specimen no. 67. Rotation of the heart from position a in 180 increments to position p-a. The right-sided branching of the anterior interventricular branch. Legend: 1 – aortic bulb; 2 – right coronary artery; 3 – anterior interventricular branch; 4 – left coronary artery; 5 – traces of contrast medium in the left ventricular lumen. Imaging on the second day of shading of the arteries.

Rycina 1. Obraz naczyń wieńcowych szczura szczepu Sprague-Dawley®, samica, preparat nr 67. Obrót serca z pozycji a – p o 180° do pozycji p – a. Prawostronne odejście gałęzi międzykomorowej przedniej. Oznaczenia: 1 – opuszka aorty; 2 – prawa tętnica wieńcowa; 3 – gałąź międzykomorowa przednia; 4 – lewa tętnica wieńcowa; 5 – ślad kontrastu w świetle lewej komory serca. Zdjęcie wykonane w drugiej dobie po zacienianiu tętnic wieńcowych (por. ryc. 2A).

2) gałąź międzykomorowa biegnie śródmięśniowo.

Podczas wypełniania łożyska naczyniowego środkiem cieniującym w 26 przypadkach na 69 przebadanych serc szczurzych (37,7%) doszło do wstecznego zakontraktowania lewej komory serca (ryc. 2).

Wypracowana technika pośmiertnego kontrastowania naczyń oraz rejestracji ich radiologicznego obrazu pozwalała na:

1) powtarzalne w kolejnych eksperymentach, dokładne i przestrzenne uwidocznienie kształtu i przebiegu tętnic wieńcowych szczura,

2) opisanie uwidocznionych naczyń na podstawie oceny uzyskanych arteriogramów zgodnie z nazewnictwem przyjętym w anatomii opisowej i rentgenowskiej człowieka (ryc. 1), [11–14],

3) potwierdzenie występowania różnic w obrazach tętniczego unaczynienia wieńcowego u szczurów należących do dwóch porównywanych przez nas szczepów Sprague-Dawley® i Wistar® (ryc. 2 i 3); w kardiologii doświadczalnej – ze względu na mniejszą homogenność unaczynienia serca szczura szczepu Wistar® – stosuje się z wyboru szczep Sprague-Dawley® [15–17],

4) wykazanie istnienia anatomicznej odmiany odejścia gałęzi międzykomorowej przedniej u badanych zwierząt; prawostronne odejście gałęzi międzykomorowej przedniej w wykonanych przez nas badaniach radiologicznych i anatomicznych odnotowaliśmy aż u 80% spostrzeganych szczurów (ryc. 1, 2 i 3), [7, 12],

5) wykazanie – podobnie jak ma to miejsce u ludzi – obecności zespołów tętniczo-tętniczych, tak w zakresie jednoimiennej dorzecza naczyniowego, jak i pomiędzy dorzeczami prawej i lewej tętnicy wieńcowej [5, 9, 18–20]; występowanie

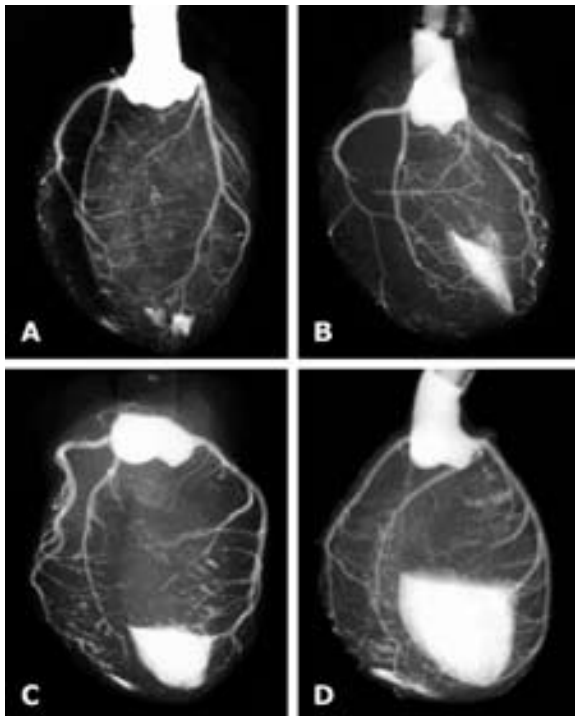


Figure 2. Coronary arteriograms of rats the Sprague-Dawley® and Wistar®. A – Sprague-Dawley® strain, female, specimen no. 67; image obtained 6 months after the start of the experiment. B – Wistar®, female, specimen no. 59; the right-sided branching of the interventricular branch; traces of contrast medium in the left ventricular lumen. C – Sprague-Dawley®, male, specimen no. 47; the right-sided branching of the interventricular branch; the level of contrast medium in the left ventricular lumen. D – Wistar®, female, specimen no. 44; the left-sided branching of the intraventricular branch; the level of contrast medium in the left ventricular lumen.

Rycina 2. Arteriogramy wieńcowe szczurów szczepu Sprague-Dawley® i Wistar®. A – Sprague-Dawley®, samica, preparat nr 67; zdjęcie wykonane po upływie 6-ciu miesięcy od dnia rozpoczęcia eksperymentu. (por. ryc.1). B – Wistar®, samica, preparat nr 59; prawostronne odejście gałęzi międzykomorowej; ślad środka cieniującego w świetle lewej komory. C – Sprague-Dawley®, samiec, preparat nr 47; prawostronne odejście gałęzi międzykomorowej; poziom kontrastu w świetle lewej komory serca. D – Wistar®, samica, preparat nr 44; lewostronne odejście gałęzi międzykomorowej; poziom kontrastu w świetle lewej komory.

anastomoz tętniczo – tętniczych wykazaliśmy w badaniu anatomicznym odpowiednio u około 85 i 5% zwierząt; istnienie zespoleń znalazło potwierdzenie w badaniach drobnowidowych; przykład zespolenia w dorzeczu lewej tętnicy wieńcowej – przyjmującego kształt litery T („koniec do boku”) – ilustruje ryc. 3.

Omówienie

Obserwowane przez nas zjawisko wstecznego zakontraktowania lewej komory serca miało miejsce, gdy kontrast podawano do naczyń wieńcowych nie całkowicie jeszcze

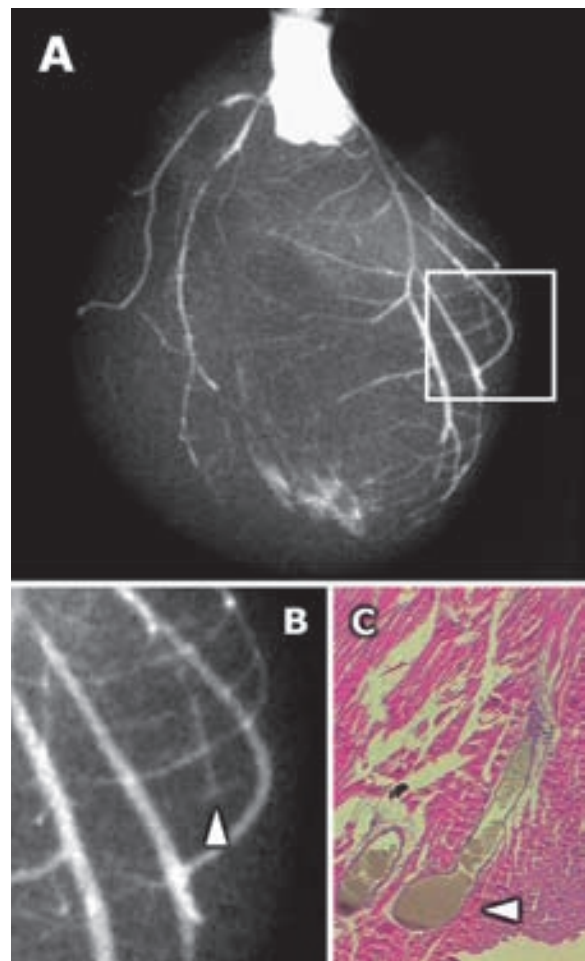


Figure 3. The image of the arterial T-shunt in the drainage-basin of the left coronary artery. Wistar®, male specimen no 35. A – Coronary arteries of the rat, the right-sided branching of the interventricular branch; frame – arterial shunt. B – enlarged detail of A (frame); arrow indicates the arterial shunt. C – histological examination; staining – HE, magnification – 200x; arrow indicates the place of the arterial shunt.

Rycina 3. Obraz zespolenia tętniczo-tętniczego w kształcie litery T w dorzeczu lewej tętnicy wieńcowej. Wistar®, samiec, preparat nr 35. A – tętnice wieńcowe szczura; prawostronne odejście gałęzi międzykomorowej; ramka – zespolenie tętniczo-tętnicze. B – powiększony wycinek obrazu A (ramka); strzałka – zespolenie tętniczo-tętnicze. C – badanie histologiczne; barwienie – HE; powiększenie – 200x; strzałka – miejsce zespolenia naczyń tętniczych.

zatrzymanego serca. W następstwie odruchowego otwarcia się zastawek aorty, środek cieniujący przedostawał się do lewej komory. Obecność kontrastu w świetle komory nie utrudniała jednak oceny obrazu samych tętnic wieńcowych, dokonywanej w oparciu na serii kilkudziesięciu zdjęć uzyskanych podczas obrotu serca wokół własnej osi. Przeciwdziałając niekontrolowanemu wypełnianiu się lewej komory, podaż mieszaniny kontrastującej starano się rozpocząć dopiero po całkowitym zatrzymaniu akcji serca. Gdy to nie skutkowało, a podczas trwania eksperymentu zaobserwowano skurcz lub skurcze serca, od strony koniuszka narządu wprowadzano do światła lewej komory

igłę iniekcyjną o wymiarze 18 G celem usunięcia tą drogą gromadzącego się w tam kontrastu. Obecność igły okazała się skutecznym sposobem postępowania i nie zakłócała przebiegu eksperymentu. Na wykonanych w późniejszym czasie rentgenogramach widoczny był w tych przypadkach jedynie ślad, a nie „poziom” środka cieniującego w świetle lewej komory serca (ryc. 1 i 2).

Z uzyskanych anatomicznych preparatów serc szczurzych można było także dodatkowo pobierać celowane wycinki do badania histologicznego, wykorzystując radiologiczną topografię anomalii lub zmian naczyniowych (ryc. 3c).

Zastosowany sposób rejestracji obrazu badanych tętnic na kliszach rentgenowskich jest pracochłonny w porównaniu z rejestracją przy użyciu cyfrowego przetwornika obrazu. Na korzyść metody „klasycznej” zapisać jednak należy większą liniową zdolność rozdzielczą drobnopiętnej kliszy rentgenowskiej, gdy idzie o wierne odzwierciedlanie szczegółów obrazu, w porównaniu ze stosowanym przez nas przetwornikiem cyfrowym.

Ostatnim z omawianych zagadnień jest skład i trwałość kontrastowego wypełnienia naczyń wieńcowych szczura. Podczas sporządzania receptury mieszaniny kontrastującej dążyliśmy do uzyskania medium na tyle płynnego, aby dobrze wypełniało rozgałęzienia tętnic wieńcowych, skutecznie je kontrastowało i zestalało się po schłodzeniu, tworząc wytrzymały na oddziaływanie sił mechanicznych

wewnętrzny odlew badanych naczyń. Końcowym wynikiem prowadzonych przez nas badań nad składem środka cieniującego jest opracowana i opisana w niniejszej pracy mieszanina siarczanu baru i żelatyny, która spełniała przytoczone powyżej wymogi. Chcąc sprawdzić trwałość wypełnienia kontrastowego w dwóch przypadkach wykonaliśmy zdjęcia rentgenowskie zakontrastowanych i przechowywanych w roztworze formaliny anatomicznych preparatów serc szczurzych po upływie trzech i sześciu miesięcy od dnia rozpoczęcia eksperymentu. Porównanie uzyskanych obrazów ze zdjęciami wykonanymi w drugiej dobie po wypełnieniu tętnic wieńcowych szczura nie wykazało różnic (ryc. 1 i 2).

Podsumowanie

Mając na uwadze rozwój zwierzęcych modeli badawczych, szczególnie w kardiologii doświadczalnej, gdzie wyniki badań przedklinicznych stanowią podstawę do dalszych badań klinicznych leków, należy zwrócić szczególną uwagę na anatomiczną odmienną układu tętnic wieńcowych, ich budowę i związaną z tym fizjologią przepływu wieńcowego. Występowanie połączeń tętniczo-tętniczych, których otwarcie zapewnia unikalną kompensację krążenia wieńcowego (np. w niedokrwieniu), może prowadzić do odmiennych wyników w badaniach nad lekami. Stąd też wydają się uzasadnione dalsze badania nad opisanym modelem zwierzęcym, prowadzące do lepszego poznania anatomii i fizjologii krążenia wieńcowego u szczura.

Piśmiennictwo

1. Dembińska-Kieć A, Dulak J, Partyka Ł et al: Induction of nitric oxide synthase (NOS) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in experimental model of angioplasty and heart ischemia. Recent Advances in Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Res. In: Advances in Experimental Medicine and Biology Eds: H.Sinzinger, B.Samuelsson, J.R.Vane, R.P. Paoletti, P.Ramwell, and P.Y-K.Wong, Plenum Press, New York and London, 1998; 163-167.
2. Heba G, Dulak J, Krzemiński T et al: Angiogeneza w niedokrwionym mięśniu sercowym – udział cytokin i czynników wzrostowych. Kardiologia Polska, 1999; 51(I): 113-116.
3. Heba G, Krzemiński T, Porc M et al: The time dependent TNF α , iNOS and VEGF expression in experimental model of chronic myocardial infarction in rats. J Vasc Res, 2001; 38: 288-299.
4. Heba G, Krzemiński T, Porc M et al: Relation between expression of TNF α , iNOS and VEGF mRNA and development of heart failure after experimental myocardial infarction in rats. J Physiol Pharmacol, 2001; 52 (1): 39-52.
5. Dbaly J: Postnatal development of coronary arteries in the rat. Z Anat, 1974; 118: 507-510.
6. Kato T, Yasue T, Shoji Y et al: Angiographic difference in coronary artery of man, dog, pig, and monkey. Acta Pathol Jpn, 1987; 37(3): 361-73.
7. Taira Y, Kanaide H, Nakamura M: The distribution of ischemia in perfused Wistar rat hearts following coronary artery occlusion. Br J Exp Path, 1985; 66: 613-21.
8. Chopra P, Sethi U, Talwar JR et al: Pattern of coronary arterial circulation and anastomoses in post mortem angiographic studies of human hearts. Acta Cardiol, 1981; 36(4): 249-62.
9. Evans H: Postmortem angiography: a new medium and technique. Arch Path Lab Med, 1967; 83: 479-484.
10. Kato T: A comparative study of the coronary arterial structure in the left ventricular free wall in infarcted and non-infarcted human hearts. Jpn Circ J, 1976; 40(9): 989-1003
11. Greene ECh: Anatomy of the rat. Ed. 2nd N.Y. Hafner Publishing Co. 1959.
12. Hebel R, Stromberg MW: Anatomy of the laboratory rat. The Williams & Wilkins Comp. Baltimore 1976.
13. Kopf – Maier P: Atlas anatomii człowieka. PZWŁ, Warszawa, 2002.
14. Luzsa G: X – ray anatomy of the vascular system. Akadémiai Kiadó, Budapest, 1974.
15. Halpern M.H: The dual blood supply of the rat heart. Am J Anat, 1957; 101: 1-16.
16. Halpern MH: The sinoatrial node in the rat heart. Anat Rec, 1955; 123: 425-435.
17. Selye H, Bajusz E, Grasso S, Mendell P: Simple techniques for surgical occlusion of coronary vessels in the rat. Angiology, 1960, 11: 398-407.
18. Nożyński J, Sitko A, Kędzia A et al: Anastomoses in rat and human heart. A Angiol, 2003; 9, suppl: 35.
19. Petelenz T: Extracoronary shunts with coronary arteries in man. Cardiologia, 1965; 47: 323-336.
20. Tsuchiya G: Postmortem angiographic studies on the intercoronary arterial anastomoses. Studies on intercoronary arterial anastomoses in adult human hearts and the influence on the anastomoses of strictures of the coronary arteries. Jpn Circ J, 1970; 34 (12): 1213-1220.