

ISPITIVANJE UTICAJA STARENJA I SIMPATOMIMETIKA IZOPRENALINA NA FUNKCIJU MIOKARDA U LANGENDORFOVOM MODELU SRCA PACOVA

Autor: LEJLA TICA, Đorđe Pilipović

e-mail: lejla.tica@student.med.unibl.org

Mentor: doc.dr Milica Gajić Bojić, doc.dr Zorislava Bajić

Centar za biomedicinska istraživanja

Medicinski fakultet Univerziteta u Banjoj Luci

Uvod: Langendorfov model izolovanog srca je eksperimentalni model koji se koristi u kardiovaskularnim istraživanjima na polju fiziologije, farmakologije i toksikologije. Zasnovan je na *ex vivo* retrogradnoj perfuziji srca izolovanog iz eksperimentalne životinje, pri čemu sistem transdjusera i amplifajera omogućava mjerenje hemodinamskih parametara i procjenu efekata prethodno primijenjene farmakološki aktivne supstance na miokard.

Cilj: Cilj ovog ispitivanja bilo je utvrđivanje razlika u kardiovaskularnom odgovoru uslovljenih starenjem, kao i tretiranjem eksperimentalnih pacova neselektivnim β -agonistom izoprenalinom, za kojeg već postoje dokazi da ima potencijal za uzrokovanje akutnog zatajenja srca.

Materijal i metode: Mužjaci Wistar albino pacova podijeljeni su u testnu grupu (3 starija pacova) i kontrolnu grupu (6 mladih pacova), pri čemu su mjerene vrijednosti hemodinamskih parametara (brzine promjene pritiska u sistoli, brzine promjene pritiska u diastoli, sistolnog pritiska u lijevoj komori, dijastolnog pritiska u lijevoj komori, frekvence srčanog rada i koronarnog protoka) pri rastućim perfuzionim pritiscima. U drugom dijelu ispitivanja isti parametri su mjereni u testnoj grupi (Iso, $n = 3$) tretiranoj izoprenalinom prva dva dana i fiziološkim rastvorom narednih sedam dana, i u kontrolnoj grupi (Con, $n = 3$) kojoj je primijenjen samo fiziološki rastvor tokom svih devet dana.

Rezultati: Između mladih i starih pacova uočene su statistički značajne razlike u funkciji srca pri svim vrijednostima perfuzionog pritiska. U funkciji srca pacova kojima je primijenjen izoprenalin i netretiranih pacova takođe su uočene razlike, iako iste nisu statistički značajne.

Zaključak: Starenje dovodi do značajnih promjena u funkciji srčanog mišića. Izoprenalin posjeduje potencijal da naruši funkciju miokarda, ali su potrebna daljnja ispitivanja.

Ključne riječi: Langendorfov model, izolovano srce, retrogradna perfuzija, hemodinamske promjene uzrokovane starenjem, izoprenalinom indukovano zatajenje srca.

UVOD

Eksperimentalni rad u oblasti fiziologije, farmakologije i toksikologije u drugoj polovini 19. vijeka obilježen je značajnim napretkom u polju ispitivanja koja se vrše na izolovanim organima, ponajviše na izolovanom srcu. Razvoj Langendorffovog modela izolovanog, perfundovanog srca predstavlja prekretnicu u oblasti kardiovaskularnih istraživanja nazvanu po njemačkom fiziologu Oskaru Langendorfu (Oscar Langendorff), koji je 1895. godine patentirao ovaj eksperimentalni model. Srce eksperimentalnog miša odnosno pacova je najkorištenije pri izvođenju biomedicinskih ispitivanja zbog lakoće manipulacije istim [1].

Langendorffov model izolovanog srca zasnovan je na *ex vivo* retrogradnoj perfuziji

kanuliranog srca izolovanog iz anestetizirane eksperimentalne životinje, pri čemu sistem transdjusera i amplifajera omogućava mjerenje hemodinamskih parametara i procjenu efekata prethodno primijenjene farmakološki aktivne supstance na miokard. Pritom su uticaji organizma u cjelini poput raznih neurohumoralnih faktora i kompenzatornih mehanizama koji se suprotstavljaju dejstvu primijenjene supstance na srce, primjerice, aktivacije renin-angiotenzin-aldosteron sistema usljed nadražaja baroreceptora u luku aorte, eliminisani, što pruža umnogome realniji uvid u manifestacije na posmatranom organu te je, kao takvu, čini vrlo iscrpnim izvorom podataka koje zahtijeva svako temeljno kardiovaskularno istraživanje [1].

Do danas je razvijeno više različitih modifikacija originalnog Langendorffovog modela koje se koriste u zavisnosti od potreba samog eksperimenta, ali princip u osnovi svake od ovih inačica izvornog modela je isti [2].

Može da se koristi u dvjema postavkama: u postavci sa konstantnim pritiskom pod kojim perfuzat protiče i u postavci sa konstantnim protokom perfuzata, u zavisnosti od potrebe konkretnog eksperimenta. Postavka sa konstantnim pritiskom preferira se ako je u pitanju studija vezana za proučavanje hemodinamskih parametara u ishemiji srca, dok se u većini ostalih slučajeva daje prednost postavci sa konstantnom brzinom protoka, što je učinjeno i u ovom eksperimentu [3].

Cilj ovog rada je bio da se na temelju Langendorffovog eksperimentalnog modela ispita uticaj fiziološkog procesa starenja na funkciju srčanog mišića te, kao drugi dio ispitivanja istom metodom, efekti simpatomimetika izoprenalina na parametre performanse miokarda. Na aparaturi za Langendorffov model izolovanog srca sa konstantnim protokom su u svim četirima grupama pri rastućim perfuzionim pritiscima (40, 60, 80, 100 i 120), čija je vrijednost izražena u centimetrima vodenog stuba (cmH_2O), mjerene vrijednosti šest hemodinamskih parametara: maksimalne brzine promjene pritiska u sistoli (dP/dt max), minimalne brzine promjene pritiska u diastoli (dP/dt min), sistolnog pritiska u lijevoj komori (engl. *Systolic Left Ventricular Pressure*, SLVP), diastolnog pritiska u lijevoj komori (engl. *Dyastolic Left Ventricular Pressure*, DLVP), frekvence srčanog rada (*Heart Rate*, HR) i koronarnog protoka (*Coronary Flow*, CF).

MATERIJAL I METODE

Teorijska osnova metode

Kao što je već u uvodu nagoviješteno, Langendorffov model izolovanog, perfundovanog srca u svojoj osnovi ima retrogradni protok perfuzione tečnosti kroz miokard. Ovakav način proticanja je po svom smjeru suprotan fiziološkom toku krvi kroz srce, tačnije, perfuzioni rastvor koji imitira krv *ex vivo* se u srce dovodi kroz kanilu koja je prethodno uvedena u ushodni dio aorte. Dakle, perfuzat ulazi u srce kroz arterijski krvni sud, dok je *in vivo* obrnut slučaj, to jeste krv ulazi u srce putem vena (kroz donju i gornju šuplju venu u desno srce, a kroz plućne vene u lijevo srce), a napušta ga putem arterija (aorte i plućnog stabla). Nakon ulaska perfuzionog rastvora u aortu, isti neće pri svom nishodnom toku ući u lijevu srčanu komoru budući da će se, zahvaljujući primijenjenom perfuzionom pritisku, aortni zalisci zatvoriti te će jedini preostali put za perfuzat biti ulazak u koronarnu cirkulaciju kroz aortni ostijum, neposredno iznad aortnih zalistaka. Na ovaj način se obezbjeđuje da se perfuzionom tečnošću srčanom mišiću dopreme sve potrebne materije, prevashodno glukoza i elektroliti, kako bi se održavala njegova funkcija nakon isključenja iz sistemske cirkulacije. Nakon prolaska kroz koronarne krvne sudove, perfuzat se kroz koronarni sinus uliva u desnu pretkomoru, odakle se prikuplja i potom analizira ako su, primjerice, predmet ispitivanja metaboliti određene supstance nastali biotransformacijom u srcu [1] [2].

Eksperimentalne životinje i etički principi

Eksperimentalne životinje korištene u ovom ispitivanju su mužjaci Wistar albino pacova. Prije sprovođenja eksperimenta boravili su u specifičnim laboratorijskim uslovima temperature ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) i procenta vlažnosti vazduha ($55 \pm 5\%$).

Eksperimentalni protokol ovog istraživanja podrazumijeva etično postupanje sa eksperimentalnim životinjama kroz boravak istih u prethodno pomenutim, kontrolisanim uslovima koji obezbjeđuju dobrobit (temperatura, vlažnost vazduha, svjetlost, hrana) te humano žrtvovanje uz anesteziju.

Grupisanje i tretman eksperimentalnih životinja

U svrhu ispitivanja uticaja starenja na funkciju miokarda, eksperimentalne životinje su podijeljene u testnu grupu koju su činila tri starija pacova te kontrolnu grupu u čiji sastav je ušlo šest mladih pacova. Radi ispitivanja uticaja izoprenalina na srčanu funkciju, pacovi su podijeljeni u testnu grupu (Iso, $n = 3$) kojoj je tokom prva dva dana supkutano (s. c.) administrirana doza od 85 mg/kg izoprenalina rastvorena u 1 ml/kg fiziološkog rastvora (vodeni rastvor natrijum-hlorida u koncentraciji 0,9%), nakon čega su u narednih sedam dana, takođe supkutanim putem, primali samo fiziološki rastvor u dozi od 1 ml/kg. Kontrolna grupa (Con, $n = 3$) je primala isključivo fiziološki rastvor u dozi 1 ml/kg apliciran supkutano tokom svih devet dana.

Po isteku devetog dana Wistar albino pacovi obiju testnih i kontrolnih grupa su anestezirani te podvrgnuti narednim koracima standardne procedure Langendorffove preparacije srca, kako je opisano u nastavku.

Langendorffova preparacija srca

Langendorffova preparacija srca podrazumijeva tri glavna koraka: hirurško anesteziranje eksperimentalne životinje, eksciziju srca i kanilaciju aorte [1].

Hirurško anesteziranje životinje može da se izvede injekcionim ili inhalacionim putem. Ne postoji univerzalni anestetik koji se može primijeniti te je potreban pažljiv odabir istog imajući u vidu da se efekti koje prouzrokuje isti opšti anestetik mogu razlikovati u zavisnosti od vrste životinje na kojoj je isti primijenjen [1]. U ovom ispitivanju korištena je kombinacija ketamina u dozi 90 mg/kg i ksilazina u dozi 10 mg/kg.

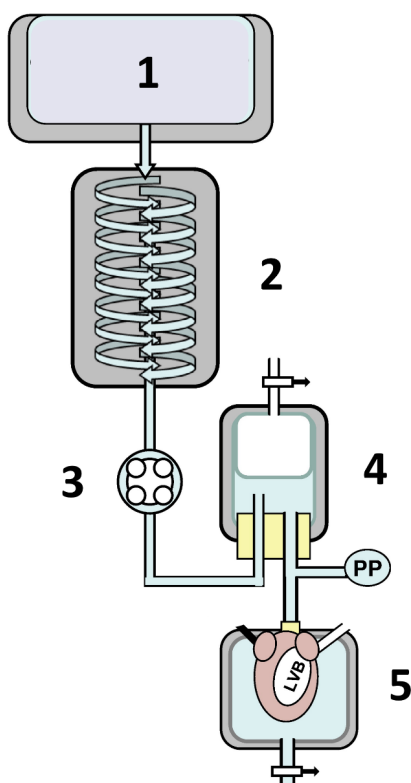
Anesteziranu životinju je potrebno smjestiti na podlogu u neposrednoj blizini same aparature na kojoj će se izvoditi ispitivanje budući da je neophodno u najkraćem mogućem vremenskom periodu, tačnije, u roku od maksimalno pet minuta, po eksciziji srca isto i povezati sa uređajem i obezbijediti protok rastvora za perfuziju kako ne bi došlo do ishemije miokarda i sljedstvenog gubitka kontraktilnosti ili pak reperfuzionog stresa koji bi nastupio ako bi se srce koje je predugo bilo lišeno kiseonika iznenada perfundovalo. Ova greška u radu bi se ogledala u povećanju oksidativnog stresa, oštećenju ćelijskih membrana i apoptozi kardiomiocita [4]. Ova pojava je u nauci poznata pod nazivom „ishemijsko-reperfuzioni stres“ te u literaturi već postoji nemali broj radova napisanih o ovoj temi.

U svrhu izdvajanja srca od ostalih struktura u torakalnoj duplji vrši se bilateralna sternotomija. Eksciziju je potrebno brzo obaviti iz ranije objašnjenih razloga, što zahtijeva i operatera sa određenim iskustvom i razvijenom vještinom. Rad izolovanog srca će svakako, ako se dozvoli njegovo spontano kontrahovanje, vremenom slabiti, što će se i primijetiti po vrijednostima za srčanu frekvencu, ali uprkos tome zadržava puni kapacitet rada dovoljno dugo da se izvrši ispitivanje. Kao dodatna mjera prevencije oštećenja miokarda prije vještačke perfuzije srce se neposredno po uklanjanju iz tijela životinje uranja

u rastvor za kardioplegiju koji predstavlja rastvor glukoze i određenih soli (natrijum-hidrogenkarbonata i hlorida natrijuma, kalijuma, magnezijuma i kalcijuma), primjerice u Petrijevoj šolji, ohlađen na temperaturu od 4°C, kako bi se usporio metabolizam u ćelijama srca te usporio nastanak ishemije dok se ne izvrši kanilacija [1].

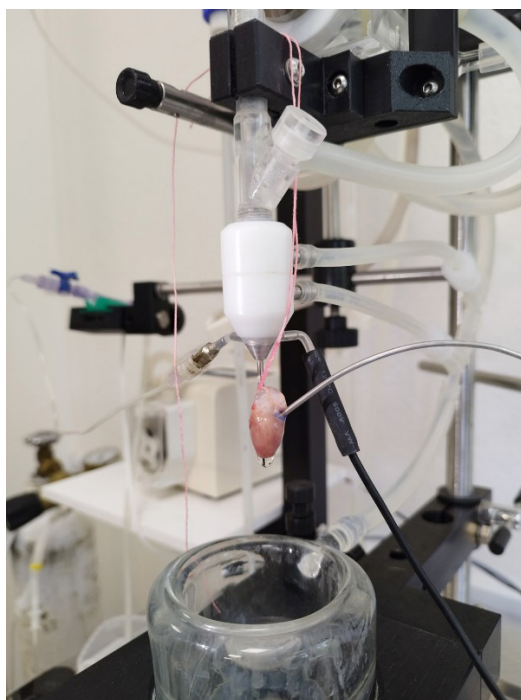
Aparatura

Aparatura potrebna za primjenu Langendorffovog eksperimentalnog modela je dostupna u različitim veličinama u zavisnosti od veličine samog srca koje je predmet istraživanja, odnosno u zavisnosti od vrste eksperimentalne životinje. Osnovni dijelovi uređaja (*MDE, LF-12, 22K0983, Budapest, Hungary*) su rezervoar perfuzione tečnosti, boca sa karbogenom kojim se vrši oksigenacija tečnosti, sistem za zagrijavanje perfuzata, perfuziona pumpa koja omogućava kontrolisan protok rastvora, izolovano i kanulirano srce, uronjeno u termostatirano kupatilo za izolovane organe, u čiju lijevu komoru je uveden kateter za mjerenje ventrikularnog pritiska ili balon, komora koja omogućava termostatiranje kanile, eliminaciju mjehurića iz perfuzionog rastvora i održavanje fiziološke komplijanse odnosno rastegljivosti krvnih sudova, transdjuser, amplifajer (pojačivač signala), sistem za snimanje i pripadajući softver (Šema br. 1) [5].



Šema br. 1 Uprošćeni prikaz aparature za primjenu Langendorffovog modela izolovanog srca: (1) rezervoar perfuzione tečnosti aerisane karbogenom; (2) navoj za razmjenu toplote namijenjen za održavanje temperature perfuzione tečnosti u definisanom temperaturnom opsegu; (3) peristaltička pumpa; (4) komora koja omogućava termostatiranje kanile, eliminaciju mjehurića iz perfuzione tečnosti i održavanje fiziološke komplijanse to jeste rastegljivosti krvnih sudova; (5) termostatirano kupatilo za izolovane organe u koje je uronjeno srce; LVB – balon uveden u lijevi ventrikul

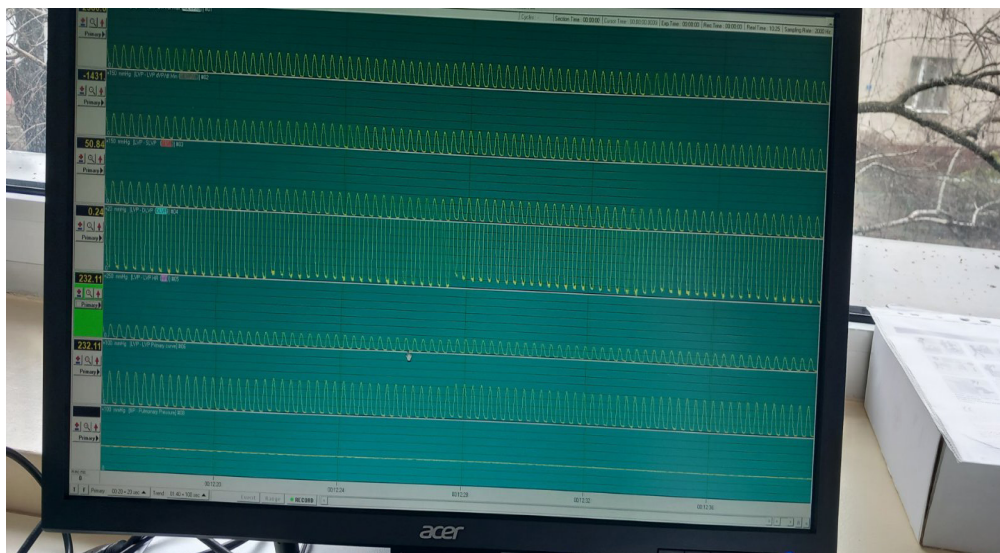
Kanila se uvodi u ascendentni dio aorte dok se balon napunjen tečnošću uvodi kroz lijevi atrijum u lijevi ventrikul, gdje se potom pozicionira i senzor (Slika br. 1 i br. 2). Senzor omogućava registrovanje podataka o električnoj aktivnosti srca i slanje istih na daljnju obradu transdjuserima i amplifajerima, da bi softver uređaja obrađene informacije prikazao u vidu zapisa na monitoru (Slika br. 3). [2] Neophodno je neposredno nakon toga pokrenuti dotok perfuzionog rastvora kroz cijev koja povezuje njegov rezervoar sa kanilom. Cjelokupna aparatura, uključujući i cijevi kojima se perfuzat doprema do srca kao i komora u kojoj se srce nalazi, uronjeni su u vodu koja konstantno recirkuliše osiguravajući da se strujanje tečnosti kroz srce odvija na tjelesnoj temperaturi životinjske vrste koja je predmet ispitivanja. Pri ovom ispitivanju ciljani temperaturni raspon bio je $35,9^{\circ}\text{C} - 37,5^{\circ}\text{C}$ [1].



Slika br. 1 Kanulirano pacovsko srce u eksperimentalnoj postavci Langendorffovog modela



Slika br. 2 Uvećani prikaz kanuliranog pacovskog srca u eksperimentalnoj postavci Langendorfovog modela



Slika br. 3 Grafički prikaz rezultata dobijenih softverskom obradom prikupljenih podataka

Perfuzioni rastvor

Kada je riječ o tečnosti za perfuziju, može se koristiti puna krv, prečišćene krvne ćelije ili kristaloidni rastvor čiji je kvalitativni i kvantitativni sastav precizno definisan tako da oponaša fiziološke koncentracije elektrolita. Pod potonjim najčešće se misli na Krebs-Henseleit-ov puferovani rastvor koji sadrži natrijum-hlorid (118,5 mmol/L), natrijum-hidrogenkarbonat (25 mmol/L), kalijum-hlorid (4,7 mmol/L), magnezijum-sulfat (1,2 mmol/L), kalijum-dihidrogenfosfat (1,2 mmol/L), glukozu (11 mmol/L) i kalcijum-hlorid u koncentraciji od 1,2 mmol/L do 1,8 mmol/L te njegova pH vrijednost odgovara fiziološkoj vrijednosti od 7,4 [1]. Upravo Krebs-Henseleit-ov rastvor korišten je i u ovom ispitivanju.

Bez obzira na odabranu vrstu perfuzione tečnosti, neophodno je izvršiti aeraciju iste odnosno snabdjeti je visokom koncentracijom kiseonika, za šta se najčešće koristi karbogen, to jeste smjesa kiseonika u udjelu 95% i ugljen-dioksida sa udjelom 5% [1].

Statistička analiza podataka

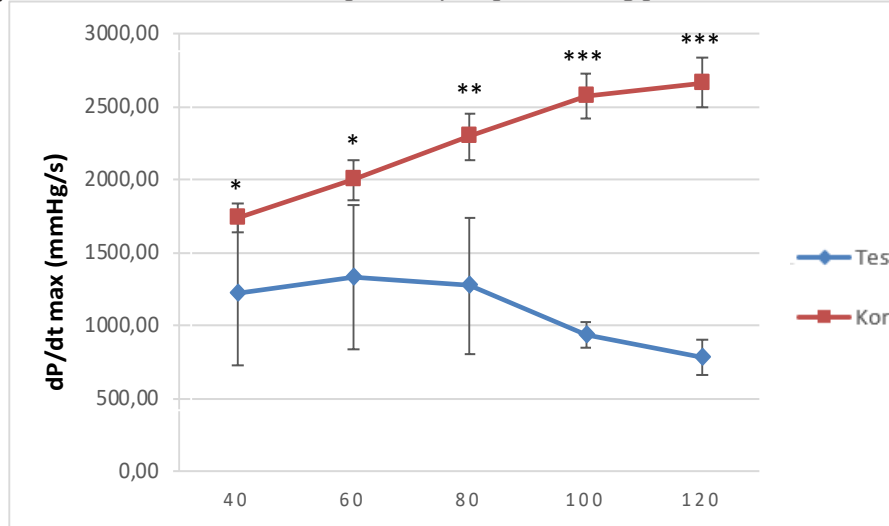
Dobijeni podaci statistički su obrađeni u programu Excel računanjem srednje vrijednosti, standardne devijacije i sprovođenjem t-testa radi određivanja statističke značajnosti uočenih razlika, pri čemu se $p < 0,05$ smatra statistički značajnim rezultatom i obilježava se oznakom *, vrijednost $p < 0,01$ predstavlja visoku statističku značajnost te je praćena oznakom **, dok $p < 0,001$ ukazuje na veoma visoku statističku značajnost (***)

REZULTATI

Ispitivanje uticaja starenja

dP/dt max

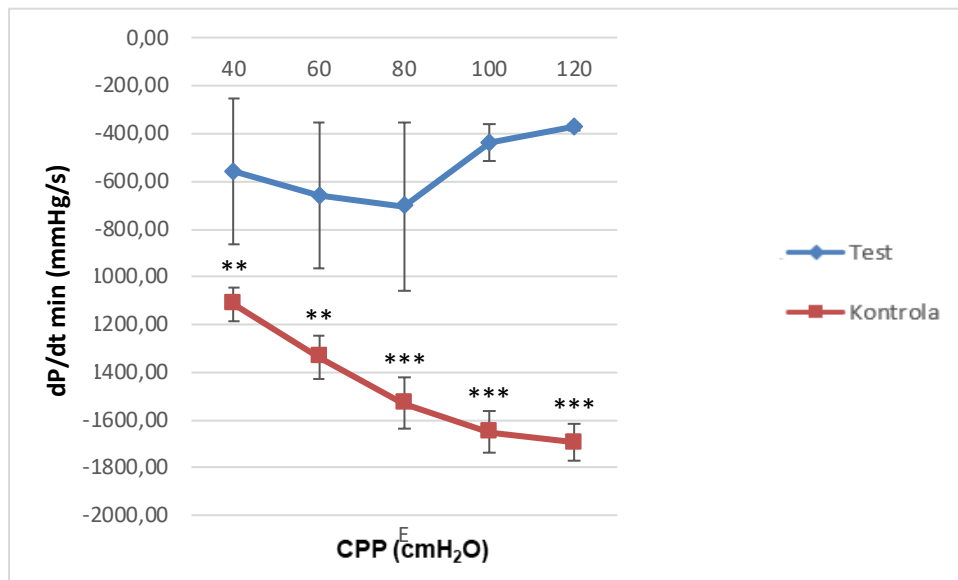
Na grafiku se uočava da su srca mladih pacova na sukcesivno povećavanje perfuzionog pritiska, što se može smatrati „naporom“ kojem se podvrgava ispitivani organ, odreagovala sukcesivnim povećanjem brzine promjene pritiska u sistoli, dok su srca starih pacova na ovaj način reagovala na porast perfuzionog pritiska samo pri prvom povećanju istog, da bi već pri drugom povećanju došlo do blagog pada vrijednosti ispitivanog parametra, a daljnje povećanje opterećenja srca dovelo je do istovrsnog, ali još izraženijeg odgovora. Statistička značajnost uočenih razlika raste sa povećanjem perfuzionog pritiska (Grafik br. 1).



Grafik br. 1 Trend promjene vrijednosti maksimalne brzine promjene pritiska u sistoli izmjerenih na srcu starih i mladih pacova pri rastućim perfuzionim pritiscima, uz prikazanu standardnu devijaciju i statističku značajnost postojećih razlika

dP/dt min

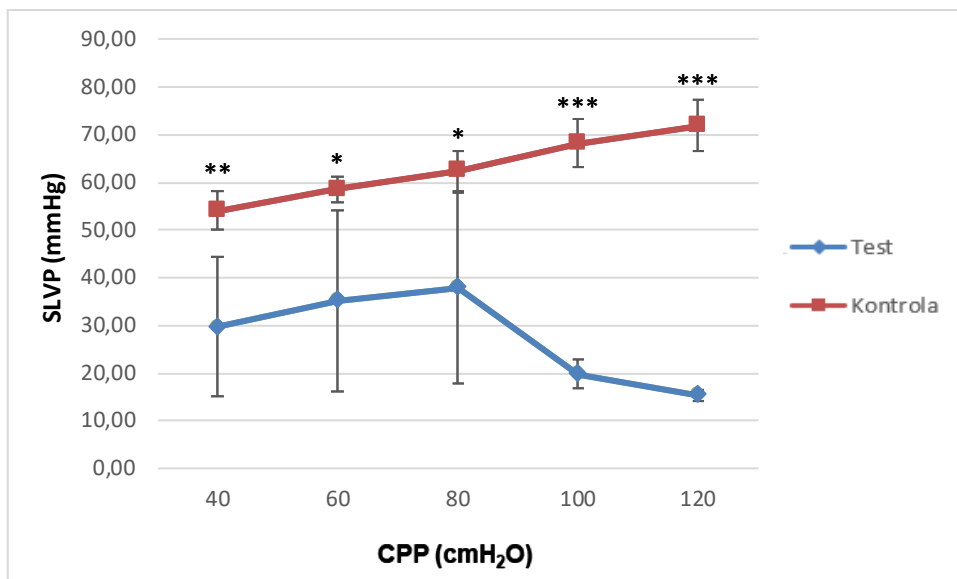
Budući da se tokom faze dijastole pritisak u srcu smanjuje, razumljivo je da su sve izmjerene vrijednosti negativnog predznaka. Opaža se da su tokom mjerenja vršenih na srcu mladih pacova zabilježene veće brzine promjene dijastolnog pritiska, to jeste, u numeričkom smislu, manje vrijednosti u odnosu na testnu grupu, i to sa visokom odnosno veoma visokom statističkom značajnošću. Takođe, tokom izvođenja eksperimenta vrijednosti parametra od interesa su u kontrolnoj grupi konstantno padale, dok su srca starih pacova ovakav trend promjene parametra pratile tokom prvih dviju promjena perfuzionih pritisa, nakon čega su brzine promjene pritiska u dijastoli počeli rasti (Grafik br. 2).



Grafik br. 2 Trend promjene minimalne vrijednosti brzine promjene pritiska u dijastoli izmjerenih na srcu starih i mladih pacova pri rastućim perfuzionim pritiscima, uz prikazanu standardnu devijaciju i statističku značajnost postojećih razlika

SLVP

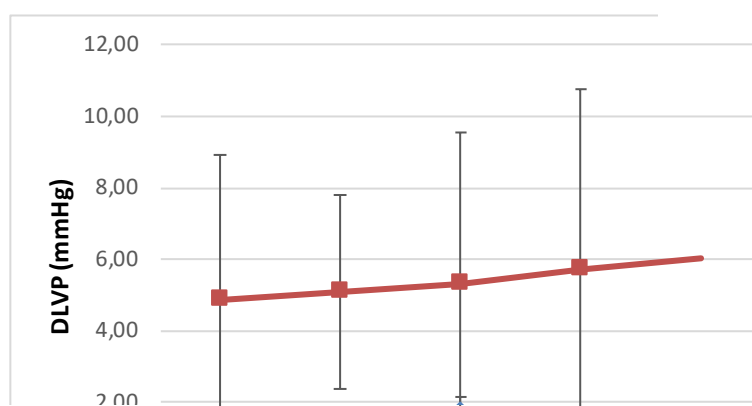
Srednja vrijednost sistolnog pritiska u lijevom ventrikulu srca starih pacova je, pri svim pritiscima pod kojima je perfuzat tekao kroz koronarnu cirkulaciju, manja od pritiska koji se razvijao u lijevoj komori mladih pacova tokom kontrakcije, te su ove razlike obilježene različitim stepenima statističke značajnosti. Izmjerene vrijednosti parametra na srcima mladih pacova pokazuju konzistentan porast tokom cjelokupnog ispitivanja, dok trend promjene sistolnog pritiska u lijevom ventrikulu u srcu starih pacova pokazuje sličan tok pri nižim vrijednostima perfuzionog pritiska, nakon čega povećanje CPP-a dovodi do značajnog pada rezultata te isti postaje još niži pri najvećem primijenjenom perfuzionom pritisku (Grafik br. 3).



Grafik br. 3 Trend promjene vrijednosti sistolnog pritiska u lijevom ventrikulu izmjerenih na srcu starih i mladih pacova pri rastućim perfuzionim pritiscima, uz prikazanu standardnu devijaciju i statističku značajnost postojećih razlika

DLVP

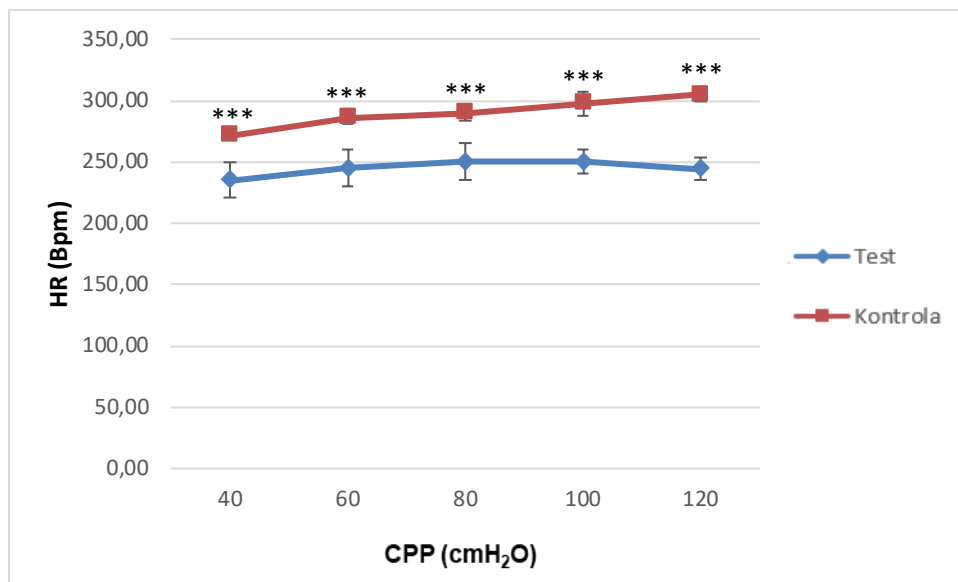
Pri svim primijenjenim perfuzionim pritiscima srca mladih pacova uspijevaju da razviju upadljivo veći pritisak u lijevom ventrikulu dok traje relaksacija miokarda u poređenju sa testnom grupom. Ovo opažanje potvrđuje i t-test, koji je razliku između testne i kontrolne grupe pri svim perfuzionim pritiscima okarakterisao kao veoma veliku statističku značajnost. Grafička interpretacija ishoda ispitivanja takođe ukazuje na to da je trend porasta vrijednosti ispitivanog parametra u testnoj i kontrolnoj grupi istovjetan odnosno blag, ali konzistentan pri nižim vrijednostima perfuzionog pritiska (do 80 cmH₂O), da bi pri daljnjem rastu perfuzionog pritiska vrijednost DLVP u grupi mladih pacova nastavila pratiti isti obrazac promjene, dok u srcima starih pacova dolazi do pada pritiska u lijevoj komori tokom diastole (Grafik br. 4).



Grafik br. 4 Trend promjene vrijednosti diastolnog pritiska u lijevom ventrikulu izmjerenih na srcu starih i mladih pacova pri rastućim perfuzionim pritiscima, uz prikazanu standardnu devijaciju i statističku značajnost postojećih razlika

Heart Rate (HR)

Brzina rada srca mladih pacova pri svim perfuzionim pritiscima bila je veća u poređenju sa starim pacovima te se sve razlike odlikuju veoma visokom statističkom značajnošću. Grafički prikaz rezultata ukazuje i na to da zabilježene frekvence srčanog rada u testnoj i kontrolnoj grupi imaju veoma sličan trend promjene. Naime, u objema grupama uočava se rastući trend promjene frekvence rada miokarda, s izuzetkom srednje vrijednosti frekvenci zabilježenih pri najvišem primijenjenom perfuzionom pritisku, koja je nešto niža od srednje vrijednosti frekvenci zabilježenih pri pritisku od 100 cmH₂O (Grafik br. 5).

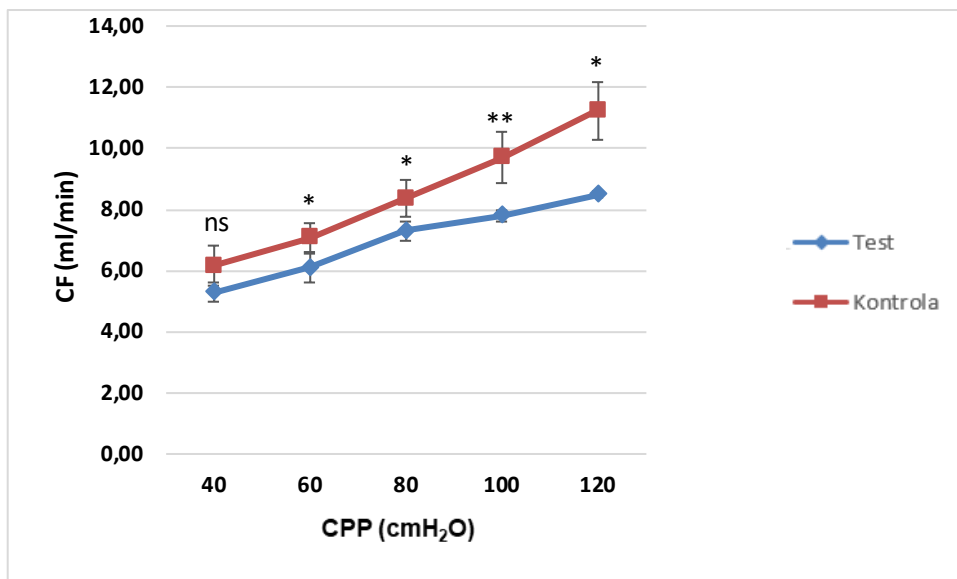


Grafik br. 5 Trend promjene vrijednosti frekvence srčanog rada izmjerenih na srcu starih i mladih pacova pri rastućim perfuzionim pritiscima, uz prikazanu standardnu devijaciju i statističku značajnost postojećih razlika

Coronary flow (CF)

Koronarni protok definiše se kao broj mililitara krvi, odnosno, u slučaju ovog ispitivanja uopšteno perfuzione tečnosti, koja u jedinici vremena protekne kroz koronarnu cirkulaciju.

Vrijednosti protoka perfuzata kroz koronarne krvne sudove mladih pacova veće su od koronarnog protoka u srcu starijih pacova, što se odnosi na sve perfuzione pritiske. Uočava se trend porasta koronarnog protoka u objema ispitivanim grupama, koji je vrlo sličan na nižim perfuzionim pritiscima, da bi od perfuzionog pritiska 80 cmH₂O pa naviše povećanje koronarnog protoka u srcima mladih pacova poprimilo strmiji tok (Grafik br. 6).

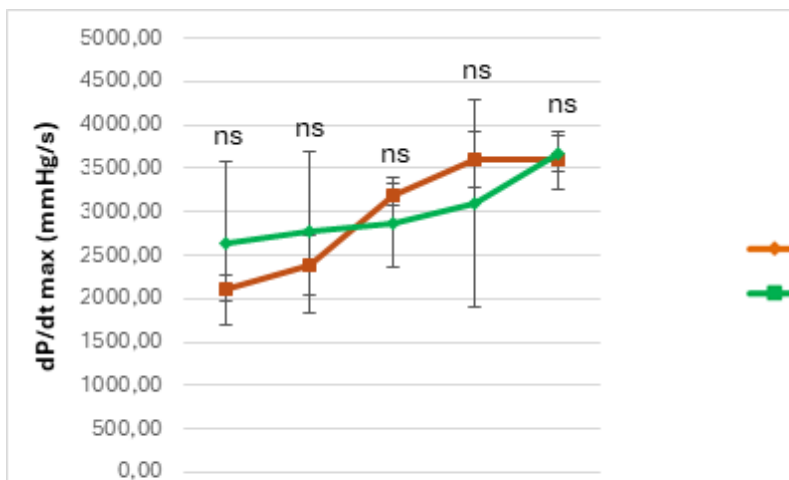


Grafik br. 6 Trend promjene vrijednosti koronarnog protoka izmjerenih na srcu starih i mladih pacova pri rastućim perfuzionim pritiscima, uz prikazanu standardnu devijaciju i statističku značajnost postojećih razlika

Ispitivanje uticaja izoprenalina

dP/dt max

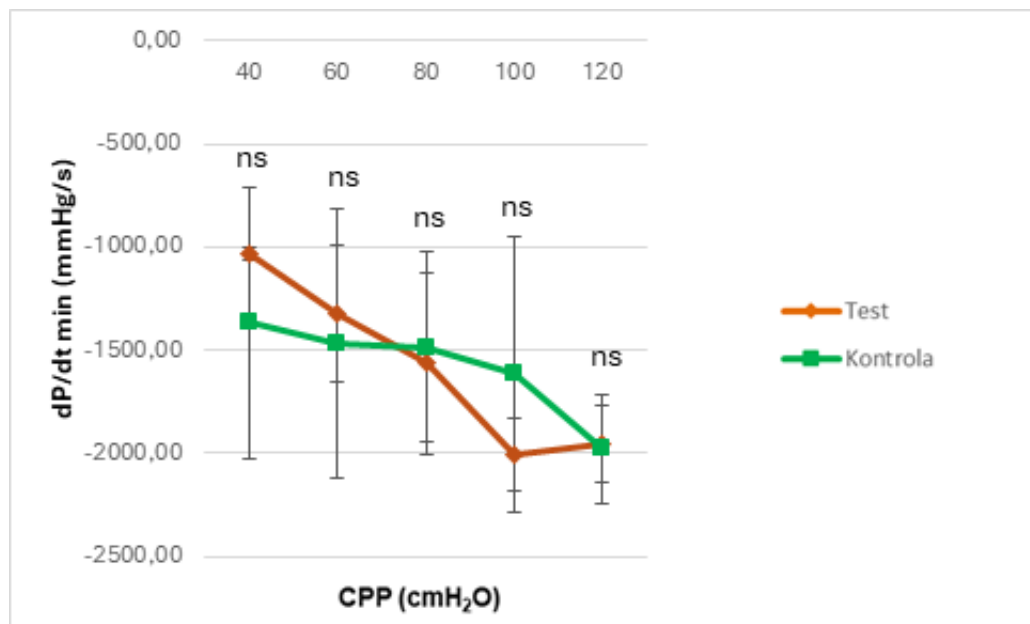
Maksimalna brzina promjene pritiska tokom kontrakcije srca pacova tretiranih izoprenalinom je, pri nižim perfuzionim pritiscima, manja u poređenju sa netretiranim pacovima, dok, počevši od perfuzionog pritiska 80 cmH₂O odnos vrijednosti ovog parametra postaje obrnut. U objema grupama vrijednosti ovog parametra prate trend rasta, pri čemu je rast vrijednosti u testnoj grupi strmiji, s izuzetkom veoma blagog pada maksimalne brzine promjene pritiska u sistoli pri najvišem perfuzionom pritisku (Grafik br. 7).



Grafik br. 7 Trend promjene vrijednosti maksimalne brzine promjene pritiska u sistoli izmjerenih na srcu pacova koji su primali izoprenalin i netretiranih pacova pri rastućim perfuzionim pritiscima, uz prikazane standardne devijacije i statističku značajnost

dP/dt min

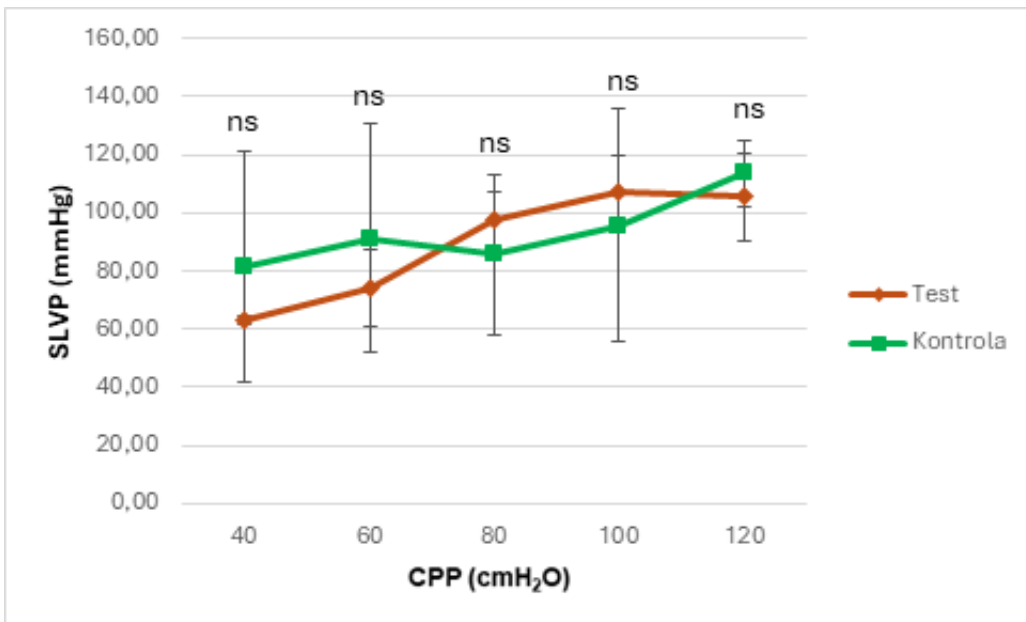
Pri nižim vrijednostima CPP-asu u testnoj grupi zabilježene su više vrijednosti minimalne promjene pritiska u dijastoli nego u kontroli, da bi se usljed daljnjeg povećanja pritiska kontrola odlikovala višim vrijednostima. U srcima eksperimentalnih životinja kojima je apliciran izoprenalin uočen je konstantan pad vrijednosti minimalne brzine primjene pritiska pri relaksaciji miokarda uz blagi porast vrijednosti iste pri posljednjem povećanju perfuzionog pritiska. U poređenju s tim, u srcu netretiranih pacova zabilježene su veće fluktuacije numeričkih vrijednosti, odnosno, na početku je pad vrijednosti praćen porastom istih da bi se pri većim perfuzionim pritiscima ponovo zabilježio pad, iako nešto strmiji od inicijalnog (Grafik br. 8).



Grafik br. 8 Trend promjene vrijednosti minimalne brzine promjene pritiska u dijastoli izmjerenih na srcu pacova koji su primali izoprenalin i netretiranih pacova pri rastućim perfuzionim pritiscima, uz prikazane standardne devijacije i statističku značajnost

SLVP

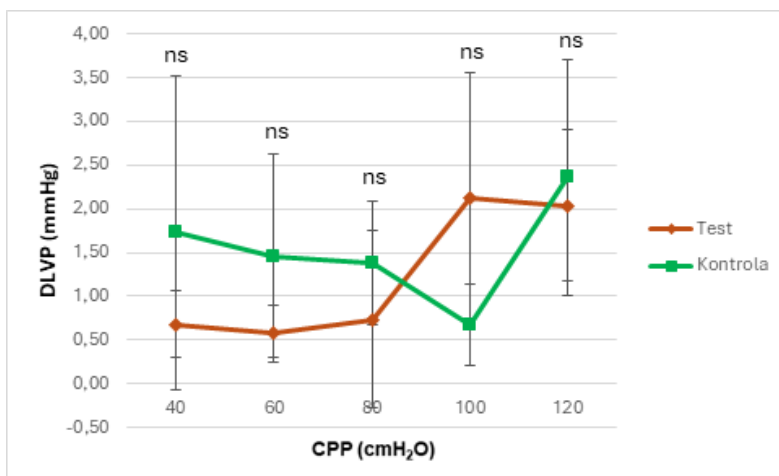
Sistolni pritisak u lijevom ventrikulu u objema ispitivanim grupama pokazuje određene fluktuacije. Naime, pri prvom povećanju perfuzionog pritiska ovaj pritisak raste u objema grupama približno istom brzinom, pri čemu su vrijednosti kontrolne grupe veće. U ovoj grupi se pri višim perfuzionim pritiscima najprije bilježi pad u odnosu na početni dio krive, nakon čega slijede dva uzastopna porasta, dok testna grupa, suprotno, bilježi dva uzastopna porasta praćena blagim padom pri posljednjem povećanju perfuzionog pritiska (Grafik br. 9).



Grafik br. 9 Trend promjene vrijednosti sistolnog pritiska u lijevom ventrikulu izmjerene na srcu pacova koji su primali izoprenalin i netretiranih pacova pri rastućim perfuzionim pritiscima, uz prikazane standardne devijacije i statističku značajnost

DLVP

U kontrolnoj grupi su prva dva povećanja perfuzionog pritiska za posljedicu imala blage padove dijastolnog pritiska u lijevom ventrikulu, da bi pri narednim dvjema promjenama najprije došlo do znatno strmijeg pada, a zatim i do još strmijeg porasta vrijednosti. U testnoj grupi zabilježeni su naizmjenična smanjenja i povećanja mjenog parametra to jeste nakon blagog pada uslijedio je blagi porast praćen novim, upadljivo većim porastom, dok je finalno povećanje perfuzionog pritiska rezultovalo blagim obaranjem pritiska u lijevoj komori u mirovanju (Grafik br. 10).

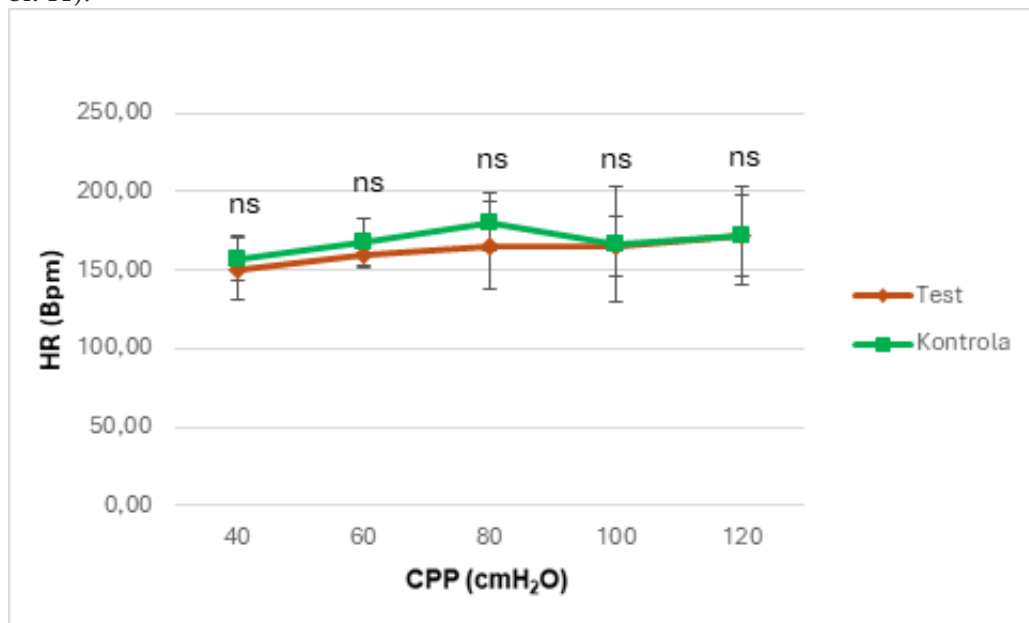


Grafik br. 10 Trend promjene vrijednosti dijastolnog pritiska u lijevom ventrikulu izmjerene na srcu pacova koji su primali izoprenalin i netretiranih pacova pri rastućim perfuzionim pritiscima, uz prikazane standardne devijacije i statističku značajnost

Heart rate (HR)

Izmjerene frekvence srčanog rada su umnogome slične između izoprenalinske i kontrolne grupe. U izoprenalinskoj grupi se u skoro svim tačkama bilježi blag, ali postojan porast frekvence, dok je u kontrolnoj grupi povećanje perfuzionog pritiska sa 80 na 100 cmH_2O

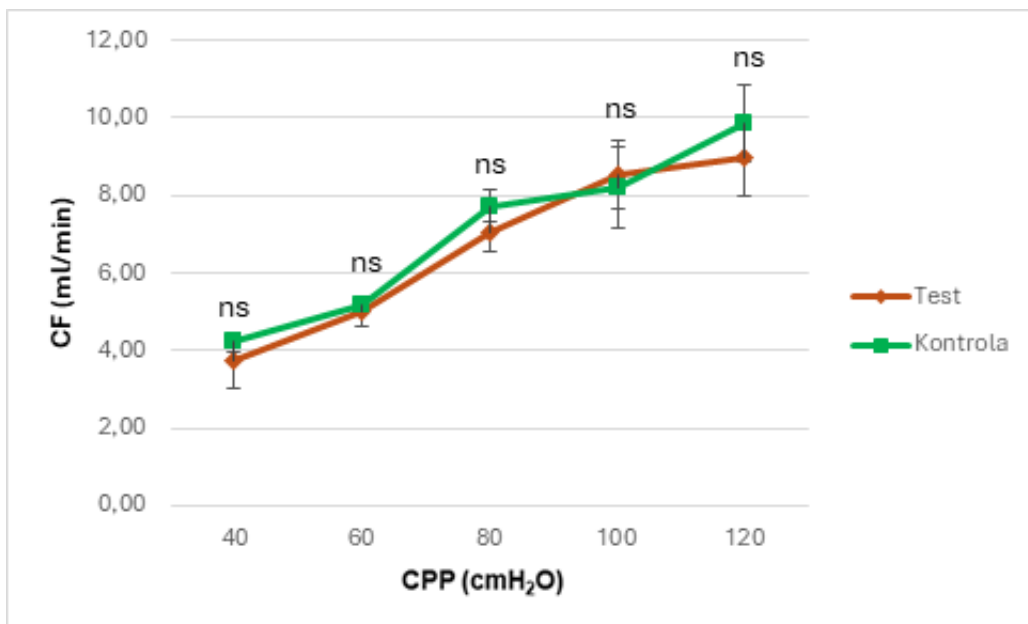
dovelo do određenog pada broja otkucaja u minuti, da bi srednje vrijednosti frekvence testne i kontrolne grupe pri dvama najvišim perfuzionim pritiscima bile gotovo iste (Grafik br. 11).



Grafik br. 11 Trend promjene vrijednosti frekvence srčanog rada izmjerene na srcu pacova koji su primali izoprenalin i netretiranih pacova pri rastućim perfuzionim pritiscima, uz prikazane standardne devijacije i statističku značajnost

Coronary flow (CF)

Vrijednosti koronarnog protoka u izoprenalinskoj i kontrolnoj grupi su bliske u svim tačkama, ali se trendovi promjene ovih vrijednosti donekle razlikuju među grupama. U izoprenalinskoj grupi je samo pri posljednjem povećanju perfuzionog pritiska zabilježen blagi pad protoka kroz koronarnu cirkulaciju, dok su u kontroli registrovana dva uzastopna porasta koronarnog protoka praćena padom, nakon čega je ponovno uslijedio rast (Grafik br. 12).



Grafik br. 12 Trend promjene vrijednosti koronarnog protoka izmjerene na srcu pacova koji su primali izoprenalin i netretiranih pacova pri rastućim perfuzionim pritiscima, uz prikazane standardne devijacije i statističku značajnost

DISKUSIJA

Uporedna analiza mladih i starih pacova

Srca mladih pacova bolje kompenzuju povećanje perfuzionog pritiska jer su njihova srca snažnija te kao takva daju bolji odgovor na povećano opterećenje, što se očituje kroz veću brzinu promjene sistolnog pritiska, koji predstavlja direktan indikator kontraktibilnosti srca odnosno daje podatke o tome kolikom brzinom je srce u stanju da razvije pritisak u ventrikulu tokom faze kontrakcije.

Odgovor miokarda starijih pacova je, međutim, značajno manje izražen u poređenju s kontrolnom grupom odnosno pad brzine promjene sistolnog pritiska je nastupio već pri drugom povećanju perfuzionog pritiska.

Slično tome, nemogućnost odgovora na povećanje opterećenja u smislu održavanja porasta sistolnog pritiska u lijevom ventrikulu odnosno pritiska neposredno prije ejeckije udarnog volumena u ushodni dio aorte, kao i dijastolnog pritiska u lijevoj komori uočava se nakon trećeg povećanja perfuzionog pritiska.

Bilo je očekivano da će srca starih pacova pokazivati konzistentan porast vrijednosti minimalne brzine promjene pritiska u dijastoli, koji daje uvid u brzinu „oporavka“ odnosno smanjenja pritiska tokom faze relaksacije miokarda te ukazuje na efikasnost kojom se srce puni krvlju između dviju uzastopnih kontrakcija, međutim, u početku je uočen paradokasalni pad koji se može objasniti periodom adaptacije izolovanog srca na eksperimentalne uslove.

Nadalje, povećanje frekvence srčanog rada bilo je očekivano imajući u vidu da izoprenalin podražava aktivnost simpatikusa, ali uočena je manja sposobnost povećanja frekvence srčanog rada te smanjena učinkovitost koronarnog protoka u miokardu starijih pacova, što bi se moglo objasniti smanjenom elastičnošću krvnih sudova ili sličnim promjenama u cirkulaciji.

Slični ishodi ispitivanja fizioloških razlika između mladih i ostarjelih srca dobijeni su i još jednoj studiji srodne tematike koja se fokusirala na elektrofiziološke i histološke promjene, uz napomenu da je u ovom slučaju istraživanje vršeno na eksperimentalnim zečevima. Rezultati su protumačeni povećanom električnom nestabilnošću srca usljed starenja [6].

Ovi rezultati mogu ukazivati na promjene u kardiovaskularnoj funkciji koje se javljaju u starosti te na fluktuacije krvnog pritiska u različitim fazama života, što može biti relevantno za istraživanje starenja srca i krvnih sudova kao i za procjenu terapijskih intervencija u starijoj populaciji.

Uticaj izoprenalina

U stručnoj literaturi se može pronaći više naučnih radova koji tematizuju efekte neselektivnog β -adrenergika izoprenalina na srčani mišić. Ovaj simpatomimetik veoma je pogodan za primjenu u translacionoj medicini budući da izaziva strukturne i funkcionalne promjene na miokardu koje umnogome sliče promjenama koje karakterišu akutno zatajenje srca, a održava stopu mortaliteta niskom te na taj način generiše veoma pogodan model akutnog zatajenja srca. U prethodno pomenutim naučnim radovima su iz više aspekata proučavane posljedice primjene izoprenalina na eksperimentalnim životinjama, s fokusom na posljedice po srce. Utvrđeno je da izoprenalin predstavlja induktora oksidativnog stresa, promjena u lipidnom statusu i vrijednostima enzima jetre, dok su elektrokardiogramski nalazi, između ostalog, ukazali na značajno povećanje frekvence srčanog rada i skraćenje QT intervala, što jeste u skladu sa očekivanim efektima izoprenalina kao β -adrenergičkog agoniste. Dodatno, ishod ehokardiografije bio je dokaz o značajnom uticaju izoprenalina na funkciju srca, naročito u toku sistole [7].

Uprkos tome, sprovedeno ispitivanje nije pokazalo statistički značajne razlike između testne i kontrolne grupe. Primjena izoprenalina jeste dovela do promjena u vrijednostima mjerenih parametara, što sugerise da fiziološka reakcija na izoprenalin ne izostaje u potpunosti, ali ovaj eksperiment nije dao osnov za tvrdnju da izoprenalin u značajnom mjeri utiče na miokard.

Ograničenja istraživanja i preporuke

Izostanak statistički značajnih razlika između pacova tretiranih izoprenalinom i netretiranih pacova ne znači nužno da izoprenalin nema potencijal da uzrokuje akutno zatajenje srca. Postoji više razloga zbog kojih su se razlike između testne i kontrolne grupe mogle ispostaviti kao statistički neznčajne počevši od same veličine uzorka i interindividualne varijabilnosti eksperimentalnih životinja preko samog režima tretiranja istih izoprenalinom te izbora hemodinamskih parametara na osnovu kojih će se vršiti procjena uticaja aplicirane supstance na miokard do plana mjerenja vrijednosti parametara definisanih kao relevantni. U ovom istraživanju testnu i kontrolnu grupu činila su po svega tri pacova, što je moglo dovesti do nedovoljne statističke snage za ispoljavanje uočljivih štetnih dejstava izoprenalina. Nadalje, ovakvom ishodu takođe su mogle doprinijeti i nezanemarljive varijacije između pacova unutar jedne grupe to jeste njihov različit odgovor na tretman izoprenalinom. Takođe, jedan od potencijalnih razloga je i, pored suviše male doze izoprenalina, neadekvatne dužine perioda tokom kog su pacovi tretirani njime te nepogodan put primjene istog, nedovoljna osjetljivost mjerenih hemodinamskih parametara na efekte izoprenalina odnosno njihova nezadovoljavajuća specifičnost koja bi omogućila da se određivanjem njihovih vrijednosti uoče suptilne promjene na miokardu uzrokovane izoprenalinom.

Alternativa u ovom slučaju bila bi odabir markera specifičnijih za oštećenje srca poput troponina ili drugih kardijalnih enzima koji su već korišteni u određenim studijama [7].

ZAKLJUČCI

Proces starenja u značajnoj mjeri narušava funkciju miokarda, učinkovitost koronarnog protoka, sposobnost ubrzanja rada srca i ostale načine na koje bi mlado, zdravo srce odreagovalo na porast opterećenja. Mogući razlozi su pad elastičnosti krvnih sudova i srodne promjene na nivou cirkulacije kao i elektrofiziološke promjene u srčanom tkivu te bi buduća istraživanja u ovom polju doprinijela boljem razumijevanju kardiovaskularne fiziologije različitih životnih doba i potencijalno otvorila nove farmakoterapijske vidike.

Izoprenalin ispoljava određeni uticaj na srce odnosno negativno utiče na mjerene parametre srčanog rada, ali je potreban nastavak istraživanja većih razmjera kako bi se došlo do detaljnijih podataka koji će formirati širu sliku o punom potencijalu izoprenalina.

LITERATURA

- [1] Lateef RU, Al-Masri AA, Alyahya AM. Langendorff's isolated perfused rat heart technique: a review. *Int J Basic Clin Pharmacol.* 2015;4:1314–1322. doi: 10.18203/2319-200eef R3,ijbcp20151381.
- [2] Usai DS, Aasum E., Thomsen MB. The isolated, perfused working heart preparation of the mouse - Advantages and pitfalls. *Acta Physiol.* 2025; 241. doi: 10.1111/apha.70023.
- [3] Dhein S. The Langendorff Heart. 2005. doi: 10.1007/3-540-26574-0_9.
- [4] Zhang M., Liu Q., Meng H., Duan H., Liu X., Wu J. et al. Ischemia-reperfusion injury: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther.* 2024;9:12. doi: 10.1038/s41392-01688-x.
- [5] Gottwald M., Gottwald E., Dhein S. Age-related electrophysiological and histological changes in rabbit hearts: Age-related changes in electrophysiology. *Int J Cardiol.* 1997;62:97–106. doi: 10.1016/s0167-5273(97)00183-6.
- [6] Bell RM, Mocanu MM, Yellon DM. Retrograde heart perfusion: The Langendorff technique of isolated heart perfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;50:940–950. doi: 10.1016/j.yjmcc.2011.02.018.
- [7] Bajić Z., Šobot T., Šmitran A., Uletilović S., Mandić-Kovačević N., Cvjetković T. et al. Liraglutide Treatment Restores Cardiac Function After Isoprenaline- Induced Myocardial Injury and Prevents Heart Failure in Rats. *Life.* 2025;15(3):443. doi: <https://doi.org/10.3390/life15030443>.

EXAMINATION OF THE IMPACT OF AGING AND SYMPATHOMIMETIC ISOPRENALINE ON MYOCARDIAL FUNCTION USING THE LANGENDORFF HEART MODEL

Authors: LEJLA TICA, Đorđe Pilipović

Email: lejla.tica@student.med.unib.org

Mentors: Assist. Prof. Milica Gajić Bojić, Assist. Prof. Zorislava Bajić

Centre for Biomedical Research

Faculty of Medicine, University of Banjaluka

Introduction: The Langendorff model of the isolated heart is an experimental model that is widely used in cardiovascular research in the fields of physiology, pharmacology, and toxicology. It is based on ex vivo perfusion of the heart isolated from an experimental animal, whereby a system of transducers and amplifiers enables the measurement of hemodynamic parameters and the assessment of the effects of the previously administered pharmacologically active substance on the myocardium.

Aim: The aim of this study was to determine the differences in the cardiovascular response caused by aging, as well as by treating experimental rats with the β -agonist isoprenaline.

Materials and Methods: Male Wistar albino rats were divided into a test group (3 older rats) and a control group (6 young rats) in order to measure the values of hemodynamic parameters (rate of change in systolic pressure (dP/dt max), rate of change in diastolic pressure (dP/dt min), left ventricular systolic pressure (SLVP), left ventricular diastolic pressure (DLVP), heart rate (HR), and coronary flow (CF)) at increasing perfusion pressures. In the second part of the test, the same parameters were measured under the same conditions in the test group, which consisted of 3 rats previously treated with isoprenaline according to a certain scheme, and in the control group, with 3 untreated rats.

Results: Statistically significant differences in heart function were observed between young and old rats at all values of perfusion pressure. Differences were also observed in the heart function of rats administered isoprenaline and untreated rats, although they did not turn out to be statistically significant.

Conclusion: Aging leads to significant changes in the function of the heart muscle. Isoprenaline has the potential to impair myocardial function, but further research is needed.

Keywords: Langendorff model; isolated heart; retrograde perfusion; hemodynamic changes due to aging; isoprenaline-induced heart failure