

УДК 616.61-008.64

DOI: 10.24884/1682-6655-2017-16-4-56-59

МИНАСЯН С. М.^{1, 2}, МАМЕДОВ А. Э.²,
ПОЛЕЩЕНКО Я. И.², СКВОРЦОВ А. Е.^{2, 3},
РЕЗНИК О. Н.^{2, 3}, КУТЕНКОВ А. А.^{2, 3},
ГАЛАГУДЗА М. М.^{1, 2}, СОНИН Д. Л.¹,
КАРПОВ А. А.¹, БЕРКО О. М.², ДМИТРИЕВ Ю. В.¹,
ВЛАСОВ Т. Д.^{1, 2}

Методика гемоперфузии изолированной почки крысы

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации
197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации
197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6/8

³ Государственное бюджетное учреждение «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи им. И. И. Джанелидзе» Министерства здравоохранения Российской Федерации
192242, Россия, Санкт-Петербург, Будапештская ул., д. 3, лит. А
e-mail: carkis@yandex.ru

Статья поступила в редакцию 12.10.17; принята к печати 21.10.17

Резюме

Введение и цель работы. Перфузия изолированных органов лабораторных животных является важным этапом оценки эффективности разрабатываемых способов консервации донорских органов.

Материал и методы. Предложен способ гемоперфузии изолированной почки крысы после длительного периода гипотермической ишемии с целью воспроизведения реперфузии для последующей оценки морфологических изменений ткани почечной паренхимы.

Результаты исследования. Данный способ оказался эффективным и технически более просто реализуемым, чем различные модификации классической методики трансплантации почки у мелких лабораторных животных.

Выводы. Предлагаемая методика является альтернативой классической трансплантации почки в случае необходимости реперфузии в остром эксперименте в течение нескольких часов.

Ключевые слова: экспериментальная перфузия почки, консервирующий раствор

Для цитирования: Минасян С. М., Мамедов А. Э., Полещенко Я. И., Скворцов А. Е., Резник О. Н., Кутенков А. А., Галагудза М. М., Сонин Д. Л., Карпов А. А., Берко О. М., Дмитриев Ю. В., Власов Т. Д. Методика гемоперфузии изолированной почки крысы. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2017;16(4):56–59. doi: 10.24884/1682-6655-2017-16-4-56-59

UDC 616.61-008.64

DOI: 10.24884/1682-6655-2017-16-4-56-59

MINASIAN S. M.^{1, 2}, MAMEDOV A. E.²,
POLESHENKO Ja. I.², SCVORTCHOV A. E.^{2, 3},
REZNIK O. N.^{2, 3}, KUTENKOV A. A.^{2, 3}, GALA-
GUDZA M. M.^{1, 2}, SONIN D. L.¹, KARPOV A. A.²,
BERKO O. M.², DMITRIEV Y. V.¹, VLASOV T. D.^{1, 2}

A new protocol for isoheart rat kidney blood perfusion

¹ The Almazov National Medical Research Centre

197341, Russian Federation, St.-Petersburg, Akkuratova street, 2.

² Institute of Physiology named after I. P. Pavlov Russian Academy of Sciences

197022, Russian Federation, St. Petersburg, Lev Tolstoy street, 6/8.

³ Institute of emergency medicine

192242, Russian Federation, St. Petersburg, Budapeschtskaya street, 3.

e-mail: carkis@yandex.ru

Received 12.10.17; accepted 21.10.17

Summary

Introduction and the purpose of the work. The perfusion of isolated laboratory animal organs is important for estimation of the effectiveness of methods elaborated for donor organ preservation.

Materials and methods. Hemoperfusion of isolated rat kidney was performed after long-term hypothermal ischemia in order to reproduce reperfusion for the subsequent estimation of morphological changes in the cloth of nephritic parenchyma.

Results. This method proved to be effective and technically simpler than different modifications of the classical procedure of kidney transplantation in small laboratory animals.

Conclusions. The proposed procedure is an alternative to the classical kidney transplantation if reperfusion is required in an acute experiment for several hours.

Key words: *experimental perfusion, preservation solution*

For citation: Minasian S. M., Mamedov A. E., Poleshenko Ja. I., Scvortchov A. E., Reznik O. N., Kutenkov A. A., Galagudza M. M., Sonin D. L., Karpov A. A., Berko O. M., Dmitriev Y. V., Vlasov T. D. A new protocol for isoheart rat kidney blood perfusion. *Regional hemodynamics and microcirculation*. 2017;16(4):56–59. doi: 10.24884/1682-6655-2017-16-4-56-59

Введение

Консервация донорских органов является важным этапом в процедуре трансплантации. Качество донорского органа и сроки его сохранения во многом определяются качеством консервации, в связи с чем, несмотря на достигнутые успехи, необходимы дальнейшие разработки в этом направлении. Трансплантация почки в настоящее время является наиболее часто выполняемой операцией в трансплантологии. В большинстве случаев донорами почки являются пациенты с подтвержденной мозговой смертью, реже – асистолические или живые родственные доноры. В последнем случае, ввиду малого времени ишемии почки, процедура ее сохранения относительно несложна, а в случае асистолического донора, наоборот, проводится после рекондиционирования донора и имеет ряд особенностей [2]. Задачей консервации любого донорского органа является сохранение его функциональных и морфологических характеристик на максимально возможный срок [1, 8].

Стандартная процедура консервации почки включает в себя перфузию охлажденным консервирующим раствором с последующим помещением почки в охлаждающий контейнер с целью транспортировки. В процессе перфузии раствором орган отмывается от крови и дополнительно охлаждается. При этом его метаболизм замедляется с целью лучшей переносимости длительной ишемии. Очевидно, что химический состав консервирующего раствора в значительной степени определяет качество консервации. К настоящему времени предложено достаточно большое количество органоконсервирующих растворов. Для исследования новых консервирующих растворов в сравнении с уже известными, а также протоколов перфузии необходимы экспериментальные исследования [1, 8]. С их помощью воспроизводятся длительная ишемия органа с предварительной перфузией его консервирующим раствором и последующая репер-

фузия с оценкой его функциональных и морфологических характеристик. Разработка экспериментальных моделей для исследования консервации почки началось практически сразу после начала трансплантации почки в клинической практике. Этому способствовало развитие микрохирургической техники и инструментария, позволяющего выполнить операцию трансплантации почки лабораторным животным, а также методик патоморфологического анализа, гистохимических и иммуногистохимических методик оценки состояния ткани почки.

Технические аспекты трансплантации почки у мелких лабораторных животных (преимущественно крыс) подробно описаны в современной литературе [3–7]. Однако в ряде случаев требуется оценка состояния трансплантированной почки в ближайшее время после трансплантации. При этом выполнять полноценную трансплантацию нет необходимости. Речь идет о реперфузии почечного трансплантата в течение короткого времени после продолжительной ишемии с последующей эксплантацией почки для различных морфологических исследований. Почка даже по прошествии длительной ишемии, независимо от способа консервации и его эффективности, непригодна для морфологического анализа в отсутствие последующей реперфузии, так как без реперфузии в ней не формируются те изменения, которые могли бы указывать на степень выраженности ишемического повреждения или его отсутствия. Следует оговорить приемлемые сроки ишемии и реперфузии почечного трансплантата. Современные органоконсервирующие растворы позиционируются как эффективные в сохранении почечного трансплантата на срок до 24 ч. Соответственно, эта продолжительность ишемии эксплантационной почки считается эталонной величиной; при этом сравнение эффективности новых и известных консервирующих растворов необходимо проводить при данном сроке ишемии.

В связи с этим, различные варианты консервации почки на непродолжительное время *in vivo*, т. е. без эксплантации и последующей трансплантации, уже не удовлетворяют этому требованию. Кроме того, необходимое сопутствующее охлаждение почки в условиях *in vivo* осуществлять крайне сложно. Время постишемической реперфузии, необходимое для полноценного формирования морфологических изменений, по современным представлениям, не должно быть менее 4 ч. Этого достаточно, чтобы адекватно и качественно провести патоморфологический анализ почечной ткани. Если, согласно протоколу исследования, после этого необходимого периода реперфузии почка подлежит забору с целью морфологического исследования, то вместо стандартных методик трансплантации почки можно выполнить технически более простой эксперимент, протокол которого мы приводим ниже.

Целью работы являлась разработка технически более простой методики осуществления постишемической реперфузии консервированной почки крысы в эксперименте с целью ее последующего патоморфологического анализа.

Материал и методы исследования

Эксперименты выполнены на 15 крысах-самцах стока Wistar массой 200–300 г, наркотизированных внутривенным введением хлоралгидрата (производство «Химмед», Россия) в дозе 450 мг/кг. Температура тела животных поддерживалась на уровне $37,0 \pm 0,5$ °C с помощью термостатируемого операционного столика.

Результаты исследования и их обсуждение

Под общей анестезией у крысы-донора выполняется продольная срединная лапаротомия, кишечник отводится вправо. С применением микрохирургической техники и бинокулярного микроскопа препарируется аорта от места отхождения левой почечной артерии до бифуркации с лигированием или коагулированием боковых ветвей. Выделяются левая почечная вена и участок задней поллой вены тотчас выше и ниже впадения в нее левой почечной вены. Аорта лигируется выше отхождения левой почечной артерии и выше бифуркации, после чего через переднюю стенку проксимальнее дистальной лигатуры в краниальном направлении через надрез в стенке вводится катетер для инфузии консервирующего раствора, который проводится до устья левой почечной артерии и фиксируется к аорте 2–3 лигатурами, после чего выделенный участок аорты отсекается. Задняя полая вена лигируется на расстоянии в несколько миллиметров выше и ниже места впадения левой почечной вены, а ее стенка напротив устья почечной вены надсекается, и через этот разрез в почечную вену также вводится катетер, который фиксируется лигатурами к почечной вене, после чего выделенный участок задней поллой вены отсекается и начинается перфузия почки охлажденным консервирующим раствором через аортальный катетер с оттоком перфузата через венозный катетер. В течение времени перфузии почка полностью экспланти-

руется, включая пересечение мочеточника. После окончания перфузии препарат почки с сосудистыми катетерами помещается в стакан с холодным консервирующим раствором в холодильник на 24 ч. По прошествии суток также под общей анестезией начинается подготовка животного-реципиента. После вскрытия брюшной полости выполняется препаровка инфраренального отдела брюшной аорты и задней поллой вены на всем протяжении с коагуляцией или лигированием боковых ветвей. Затем проксимально на оба сосуда накладывается клипса, а дистально они лигируются. После вскрытия просвета тотчас выше дистальной лигатуры просвет сосудов промывается раствором гепарина, после чего к ним подключается донорская почка через катетеры, находящиеся в ее сосудах. Катетеры фиксируются лигатурами к сосудам крысы-реципиента, после чего клипса снимается и начинается реперфузия длительностью 4–5 ч. При этом препарат донорской почки располагается в брюшной полости реципиента, мочеточник не имплантируется в мочевой пузырь. Адекватность перфузии при этом может контролироваться тканевым доплеровским датчиком, и степень и скорость восстановления почечного кровотока может служить одним из критериев эффективности консервации. По прошествии периода реперфузии препарат почки эксплантируется и подвергается морфологическим исследованиям. По вышеописанной методике было выполнено 5 экспериментов с реперфузией эксплантированной почки. Время подключения сосудов почки к сосудам крысы-реципиента посредством катетеров составило $4,2 \pm 1,6$ мин, если отсчитывать начало подключения после окончания выделения сосудов крысы-реципиента в инфраренальном сегменте. Трансплантация почки в этих же условиях с наложением двух сосудистых микроанастомозов занимает не менее 20 мин.

Таким образом, предлагаемая методика является хорошей альтернативой классической трансплантации почки у крысы в случае необходимости реперфузии почки в остром эксперименте в течение нескольких часов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-04-02061.

Конфликт интересов / Conflict of interests

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interests.

Литература / References

1. Минасян С. М., Галагудза М. М., Дмитриев Ю. В. и др. Консервация донорского сердца: история и современность с позиции трансляционной медицины // *Региональное кровообращение и микроциркуляция*. – 2014. – Т. 13. – № 3 (51). – С. 4–16. [Minasian S. M., Galagudza M. M., Dmitriev Yu. V., Karpov A. A., Bobrova E. A., Krasichkov A. S., Grigoriev E. B., Vlasov T. D. Donor heart preservation: history and current status in terms of translational medicine. // *Regional circulation and microcirculation*, 2014, T.13, №3 (51). P. 4-16].
2. Резник О. Н. Оптимизация донорского ресурса трансплантации почек: организационный и технологиче-

ский аспект // *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. – 2008. – № 1. – С. 14–22. [Reznik O. N. The optimization of kidney resource. // *Bulletin of transplantology and artificial organ*. 2008.- No 1.- P. 14-22].

3. Badri Shrestha, John Haylor. Review of Surgical Techniques of Experimental Renal Transplantation in Rats // *Experimental and Clinical Transplantation* (2017) 4: 373-380

4. Blom D, Orloff MS. A more versatile and reliable method for renal transplantation in the rat. // *Microsurgery*. 1998;18(4):267-269

5. Brown K, Phillips RE, Wong W. What have we learnt from experimental renal transplantation? // *Nephron Exp Nephrol*. 2010; 115(1):e9-e14.

6. Karatzas T, Santiago S, Xanthos T, de Faria W, Gandia C, Kostakis A. An easy and safe model of kidney transplantation in rats. // *Microsurgery*. 2007;27(8):668-672.

7. Lopez-Neblina F, Toledo-Pereyra LH, Suzuki S. Ultra-rapid orthotopic technique for renal transplantation in the rat. // *Microsurgery*. 1994; 15(4):274-278.

8. Minasian S., Galagudza M., Dmitriev Yu., Karpov A., Vlasov T. Preservation of the donor heart: from basic science to clinical studies // *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2015 Apr 23; 20(4):510-9. Epub 2014 Dec 23.

9. Schumacher M, Van Vliet BN, Ferrari P. Kidney transplantation in rats: an appraisal of surgical techniques and outcome. // *Microsurgery*. 2003;23(4):387-394.

10. Shrestha B, Haylor J. Experimental rat models of chronic allograft nephropathy: a review. // *Int J Nephrol Renovasc Dis*. 2014;7:315-322

Информация об авторах

Минасян Саркис Минасович – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник Института экспериментальной медицины НМИЦ им. В. А. Алмазова, старший научный сотрудник Института биомедицины ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, e-mail: carkis@yandex.ru.

Мамедов Али Эльманович – студент ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, e-mail: ali-ma@mail.ru.

Полешенко Яна Игоревна – студент ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, e-mail: yana.poleschenko@gmail.com.

Скворцов Андрей Евгениевич – кандидат медицинских наук, заведующий хирургическим отделением № 7 ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, врач-хирург НИИ СП им. И. И. Джанелидзе, e-mail: skvortsov.spb@gmail.com.

Резник Олег Николаевич – доктор медицинских наук, руководитель отдела трансплантологии и искусственных органов ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, руководитель центра органного донорства НИИ СП им. И. И. Джанелидзе.

Кутенков Алексей Анатольевич – врач-хирург ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, врач-хирург НИИ СП им. И. И. Джанелидзе.

Галагузда Михаил Михайлович – доктор медицинских наук, директор Института экспериментальной медицины НМИЦ им. В. А. Алмазова, профессор кафедры патофизиологии с курсом клинической патофизиологии ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, e-mail: galagoudza@mail.ru.

Сонин Дмитрий Леонидович – кандидат медицинских наук, заведующий Научно-исследовательским отделом

микроциркуляции и метаболизма миокарда Института экспериментальной медицины НМИЦ им. В. А. Алмазова, e-mail: sonin_d@mail.ru.

Карпов Андрей Александрович – младший научный сотрудник Института экспериментальной медицины НМИЦ им. В. А. Алмазова, e-mail: a--karpoff@mail.ru.

Берко Олеся Михайловна – студент ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова.

Дмитриев Юрий Валерьевич – младший научный сотрудник Института экспериментальной медицины НМИЦ им. В. А. Алмазова.

Власов Тимур Дмитриевич – доктор медицинских наук, заведующий кафедрой патофизиологии с курсом клинической патофизиологии ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, директор Института биомедицины ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, ведущий научный сотрудник Института экспериментальной медицины НМИЦ им. В. А. Алмазова.

Author information

Minasian S. M. – MD, the scientist of the Institute of Experimental medicine of the Almazov National Medical Research Centre, the scientist of the Biomedical Institute of SPb. First Medical University n. after I. P. Pavlov, e-mail: carkis@yandex.ru.

Mamedov A. E. – student of SPb. First Medical University n. after I. P. Pavlov.

Poleshenko Ja. I. – student of SPb. First Medical University n. after I. P. Pavlov, e-mail: yana.poleschenko@gmail.com.

Scvortchov A. E. – MD, the head of the organ donation department of SPb. First Medical University n. after I. P. Pavlov, the surgeon of the transplantology department and organ donation of the Institute of emergency medicine, e-mail: skvortsov.spb@gmail.com.

Reznik O. N. – PHD, the head of the transplantology department of SPb. First Medical University n. after I. P. Pavlov, the head of the transplantology department and organ donation of the Institute of emergency medicine.

Kutenkov A. A. – the surgeon of SPb. First Medical University n. after I. P. Pavlov, the surgeon of the transplantology department and organ donation of the Institute of emergency medicine.

Galagudza M. M. – PHD, the head of the the Institute of Experimental medicine of the Almazov National Medical Research Centre, the professor of the pathophysiological department of SPb. First Medical University n. after I. P. Pavlov, e-mail: galagoudza@mail.ru.

Sonin D. L. – MD, the scientist of the Institute of Experimental medicine of the Almazov National Medical Research Centre, e-mail: sonin_d@mail.ru.

Karpov A. A. – the scientist of the Institute of Experimental medicine of the Almazov National Medical Research Centre, e-mail: a--karpoff@mail.ru.

Berko O. M. – student of SPb. First Medical University n. after I. P. Pavlov.

Dmitriev Ja. V. – the scientist of the Institute of Experimental medicine of the Almazov National Medical Research Centre.

Vlasov T. D. – PHD, the head of the pathophysiological department of SPb. First Medical University n. after I. P. Pavlov, the head of the Biomedical Institute of SPb. First Medical University n. after I. P. Pavlov, the scientist of the Institute of Experimental medicine of the Almazov National Medical Research Centre.