

УДК 616.12-008.1

DOI: 10.24884/1682-6655-2019-18-3-59-67

С. М. МИНАСЯН^{1, 2}, Я. И. ПОЛЕЩЕНКО^{1, 2},
П. Ю. ШУБИНА^{1, 2}, Е. С. ПРОЦАК^{1, 2},
Д. А. ДРУЖИНИНСКИЙ², М. М. ГАЛАГУДЗА^{1, 2},
И. С. УСКОВ¹, Ю. В. ДМИТРИЕВ¹

Использование методики гетеротопической трансплантации сердца крысы для исследования кардиопротективной эффективности кардиоплегических растворов

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

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия 197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8
e-mail: ca@yandex.ru

Статья поступила в редакцию 03.06.19; принята к печати 27.07.19

Резюме

Подробно описана модифицированная методика гетеротопической трансплантации сердца у крыс. Подробно изложены способы анестезии животных, хирургические особенности изъятия донорского сердца и его имплантации крысе-реципиенту. Описаны преимущества и недостатки методов консервации донорского сердца, а также способы оценки препарата донорского сердца, качества консервации и эффективности кардиопротекции. Предложены экспериментальные подходы к исследованию эффективности кардиоплегических и консервирующих растворов с применением данной методики. Приведены данные собственного пилотного исследования по сравнительному анализу эффективности кардиопротекции с применением консервирующих растворов с использованием данной экспериментальной модели.

Ключевые слова: кардиоплегия, кардиопротекция, консервация донорского сердца, трансплантация донорского сердца

Для цитирования: Минасян С. М., Полещенко Я. И., Шубина П. Ю., Процак Е. С., Дружининский Д. А., Галагудза М. М., Усков И. С., Дмитриев Ю. В. Использование методики гетеротопической трансплантации сердца крысы для исследования кардиопротективной эффективности кардиоплегических растворов. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2019;18(3):59–67. Doi: 10.24884/1682-6655-2019-18-3-59-67.

UDC 616.12-008.1

DOI: 10.24884/1682-6655-2019-18-3-59-67

S. M. MINASYAN^{1, 2}, Ya. I. POLESHENKO^{1, 2},
P. Yu. SHUBINA^{1, 2}, E. S. PROTSAK^{1, 2},
D. A. DRUZHININSKY², M. M. GALAGUDZA^{1, 2},
I. S. USKOV¹, Yu. V. DMITRIEV¹

The method of heterotopic rat heart transplantation for investigation the cardioprotective efficacy of cardioplegic solutions

¹ Almazov National Medical Research Centre, Russia, St. Petersburg

² Akkuratova street, St. Petersburg, Russia, 197341

² Pavlov University, Russia, St. Petersburg

6-8 L'va Tolstogo street, St. Petersburg, Russia, 197022

e-mail: ca@yandex.ru

Received 03.06.19; accepted 27.07.19

Summary

This article describes in detail the modified method of heterotopic heart transplantation in rats. The methods of animal anesthesia, surgical features of the removal of a donor heart and its implantation to a recipient rat are described in detail. The advantages and disadvantages of donor heart preservation methods are described, as well as methods for evaluating a donor heart preparation, the quality of preservation and the effectiveness of cardioprotection. Experimental approaches to the study of the effectiveness of cardioplegic and preservative solutions using this technique are proposed. The data of our own pilot study on a comparative analysis of the effectiveness of cardioprotection using preservative solutions using this experimental model are presented.

Keywords: *cardioplegia, cardioprotection, donor heart conservation, donor heart transplantation*

For citation: Minasyan S. M., Poleshenko Ya. I., Shubina P. Yu., Protsak E. S., Druzhininsky D. A., Galagudza M. M., Uskov I. S., Dmitriev Yu. V. The method of heterotopic rat heart transplantation for investigation the cardioprotective efficacy of cardioplegic solutions. Regional hemodynamics and micro-circulation. 2019;18(3):59–67. Doi: 10.24884/1682-6655-2019-18-3-59-67. (In Russ.).

Введение

Разработка новых кардиоплегических и органоконсервирующих растворов является актуальной задачей для современной кардиохирургии и трансплантологии [1, 2]. Существующие технологии консервации донорских органов и современные интраоперационные методики защиты миокарда от ишемического повреждения, вызванного наложением зажима на аорту, достигли высокого уровня и позволяют относительно безопасно выключать сердце из кровообращения на срок до 2–3 ч, консервировать донорское сердце и печень на срок до 4–6 ч, донорскую почку – до 12–24 ч. Однако с увеличением длительности ишемии органа неизбежно ухудшается его качество и последующая работоспособность, поэтому дальнейшее улучшение методов консервации органов необходимо, в первую очередь, для увеличения длительности периода безопасной ишемии органа. Относительно кардиopleгии, проблема срока ишемии сердца стоит не так остро, благодаря возможности осуществлять повторные инфузии кардиоплегического раствора. Здесь актуальна задача лучшего сохранения исходно компромитированного миокарда (в случаях гипертрофии, исходной ишемии и других последствий предсуществующего поражения миокарда вследствие основного заболевания). В кардиохирургии взрослых в настоящее время оптимальной является кровяная кардиopleгия, которая практически полностью вытеснила кристаллоидную кардиopleгию. Остается спорным вопрос о должной температуре кровяной кардиopleгии и миокарда в процессе ее осуществления: существуют сторонники классической холодной кровяной кардиopleгии, изотермической, а также предлагаются промежуточные температурные варианты. Однако в детской кардиохирургии, особенно в хирургии врожденных пороков сердца у детей младшего возраста, кристаллоидная холодная кардиopleгия по-прежнему занимает лидирующие позиции вследствие некоторых проблем использования кровяной кардиopleгии у данного контингента больных. Учитывая длительность оперативной коррекции тяжелых пороков сердца у детей, исходное состояние миокарда правого и левого желудочков, сложности с повторным введением кардиоплегического раствора в процессе операции в некоторых случаях, именно для данного направления кардиохирургии дальнейшие разработки новых кардиоплегических растворов являются актуальными.

Что касается консервации донорских органов, то здесь также появляются и успешно внедряются но-

вые способы сохранения, в частности, постоянная перфузия эксплантационного органа оксигенированным кровяным раствором, обедненным лейкоцитами с помощью специально разработанных для этой цели аппаратов. Внедрение данного метода пока ограничивается стоимостью и сложностью данной технологии, а также неизбежными побочными действиями на донорский орган любой экстракорпоральной аппаратной перфузии, хорошо известными при проведении искусственного кровообращения в кардиохирургии. При этом увеличение сроков сохранения донорских органов (как методом консервации, так и методом аппаратной перфузии) является актуальной задачей с целью расширения донорской базы, что особенно важно в условиях донорского дефицита.

Наиболее простой и распространенной экспериментальной моделью для исследования эффективности кардиоплегических и кардиоконсервирующих растворов является методика перфузии изолированного сердца по Лангендорфу [3–5]. Эта методика хорошо зарекомендовала себя для подобных исследований, и ее пригодность для них общепризнана. Однако, помимо преимуществ, она имеет и недостатки. Одним из самых серьезных недостатков является невозможность осуществить реперфузию сердца нативной кровью животного, что, безусловно, вносит свои коррективы в результаты. Исходная перфузия кристаллоидным раствором Кребса – Хенселейта перед введением в коронарное русло сердца кардиоплегического/консервирующего раствора также не является оптимальной, особенно в контексте изменений микроциркуляторного русла и эндотелиальной дисфункции. Поэтому представляется правильным подход с дополнительным применением альтернативных методик. При этом отказываться от методики Лангендорфа недопустимо, более того, для первоначального скрининга она действительно очень хороша и информативна [6].

Такой альтернативой может являться трансплантация сердца. Если на крупных лабораторных животных эта процедура по технике исполнения эквивалентна трансплантации сердца у человека, то у мелких животных (грызуны) классическая ортотопическая трансплантация сердца с искусственным кровообращением на данный момент развития экспериментальных подходов неосуществима. Для таких животных существует разработанная модель гетеротопической пересадки сердца, когда донорское сердце пересаживается в брюшную полость, после

пересадки не выполняет насосной функции, а животное-реципиент снабжает его кровью. Получается, что это фактически модель длительной перфузии изолированного сердца аллогенной кровью.

Данная методика имеет несколько модификаций, касаемых в основном особенностей хирургической техники [7, 8]. Ни одна из них не имеет описания в русскоязычной литературе. Англоязычные издания гетеротопической трансплантации сердца у крыс существуют, однако их число очень невелико. И они, на наш взгляд, имеют некоторые недостатки. Во-первых, непосредственно хирургическая техника в них описывается достаточно поверхностно, иногда – общими фразами. Во-вторых, в данной статье мы приводим описание методики трансплантации сердца именно в контексте изучения кардиоконсервации, т. е. описываем не только непосредственно пересадку, но и методику забора донорского сердца, консервацию, подходы к оценке состояния пересаженного сердца в остром эксперименте. Также мы приводим результаты пилотного тестирования двух кардиоплегических растворов, сравнение которых проведено на данной экспериментальной модели.

Материал и методы исследования

Описание методики гетеротопической трансплантации сердца у крыс

Какой-либо специальной подготовки животных (и доноров, и реципиентов) перед проведением экспериментов не требуется. Более того, исследуя способы сохранения донорского сердца (в частности, различные рецептуры органоконсервирующих растворов), следует учитывать, что забор донорского сердца у человека-донора с мозговой смертью производится по факту диагностики мозговой смерти, на фоне причинного заболевания головного мозга (в подавляющем большинстве случаев – внутричерепной сосудистой катастрофы), с тяжелейшими сдвигами гомеостаза, на фоне интенсивного рекондиционирования донора. Операция трансплантации сердца реципиенту осуществляется экстренно, и подготовка к ней резко ограничена. С целью улучшения интерполяции результатов экспериментального исследования на реальную клиническую ситуацию от специальной подготовки животных следует отказаться. Более того, разнородная группа экспериментальных животных (по полу, массе, возрасту, по условиям содержания и т. д.) хоть и является нарушением определенных канонов экспериментальных исследований, но зато позволяет приблизить ситуацию к клинической и значительно увеличить ценность полученных результатов. На действительно эффективные (для клинической практики) способы защиты сердца от ишемического и реперфузионного повреждения случайные факторы, сознательно исключаемые в фундаментальных исследованиях, влиять не должны.

Анестезия у животного-донора

Поскольку длительность операции по эксплантации донорского сердца небольшая (не более 10 мин), то анестезия обычно не представляет сложности. Мы отдаем предпочтение внутрибрюшному введению

хлоралгидрата из расчета 450 мг на 1 кг массы крысы. Возможно использование золетил-ксилазиновой или золетил-рамитаровой анестезии. В ингаляционной анестезии необходимости нет, так как сложности с ее осуществлением (из-за необходимости использовать искусственную вентиляцию легких (ИВЛ)) не оправдываются ее преимуществами при столь короткой длительности операции. Использование ИВЛ обязательно, так как отсутствие спонтанного дыхания после вскрытия грудной полости в течение некоторого времени может привести к тяжелому повреждению миокарда, как непосредственно из-за аноксии сердца, так и опосредованно – через гипоперфузию на фоне падения системного артериального давления из-за аноксии мозга. Известно, что при заборе сердца грызунов для последующей перфузии по Лангендорфу ИВЛ применяется крайне редко, и проблем не возникает. Однако существует разница в длительности периода времени от прекращения спонтанного дыхания животного до отсечения сосудов сердца в случае методики Лангендорфа и подготовки сердца к трансплантации. В первом варианте короткий период аноксии допустим, во втором его длительность уже превышает допустимые сроки.

Техника операции у животного-донора

После анестезии крыса фиксируется в положении на спине на операционном столике. Выполняется продольный кожный разрез на шее, послойно тупо и остро выделяется участок трахеи, который берется на держалку. Электрокаутером выполняется поперечное (между хрящевыми полукольцами) вскрытие просвета трахеи на $\frac{1}{3}$ ее окружности. В просвет трахеи вставляется трахеотомическая канюля, которая подключается к аппарату ИВЛ, нить-держалка вокруг трахеи над канюлей завязывается для герметичности. В качестве трахеотомической трубки возможно использовать укороченный подключичный катетер. После налаживания ИВЛ производится широкий доступ к сердцу для его забора. Мы рекомендуем лапаротомию, которая обеспечивает достаточно удобный подход ко всем структурам сердца и выполняется быстро и технически просто. Ножницами Купера осуществляется разрез всех слоев передней стенки живота, включая париетальную брюшину, на средней линии ближе к лобковому сочленению. Далее разрез расходится в обе стороны и продолжается вверх. Затем тупым путем (браншей ножниц) перфорируется диафрагма и линия разреза идет по ребрам вверх и латерально. Грудинная часть диафрагмы также перерезается ножницами. Во время торакотомии важно смещаться в латеральную сторону на достаточное расстояние (хотя бы до передней подмышечной линии), чтобы широко обнажить сердце. Для лучшей экспозиции на выступающую часть мечевидного отростка накладывается зажим Кохера, которым получившийся кожно-мышечно-реберно-грудинный лоскут отворачивается в краниальном направлении и фиксируется. При этом полностью обнажаются все структуры переднего средостения. Несмотря на достаточную травматичность, данный этап операции сопровождается небольшой крово-

потерей, локальные кровотечения из перерезанных межреберных артерий останавливаются коагуляцией. Альтернативным доступом, менее травматичным, но более длительно выполняемым и обеспечивающим менее широкий обзор, является двухсторонняя передне-боковая торакотомия по 4-му межреберью, дополненная поперечной стернотомией. В процессе выполнения такого доступа необходимо с особой тщательностью коагулировать рассекаемые межреберные мышцы вблизи грудины для предотвращения сильного кровотечения из внутренних грудных артерий, а после завершения разреза и стернотомии необходимо использовать ранорасширитель. В целом это менее подходящий доступ. После обнажения переднего средостения необходимо освободить сердце от перикарда, на переднем листке которого располагается тимус, у молодых крыс (массой примерно до 230 г) его размеры могут быть значительными и затруднять подход к основанию сердца. Поэтому его необходимо удалить. При отсечении основания тимуса возможны кровотечения, однако коагулятор следует использовать осторожно для предотвращения повреждения крупных сосудов средостения с последующим неконтролируемым кровотечением. После обнажения сосудов на основании сердца необходимо лигировать все сосуды, кроме восходящей аорты и ствола легочной артерии. Проще это сделать одной единой нитью. Используется для этого прочная нерассасывающаяся нить 3–0, плетеная, хорошо держащая узел (лавсан, капрон, желативно непокрытый, допустимо использование даже хлопчатобумажных нитей). Очень аккуратно под восходящую аорту и легочный ствол подводится зажим москит (с левой стороны), и после обхода его браншами указанных сосудов москитом подводится под них лигатура. После этого сердце приподнимается в вентральном направлении, и ассистент завязывает лигатуру, в которую попадают все вены, впадающие в правое и левое предсердия. После этого под лигатурой вены перерезаются (узел лигатуры остается на сердце), сердце подтягивается каудально, пересекаются аорта и легочный ствол максимально дальше от основания сердца.

Далее препарат донорского сердца необходимо отмыть от оставшейся в его полостях и сосудах коронарного русла крови. Мы рекомендуем для этого использовать методику перфузии изолированного сердца по Лангендорфу. Через восходящую аорту сердце подключается к аппарату Лангендорфа, и ретроградная перфузия через аорту надежно отмывает сердце от крови. При подключении следует соблюдать правило: канюля в восходящую аорту вводится неглубоко, а фиксация аорты к канюле производится максимально атравматично, чтобы участок аорты остался пригодным для последующего анастомозирования. В идеале лучше вообще отсечь участок аорты, где производилась фиксация к канюле, именно для этого длина аорты должна быть максимально возможной, а помещение канюли в аорту – неглубоким. Спорным является вопрос о необходимости введения гепарина животному-донору непосредственно перед изъятием сердца, уже после выполнения доступа (введение ге-

парина перед выполнением доступа может значительно усилить кровопотерю, что ухудшит качество препарата сердца). На наш взгляд, необходимости введения гепарина нет, если ретроградная перфузия изолированного сердца начнется тотчас после его извлечения из донора. Однако если перфузия кристаллоидными растворами недопустима с точки зрения дизайна эксперимента, то в этом случае введение гепарина все же необходимо.

Действительно, дальнейшие манипуляции с препаратом извлеченного донорского сердца зависят от целей и задач эксперимента. Однако в любом случае следует иметь в виду, что нахождение препарата сердца *ex vivo* даже в течение небольшого промежутка времени приводит к развитию в нем необратимых ишемических изменений. Промежуток времени, в течение которого такие изменения не успеют развиться, всегда меньше времени, которое требуется для выполнения трансплантации у животного реципиента. Поэтому в любом случае консервация сердца необходима.

После выполнения консервации сердца (об этом будет сказано ниже) оно помещается в термостатируемый контейнер на определенное (согласно протоколу эксперимента) время.

Когда сердце уже находится в охлаждающем растворе, желательно под микроскопом провести ревизию аорты и ствола легочной артерии и подготовить их для наложения анастомозов. Это необходимо делать прямо под слоем холодного раствора, чтобы не допустить согревания сердца. Аорта и легочный ствол тупо отделяются друг от друга, при сохранении достаточной длины аорты участок фиксации ее за канюлю срезается ножницами, при наличии на препарате бифуркации легочной артерии этот участок также отсекается.

Консервация донорского сердца

После подключения препарата изолированного сердца к аппарату Лангендорфа в целях его консервации нет необходимости осуществлять перфузию стандартным для перфузии изолированного сердца раствором, можно сразу же начинать введение консервирующего/кардиоплегического раствора. Этот раствор вводится антеградно через канюлю в корень аорты под давлением, примерно равным диастолическому давлению у животного (примерно 80 мм рт. ст.). Давление создается высотой столба (колонка, система для внутривенных вливаний с флаконом), в котором находится раствор. Температура консервирующего раствора должна быть соответствующая: если по условиям эксперимента она не должна отличаться от стандартных +4 °С, флакон с раствором перед экспериментом некоторое время находится в холодильнике, где и охлаждается до заданной температуры. Стандартную для аппарата Лангендорфа колонку для введения холодного раствора применять неудобно и незачем, проще использовать систему для капельных инфузий, которая не оказывает на протекающий через нее раствор согревающего эффекта. Перфузируемое сердце для более надежного охлаждения помещается в стакан с также

охлажденным в холодильнике физиологическим раствором и ледяной крошкой. За время перфузии (минуты) консервирующий раствор и раствор в стакане, где находится сердце, при обычной комнатной температуре нагреться не успевают, поэтому дополнительные способы термостатирования раствора не требуются. Если же в силу особенностей эксперимента сердце необходимо перфузировать раствором более высокой температуры, то для этого удобнее использовать термостатируемую двухконтурную колонку.

Проводить перед консервацией сердца его стандартную перфузию и измерение внутрилевожелудочкового давления путем установки баллона в левый желудочек и создания пред- и постнагрузки мы не рекомендуем, так как затем придется ушивать отверстие в стенке левого предсердия, что значительно усложнит эксперимент. При желании можно оценить исходную сократимость донорского сердца, чтобы убедиться в его нормальном состоянии, выполнив трансторакальную эхокардиографию перед изъятием сердца.

Анестезия у животного-реципиента

Учитывая продолжительность операции – около 1–1,5 ч, здесь может иметь преимущества ингаляционная анестезия как управляемая в течение всего срока операции. Поскольку лапаротомия не препятствует спонтанному дыханию, надобность в ИВЛ и интубации трахеи или трахеотомии отсутствует. Ингаляция анестетика (Изофлюран, Севофлюран) осуществляется масочно, пары смешиваются с воздухом или (это лучше) с кислородом. Однако обязательно следует иметь в виду, что для данных анестетиков известен эффект фармакологического preconditionирования, т. е., они могут улучшать состояние ишемизированного миокарда, и это следует учитывать при анализе полученных результатов. Кроме того, данные анестетики не обладают достаточным анальгетическим эффектом, в связи с чем их необходимо комбинировать с опиатами или Кетамином. Также возможно использование неингаляционной анестезии, однако необходимо четко сопоставлять длительность ее действия и продолжительность оперативного вмешательства. Из неингаляционных анестетиков здесь следует отдать предпочтение введению смеси Тилетамин+Золазепам с Ксилазином или использовать мононаркоз хлоралгидратом. Следует отметить, что хлоралгидрат в настоящее время не рекомендован для наркотизации лабораторных животных, однако объективных причин отказываться от него нет. Наш собственный опыт показывает возможность его использования в данных целях.

Техника операции у животного-реципиента

После наркотизации животное фиксируется на термостатируемом операционном столике. После обработки операционного поля выполняется продольная срединная лапаротомия, края раны разводятся ранорасширителем типа «крокодил». Органы брюшной полости (кишечник, желудок, селезенка) выводятся в рану вправо, предварительно обертываются влажными теплыми салфетками. В левом брыжееч-

ном синусе вскрывается задний листок париетальной брюшины, путем тупого разделения забрюшинной клетчатки обнажается сосудистый пучок из аорты и задней полой вены. Допустимо взять листки вскрытой париетальной брюшины на нити-держалки для улучшения экспозиции сосудистого пучка – по две держалки с каждой стороны – и фиксировать эти нити к ранорасширителю или операционному столику.

Далее выполняется микрохирургический этап, проводимый с использованием микрохирургического инструментария и микроскопа. Идеальным является микроскоп с дополнительными окулярами для ассистента, однако допустимо использование оптики только для одного оператора.

В инфраренальном сегменте аорты и задняя полая вена выделяются на протяжении, достаточном для наложения анастомозов. При этом не надо стремиться к сокращению длины выделяемого участка в целях меньшей инвазивности и сокращения времени вмешательства во избежание последующих трудностей. Необходимо также учитывать ширину браншей клипс, которые будут наложены на сосуды. Мы рекомендуем начинать выделение с аорты. Препаровка осуществляется тупо с использованием микрохирургических изогнутых пинцетов. Боковые ветви коагулируются, крупные перевязываются, при наличии ветви среднего калибра мы отдаем предпочтение коагуляции. Затем аналогичным способом выделяется задняя полая вена.

На аорту и полую вену накладываются клипсы проксимально и дистально. Желательно, чтобы бранши клипс располагались примерно во фронтальной плоскости навстречу друг другу, тем самым немного отодвигая сосуды друг от друга. Неудобным является расположение клипс в саггитальной плоскости, такого расположения лучше избегать, при этом также существует опасность соскальзывания бранш клипс с сосуда с развитием неконтролируемого кровотечения.

Далее продольным разрезом вскрывается стенка аорты и стенка полой вены. Мы сначала пунктируем аорту инъекционной иглой, промываем ее просвет физиологическим раствором с добавлением в него гепарина, затем микрохирургическими ножницами продолжаем разрез передней стенки в продольном направлении. Он должен быть примерно равен диаметру восходящей аорты донорского сердца. Таким же образом вскрывается просвет задней полой вены. После ее пункции мы проводим гидравлическую препаровку вены через ту же иглу, что способствует дилатации вены между клипсами и облегчает дальнейшие манипуляции на ней. После вскрытия просвета сосудов он повторно промывается раствором гепарина. Для предотвращения слипания стенок вены после ее вскрытия мы помещаем в просвет вены буж из мягкой пластиковой трубки.

На наш взгляд, удобнее начинать с артериального анастомоза между аортой крысы-реципиента и восходящей аортой донорского сердца. Мы помещаем донорское сердце в область левого брыжеечного синуса, то есть сердце располагается слева от сосудов. Таким образом, артериальный анастомоз оказывается левее и немного глубже венозного, поэтому с него и следует начинать.

Существует несколько технических вариантов наложения анастомозов. На наш взгляд, оптимальным в данном случае является непрерывный сосудистый шов, который создает большую герметичность и осуществляется гораздо быстрее по сравнению с узловым швом. Герметичность микрососудистых анастомозов в данном случае крайне важна, так как сшиваются магистральные сосуды, с высоким объемом кровотоком, а давление в аорте является системным. Неизбежная кровопотеря через линию шва, незаметная по объему при сшивании периферических микрососудов у крупного животного или человека, здесь, при тех же объемах, может стать фатальной.

Поскольку сердце изначально располагается слева от сосудов, и его перемещения по обе стороны от сосудистого пучка в процессе операции затруднительны и неудобны, рекомендуется левую губу артериального анастомоза сшивать изнутри. Наложение провизорных швов-держалок остается исключительным выбором хирурга, на наш взгляд, их наличие облегчает наложение анастомозов, хотя и не является обязательным. Для лучшего соответствия длины разреза стенки аорты диаметру восходящей аорты донорского сердца возможно окончательное досечение разреза передней стенки после начала анастомозирования. После завершения шва левой (т. е. задней по отношению к хирургу) стенки анастомоза накладывается шов на переднюю стенку. При переходе шва (если он непрерывный) с задней на переднюю губу рекомендовано связывать шовную нить со швом-держалкой, наложенной на угол анастомоза. Если же держалки не накладывались (что вполне допустимо), то натяжение нити в области узла нужно осуществлять с особой тщательностью и даже возможно выполнить захлест нити во избежание ослабления нити непрерывного шва. Безусловно, узловой шов лишен данного недостатка, однако имеет другие – низкую герметичность и длительное время наложения. Кроме того, наложение узлового шва на левую (заднюю) губу анастомоза еще более затрудняется расположением сердца слева. Опасность сузить просвет анастомоза при непрерывном шве может существовать при сшивании циркулярно пересеченных сосудов «конец в конец»; при наложении анастомозов «бок в конец» или при косом срезе сшиваемых сосудов такая опасность отсутствует.

После окончания выполнения артериального анастомоза клипсы не снимаются, а сразу начинается наложение венозного анастомоза между стволом легочной артерии донорского сердца и задней поллой веной. Техника наложения аналогична вышеописанной, с поправкой на необходимость предельно аккуратного обращения со стенкой вены из-за ее чрезвычайной тонкости и склонности к повреждению. Предварительно установленный в просвете вены буж значительно облегчает работу. Удалять его нужно уже в процессе сшивания правой (передней к хирургу) губы, при этом становится невозможным случайный подхват задней стенки в шов.

После окончания выполнения анастомозов последовательно снимаются клипсы сначала с задней поллой вены, затем с дистального участка аорты, и в

конце снимается клипса с проксимального участка аорты. Кровотечение по линии швов возникает часто, но не является опасным при правильном наложении шва, останавливается тампонированием (с умеренной силой) области анастомозов марлевыми шариками.

Во избежание сдавления анастомозов (прежде всего венозного) задний листок париетальной брюшины мы не ушиваем. Сердце остается свободно лежать на задней стенке брюшной полости. Если состояние сердца перед трансплантацией было удовлетворительным (качественная консервация и/или другая мощная кардиопротекция, разумные сроки ишемии с поправкой на консервацию, отсутствие дополнительных локальных или глобальных ишемических повреждений и других причин, ухудшающих состояние сердца), то его сокращения начинаются практически сразу же после запуска кровотока по анастомозам. Другим условием запуска сердца является адекватное артериальное давление у крысы-реципиента.

Трансплантированное таким образом сердце кровоснабжается организмом животного-реципиента, при этом насосной функции и участия в поддержании кровообращения не выполняет. Более того, у животного-реципиента такое сердце работает как артерио-венозная фистула, причем объемная скорость сброса крови из аорты в заднюю полую вену равна величине коронарного кровотока в донорском сердце. Учитывая, что в норме величина коронарного кровотока составляет около 5–7 % от сердечного выброса (в состоянии покоя), данный сброс у реципиента можно рассматривать как гемодинамически незначимый. Схема потока крови через трансплантированное сердце аналогично потоку перфузата изолированного сердца на аппарате Лангендорфа: кровь из аорты реципиента поступает в коронарные артерии донорского сердца, проходит через микроциркуляторное русло миокарда и собирается в правых камерах, будучи уже венозной, а оттуда правым желудочком через легочный ствол выбрасывается в заднюю полую вену. Учитывая, что часть оттекающей от миокарда крови (особенно от правых отделов сердца) дренируется непосредственно в полость правого желудочка, минуя коронарный синус и правое предсердие, мы считаем оптимальным вшивать в заднюю полую вену именно ствол легочной артерии, а не одну из полых вен донорского сердца. Левый желудочек его сокращается, однако гемодинамически не нагружен и в кровообращении не участвует. Данный недостаток принципиально устранить невозможно. Некоторыми авторами предлагается для создания гемодинамической нагрузки на левый желудочек дополнительно создавать анастомоз между левым предсердием и аортой крысы-реципиента, однако такой подход вряд ли является оптимальным – левые камеры сердца в диастолу будут наполняться не из легочных вен, как в норме, а из аорты под системным артериальным давлением, что абсолютно нефизиологично. Такое же нефизиологическое состояние возникнет и при намеренном разрушении аортального клапана сердца с целью диастолического наполнения левого желудочка непосредственно из аорты. Неоднозначным

является ответ на вопрос, насколько гемодинамическая разгрузка левого желудочка в процессе его функционирования влияет на его функциональное и морфологическое состояния. В случае длительного периода работы миокард желудочка, безусловно, будет подвергаться атрофии. При коротком сроке наблюдения ответ не столь очевиден. К примеру, по нашим данным, переносимость 60-минутной ишемии изолированным сердцем крысы, перфузируемым по Лангендорфу в отсутствие каких-либо кардиопротективных воздействий (кардиоплегия, прекондиционирование, гипотермия), достаточно низкая, и гемодинамическая разгрузка левого желудочка путем отказа от установки в его полость нагружающего баллона никак не улучшает результаты.

Особенностью дизайна острого эксперимента по гетеротопической трансплантации сердца, когда длительность функционирования препарата донорского сердца после трансплантации дизайном эксперимента ограничена несколькими часами, является возможность дистальной перевязки аорты и задней полой вены у крысы-реципиента. Во-первых, это улучшает гемодинамическую стабильность реципиента, во-вторых, облегчает процесс измерения объемной скорости коронарного кровотока в донорском сердце. Для этого достаточно наложить датчик расходомера на брюшную аорту реципиента проксимальнее анастомоза.

В случае хронического эксперимента на завершающем этапе операции проводится контроль гемостаза, отсутствия инородных тел в брюшной полости, возвращения внутренних органов на место и послыйный шов лапаротомной раны.

Оценка препарата донорского сердца, качества консервации и эффективности кардиопротекции

Здесь следует различать острый эксперимент, где непосредственно (через десятки минут или несколько часов) оценивается состояние сердца, при этом исследование нацелено на оценку эффективности использованной кардиопротекции для защиты миокарда от ишемии, и хронический эксперимент, когда, наряду с последствиями ишемического повреждения (в виде ремоделирования – образования рубцовых полей, изменения геометрии левого желудочка), на состояние пересаженного сердца будет оказывать влияние реакция отторжения трансплантата. Оценка реакции отторжения и оценка эффективности способов предотвращения или лечения реакции отторжения трансплантанта в эксперименте является темой для отдельной статьи, поэтому в нашем обзоре мы не затрагиваем эту обширную тему, остановившись только на оценке ишемического повреждения миокарда и эффективности кардиопротекции. Эту кардиопротекцию мы предлагаем проводить в остром эксперименте, в условиях которого иммунологический конфликт и реакция отторжения не успевают проявиться.

1. *Измерение объемной скорости коронарного кровотока донорского сердца.* Это возможно осуществить сразу же после запуска кровотока по анастомозам, а также через некоторое время. Датчик рас-

ходомера накладывается на восходящую аорту сердца, либо на брюшную аорту крысы проксимальнее анастомоза, при условии, что дистальнее анастомоза аорта перевязана. Если эксперимент продолжается длительное время и перевязка аорты над бифуркацией нежелательна, а длина восходящей аорты либо ее пространственное расположение неоптимальны для наложения датчика на нее, то в таком случае можно аорту не перевязывать, а датчиком измерить объемную скорость кровотока тотчас проксимальнее и дистальнее анастомоза с восходящей аортой донорского сердца. Разница между этими значениями будет равняться величине коронарного кровотока.

2. *Исследование сократительной способности трансплантанта методом трансбдоминальной эхокардиографии.* После ушивания лапаротомной раны до пробуждения крысы-реципиента бьющееся сердце в брюшной полости доступно для ультразвуковой визуализации. В литературе мы не встретили описания такой оценки, и на собственном опыте убедились в его неоптимальности. Дело в том, что пространственное положение сердца в брюшной полости достаточно вариабельно и использование неких стандартных для этого исследования позиций крайне затруднительно, тем более что такие позиции, в отличие от трансторакальной и транспищеводной ЭХОКГ, пока даже не разработаны. Визуализировать левый желудочек сердца в животе в принципе возможно, но качество визуализации оставляет желать лучшего. Кроме того, отсутствие более или менее стандартного положения сердца и отсутствие на данный момент стандартных позиций значительно затрудняет интерпретацию оценочных критериев. Возможно, данный метод после прицельных исследований и доработок станет высокоэффективным, но на данный момент говорить о его рутинном использовании для оценки функций гетеротопически трансплантанта еще преждевременно.

3. *Оценка концентрации тропонина в плазме животного-реципиента.* Этот стандартный метод оценки наличия и тяжести повреждения миокарда является очень специфичным (для миокарда, но не для его именно ишемического повреждения) и в данной методике может быть использован. Забор крови у крысы через несколько часов после трансплантации не является сложной процедурой, а в случае вывода животного из эксперимента легко осуществить тотальный забор всей крови через пункцию или катетеризацию какой-либо центральной артерии или вены.

4. *Эксплантация донорского сердца через несколько часов после его трансплантации с целью морфологической оценки различными методиками.* Морфологические критерии состояния препарата сердца, на наш взгляд, являются очень важными, и ими не следует пренебрегать. Здесь возможны различные подходы; мы используем широко распространенный гистохимический метод оценки необратимого повреждения миокарда путем окрашивания срезов сердца 1 %-м раствором ТТС. Следует отметить, что данный метод обязательно требует адекватной реперфузии во избежание получения ложных результатов, поэтому реперфузия сердца не должна

осуществляться менее 2 ч (и это при условии хорошего восстановления коронарного кровотока, в иных случаях реперфузия должна быть длительнее).

5. *Оценка сократительной способности левого желудочка донорского сердца после его эксплантации из реципиента перед морфологическим исследованием.* Этот способ нам не встретился в литературе, однако его применение вполне возможно. Суть метода заключается в следующем: после эксплантации донорского сердца через некоторое время после трансплантации (при этом необходимо сохранить максимально длинный участок восходящей аорты) сердце повторно подключается к аппарату Лангендорфа, и осуществляется его ретроградная перфузия стандартным методом. При этом в полость левого желудочка вводится баллон, и после создания с его помощью пред- и постнагрузки производится оценка сократительной способности левого желудочка в виде значений систолического и диастолического внутрилевожелудочкового давления в изоволюметрическом режиме, т. е. стандартным для перфузии по Лангендорфу способом. Здесь следует оговориться, что методологически правильно создать адекватную гидродинамическую нагрузку на левый желудочек изолированного сердца баллоном, введенным в его полость, что возможно только у исходно интактного, «здорового» сердца, подразумевая, что у него отсутствует диастолическая дисфункция или, тем более, ишемическая контрактура. Связано это с тем, что величина нагрузки (эквивалентная объему введенной в баллон жидкости) устанавливается с ориентировкой на величину диастолического давления в полости левого желудочка, которое зависит от созданной преднагрузки, т. е., от объема введенной в полость баллона жидкости. Но такая зависимость справедлива только для неповрежденного миокарда. Если же есть основания предполагать, что сердце неинтактно (а после трансплантации оно не может быть интактным), то уровень фактического диастолического давления в желудочке остается неизвестным. Однако остается возможность оценить пульсовое давление, развиваемое левым желудочком, без оценки абсолютных значений систолического и диастолического давления. Впрочем, описанный методологический подход все равно неоднозначен, продолжает вызывать споры, поэтому вряд ли стоит рекомендовать его в качестве рутинного и обязательного.

Результаты исследования и их обсуждение

Сразу следует пояснить, что данная статья не преследует цель публикации результатов исследования кардиоплегических и органоконсервирующих растворов или результатов других способов защиты сердца от ишемического и реперфузионного повреждения – этому посвящены отдельные публикации. Предварительные результаты сравнения двух кардиоплегических растворов на данной модели в данной статье приводятся как завершающий этап описания данной методики, чтобы продемонстрировать, что полученные результаты сопоставимы с результатами аналогичного сравнительного исследования, полученными на другой экспериментальной модели.

На 12 крысах стока Wistar были тестированы органоконсервирующий раствор Кустодиол (n=5) и кардиоплегический раствор собственной разработки на основе буферного раствора Кребса – Хенселейта (n=7). Продолжительность холодной ишемии миокарда составляла 120 мин, затем в трансплантированном сердце запускался кровоток на 180 мин, после чего миокард подвергался гистохимическому исследованию для установления объема необратимого повреждения миокарда путем окрашивания его срезов 1 %-м раствором трифенилтетразолия хлорида. Размер необратимого повреждения миокарда составил $3,5 \pm 1,2$ % во второй экспериментальной группе и более 75 % в первой экспериментальной группе (точное значение для группы с Кустодиолом привести невозможно, так как коронарный кровоток у сердец, консервированных Кустодиолом, оказался крайне низким – всего $0,4 \pm 0,1$ мл/мин, что, вероятно, также является следствием неадекватной кардиопротекции). Данные результаты согласуются с результатами, полученными ранее на модели перфузии изолированного сердца: размер необратимого повреждения при 60-минутной нормотермической ишемии составил $83,9 \pm 8,6$ % при использовании Кустодиола и 14 ± 5 % при использовании раствора на основе буфера Кребса – Хенселейта [2]. Крайне негативные результаты тестирования Кустодиола – достаточно распространенного органоконсервирующего раствора – требуют дальнейших исследований, а сопоставимость приведенных результатов позволяет активно использовать модель гетеротопической трансплантации сердца для тестирования способов кардиопротекции.

Заключение

Данная методика позволяет воспроизводить ишемию-реперфузию сердца в эксперименте с целью изучения патофизиологии этих состояний, а также тестирование фармакологических препаратов – кардиопротекторов, кардиоплегических растворов и других факторов, способных оказать на ишемизированное сердце какие-либо эффекты. Владение этой методикой существенно расширяет возможности специалиста, занимающегося фундаментальными и прикладными исследованиями в области ишемии миокарда.

Финансирование

Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 17-04-02061 «МикроРНК-223-5p и -3p-зависимые механизмы некроптоза в миокарде сердечного аллогraftа при трансплантации донорского сердца».

Funding Acknowledgements

The study is supported by the grant of the Russian Scientific Foundation No 17-04-02061 «MiR-223-5p and -3p-based myocardial necroptosis pathways in the cardiac allograft in heart transplantation».

Конфликт интересов / Conflict of interest

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

Литература / References

1. Минасян С. М., Галагудза М. М., Дмитриев Ю. В. и др. Консервация донорского сердца: история и современность с позиции трансляционной медицины // Регионар. кровообращение и микроциркуляция. – 2014. – № 3 (51). – С. 4–16. [Minasyan SM, Galagudza MM, Dmitriyev YuV, Karpov AA, Bobrova EA, Krasichkov AS, Grigor'ev EB, Vlasov TD. Konservatsiya donorskogo serdtsa: istoriya i sovremennost's pozitsii translyatsionnoy meditsiny. Regionarnoye krovoobrashcheniye i mikrotsirkulyatsiya. 2014;3(51):4–16. (In Russ.)].
2. Minasian SM, Galagudza MM, Dmitriyev YV, Karpov AA, Vlasov TD. Preservation of the donor heart: from basic science to clinical studies. J Cardiovasc. Thorac. Surg. 2015;20(4):510–519. Doi: 10.1093/icvts/ivu432.
3. Минасян С. М., Галагудза М. М., Сонин Д. Л. и др. Методика перфузии изолированного сердца крысы // Регионар. кровообращение и микроциркуляция. – 2010. – № 4 (32). – С. 54–59. [Minasyan SM, Galagudza MM, Sonin DL, Bobrova EA, Zverev DA, Korolev DV, Dmitriyev YuV, Vasil'eva MS. Metodika perfuzii izolirovannogo serdtsa krysy. Regionarnoye krovoobrashcheniye i mikrotsirkulyatsiya. 2010;4(32):54–59. (In Russ.)].
4. Минасян С. М., Галагудза М. М., Васильева М. С. и др. Защита миокарда от глобальной ишемии/реперфузии с использованием кардиоплегического раствора на основе буфера Кребса-Хензелейта // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. – 2010. – Т. 96, № 4. – С. 353–361. [Minasyan SM, Galagudza MM, Vasil'yeva MS, Kurapeev DI, Zverev DA. Zashchita miokarda ot global'noy ishemii/reperfuzii s ispol'zovaniyem kardioplegicheskogo rastvora na osnove bufera Krebsa-Khenzelayta. Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal im. I. M. Sechenova. 2010;96(4):353–361. (In Russ.)].
5. Minasian SM, Galagudza MM, Dmitriyev YuV, Kurapeev DI, Vlasov TD. Myocardial protection against global ischemia with Krebs-Henseleit buffer-based cardioplegic solution. J Cardiothorac. Surg. 2013;8:60. Doi: 10.1186/1749-8090-8-60.
6. Minasian SM, Galagudza MM, Dmitriyev YV, Karpov AA, Vlasov TD. Preservation of the donor heart: from basic science to clinical studies. J Cardiovasc. Thorac. Surg. 2015;20(4):510–519. Doi: 10.1093/icvts/ivu432.
7. Ruzza A, Vespignani R, Czer LS, De Robertis M, Wu GN, Trento A. Heterotopic Heart Transplantation in Rats: Improved Anesthetic and Surgical Technique. Transplantation Proceedings. 2010;42(9):3828–3832. Doi: 10.1016/j.transproceed.2010.07.097.
8. Shan J, Huang Y, Feng L, Luo L, Li C, Ke N, Zhang C, Li Y. A Modified Technique for Heterotopic Heart Transplantation in Rats. J Surg Res. 2010;164(1):155–161. Doi: 10.1016/j.jss.2009.05.024.

Информация об авторах

Минасян Саркис Минасович – канд. мед. наук, старший научный сотрудник НОИ биомедицины ПСПбГМУ им. И. П. Павлова, старший научный сотрудник НИЛ микроциркуляции

и метаболизма миокарда ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» МЗ РФ, Санкт-Петербург, e-mail: ca@yandex.ru.

Полешенко Яна Игоревна – студент ПСПбГМУ им. И. П. Павлова, зоолаборант ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» МЗ РФ, Санкт-Петербург, e-mail: yana.poleschenko@gmail.com.

Шубина Полина Юрьевна – студент ПСПбГМУ им. И. П. Павлова, зоолаборант ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» МЗ РФ, Санкт-Петербург, e-mail: shubina.polina97@mail.ru.

Протсак Егор Сергеевич – студент ПСПбГМУ им. И. П. Павлова, зоолаборант ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» МЗ РФ, Санкт-Петербург, e-mail: egor-protsak@yandex.ru.

Дружинский Дмитрий Александрович – студент ПСПбГМУ им. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, e-mail: druzhininsky98@yandex.ru.

Галагудза Михаил Михайлович – д-р мед. наук, член-корреспондент РАН, директор института экспериментальной медицины ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» МЗ РФ, профессор кафедры патофизиологии ПСПбГМУ им. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, e-mail: galagoudza@mail.ru.

Усков Иван Сергеевич – младший научный сотрудник института экспериментальной медицины ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» МЗ РФ, Санкт-Петербург, e-mail: ivan.uskoff@yandex.ru.

Дмитриев Юрий Валерьевич – младший научный сотрудник института экспериментальной медицины ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» МЗ РФ, Санкт-Петербург, e-mail: yury.v.dmitriev@gmail.com.

Authors information

Minasyan Sarkis Minasovich – senior researcher at the Scientific Research Institute of Biomedicine of Pavlov University, senior researcher at the Scientific Research Laboratory of Microcirculation and Myocardial Metabolism of the Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, e-mail: ca@yandex.ru.

Poleschenko Yana Igorevna – student at the Pavlov University, Saint-Petersburg, zoological assistant of the Almazov National Medical Research Centre, e-mail: yana.poleschenko@gmail.com.

Shubina Polina Yurievna – student at the Pavlov University, Saint-Petersburg, zoological assistant of the Almazov National Medical Research Centre, e-mail: shubina.polina97@mail.ru.

Protsak Egor Sergeevich – student at the Pavlov University, Saint-Petersburg, zoological assistant of the Almazov National Medical Research Centre, email: egor-protsak@yandex.ru

Druzhinsky Dmitry Aleksandrovich – student at the Pavlov University, Saint-Petersburg, e-mail: druzhininsky98@yandex.ru.

Galagudza Mikhail Mikhailovich – director at the Institute of Experimental Medicine of the Almazov National Medical Research Centre, professor at the Department of Pathophysiology of the Pavlov University, Saint-Petersburg, doctor of medical science, corresponding member of the Russian Academy of Sciences, e-mail: galagoudza@mail.ru.

Uskov Ivan Sergeevich – junior researcher at the Institute of Experimental Medicine of the Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, e-mail: ivan.uskoff@yandex.ru.

Dmitriy Yuri Valerievich – junior Researcher at the Institute of Experimental Medicine of the Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, e-mail: yury.v.dmitriev@gmail.com.