

ISSN 1607-419X
ISSN 2411-8524 (Online)
УДК 616-089.843:599.323

Сравнение гемодинамических и инфаркт-лимитирующих эффектов консервирующего раствора на основе буфера Кребса–Хенселейта и раствора Кустодиол на модели гетеротопической трансплантации сердца крысы

М. М. Галагудза^{1,2}, С. М. Минасян¹,
Ю. В. Дмитриев¹, Я. И. Полещенко²,
П. Ю. Шубина², Е. С. Процак², И. С. Усков¹,
Д. Л. Сонин², А. А. Кутенков², Т. Д. Власов²

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

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Галагудза Михаил Михайлович,
ФГБУ «НМИЦ
им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: galagudza@almazovcentre.ru

Статья поступила в редакцию
20.12.18 и принята к печати 27.12.18.

Резюме

Цель исследования. Провести сравнение кардиопротективной эффективности консервирующего раствора на основе буфера Кребса–Хенселейта и раствора Кустодиол на модели гетеротопической трансплантации сердца крысы. **Материалы и методы.** Исследование проведено на 12 крысах стока Wistar. Животные были разделены на группы в зависимости от использованного консервирующего раствора: 1) раствор на основе буфера Кребса–Хенселейта ($n = 7$), 2) Кустодиол ($n = 5$). Каждый эксперимент состоял из забора донорского сердца крысы, его консервации соответствующим кардиopleгическим раствором, гетеротопической трансплантации крысе-реципиенту с последующей эксплантацией и оценкой сократительной способности левого желудочка на модели Лангендорфа, а также гистохимическим определением объема необратимого повреждения миокарда. Коронарный кровоток в донорском сердце оценивали *in vivo* методом ультразвуковой доплеровской флоуметрии. Через 3 часа после запуска кровотока донорское сердце эксплантировалось и подключалось к аппарату Лангендорфа для оценки сократимости левого желудочка, а затем миокард подвергался гистохимическому исследованию для установления объема необратимого повреждения миокарда путем окрашивания его срезов 1-процентным раствором трифенилтетразоля хлорида. **Результаты.** В группе кардиopleгического раствора на основе буфера Кребса–Хенселейта было выполнено 7 опытов. Размер необратимого повреждения миокарда составил $3,5 \pm 1,2\%$, объемная скорость коронарного кровотока — $4,5 \pm 1,3$ мл/мин, пульсовое давление в левом желудочке эксплантированного сердца на аппарате Лангендорфа — $70 \pm 6,3$ мм рт. ст. при диастолическом давлении 10 мм рт. ст. В группе Кустодиола ($n = 5$) ни в одном из опытов после запуска кровотока трансплантированное сердце не начало сокращаться, все 5 сердец остались в состоянии асистолии. В связи с этим после

окончания 3-часового периода реперфузии определение сократительной способности левого желудочка на аппарате Лангендорфа не осуществлялось. Коронарный кровоток составил всего $0,4 \pm 0,1$ мл/мин, что, вероятно, является следствием неадекватной кардиопротекции Кустодиолом. Из-за отсутствия адекватной реперфузии было невозможно точно оценить объем необратимого повреждения миокарда в группе Кустодиола. **Выводы.** Методика гетеротопической трансплантации сердца у крыс является адекватной и информативной для исследования ишемического и реперфузионного повреждения миокарда и для исследования методов защиты донорского сердца и позволяет оценивать эффективность кардиоплегических и кардиоконсервирующих растворов. Кардиоплегический раствор на основе буфера Кребса–Хенселейта в сравнении с раствором Кустодиол обладает более выраженной кардиопротективной эффективностью при экспериментальной гетеротопической трансплантации донорского сердца.

Ключевые слова: внутрисердечная гемодинамика, пульсовое внутрижелудочковое давление, кардиопротекция, консервирующий раствор, скорость коронарного потока, трансплантация донорского сердца

Для цитирования: Галагудза М. М., Минасян С. М., Дмитриев Ю. В., Полещенко Я. И., Шубина П. Ю., Процак Е. С., Усков И. С., Сонин Д. Л., Кутенков А. А., Власов Т. Д. Сравнение гемодинамических и инфаркт-лимитирующих эффектов консервирующего раствора на основе буфера Кребса–Хенселейта и раствора Кустодиол на модели гетеротопической трансплантации сердца крысы. Артериальная гипертензия. 2019;25(1):84–89. doi:10.18705/1607-419X-2019-25-1-84-89

Comparison of hemodynamic and infarct-limiting effects of preservation solution based on Krebs–Henseleit buffer and HTK solution in the rat model of heterotopic heart transplantation

M. M. Galagudza^{1,2}, S. M. Minasian^{1,2},
Yu. V. Dmitriev¹, Ya. I. Poleshenko²,
P. Yu. Shubina², E. S. Protsak², I. S. Uskov¹,
D. L. Sonin¹, A. A. Kutenkov², T. D. Vlasov²

¹ Almazov National Medical Research Center,
St Petersburg, Russia

² First Pavlov State Medical University of St. Petersburg,
St Petersburg, Russia

Corresponding author:

Mikhail M. Galagudza,
Almazov National Medical
Research Centre,
2 Akkuratov street, St Petersburg,
197341 Russia.
E-mail: goncharova_ns@almazovcentre.ru

Received 20 December 2018;
accepted 27 December 2018.

Abstract

Objective. To compare the cardioprotective efficacy of a preservation solution based on Krebs–Henseleit buffer and HTK solution in the model of heterotopic heart transplantation in rat. **Design and methods.** A study was conducted on 12 Wistar rats. The animals were divided into groups depending on the preservation solution used: 1) Krebs–Henseleit buffer-based solution ($n = 7$), 2) HTK ($n = 5$). Each experiment consisted of collecting donor heart, preserving it with an appropriate cardioplegic solution, heterotopic transplantation into a recipient rat followed by explantation and evaluation of left ventricular contractility using the Langendorff model and histochemical assessment of the irreversible myocardial damage. Coronary blood flow in the donor heart was assessed *in vivo* using ultrasound doppler flowmetry. After 3 hours, the donor heart was explanted and connected to the Langendorff apparatus to assess left ventricular contractility, and the myocardium was subjected to histochemical staining with 1 % triphenyltetrazolium chloride for the assessment of the irreversible myocardial

damage. **Results.** In the group of Krebs–Henseleit buffer-based cardioplegic solution, 7 experiments were performed. Myocardial infarct size was $3,5 \pm 1,2\%$, the coronary flow rate was $4,5 \pm 1,3$ ml/min, and the developed left ventricular pressure of the donor heart was $70 \pm 6,3$ mmHg at diastolic left ventricular pressure of 10 mmHg. In the HTK solution group ($n = 5$), in all of the experiments after the start of blood flow, the transplanted heart did not begin to contract, and all 5 hearts remained in an asystole state. Therefore, after the end of the 3-hour reperfusion period, the assessment of the contractility of the left ventricle using the Langendorff apparatus was not carried out. Coronary flow rate was only $0,4 \pm 0,1$ ml/min, probably resulting from inadequate cardioprotection with HTK solution. Due to the lack of adequate reperfusion, the accurate assessment of the irreversible myocardial damage was impossible in the HTK solution group. **Conclusions.** The technique of heterotopic heart transplantation in rats is adequate and informative for the study of ischemia-reperfusion myocardial damage as well as for the study of the effectiveness of cardioplegic and cardiac preservation solutions. Cardioplegic solution based on Krebs–Henseleit buffer demonstrated greater cardioprotective effectiveness in our model compared to HTK solution.

Key words: intracardiac hemodynamics, developed left ventricular pressure, cardioprotection, preservation solution, coronary flow rate, donor heart transplantation

For citation: Galagudza MM, Minasian SM, Dmitriev YuV, Poleshenko YaI, Shubina PYu, Protsak ES, Uskov IS, Sonin DL, Kutenkov AA, Vlasov TD. Comparison of hemodynamic and infarct-limiting effects of preservation solution based on Krebs–Henseleit buffer and HTK solution in the rat model of heterotopic heart transplantation. Arterial'naya Gipertenziya = Arterial Hypertension. 2019;25(1):84–89. doi:10.18705/1607-419X-2019-25-1-84-89

Введение

Разработка новых кардиоплегических и органоконсервирующих растворов является актуальной задачей современной кардиохирургии и трансплантологии [1–6]. Наиболее простой и распространенной экспериментальной моделью для исследования эффективности кардиоплегических и кардиоконсервирующих растворов является методика перфузии изолированного сердца по Лангендорфу [1–5]. Одним из серьезных недостатков этой модели является невозможность осуществить реперфузию сердца нативной кровью животного, что, безусловно, вносит свои коррективы в результаты [1]. 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. Альтернативой может являться трансплантация сердца. Если на крупных лабораторных животных эта процедура по технике исполнения эквивалентна трансплантации сердца у человека, то у мелких грызунов классическая ортотопическая трансплантация сердца с искусственным кровообращением на данный момент развития экспериментальных подходов неосуществима. Для таких животных разработана модель гетеротопической пересадки сердца, когда донорское сердце пересаживается в брюшную полость, после пересадки не выполняет насосной функции, а животное-реципиент обеспечивает его перфузию кровью [8, 9]. Фактически данный экспериментальный прием эквивалентен длительной перфузии изолированного сердца аллогенной кровью.

В рамках пилотного проекта по внедрению данной методики нами было выполнено исследование сравнительной эффективности двух кардиоплегических растворов: Кустодиола и кардиоплегического раствора собственной разработки на основе буфера Кребса–Хенселейта. Растворы этой серии были разработаны ранее и исследованы на общепринятой модели перфузии изолированного сердца по Лангендорфу; некоторые растворы этой линейки показали высокую эффективность в сравнении с кардиоплегическим раствором госпиталя святого Томаса № 2 и Кустодиолом [2, 4, 5]. Кустодиол в качестве раствора сравнения был выбран как широко используемый для консервации донорских органов, а также для кристаллоидной кардиopleгии [7]. В ходе дальнейших мероприятий по совершенствованию растворов данной серии было решено протестировать их на модели гетеротопической трансплантации сердца у крыс.

Цель исследования — изучить кардиопротективные эффекты консервирующего раствора на основе буфера Кребса–Хенселейта и раствора Кустодиол на модели гетеротопической трансплантации сердца крысы.

Материалы и методы

Данное исследование включало в себя 2 экспериментальные группы, единственное отличие между которыми заключалось в различных кардиоплегических растворах, вводимых в коронарное русло донорского сердца. Все эксперименты проводились на крысах стока Вистар SPF категории (питомник «Пушино») массой 230–270 г. Содержание живот-

ных и методика проведения экспериментов полностью соответствовали принципам гуманного обращения с животными и были одобрены биоэтической комиссией. Животные распределялись случайным образом. Каждый эксперимент состоял из изъятия донорского сердца крысы, его консервации соответствующим кардиоплегическим раствором, гетеротопической трансплантации крысе-реципиенту после стандартного времени экспозиции с последующей эксплантацией, оценкой сократительной способности левого желудочка на модели Лангендорфа и гистохимическим определением объема необратимого повреждения миокарда с помощью окрашивания трифенилтетразолия хлоридом (ТТХ). Крысы-доноры наркотизировались хлоралгидратом внутривенно в дозе 450 мг/кг, подключались к аппарату искусственной вентиляции легких, после широкой двухсторонней торакотомии с пересечением грудины и перевязкой всех вен, впадающих в камеры сердца единой лигатурой, сердце эксплантировалось и сразу же консервировалось *ex vivo* кардиоплегическим раствором, вводимым в восходящую аорту ретроградно в течение 10 минут под постоянным перфузионным давлением 80 мм рт. ст. Температура вводимого раствора при этом составляла +5 °С. После окончания перфузии сердце находилось в охлажденном до +5 °С соответствующем консервирующем растворе; до момента запуска кровотока в нем при трансплантации проходило в среднем 2 часа.

Животных-реципиентов наркотизировали изофлюраном (1,5–1,8 %) через маску на спонтанном дыхании. После выполнения продольной срединной лапаротомии с использованием микрохирургической техники и стереомикроскопа в инфраренальном сегменте аорта и задняя полая вена выделялись на протяжении 15–20 мм. Затем формировались артериальный анастомоз между аортой крысы-реципиента и восходящей аортой донорского сердца и венозный анастомоз между стволом легочной артерии донорского сердца и задней полую веной реципиента. После проведения окончательного гемостаза и контроля инородных тел на брюшную аорту проксимальнее анастомоза накладывался доплеровский датчик (Transonic Inc., США) для измерения объемной скорости кровотока, которая равнялась величине коронарного кровотока в донорском сердце, так как дистальный сегмент брюшной аорты оставался перевязанным. Затем лапаротомная рана ушивалась, и животное-реципиент оставалось под анестезией в течение 3 часов. После повторной лапаротомии донорское сердце эксплантировалось и подключалось к аппарату Лангендорфа для оценки сократимости левого желудочка, а затем

миокард подвергался гистохимическому исследованию для установления объема необратимого повреждения миокарда путем окрашивания его срезов 1-процентным раствором ТТХ. Таким образом, оценочными критериями состояния трансплантированного сердца являлись: размер необратимого повреждения миокарда, сократимость левого желудочка *ex vivo*, объемная скорость коронарного кровотока. Результаты представлены в виде «среднее $\pm$ среднеквадратическое отклонение».

Результаты и их обсуждение

В группе кардиоплегического раствора на основе буфера Кребса–Хенселейта было выполнено 7 опытов. Размер необратимого повреждения миокарда составил $3,5 \pm 1,2\%$, объемная скорость коронарного кровотока — $4,5 \pm 1,3$ мл/мин, пульсовое давление в левом желудочке эксплантированного сердца на аппарате Лангендорфа — $70 \pm 6,3$ мм рт. ст. при диастолическом давлении 10 мм рт. ст.

В группе Кустодиола ($n = 5$) ни в одном из опытов после запуска кровотока трансплантированное сердце не начало сокращаться, все 5 сердец остались в состоянии асистолии. В связи с этим после окончания 3-часового периода реперфузии определение сократительной способности левого желудочка на аппарате Лангендорфа не осуществлялось. Коронарный кровоток составил всего $0,4 \pm 0,1$ мл/мин, что соответствует 10 % от нормы и, вероятно, является следствием тяжелого ишемического-реперфузионного повреждения миокарда и микрососудистого русла из-за неадекватной кардиопротекции Кустодиолом. Вследствие отсутствия адекватной реперфузии была значительно затруднена интерпретация результатов окрашивания срезов миокарда ТТХ. Несмотря на то, что визуально объем необратимо поврежденного миокарда был значительным, точное определение стандартными программными методами из-за некачественной «отмывки» срезов в процессе реперфузии не представлялось возможным. Все это послужило основанием для ограничения данной экспериментальной группы столь малым числом экспериментов.

Данное сравнительное исследование Кустодиола и кардиоплегического раствора на основе буфера Кребса–Хенселейта не является первым. Ранее на модели перфузии изолированного сердца крысы по Лангендорфу сравнительное исследование различных кардиоплегических растворов также показало более низкую эффективность Кустодиола не только в сравнении с различными кардиоплегическими растворами, созданными на основе буфера Кребса–Хенселейта, но и в сравнении с раствором госпиталя святого Томаса № 2 [2, 5]. Сопоставимые

с этими результатами, полученные в настоящей работе на модели гетеротопической трансплантации сердца у крыс данные позволяют считать данную методику адекватной и пригодной для дальнейших исследований в этом направлении. Очевидно, что для растворов с низким кардиопротективным потенциалом необходимо уменьшать время ишемии с целью получения пригодных для количественного анализа результатов. Также, вопреки распространенному мнению, перфузия на аппарате Лангендорфа исходно функционально скомпрометированного сердца с целью оценки его сократительной способности вполне возможна. При этом, несмотря на то, что истинная величина диастолического давления в левом желудочке при естественной преднагрузке неизвестна, создание фиксированного диастолического давления за счет дозированного увеличения объема левожелудочкового баллона позволяет получить объективную информацию о систолической функции.

Выводы

Методика гетеротопической трансплантации сердца у крыс является адекватной и информативной для исследования ишемически-реперфузионного повреждения миокарда и для исследования методов защиты донорского сердца. В частности, данная методика позволяет оценивать эффективность кардиоплегических и кардиоконсервирующих растворов. Кардиоплегический раствор на основе буфера Кребса–Хенселейта продемонстрировал более высокую эффективность в исследовании на данной модели, чем Кустодиол.

Финансирование

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-04-02061 «МикроРНК-223-5p и -3p — зависимые механизмы некроптоза в миокарде сердечного аллогraftа при трансплантации донорского сердца». / The study is supported by the grant of the Russian Foundation of the Fundamental Research # 17-04-02061 «MicroRNA-223-5p and -3p-dependent mechanisms of the necroptosis in myocardium of the heart allograft in the transplantation of the donor's heart».

Конфликт интересов / Conflict of interest

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

Список литературы / References

1. Минасян С. М., Галагудза М. М., Сонин Д. Л., Боброва Е. А., Зверев Д. А., Королёв Д. В. и др. Методика перфузии изолированного сердца крысы. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2009;4(32):54–59. [Minasian SM, Galagudza MM, Sonin DL, Bobrova EA, Zverev DA, Korolev DV et al. The technique of isolated rat heart perfusion. Regionarnoye krovoobrashcheniye i mikrotsirkulyatsiya = Regional Hemodynamics and Microcirculation. 2009;4(32):54–59. In Russian].
2. Минасян С. М., Галагудза М. М., Васильева М. С., Курापеев Д. И., Зверев Д. А. Защита миокарда от глобальной ишемии/реперфузии с использованием кардиоплегического раствора на основе буфера Кребса–Хенселейта. Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. 2010;(96)4:353–361. [Minasian SM, Galagudza MM, Vasil'eva MS, Kurapeev DI, Zverev DA. Myocardial protection against global ischemia-reperfusion with use of Krebs–Henseleit buffer-based cardioplegic solution. Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I. M. Sechenova = Russian Journal of Physiology. 2010;(96)4:353–361. In Russian].
3. Минасян С. М., Галагудза М. М., Дмитриев Ю. В., Карпов А. А., Боброва Е. А., Красичков А. С. и др. Консервация донорского сердца: история и современность с позиции трансляционной медицины. Региональное кровообращение и микроциркуляция. 2014; 3(51): 4–16. [Minasian SM, Dmitriev YuV, Karpov AA, Bobrova EA, Krasichkov AS et al. Donor heart preservation: history and current status in terms of translational medicine. Regionarnoye krovoobrashcheniye i mikrotsirkulyatsiya = Regional Hemodynamics and Microcirculation. 2014;3(51):4–16. In Russian].
4. Минасян С. М., Дмитриев Ю. В., Галагудза М. М., Карпов А. А., Боброва Е. А., Власов Т. Д. Исследование инфаркт-лимитирующего эффекта консервирующих растворов на модели длительной холодовой консервации изолированного сердца крысы. Региональное кровообращение и микроциркуляция. 2015;3(55):78–81. <https://doi.org/10.24884/1682-6655-2015-14-3-78-81> [Minasian SM, Dmitriev YV, Galagudza MM, Karpov AA, Bobrova EA, Vlasov TD. The investigation of infarct-limiting effects of preservation solutions in the rat model of long-time static cold storage of isolated rat heart. Regionarnoye Kровоobrashcheniye i Mikrotsirkulyatsiya = Regional hemodynamics and microcirculation. 2015;3(55):78–81. <https://doi.org/10.24884/1682-6655-2015-14-3-78-81> In Russian].
5. Minasian S, Galagudza M, Dmitriev Y, Kurapeev D, Vlasov T. 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 S, Galagudza M, Dmitriev Y, Karpov A, Vlasov T. Preservation of the donor heart: from basic science to clinical studies. J Cardiovasc Thorac Surg. 2015. 20(4):510–9. doi:10.1093/icvts/ivu432
7. Edelman J, Seco M, Dunne B, Matzelle S, Murphy M, Joshi P et al. Custodiol for myocardial protection and preservation: a systematic review. Ann Cardiothorac Surg. 2013;2(6):717–728. doi:10.3978/j.issn.2225-319X.2013.11.10
8. Ruzza A, Vespignani R, Czer L, De Robertis M, Wu G, Trento A. Heterotopic heart transplantation in rats: improved anesthetic and surgical technique. Transplant Proceedings. 2010;42:3828–3832. doi:10.1016/j.transproceed.2010.07.097
9. Shan J, Huang Y, Li F, Luo L, Li C, Ke N et al. A modified technique for heterotopic heart transplantation in rats. J Surg Res. 2010;164(1):155–161. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jss.2009.05.024>

Информация об авторах

Галагудза Михаил Михайлович — доктор медицинских наук, директор Института экспериментальной медицины ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, профессор кафедры патофизиологии ПСПбГМУ им. И. П. Павлова;

Минасян Саркис Минасович — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник НИО микроциркуляции и метаболизма миокарда Института экспериментальной медицины ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Дмитриев Юрий Валерьевич — научный сотрудник НИЛ нанотехнологий Института экспериментальной медицины ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Полещенко Яна Игоревна — студентка ПСПбГМУ им. И. П. Павлова;

Шубина Полина Юрьевна — студентка ПСПбГМУ им. И. П. Павлова;

Процак Егор Сергеевич — студент ПСПбГМУ им. И. П. Павлова;

Усков Иван Сергеевич — лаборант-исследователь Института экспериментальной медицины ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Сонин Дмитрий Леонидович — кандидат медицинских наук, заведующий НИО микроциркуляции и метаболизма миокарда Института экспериментальной медицины ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Кутенков Алексей Анатольевич — студент ПСПбГМУ им. И. П. Павлова;

Власов Тимур Дмитриевич — доктор медицинских наук, заведующий кафедрой патофизиологии ПСПбГМУ им. И. П. Павлова.

Author information

Mikhail M. Galagudza, MD, PhD, DSc, Director, Institute of Experimental Medicine, Almazov National Medical Research Centre, Professor, Department of Pathophysiology, First Pavlov State Medical University of St. Petersburg;

Sarkis M. Minasian, MD, PhD, Senior Researcher, Institute of Experimental Medicine, Almazov National Medical Research Centre;

Yuri V. Dmitriev, MD, Researcher, Institute of Experimental Medicine, Almazov National Medical Research Centre;

Yana I. Poleshenko, Student, First Pavlov State Medical University of St. Petersburg;

Polina Y. Shubina, Student, First Pavlov State Medical University of St. Petersburg;

Egor S. Protsak, Student, First Pavlov State Medical University of St. Petersburg;

Ivan S. Uskov, MD, Technician, Institute of Experimental Medicine, Almazov National Medical Research Centre;

Dmitry L. Sonin, MD, PhD, Head, Laboratory of Myocardial Metabolism, Institute of Experimental Medicine, Almazov National Medical Research Centre;

Aleksey A. Kutenkov, Student, First Pavlov State Medical University of St. Petersburg;

Timur D. Vlasov, MD, PhD, DSc, Head, Department of Pathophysiology at the First Pavlov State Medical University of St. Petersburg.