

**МЕТОДИКА КОНСЕРВАЦИИ ДОНОРСКОГО СЕРДЦА EX VIVO**  
**PRESERVATION METHOD DONOR HEART EX VIVO**

**Е. О. Кузнецова**, студент

**Н. В. Садовников**, студент

Уральский государственный аграрный университет

(Екатеринбург, ул. Карла Либкнехта, 42)

*Рецензент:* О. Г. Петрова, доктор ветеринарных наук, профессор

**Аннотация**

Одной из главных задач в трансплантологии является сохранение на длительный срок донорских органов. В данный момент имеющиеся методы консервации донорского сердца не обеспечивают полного отсутствия негативного влияния эффектов ишемии, а в последующем и реперфузии. Мы предложили модифицированную методику персифляции для сохранения сердца, в которой постарались устранить все недостатки классической методики.

**Ключевые слова:** трансплантация, персифляция, донорское сердце.

**Summary**

One of the main tasks in transplantation is to preserve the right to term donor organs. At the moment of observation, donor heart preservation methods do not require a complete serious reduction in the severity of ischemia symptoms, and subsequently reperfusion. We have proposed a modified persufflation procedure for the collection of the heart, in which attempts have been made to stop the universal following of the procedures.

**Keywords:** transplantation, persufflation, donor heart.

Патологии сердечно сосудистой системы в ветеринарной медицине встречаются достаточно часто. По разным источникам от 5 до 23 % от всех заболеваний приходится на болезни сердца [2, 3, 4, 5, 6]. В гуманной медицине, в случае развития сердечной недостаточности конечной стадии, при которой медикаментозное лечение не эффективно (дилатационная кардиомиопатия, ишемическая болезнь сердца, аритмия), единственным вариантом спасения жизни пациента остается трансплантация донорского сердца. Одной из главных задач трансплантологии считается создание условий для сохранения клеток и тканей донорского органа. Основным повреждающим фактором клеток и тканей трансплантируемых органов является ишемия [1].

Ишемия – это полное или частичное прекращение артериального кровотока с немедленным кислородным голоданием клеток (гипоксией) с накоплением продуктов метаболизма. Ишемия действует на донорские органы на всех этапах: в организме донора, при изъятии, консервации, в процессе трансплантации и даже в раннем посттрансплантационном периоде. Несмотря на то, что охлаждение до 4–8°C изначально безопасно снижает метаболизм до уровня 10–15% от исходного с сохранением жизнедеятельности клеток и тканей, длительная холодовая ишемия приводит к истощению клеточного аденозинтрифосфата (АТФ) и ускорению гликолиза, а также к выработке молочной кислоты. Сочетание эффекта увеличения внутриклеточного ацидоза, активации лизосом, повышения уровня свободных пулов  $Ca^{2+}$  и  $Fe^{2+}$ , а также дисфункции митохондрий способствует формированию окислительного стрес-

са. Все это в последующем приводит к ишемически-реперфузионному повреждению донорских органов при возобновлении потока перфузионного раствора через сосудистую систему сердца (реперфузии).

Ишемически-реперфузионное повреждение (ИРП) – это сложный комплекс многофакторных процессов, во время которых происходит запуск иммунных реакций, проявляющихся системной воспалительной реакцией, направленной на развитие острого криза отторжения, что является дополнительным повреждающим фактором. ИРП, как следствие реперфузии, может развиваться через несколько часов или дней после первоначального повреждения.

При реперфузии происходит как повышение уровня кислорода, так и нормализация внеклеточного рН. Эта нормализация опасна для клеток, ранее подвергшихся ишемии. Действительно, после реперфузии происходит дальнейшее увеличение цитоплазматических и митохондриальных кальциевых перегрузок, которые активируют кальпаины, вызывающие нарушение клеточной структуры и гибель клеток. Возвращение к нормоксии вызывает большую выработку активных форм кислорода и снижение уровня антиоксидантной способности [9, 14]. Активные формы кислорода способствуют повреждению мембран и цитоскелета кардиомиоцитов [13]. Увеличение активных форм кислорода и повышенное содержание кальция в митохондриях вызывают гибель клеток посредством различных механизмов, таких как апоптоз, некроз и аутофагия [12, 13].

Понимание механизмов повреждения клеток при консервации донорских органов лежит в основе разработки консервирующих растворов, а также режимов аппаратной перфузии [3, 8].

Для сохранения донорского сердца используют различные растворы: Раствор Висконсинского университета, Кустодиол, Целсиор. В трансплантологии сердца известны такие методы консервации, как статическое холодное хранение, гипотермическая машинная перфузия и нормотермическая машинная перфузия [10,16]. Еще одним методом, не получившим широкого распространения, является нагнетание в коронарное русло газовых смесей различного состава– персуффляция.

Ни один из применяющихся на сегодняшний день методов противоишемической защиты миокарда не даёт гарантию отсутствия негативного влияния эффектов ишемии. В России для консервации донорского сердца применяют холодное статическое хранение с использованием Кустодиола. Исследования в области трансплантологии указывают на то, что методы статического холодного хранения приводят к негативным последствиям холодной ишемии и не способны обеспечить достаточное количество кислорода в органах [15]. Данный факт диктует необходимость расширения арсенала мероприятий по кардиопротекции.

В рамках нашей научной гипотезы выдвинуто предположение, что модифицированная методика персуффляции может стать перспективным методом консервации сердца, при условии устранения имеющихся недостатков. При помощи персуффляции может доставляться больше кислорода на грамм ткани, чем при использовании методов статического холодного хранения или машинной перфузии растворами. Так же газообразный перфузат имеет меньшую вязкость, может достигать большего количества участков органа и не вызывает отека. Экспериментальные данные подтверждают способность продлевать время консервации и реанимировать органы [11].

Из-за своих недостатков этот метод долгое время не использовали. В зависимости от концентрации газообразного кислорода возможно гипероксическое повреждение тканей, т.е. нарушение транспорта газа и повреждение мембран клеток. Так же велик риск повреждения ткани из-за высыхания эндокарда. Если газ не увлажняется должным образом во время длительного хранения, возможен риск повреждения сосудистых структур. Существенными

недостатками метода являются отсутствие питания тканей и менее эффективное удаление продуктов метаболизма.

В связи со всем сказанным, было решено провести серию экспериментов по сохранению сердечной ткани методом персифлюции с использованием различных газовых смесей.

Объектом исследования были изолированные сердца самцов крыс линии Wistar массов тела 180-250 гр. в количестве 7 голов. Животных вводили в наркоз, после чего приступали к извлечению сердечно-легочного препарата. Для доступа использовали билатеральную трансабдоминальную торакотомия. После извлечения сердечно-легочный препарат подключали к модифицированной установке Лангендорфа (рис.1) путем канюлирования аорты и начинали ретроградную персифлюцию модифицированным раствором Кребса-Хенселейта (таб. 1). Раствор барбатировали карбогеном (5% CO<sub>2</sub>, 95% O<sub>2</sub>) для насыщения его кислородом и поддержания рН на уровне 7,4. Персифлюцию проводили при давлении 80 мм рт. ст. и температуре 37°C.

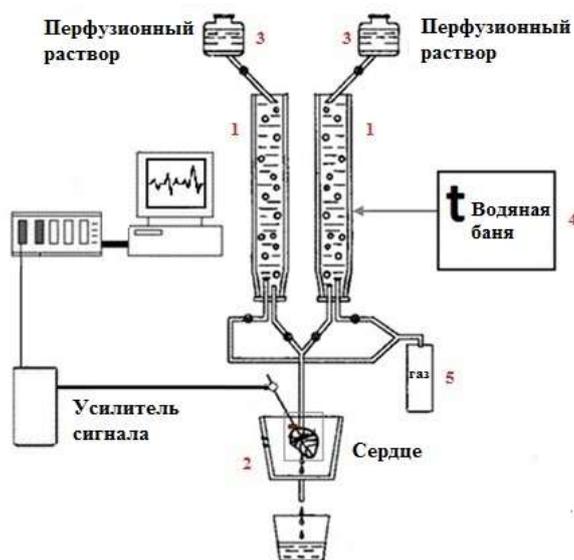


Рис. 1. Модифицированная установка Лангендорфа [7]

Таблица 1

**Состав модифицированного раствора Кребса–Хенселейта**

Компонент	Концентрация, ммоль/л
Na <sup>+</sup>	143
K <sup>+</sup>	5,9
Ca <sup>2+</sup>	1,2
Mg <sup>2+</sup>	1,2
Cl <sup>-</sup>	125,1
HCO <sub>3</sub>	25
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	1,2
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1,2
Глюкоза	11

Методом ретроградной персифлюзии осуществляли освобождение сосудистой системы сердца от крови и заполнение её персифлюзионным раствором. В это время от сердца отделяли лёг-

кие, околосердечный жир и перикард. Надсекали ушко левого предсердия и вводили в полость левого желудочка канюлю с баллончиком для измерения частоты сердечных сокращений, систолического и диастолического давления. Также в системе присутствовал датчик потока, измеряющий объёмную скорость коронарной перфузии. После подключения к перфузионной системе, сердце погружали в ёмкость с перфузионным раствором и проводили регистрацию контрольных параметров в течение 5 минут.

После периода стабилизации перфузионный раствор заменяли на охлаждённый (4-8°C) кардиоплегический раствор Кустодиолаи перфузировали сердце до полного прекращения сокращений. Затем сердце с канюлей переносили в экспериментальную установку для консервации и начинали введение газовых смесей в коронарное русло.

Далее следовал период хранения консервированного сердца в экспериментальной установке (рис.2) в течение 6 часов. Экспериментальная установка для консервирования сердца представляет собой герметичную камеру с электронно-управляемой помпой для подачи газовой смеси и системой охлаждения. Таким образом, обеспечивалась регулярная подача газовой смеси с заданным давлением и температура хранения в диапазоне 4-6°C. Газовая смесь для персифляции содержала 70 % кислорода и 30% аргона и подавалась из заранее охлаждённых баллонов для газовых смесей через систему увлажнения, представляющую собой систему барбатирования (рис. 3).

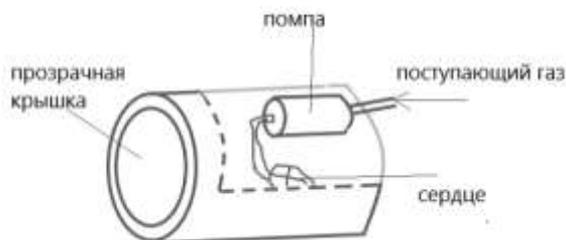


Рис. 2. Экспериментальная установка для консервирования сердца



Рис. 3. Система увлажнения газовой смеси

Затем сердце возвращали на аппарат Лангендорфа и начинали период реперфузии в течение 60 минут с регистрацией функциональных показателей (объёмная скорость коронарной перфузии, ЧСС, систолическое и диастолическое давление в полости левого желудочка) на 10, 20, 30, 40, 50 и 60 минутах перфузии.

После проведения измерений сердце снимали с аппарата Лангендорфа, проводили его секционирование (поперечные срезы толщиной 1-2 мм) и окраску 2,3,5-трифенилтетразолином хлористым (ТТЗ) с последующим измерением объёма необратимо повреждённого миокарда.

Таким образом, данная методика решает проблемы классической методики персuffляции. Для предотвращения повреждения ткани из-за высыхания эндокарда производилось обильное увлажнение газовой смеси методом барбатирования в герметичной ёмкости с охлаждённым раствором Кребса-Хенселейта, а герметичность самой экспериментальной установки обеспечивала сохранение влаги, поступающей в камеру.

Для защиты от гипероксического влияния на ткани в состав газовой смеси были добавлены инертные газы, которые снижали активность кислорода, не вступая при этом в самостоятельные реакции. Кроме того, тяжёлые молекулы Аргона способствуют вытеснению молекул двуокиси углерода (CO<sub>2</sub>) из тканей сердца, тем самым участвуя в процессе выведения метаболитов.

Отсутствие питания тканей и менее эффективное удаление продуктов метаболизма компенсируется рекомендованным сроком хранения не более 6 часов.

### Библиографический список

1. *Аванесян Р. А., Ивлева А. Д.* Экспериментально-лабораторное исследование методов консервирования биотрансплантатов // *Современные проблемы науки и образования*. 2015. С. 342.
2. *Гончаренко О. Н., Веремеева С. А.* Основные этапы развития ветеринарной анатомии в Тюменской области // *Вестник КрасГАУ*. 2020. № 7 (160). С. 145-150.
3. *Калашиников А. Е., Прибил Дж., Кочетков А. А.* Составление простых линейных моделей для прогноза племенной ценности животных // *Молочное и мясное скотоводство*. 2020. № 4. С. 13-16.
4. *Калашиников А. Е., Прибил Дж., Кочетков А. А.* Составление линейных моделей для прогноза племенной ценности животных в геномной оценке // *Молочное и мясное скотоводство*. 2020. № 5. С. 28-32.
5. *Краснолобова Е. П.* Особенности электрокардиограммы при дилатационной кардиомиопатии у собак // *Интеграция науки и практики для развития агропромышленного комплекса: материалы 2-ой национальной научно-практической конференции*. Тюмень: Государственный аграрный университет Северного Зауралья, 2019. С. 141-144.2.
6. *Резник О. Н., Скворцов А. Е., Мойсюк Я. Г.* Сохранение и перфузионная реабилитация донорских органов: достижения последнего десятилетия // *Альманах клинической медицины*. 2020. 48 (3). С. 193-206.
7. *Харьковская Е. Е., Жидкова Н. М., Другова О. В., Осипов Г. В., Мухина И. В.* Изучение электрических свойств изолированного сердца крысы // *Электронное учебно-методическое пособие*. Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2016. 28 с.
8. *Юшков Ю. Я., Голдштейн М. Д.* Современные технологии консервации органов: материалы 7-й конференции «Московская трансплантология». 2017. С. 256-258.
9. *Bayrak O., Bavbek N., Karatas O. F., Bayrak R., Catal F., Cimentepe E., Akbas A., Yildirim E., Unal D., Akcay A.* Nigella sativa protects against ischaemia/reperfusion injury in rat kidneys. *Nephrol Dial Transplant*. 2008. № 23. P. 2206-2212
10. *Buhagiar A. J., Freitas L., Scott W E.* III. Persufflation—Current State of Play. *Transplantation*. 2021. № 2 (3). P. 362-378.
11. *Burns B. D., Robson J. G., Smith G. K.* The survival of mammalian tissues perfused with intravascular gas mixtures of oxygen and carbon dioxide // *Can J Biochem Physiol*. 1958. № 36. P. 499-504.

12. *Gottlieb R. A.* Cell death pathways in acute ischemia/reperfusion injury // *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2011. № 16. P. 233-238.
13. *Kalogeris T., Baines C. P., Krenz M., Korthuis R. J.* Cell biology of ischemia/reperfusion injury // *Int Rev Cell Mol Biol.* 2012. № 298. P. 229-317.
14. *Li C., Jackson R. M.* Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury // *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002. № 282. P. 227.
15. *Papas K. K., Hering B. J., Guenther L, Rappel M. J., Colton C. K., Avgoustiniatos E. S.* // Pancreas oxygenation is limited during preservation with the two-layer method. *Transplant Proc.* 2005. № 37. P. 3501-3504.
16. *Weegman B. P., Kirchner V. A., Scott W. E., Avgoustiniatos E. S., Suszynski T. M., Ferrer-Fabrega J, Rizzari M. D., Kidder L. S., Kandaswamy R., Sutherland D. E., Papas K. K.* // Continuous real-time viability assessment of kidneys based on oxygen consumption. *TransplantProc.* 2010. № 42. P. 2020-2023.