

**ПЕРФУЗИЯ ИЗОЛИРОВАННОГО СЕРДЦА МЕТОДАМИ
ЛАНГЕНДОРФА И НИЛЛИ: ОСОБЕННОСТИ ТЕХНИКИ
И ПРИМЕНЕНИЕ В СОВРЕМЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ**

Я.Г. Торопова^{1,2}, Н.Ю. Осяев³, Р.А. Мухамадияров⁴

¹ ФГБУ «Федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова»
Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

² ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
имени акад. И.П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

³ МБУЗ «Детская городская клиническая больница № 5», Кемерово, Россия

⁴ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем
сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Россия

Торопова Яна Геннадьевна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник НИЛ нанотехнологий Института экспериментальной медицины ФГБУ «Федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, ассистент кафедры патофизиологии ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени акад. И.П. Павлова» Минздрава России; *Осяев Николай Юрьевич* — врач-бактериолог МБУЗ «Детская городская клиническая больница № 5» г. Кемерово; *Мухамадияров Ринат Авхадиевич* — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний».

Контактная информация: ФГБУ «Федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Россия, 197341. E-mail: yana.toropova@mail.ru (Торопова Яна Геннадьевна).

Резюме

Настоящая публикация представляет собой конкретные материалы в помощь при проведении перфузии изолированного сердца методами Лангендорфа и Нилли. В работе представлены и описаны принципиальные схемы установки для перфузии изолированного сердца данными методами, определена конкретная последовательность действий при осуществлении перфузии (на основании имеющегося опыта авторов), а также возможности использования модели перфузируемого изолированного сердца в научных исследованиях.

Ключевые слова: изолированное сердце, перфузия.

**PERFUSION OF THE ISOLATED HEART BY LANGENDORFF
AND NEELY METHODS: PARTICULAR TECHNIQUES AND APPLICATIONS
IN RECENT SCIENTIFIC RESEARCH**

Y.G. Toropova^{1,2}, N.Y. Osyayev³, R.A. Mukhamadiyarov⁴

¹ Federal Almazov Medical Research Centre, Saint-Petersburg, Russia

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

³ Children's Clinical Hospital № 5, Kemerovo, Russia

⁴ Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute
for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russia

Contact information: Federal Almazov Medical Research Center 197341, Akkuratova Street 2, St. Petersburg, Russian Federation. E-mail: yana.toropova@mail.ru (Yana G. Toropova — PhD, Senior Researcher at Nanotechnology Research Laboratory Institute of Experimental Medicine Federal Almazov Medical Research Center; Assistant of the Department of Pathophysiology, First Pavlov State Medical University).

Abstract

This publishing is the particular matter to help for a performance of perfusion of the isolated heart by Langendorff and Neely methods. The publishing represents and describes the fundamental plan of an installation for the perfusion of the isolated heart by these methods, determines a specific succession of action while executing a perfusion (by current experience of these authors) and explores possibilities of using the model of perfusion of the isolated heart in the scientific research.

Key words: isolated heart, perfusion.

Статья поступила в редакцию 16.06.14 и принята к печати 07.08.14.

Введение

Широкая распространенность сердечно-сосудистой патологии в структуре заболеваемости населения развитых стран обуславливает необходимость изучения патогенетических механизмов ее развития, а также совершенствования методов лечения и профилактики. Отдельный научный интерес в указанном направлении представляет проведение экспериментальных исследований. Именно эксперимент дает возможность не только детально исследовать патофизиологические процессы в миокарде, находящегося в неблагоприятных условиях, но и оценить эффективность различных кардиопротективных воздействий, а также установить фундаментальные механизмы, лежащие в их основе.

Удобной моделью для этих целей является модель изолированного сердца. Основное преимущество подобных исследований по сравнению с работами, выполняемыми *in vivo*, состоит в том, что миокард в такой модели выведен из-под влияния регуляторных систем целого организма. Это дает возможность обнаружить изменения биохимических процессов и параметров функционирования миокарда, зависящие исключительно от нарушений его структуры и метаболизма.

Существует два способа перфузии изолированного сердца, принципиальным различием которых является способ подачи перфузата: в первом случае подача перфузионного раствора осуществляется ретроградно через аорту (метод Лангендорфа, предложенный австрийским физиологом Оскаром Лангендорфом в 1895 году) [1], во втором — через левое предсердие, что является физиологичным аналогом кровообращения (антеградный режим перфузии методом Нилли, разработанным в 1967 году Говардом Морганом и Джеймсом Нилли на

основе модели перфузируемого сердца по Лангендорфу) [2].

К сожалению, публикации, посвященные подробному описанию технического исполнения данных методов, в современной методической литературе представлены в весьма ограниченном количестве [3, 4]. Настоящая публикация представляет собой структурированную информацию, сочетающую конкретное описание алгоритма действий при проведении перфузии изолированного сердца, с методическими советами по осуществлению таковой (исходя из имеющегося опыта авторов).

Основные условия работы изолированного сердца

1. Необходима постоянная перфузия коронарных сосудов сердца перфузионным раствором. Существует несколько типов перфузионных растворов (Рингера, Рингера-Локка, Тироде), однако «золотым стандартом» для перфузии изолированного сердца теплокровных животных считается применение перфузионного буферного раствора Кребса-Хензеляйта [5] следующего состава (мМ): NaCl — 118,0; KCl — 4,7; MgSO₄ — 1,2; KH₂PO₄ — 1,2; CaCl₂ — 2,0; глюкоза — 5,5; NaHCO₃ — 25,0.

2. Перфузионная жидкость должна поступать в сердечные сосуды под постоянным давлением (обычно 60,0–100,0 см водяного столба).

3. Температура пропускаемой жидкости должна быть постоянной в пределах 37–38°C (за исключением экспериментов с гипо- или гипертермией).

4. Для поддержания окислительного метаболизма миокарда необходимо достаточное насыщение перфузионного раствора кислородом. Для оксигенации перфузионного раствора и доведения его pH до уровня 7,4 производится насыщение буферного раствора карбогеном (5 % CO₂ и 95 % O₂).

Методика подготовки препарата изолированного сердца

У предварительно наркотизированного животного удаляется кожный покров с грудной клетки и производится доступ к сердцу посредством билатеральной трансабдоминальной торакотомии. Затем иссекается перикард и обнажается сердце. Производится его захват большим и указательным пальцами левой руки за основание, осторожно подтягивая его вентрально и вниз, а ножницами перерезая магистральные сосуды.

Выделенное сердце помещается в охлажденный (2–4 °С) раствор Кребса-Хензеляйта. Однако, по мнению авторов, если время с момента выделения сердца из организма до начала перфузии составляет не более минуты, то необходимость в охлаждении отсутствует. После прекращения спонтанных сокращений выделяется аорта и отделяется соединительная ткань. Вокруг канюли накладывается свободная лигатура. Далее аорта натягивается на канюлю, предварительно заполненную перфузионным раствором во избежание попадания воздуха в аорту. Затем лигатура опускается так, чтобы она оказалась поверх аорты, и затягивается. После этого производится перфузия сердца.

Перфузия изолированного сердца методом Лангендорфа

Наиболее часто при проведении экспериментальных исследований на изолированном перфузируемом сердце используется методика

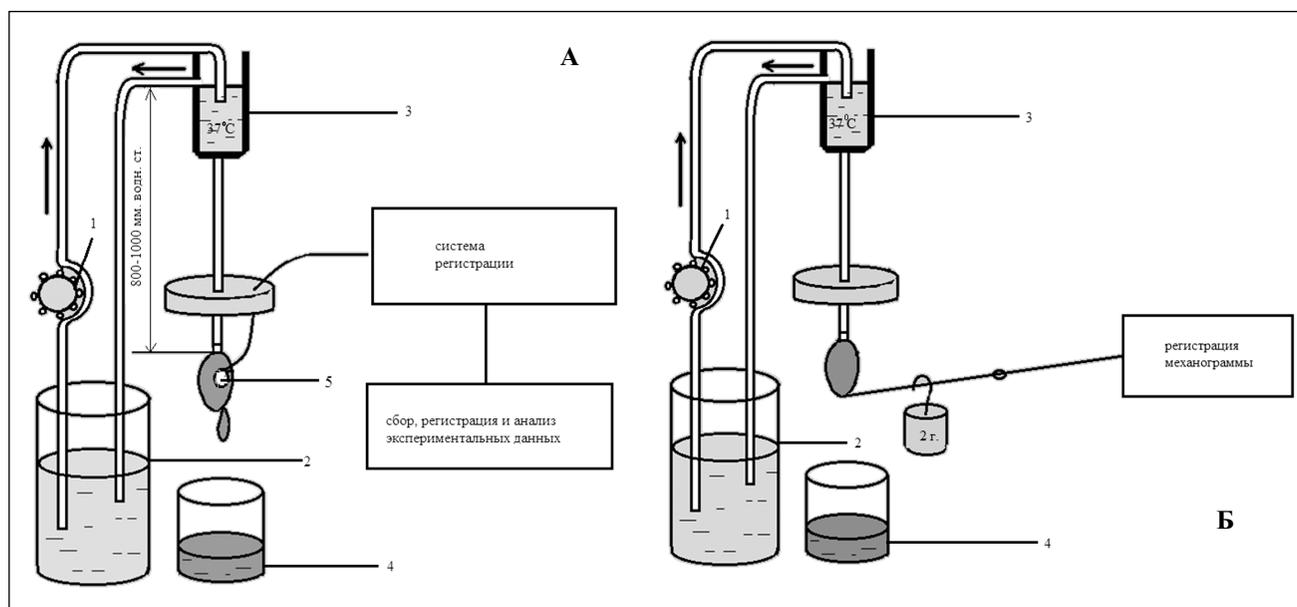
ретроградной перфузии (метод Лангендорфа), что обусловлено прежде всего относительной простотой ее исполнения и возможностью регистрации широкого спектра физиологических показателей, характеризующих состояние миокарда. В частности, модель перфузии изолированного сердца методом Лангендорфа позволяет определять следующие параметры функционирования миокарда: давление (систолическое и диастолическое), электрограмму, частоту сердечных сокращений (ЧСС), объемную скорость коронарной перфузии (коронарный кровоток) при перфузии постоянным давлением или перфузионное давление (давление в аортальной канюле) при перфузии постоянным объемом, механограмму сокращений.

Принципиальная схема установки для перфузии изолированного сердца методом Лангендорфа представлена на рис. 1. Перфузионный раствор подается в термостатируемую колонку с помощью перистальтического насоса. Перфузия изолированного сердца осуществляется в ретроградном направлении за счет избыточного давления — 800–1000 мм вод. ст.

Перфузия изолированного сердца методом Лангендорфа с регистрацией электрофизиологических показателей

При подготовке препарата работающего сердца с регистрацией давления, развиваемого левым желудочком (одного из важнейших параметров функционирования изолированного сердца), особое внимание необходимо уделить канюлированию

Рисунок 1. Принципиальная схема перфузии изолированного сердца методом Лангендорфа с регистрацией электрофизиологических показателей (А) и механограммы (Б)



Примечание: 1 — перистальтический насос, 2 — емкость для перфузионного раствора, 3 — перфузионная колонка, 4 — емкость для сбора перфузата, 5 — изолированное сердце.

аорты. В случае повреждения аортального клапана перфузионный раствор будет поступать в полость левого желудочка.

В левом предсердии за ушком делается разрез. Затем через него сначала в полость предсердия, а потом через митральный клапан в полость левого желудочка вводится латексный баллончик, соединенный с датчиком давления электроманометра (рис. 1А). После введения баллончик заполняется дистиллированной водой, объем которой достаточен для создания конечного диастолического давления в левом желудочке на уровне 10 мм рт. ст. При заполнении баллончика следует избегать попадания в него воздуха во избежание искажения результатов измерения. В течение всего последующего эксперимента объем баллончика не меняется. Оценку сердечной деятельности проводят регистрацией кривой внутрижелудочкового давления. Дальнейший расчет параметров сократимости изолированного сердца осуществляется с помощью оригинальных прикладных программ.

Регистрацию сократительной функции левого желудочка проводят через 20 мин от начала перфузии, необходимых для стабилизации показателей работы сердца. При помощи датчика давления регистрируют следующие показатели, характеризующие сократительную способность миокарда: систолическое давление (СД) и конечное диастолическое давление (КДД), ЧСС, максимальную скорость сокращения — МСС (рассчитывается как максимум производной первого порядка от кривой развития давления в левом желудочке, мм рт. ст. / с) и максимальную скорость расслабления — МСР (мм рт. ст./с).

Перфузия изолированного сердца методом Лангендорфа с регистрацией механограммы

Схема установки изолированного перфузии изолированного сердца методом Лангендорфа с регистрацией механограммы под механической нагрузкой отражена на рис. 1Б. Регистрация механических сокращений миокарда осуществляется с помощью специальных датчиков линейного перемещения. Важнейшей характеристикой функционирующей сердечной мышцы является зависимость между скоростью укорочения миокардиального волокна и развиваемым им напряжением. От степени растяжения волокон сердечной мышцы зависят характер и сила сердечных сокращений. Чем больше нагрузка на мышцу, тем меньше скорость ее сокращения. При уменьшении нагрузки скорость сокращения увеличивается. Сократительная активность сердца отражает уровень сопряжения метаболизма и механического сокращения кардиомиоцитов в миокарде.

Произведение ЧСС на амплитуду, массу груза и длительность периода сокращений характеризует механическую работу, выполняемую миокардом.

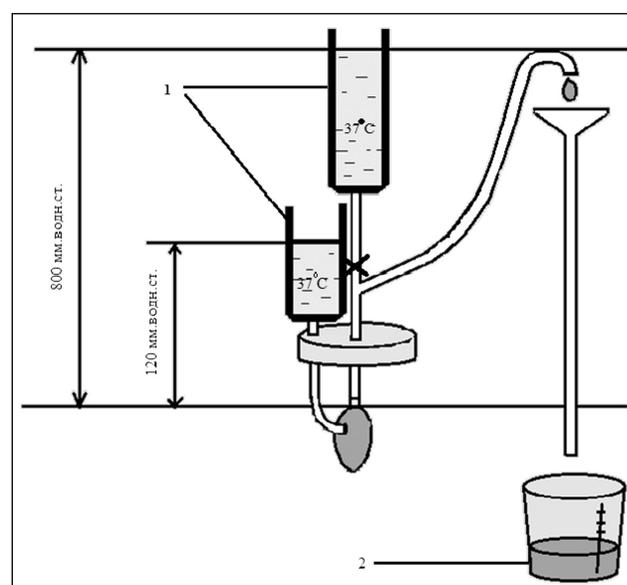
Таким образом, перфузия изолированного сердца методом Лангендорфа позволяет производить адекватную оценку сократительной функции миокарда. Кроме того, с помощью данной методики на основании информации о давлении, развиваемым левым желудочком, систолическом и диастолическом давлении, а также их производных параметров, существует возможность косвенно оценивать насосную функцию сердца.

Перфузия изолированного сердца методом Нилли

Перфузия изолированного сердца методом Нилли является более сложной в техническом исполнении относительно метода Лангендорфа, однако позволяет оценивать сократительную функцию миокарда и его способность к выполнению насосной функции в естественном режиме. Данный метод также является более предпочтительной моделью для оценки состояния желудочков.

Установка для осуществления перфузии изолированного сердца методом Нилли представлена на рис. 2. Необходимо отметить, что при перфузии сердца данным методом на начальном этапе сердце перфузируется методом Лангендорфа для обеспечения стабильности сердечной функции и дополнительного времени для подвода канюли через легоч-

Рисунок 2. Принципиальная схема перфузии изолированного сердца методом Нилли



Примечание: 1 — перфузионные колонки, 2 — емкость для сбора перфузата.

ную вену. Затем в одну из легочных вен вводится канюля, в которую подается перфузионный раствор под давлением 800–1200 мм вод. ст. Оставшиеся легочные вены лигируют. После этого подача перфузата через аорту перекрывается и в дальнейшем перфузия осуществляется в антеградном направлении. Таким образом, перфузат из левого желудочка изолированного сердца выбрасывается против гидростатического сопротивления, величина которого составляет 800 мм водяного столба. Поднимая уровень жидкости в колонке, сопротивление можно увеличивать до полного прекращения аортального выброса. В этом случае весь минутный объем (сумма аортального выброса и коронарного потока) направляется в коронарное русло.

Также существует возможность оценивать работу изолированного сердца в следующих условиях: при нагрузке объемом (в этом случае при постоянном гидростатическом сопротивлении можно увеличивать уровень перфузионного раствора в колонке, подсоединенной к левому предсердию) и при нагрузке сопротивлением (при увеличении гидростатического сопротивления с оптимальным постоянным давлением наполнения в левом желудочке).

Таким образом, при перфузии изолированного миокарда методом Нилли существует возможность оценивать объем и скорость сердечного выброса при физиологическом уровне гидростатической нагрузки (800–1200 мм водяного столба).

Заключение

В заключение следует отметить, что модель изолированного перфузируемого сердца на сегодняшний день находит широкое применение при изучении патофизиологии сердца в условиях различных патологических процессов, а также при различных протективных воздействиях. В частности, оно является удобной моделью для решения следующих научных задач:

- доклинической оценки влияния новых лекарственных средств на сократительную способность и метаболизм миокарда, тонус коронарных сосудов, частоту сердечных сокращений и электрофизиологические параметры сердечной мышцы [6];
- разработки способов консервации и хранения сердечного трансплантата с целью улучшения результатов трансплантации сердца [7, 8];
- изучения морфологических изменений в миокарде при воздействии различных факторов с помощью световой и электронной микроскопии, иммуногистохимических исследований и других подходов [9];

- изучения биохимических показателей миокарда и оттекающего от сердца перфузата в норме и при различных патологических процессах (ишемии-реперфузии, сахарном диабете и др.) [10];

- разработки методов защиты миокарда от ишемического и реперфузионного повреждения при моделировании тотальной или регионарной ишемии-реперфузии и изучения механизмов пре- и посткондиционирования миокарда, станнирования, гибернации [11–13];

- исследования антиаритмической эффективности различных субстанций и тестирования наличия проаритмической активности лекарственных средств путем регистрации электрограммы и монофазного потенциала действия [14, 15].

Литература

1. Langendorff O. Untersuchungen am uberlebenden Säugetierherzen // Pflügers Arch. — 1895. — Vol. 61. — P. 291–332.
2. Neely J.R. et al. Effects of ischemia on function and metabolism of the isolated working rat heart // Am. J. Physiol. 1973. — Vol. 225. — № 3. — P. 651–658.
3. Минасян С.М., Галагудза М.М., Сонин Д.Л. и др. Методика перфузии изолированного сердца крысы // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. — 2010. — № 8. — С. 54–59.
4. Merin R.G. The isolated heart preparation // Br. J Anaesth. — 1988. — Vol. 60. — № 8. — Suppl. 1. — P. 28S–34S.
5. Krebs H.A., Henseleit K. Untersuchungen ueber die Harnstoffbildung im Tierkoerper // Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. — 1932. — Vol. 210. — P. 33–36.
6. Писаренко О.И., Шульженко В.С., Студнева И.М. и др. Модифицированная реперфузия уменьшает повреждение изолированного сердца крысы после ишемии // Кардиологический вестник. — 2007. — № 1. — С. 13–16.
7. Минасян С.М., Галагудза М.М., Дмитриев Ю.В. и др. Консервация донорского сердца: история и современность с позиции трансляционной медицины // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. — 2014. — Т. 13, № 3. — С. 4–16.
8. Minasian S.M., Galagudza M.M., Dmitriev Y.V. et al. Preservation of the donor heart: from basic science to clinical studies. Interact CardioVasc Thorac Surg. — 2014. [Электронный ресурс]. doi:10.1093/icvts/ivu432. — P. 10.
9. Капелько В.И., Лакомкин В.Л., Цыпенкова В.Г. Функциональные и структурные изменения миокарда в ранней стадии действия адриамицина // Кардиологический вестник. — 2006. — Т. I (XIII), № 2. — С. 14–20.
10. Маслов Л.Н., Платонов А.А., Ласукова Т.В. и др. Активация 8-опиоидных рецепторов предупреждает появление необратимых повреждений кардиомиоцитов и усугубляет сократительную дисфункцию миокарда при ишемии-реперфузии // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 2006. — № 4. — С. 13–17.

11. *Торопова Я.Г., Мухамадияров Р.А., Головкин А.С.* Влияние различных концентраций липосомальной формы эноксипина на коронарный поток, сократительную и насосную функции изолированного сердца крысы в условиях тотальной нормотермической ишемии и реперфузии // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. — 2013. — № 7. — С. 869–875.

12. *Шляхто Е.В., Галагудза М.М., Сыренский А.В. и др.* Ишемическое посткондиционирование миокарда: новый способ защиты сердца от реперфузионного повреждения // Терапевтический архив. — 2005. — Т. 77, № 5. — С. 77–80.

13. *Шляхто Е.В., Петрищев Н.Н., Галагудза М.М. и др.* Кардиопротекция: фундаментальные и клинические аспекты. — СПб.: ООО Студия «НП-Принт», 2013. — 399 с.

14. *Королёв Д.В., Минасян С.М., Галагудза М.М.* Исследовательская установка для регистрации поверхностной электрограммы изолированного сердца лабораторных животных // Биотехносфера. — 2014. — № 5. — С. 49–53.

15. *Ласукова Т.В., Маслов Л.Н., Лишманов Ю.Б. и др.* Активация дельта1-опиоидных рецепторов предупреждает появление аритмий и необратимых повреждений кардиомиоцитов при ишемии и реперфузии сердца: роль внутриклеточного кальция // Вестник аритмологии. — 2004. — № 33. — С. 52–56.