

УДК 577.3

## ОЦЕНКА СОХРАННОСТИ МИОКАРДА КРЫСЫ И ИЗОЛИРОВАННОГО СЕРДЦА БАРАНА ПОСЛЕ ПРОЛОНГИРОВАННОЙ 24-ЧАСОВОЙ ГИПОТЕРМИЧЕСКОЙ КОНСЕРВАЦИИ ПОД ДАВЛЕНИЕМ ГАЗОВОЙ СМЕСИ НА ОСНОВЕ МОНООКСИДА УГЛЕРОДА

© 2020 г. Е.Е. Фесенко (мл.)\*, Е.Л. Гагаринский\*, А.С. Аверин\*, Н.В. Грудинин\*\*, А.Е. Гурин\*, Н.В. Шишова\*, Н.Э. Швирст\*, М.В. Гольтяев\*, А.Л. Ковтун\*\*\*

\*Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 3

E-mail: eugeny.ef@gmail.com

\*\*НМИЦ трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова Минздрава РФ, 123182, Москва, Шукшинская ул., 1

\*\*\*Фонд перспективных исследований, 121059, Москва, Бережковская наб., 22/3

Поступила в редакцию 08.05.2020 г.

После доработки 08.05.2020 г.

Принята к публикации 15.05.2020 г.

Подтверждены высокие органопротективные свойства газовой смеси на основе монооксида углерода СО и кислорода при пролонгированной 24-часовой гипотермической консервации сердца при 4°C. Показано, что консервация под давлением 6 атм смеси СО и О<sub>2</sub> обеспечивает эффективное восстановление сократительной активности изолированного сердца крысы после 24-часового хранения. Продолжительность работы сердца на стенде после реперфузии не отличалась от интактного контроля, зоны поврежденного миокарда при окрашивании трифенилтетразолием хлоридом отсутствовали. Исследование сократительной активности папиллярных мышц сердца в ответ на электрическую стимуляцию показало высокую функциональную сохранность ткани. В опытной группе зависимость «частота–сила», выраженность эффекта потенциации паузой и ответ на стимуляцию изопроterenолом в целом соответствовали нормальному миокарду крысы. Впервые газовая консервация успешно использована для сердца барана, по размерам и массе сравнимому с сердцем человека. Во всех экспериментах в опытной группе сокращения сердца самопроизвольно восстановились после начала перфузии. Результаты гистологического анализа не показали значительных различий в сердцах барана контрольной и опытной групп. Миокард опытной группы сохранял нормальную структуру ткани. Достигнутый срок консервации 24 ч в четыре раза превышает максимально разрешенные сроки стандартной холодовой консервации в консервирующих растворах. Полученные результаты на модели сердца крупного лабораторного животного подтверждают перспективность предлагаемого подхода для пролонгации хранения сердца человека.

*Ключевые слова:* монооксид углерода, кислород, газ, орган, трансплантация, хранение, сердце, крыса, баран, консервация, гипотермия.

DOI: 10.31857/S0006302920040213

Несмотря на достижения в области фармако-терапии различных заболеваний, трансплантация органа (почка, печень, сердце, легкие, поджелудочная железа) остается для ряда больных единственным методом лечения, существенно улучшающим качество и продолжительность жизни. Ежегодно в мире выполняется около 140000 трансплантаций [1], из них в России – порядка 2200 трансплантаций [2]. При этом количество пациентов, ожидающих операции, как в России, так и в мире в четыре-пять раз превышает количество проводимых операций. Ограничения на чис-

ло трансплантаций накладываются как общая нехватка органов из-за отсутствия доноров, так и малая длительность хранения трансплантатов, ограничивающая их транспортировку. Используемый в клинической практике метод сохранения донорских органов, предназначенных для трансплантации человеку – статическая холодовая консервация [3], которая не позволяет обеспечить их жизнеспособность и нормальную, прогнозируемую начальную функцию трансплантата при сроках консервации более 24 ч для почки, 12 ч – для печени и 6 ч – для сердца [4]. При таких

сроках хранения, особенно в отношении сердца, крайне затруднена логистика, в результате чего становится невозможным осуществлять забор органа в городах, удаленных от медицинских клиник, в которой осуществляется трансплантация. По этой причине значительная часть и так ограниченного донорского ресурса просто теряется.

В рамках работы по поиску новых научных подходов к длительному хранению органов наше внимание привлекли тканевые газовые мессенджеры, такие как оксид азота (NO), сероводород (H<sub>2</sub>S) и монооксид углерода (CO). Данные молекулы обладают высокой реакционной способностью, играют важную роль в регуляции различных физиологических и патологических реакций и способны влиять на метаболизм как при физиологической температуре, так и при гипотермии. Кроме того, они легко проникают через клеточные мембраны и обладают высокой скоростью диффузии в тканях, а значит, будут легко проникать в ткани трансплантата и легко удаляться из них без специальных процедур.

Среди газовых мессенджеров наиболее перспективным представляется монооксид углерода (CO). В литературе имеются данные об органопротекторных свойствах этого газа при тепловой и холодовой ишемии и об уменьшении негативных последствий ишемии/реперфузии [5–9]. В отдельных работах приводятся данные о двух-трехкратном улучшении физиологических показателей сердечного и почечного трансплантата, подвергшихся обработке монооксидом углерода по сравнению с контролем [10, 11]. В то же время информация о влиянии этого газа достаточно противоречива, что объясняется большими вариациями условий экспериментов. Так, в разных исследованиях используются концентрации CO от десятков миллионных долей до повышенных значений, обеспечиваемых давлением в 3–4 атм, различаются стадии воздействия (непосредственно перед извлечением органа, во время отключения кровотока или на стадии реперфузии *in vivo* или *ex vivo*), также варьирует форма введения CO (ингаляция, насыщение перфузионного раствора газом, помещение органа в атмосферу газа, введение в раствор хранения либо в кровоток препаратов-доноров CO). В серии недавних работ [12, 13] показана высокая сохранность трансплантатов сердца и задней конечности крысы при (24+)-часовой холодовой консервации под давлением смеси монооксида углерода и кислорода.

Нами ранее была произведена оценка оптимальной формы воздействия монооксидом углерода на ткани сердца при гипотермической консервации, а также исследованы возможные варианты конструкции аппаратной базы, необходимой для внедрения данного подхода в биомедицинскую практику [14]. Целями настоящей ра-

боты стало подтверждение высоких органопротективных свойств газовой смеси на основе монооксида углерода при гипотермической консервации на простых биологических моделях папиллярной мышцы и изолированного сердца крысы, а также исследование возможности масштабирования подхода газовой консервации с переходом от миокарда крысы массой 1.0–1.5 г к сердцу крупных лабораторных животных, сопоставимому по размеру и массе с сердцем человека (220–300 г).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Животные.** Исследование выполнено на самцах крыс линии Wistar массой  $250 \pm 20$  г ( $n = 40$ ) и самцах баранов романовской породы массой  $33 \pm 4$  кг ( $n = 9$ ), полученных из вивария ИБК РАН.

**Исследование папиллярной мышцы сердца крысы.** В исследование были включены две группы животных. В контрольной группе «К» ( $n = 5$ ) крыс наркотизировали, выделяли сердце, выделяли папиллярную мышцу и помещали ее в установку для изучения сократительной активности в ответ на электростимуляцию. В опытной группе (группа «СО»,  $n = 5$ ) крыс наркотизировали, выделяли сердце, осуществляли консервацию и хранение сердца под давлением CO при 4°C в течение 24 ч, выделяли папиллярную мышцу и помещали ее в установку для изучения сократительной активности в ответ на электростимуляцию.

### Оценка сохранности изолированного сердца крысы.

*Оценка максимальной продолжительности работы сердца крысы на перфузионном стенде.* В исследование были включены три группы животных. В контрольной группе «К» ( $n = 5$ ) крыс наркотизировали, выделяли сердце, помещали сердце на стенд и реперфузировали оксигенированным раствором Тироде, содержащим антиоксидант пероксиредоксин-6 (далее раствором Тироде), при 37°C до полной остановки сокращений с целью фиксировать максимальное время работы. В опытной группе «КСЛ» ( $n = 5$ ) крыс наркотизировали, выделяли сердце, осуществляли статическую холодовую консервацию в растворе препарата «Кустодиол» (Др. Франц Кёлер Хеми ГмБХ, Германия) и хранение сердца при 4°C в течение 24 ч, помещали сердце на стенд и реперфузировали раствором Тироде при 37°C в течение 3+ ч. В опытной группе «СО» ( $n = 5$ ) крыс наркотизировали, выделяли сердце, осуществляли консервацию и хранение сердца под давлением газовой смеси при 4°C в течение 24 ч, помещали сердце на стенд и реперфузировали раствором Тироде при 37°C до полной остановки сокращений. Стадию помещения на стенд и перфузии сердца для

всех трех групп проводили одновременно в параллельных экспериментах.

**Оценка инфарктной зоны.** В исследование были включены три группы животных: «К» ( $n = 5$ ), «КСЛ» ( $n = 5$ ) и «СО» ( $n = 5$ ). Эксперименты проводили, как описано в предыдущем разделе, за исключением того, что через 15 мин после начала перфузии раствором Тироде сердца снимали со стендов, готовили срезы и проводили их окрашивание на наличие инфарктных зон.

**Оценка сохранности изолированного сердца барана.** В исследование были включены две группы животных. В контрольной группе «К» ( $n = 4$ ) баранов наркотизировали, выделяли сердце, помещали сердце на стенд и реперфузировали раствором Тироде, через 5–15 мин работы на стенде ретроградной перфузии сердце снимали и разрезали на сегменты, часть препаратов фиксировали в 10%-м формалине для последующего гистологического анализа, часть препаратов окрашивали на инфарктные зоны. В опытной группе СО ( $n = 5$ ) баранов наркотизировали, выделяли сердце, осуществляли консервацию и хранение сердца под давлением газовой смеси при  $4^{\circ}\text{C}$  в течение 24 ч, затем помещали сердце на стенд и реперфузировали раствором Тироде. Далее проводили забор материала как для контрольной группы «К».

**Исследование электрической сократимости папиллярной мышцы сердца крысы.** После выделения сердца (группа «К») либо после гипотермического хранения (группа «СО») без предварительного отогрева хирургически выделяли папиллярную мышцу с сухожилием и прилегающим фрагментом стенки желудочка. Мышцу за сухожильную часть прикрепляли к механотрону 6X-2M (Россия), исследование проводили с помощью автоматизированной установки на основе персонального компьютера и плат АЦП–ЦАП собственного производства. Препарат перфузировали раствором Тироде ( $36^{\circ}\text{C}$ ) с помощью перистальтического насоса со скоростью 2 мл/мин. Раствор Тироде оксигенировали смесью  $\text{O}_2$  (95%) и  $\text{CO}_2$  (5%). Стационарную зависимость «частота–сила» изучали в интервале частот от 0.003 до 3 Гц. Эффект потенциации паузой исследовали на фоне частоты стимуляции 1 Гц. Для анализа функционального ответа папиллярной мышцы на адренергическую стимуляцию вводили препарат изопротеренол в концентрации 1 мкМ. Исследование проводили в течение 3+ часов.

**Наркотизация животных, выделение сердца и подготовка к консервации.** Наркотизацию крысы осуществляли смесью, состоящей из 20 мкл препарата «Золетил 100» и 80 мкл препарата «Ксила». После достижения наркоза проводили продольную срединную лапаротомию, далее в нижнюю полую вену вводили раствор гепарина объемом

1 мл из расчета 50 МЕ/мл. Спустя 5 мин проводили продольную срединную стернотомию, осторожно разводили ребра и вырезали сердце с частью аорты длиной не менее 1 см. Сердце помещали в охлажденный до  $4^{\circ}\text{C}$  раствор Тироде, вводили в аорту канюлю и фиксировали ее лигатурой.

Далее промывали сердце раствором Тироде ( $36^{\circ}\text{C}$ ) на модифицированной двухконтурной установке перфузии по Лангендорфу с двумя подключенными термостатами MiniStat 230 (Huber, Германия) и двумя перистальтическими насосами LongerPump BT100-2J (Китай). После отмывки сердца от крови проводили преклождение перфузии с теплового контура на холодовой, подводили термостатирующую рубашку и в течение 5 мин перфузировали сердце консервирующим раствором «Евро-Коллинз» ( $4^{\circ}\text{C}$ ) с добавлением антибиотика цефтриаксона (0.1 мг/мл). По достижении состояния кардиopleгии сердце снимали вместе с канюлей с установки и помещали в охлажденную до  $4^{\circ}\text{C}$  камеру.

Наркотизацию баранов проводили в два этапа. Внутримышечно вводили препарат «Ксила» из расчета 0.015 мл на 1 кг массы. Спустя 10 мин после наступления выраженного седативного эффекта внутримышечно вводили препарат «Золетил 100» из расчета 15 мг на 1 кг массы (во время операции могли дополнительно вводить препарат «Золетил» для поддержания анестезии). Наркотизированное животное фиксировали на операционном столе в положении на спине. Проводили интубацию трахеи с последующим подключением животного к аппарату искусственной вентиляции легких. Проводили полную продольную срединную стернотомию. Выделяли основные сосуды сердца (верхнюю и нижнюю полые вены, аорту и легочный ствол). Под полые вены подводили нить (шовный материал 3/0, 2/0) через магистральную силиконовую трубку, концы нити выводили из грудной полости. На нижнюю полую вену накладывали Z-образный шов и вводили гепарин из расчета 300 МЕ на кг массы тела. После удаления иглы шов затягивали. В аорту вводили кардиopleгическую канюлю, дистальнее сердца накладывали сосудистый зажим на аорту. Затягивали лигатуры на полых венах и подавали холодный ( $4^{\circ}\text{C}$ ) раствор «Евро-Коллинз» с добавлением антибиотика цефтриаксона (0.1 мг/мл) до полной остановки сердечных сокращений (300–400 мл/мин), сердце дополнительно обкладывали льдом. После остановки сердца накладывали сосудистый зажим на нижнюю полую вену дистальнее лигатуры, сердце деликатными ножницами выделяли из грудной полости, пересекали полые вены, аорту, легочный ствол и легочные вены. Сердце помещали в чашу с холодным раствором «Евро-Коллинз». В аорту вводили канюлю и накладывали кисет (шовный материал 4/0), далее

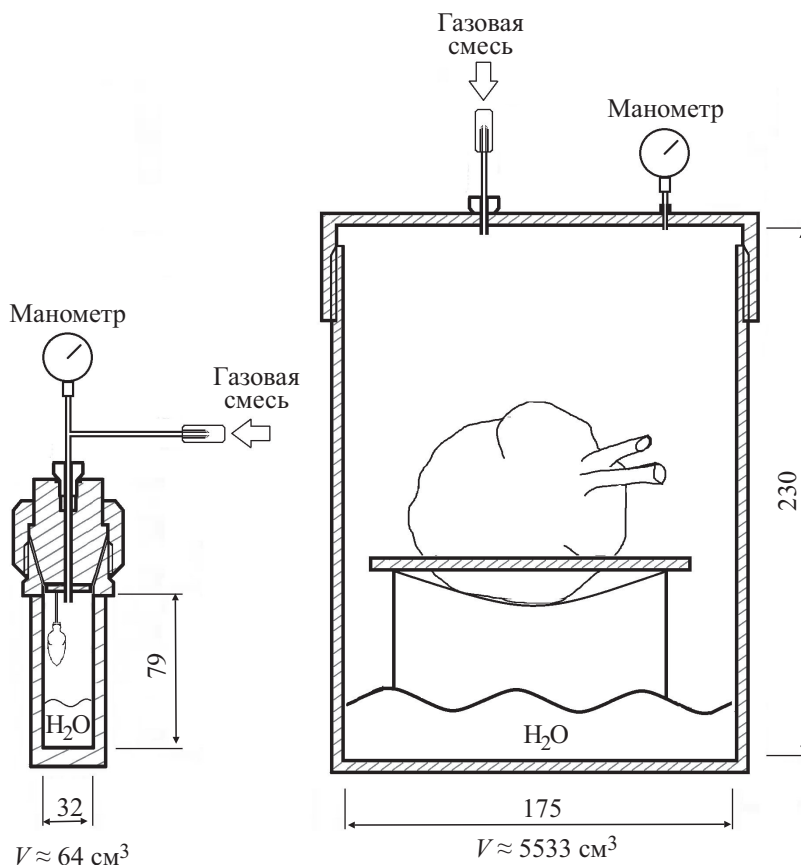


Рис. 1. Схематическое изображение камер для гипотермического хранения сердца крыс и баранов.

орган помещали на марлевый столик в охлажденную до  $4^{\circ}\text{C}$  камеру.

В дальнейшем после выделения сердца (см. раздел «Результаты») в аорту и легочный ствол дополнительно вводили стенты для фиксации клапанов в открытом состоянии, из полостей сердца сливали раствор хранения для лучшего насыщения газовой смесью. Затем в аорту вводили канюлю и накладывали кисет, далее орган помещали на марлевый столик в охлажденную до  $4^{\circ}\text{C}$  камеру.

**Консервация сердца.** Камеры — малую для сердца крысы на основе химического реактора Vivog (Premex, Швейцария) (материал — сталь) или большую для сердца барана собственного изготовления (материал — пластик) (рис. 1) — предварительно охлаждали до температуры  $4^{\circ}\text{C}$ . С целью поддержания влажности в камере во время консервации на дно наливали дистиллированную воду до уровня в 1 см. После выделения сердца и помещения его в камеру (сердце крысы подвешивали в камере за канюлю вставленную в аорту; сердце барана помещали на марлевый столик) проводили продувку газовой рабочей смесью, с целью вытеснения воздуха из камеры. Все работы с газом выполняли под тягой. Далее плотно за-

винчивали крышку и нагнетали газовую смесь, состоящую из монооксида углерода и кислорода в соотношении 4 : 3 при итоговом давлении в камере 6 атм (избыточное давление) (см. рис. 1). Далее камеру помещали на хранение в емкость, наполненную водой, охлажденной до  $4^{\circ}\text{C}$  для стабилизации температуры, и помещали в холодильник с температурой  $4^{\circ}\text{C}$ . После 24 ч камеру извлекали из холодильника и проводили дегазацию, плавно в ручном режиме сбрасывая давление в течение 15 мин до атмосферного.

**Реперфузия сердца лабораторных животных.** Сердце крысы после гипотермического хранения подключали к установке ретроградной перфузии по Лангендорфу. Затем промывали препаратом «Кустодиол» в течение 5 мин при  $4^{\circ}\text{C}$  со скоростью 6–8 мл/мин, далее переключали перфузию на тепловой контур с раствором Тироде ( $37^{\circ}\text{C}$ ) с пероксиредоксин-6 в концентрации 0.1 мг/мл. Перфузию проводили со скоростью  $8 \pm 2$  мл/мин. Раствор Тироде оксигенировали смесью  $\text{O}_2$  (95%) и  $\text{CO}_2$  (5%).

Реперфузию сердца баранов осуществляли на марлевом столике путем подключения к аорте сердечно-легочного насоса от аппарата искусственного кровообращения Stockert (Германия).

Вначале сердце промывали 800 мл раствора «Кустодиола» при 4°C со скоростью 200 мл/мин. Далее сердце перфузировали в течение 5–15 мин раствором Тироде (37°C) со скоростью 300–400 мл/мин с добавлением в первые минуты пероксиредоксина-6 (0.1 мг/мл). Раствор Тироде оксигенировали смесью O<sub>2</sub> (95%) и CO<sub>2</sub> (5%).

**Анализ инфарктной зоны сердца.** После реперфузии в течение 5–15 мин сердца разрезали с получением срезов толщиной 2 мм. Полученные срезы выдерживали в 1%-м растворе хлорида трифенилтетразолия в фосфатном буфере при 37°C в течение 20 мин. Размер инфаркта измеряли с использованием программного обеспечения ImageJ и выражали в процентах от общей площади исследуемого образца.

**Гистологический анализ.** Сердце барана фиксировали в растворе 10%-го формалина в течение 24 ч. Далее проводили стандартную проводку материала с последующим заключением в парафиновые блоки. Полученные на микротоме срезы окрашивали гематоксилином и эозином и трихромом по Массону. Далее проводили микроскопическое исследование полученных препаратов при увеличении  $\times 400$ .

**Статистическая обработка.** Значения представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение. Значимость различий определяли с использованием *t*-критерия Стьюдента. Значения с  $p < 0.05$  считались статистически значимыми. Обработку результатов производили с использованием программного обеспечения SigmaPlot 12.5.

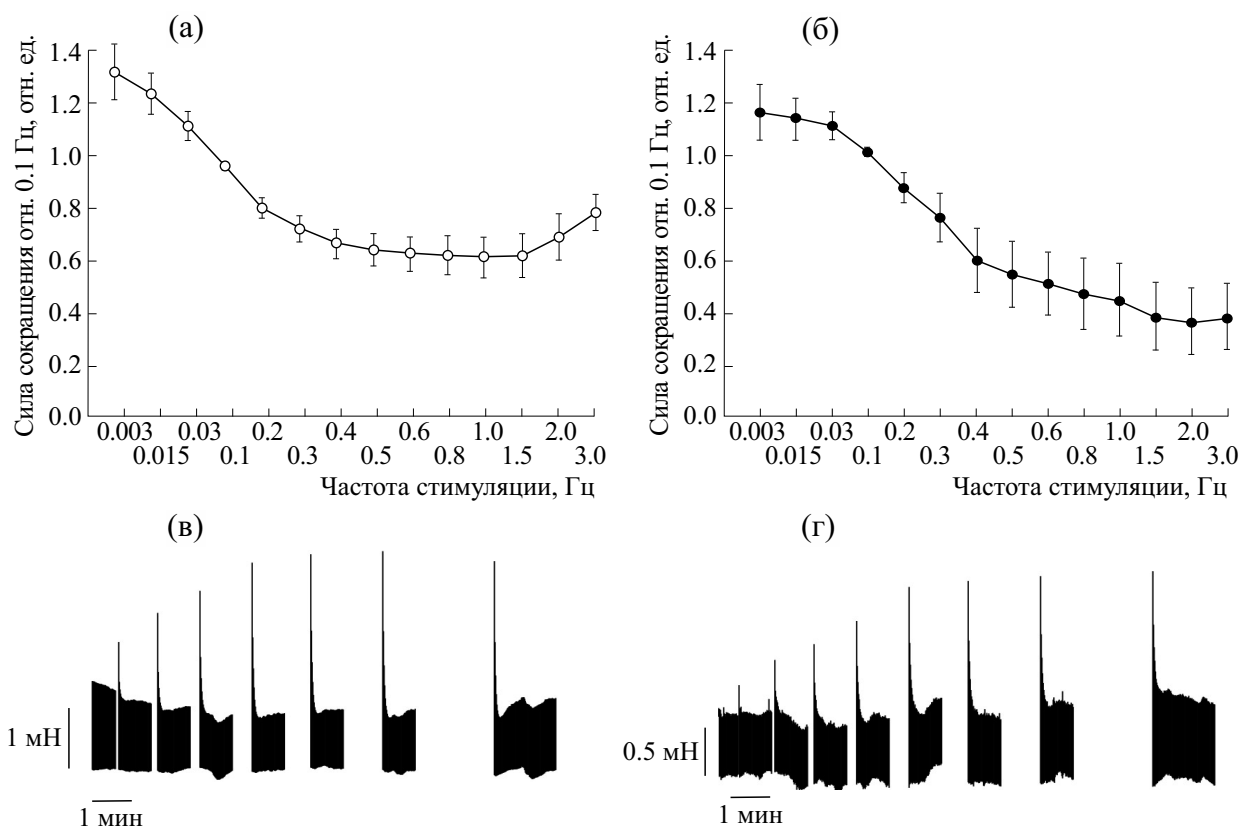
## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Сократимость папиллярной мышцы сердца крысы после 24-часовой гипотермической консервации под давлением газовой смеси на основе монооксида углерода.** Общее время работы с периодом адаптации папиллярной мышцы в контроле и в опыте не отличалось, составив  $3.5 \pm 0.3$  ч. Уровень сократимости в контрольной и опытной группах укладывался в нормальное распределение силы сокращения у экспериментальных животных (1.0–3.0 мН). В опытной группе «СО» в интервале от низких до средних частот зависимость «частота–сила» сохраняла отрицательную направленность, что характерно для нормального миокарда крысы (рис. 2). Также в опыте отмечали наличие выраженного эффекта потенциации паузой (рис. 2г), соответствующее контролю. В области высоких частот (1–3 Гц) регистрировали менее выраженный либо вовсе отсутствующий по сравнению с контролем прирост силы сокращения. При стимуляции изопротеренолом в группе «СО» отмечали положительный инотропный эффект на введение препарата (рис. 3). Не отмечено значимого различия показателей прироста силы сокраще-

ния между группами «К» ( $1.8 \pm 0.3$  отн. ед.) и «СО» ( $1.4 \pm 0.2$  отн. ед.) в ответ на введение бета-миметика.

**Оценка сохранности изолированного сердца крысы после 24-часовой гипотермической консервации под давлением газовой смеси на основе монооксида углерода.** Был проведен анализ трех экспериментальных групп (рис. 4а) – группы «К» с нулевым временем хранения, группы «КСЛ» с временем хранения 24 ч при температуре 4°C в стандартном для трансплантологической практики консервирующем растворе «Кустодиол» и группы «СО» с временем хранения 24 ч при температуре 4°C под давлением газовой смеси на основе монооксида углерода. Общее время работы сердца после помещения на стенд и проведения ретроградной перфузии оксигенированным раствором Тироде в группах «К» и «СО» значимо не различалось, составив  $195.3 \pm 7.9$  мин и  $177.0 \pm 14.8$  мин соответственно (рис. 4в). В обеих группах функциональная активность изолированного сердца постепенно и практически синхронно снижалась во времени: после одного часа работы наступала остановка желудочков, после трех часов – предсердий. В группе «КСЛ» не удалось зарегистрировать возникновение функциональной активности после разогрева на этапе помещения на перфузионный стенд после гипотермической консервации. Ткань сердца визуальнее была более темной по сравнению с контролем. Анализ инфарктных зон миокарда с помощью окрашивания трифенилтетразолием хлоридом (рис. 4б) через 15 мин после реперфузии в группах «К» и «СО» практически не выявил пораженных участков. Кроме того, не было отмечено значимой разницы между обеими группами (группа «К» –  $3.0 \pm 1.3\%$ , группа «СО» –  $3.8 \pm 1.5\%$ ). Напротив, в группе «КСЛ» регистрировали обширные инфарктные зоны, составившие  $76.8 \pm 8.3\%$  от площади окрашивания.

**Оценка сохранности изолированного сердца барана после 24-часовой гипотермической консервации под давлением газовой смеси на основе монооксида углерода.** Предварительная оценка продолжительности работы контрольного изолированного сердца барана на перфузионном стенде выявила, что используемые условия (в отсутствие возможности адекватной перфузии донорской кровью) не позволяют обеспечить длительную и стабильную работу сердца. Продолжительность сокращений контрольных сердец составила от 10 мин до получаса. В этой связи в качестве основного метода оценки сохранности изолированного сердца барана после гипотермической консервации под давлением газовой смеси был выбран гистологический анализ с взятием образцов через 5–15 мин после возобновления сокращений на этапе реперфузии после консервации. Возобновление сокращений сердца в группе СО реги-



**Рис. 2.** (а) и (б) — Зависимости силы сокращения от частоты стимуляции в папиллярных мышцах сердца крысы соответственно в контрольной и опытной (после 24-часовой консервации при температуре 4°C под давлением газовой смеси с монооксидом углерода,  $n = 5$ ) группах; по оси абсцисс — частота стимуляции, по оси ординат — сила стационарного изометрического сокращения в отн. ед. по отношению к силе сокращения на частоте стимуляции 0.1 Гц, принимаемой за единицу; данные представлены как средние значения  $\pm$  стандартное отклонение. (в) и (г) — Репрезентативные записи сокращения папиллярных мышц соответственно в контроле и опыте при частоте стимуляции 1 Гц, демонстрирующие наличие выраженного эффекта потенциации паузой в обеих группах.

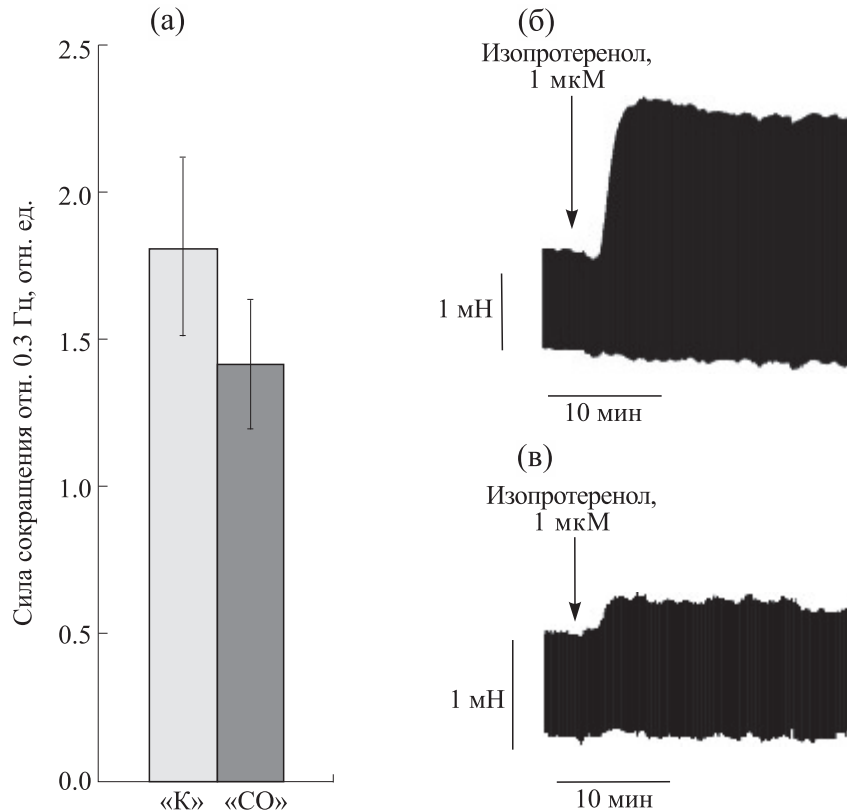
стрировали во всех пяти опытных экспериментах. В первом эксперименте в группе СО на секции было визуально выявлено затемнение миокарда в области межжелудочковой перегородки. Оценка инфарктной зоны срезом миокарда методом окрашивания трифенилтетразолием хлоридом выявила обширные инфарктные зоны (рис. 5д) в области межжелудочковой перегородки по сравнению с наружными участками ткани. В этой связи методика консервации была модифицирована с введением в полость сердца стентов, препятствующих смыканию створок аортального и легочного клапанов для облегчения доступа газовой смеси в полость сердца. После модификации методики консервации инфарктные зоны в области межжелудочковой перегородки практически не выявлялись (рис. 5е).

Анализ с помощью световой микроскопии показал, что миокард как контрольной, так и опытной групп сохранял нормальную структуру ткани, было достаточно трудно найти различия между ними (рис. 5а–г). Наиболее выраженной патологией в группе «СО» являлись умеренный очаго-

вый отек интерстиция и, в меньшей степени, периваскулярный отек (рис. 5в,г). Среди других нарушений были отмечены легкая степень склероза эпикарда, белковая дистрофия кардиомиоцитов от легкой до умеренной степени выраженности, под эндокардом и в глубине миокарда — отдельные группы кардиомиоцитов в состоянии баллонной дистрофии. В целом состояние миокарда опытной группы характеризовалось как «умеренные ишемически-реперфузионные повреждения трансплантата сердца без каких-либо необратимых нарушений».

## ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании для подтверждения высоких органопротективных свойств газовой смеси монооксида углерода и кислорода мы исследовали особенности зависимости силы сокращения от частоты стимуляции папиллярной мышцы сердца крысы. Сохранение сократимости на низких частотах и наличие выраженного эффекта потенциации паузой (резкий начальный

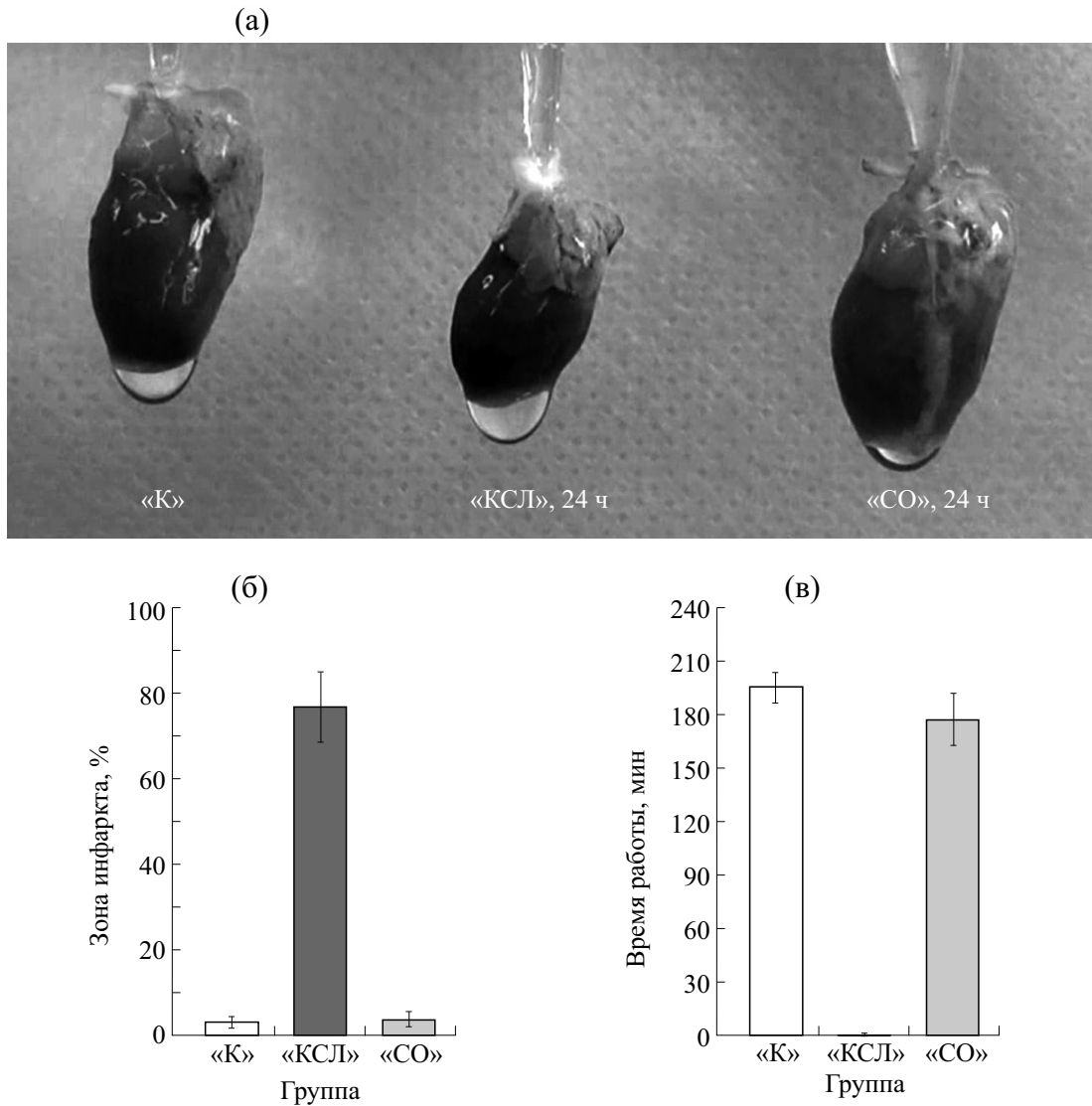


**Рис. 3.** Сравнительный анализ функционального ответа папиллярной мышцы сердца крысы на адренергическую стимуляцию изопроterenолом в контроле ( $n = 5$ ) и после 24-часовой консервации при температуре  $4^{\circ}\text{C}$  под давлением газовой смеси с монооксидом углерода ( $n = 5$ ). (а) – Гистограмма прироста силы сокращения в контрольной и опытной группах; по оси ординат – сила стационарного изометрического сокращения в отн. ед. по отношению к силе сокращения на частоте стимуляции 0.3 Гц, принимаемой за единицу; данные представлены как средние значения  $\pm$  стандартное отклонение. (б) и (в) – Репрезентативные записи прироста силы сокращения папиллярных мышц соответственно в контроле и опыте.

всплеск уровня сокращения после пауз в электрической стимуляции) в опыте соответствовали контролю, что свидетельствует о сохранении кальцийаккумулирующей способности саркоплазматического ретикулула. Выраженный положительный инотропный эффект, наблюдавшийся в ответ на введение бета-миметика изопроterenолом, свидетельствует о сохранении нормальной адренергической регуляции миокарда. В области высоких частот (1–3 Гц) в опыте отсутствовала положительная ветвь зависимости «частота–сила», что может говорить о блокировании частотно-зависимой активации кальциевого тока L-типа. Однако окончательно вывод о данном нарушении можно будет сделать только при увеличении выборки. В целом продолжительность работы мышцы, характер зависимости «частота–сила», близкий к показателям интактного миокарда? и сохранение способности к ответу на стимуляцию изопроterenолом свидетельствуют о высокой функциональной сохранности миокарда после пролонгированной консервации под давлением газовой смеси.

Биологическая модель папиллярной мышцы может быть использована для исследования механизма органопротективного действия высоких (до 0.1 мл газа на 1 мл воды при используемом давлении) концентраций монооксида углерода, который в настоящее время остается неясным. В качестве отправной гипотезы мы предполагаем, что СО связывается с гемсодержащими белками митохондрий, блокируя энергетическую систему кардиомиоцитов и, таким образом, останавливая метаболизм в клетках.

Сравнительный анализ продолжительности сократительной работы нативного изолированного сердца крысы, сердца после 24-часового хранения в консервирующем растворе «Кустодиола» и сердца после 24-часового хранения в газовой смеси наглядно (во всех пяти экспериментах реперфузия образцов из трех групп проводилась одновременно) продемонстрировал практически идентичную функциональную состоятельность сердец из групп интактного контроля и «СО». С нашей точки зрения это говорит об исключительном уровне сохранности ткани



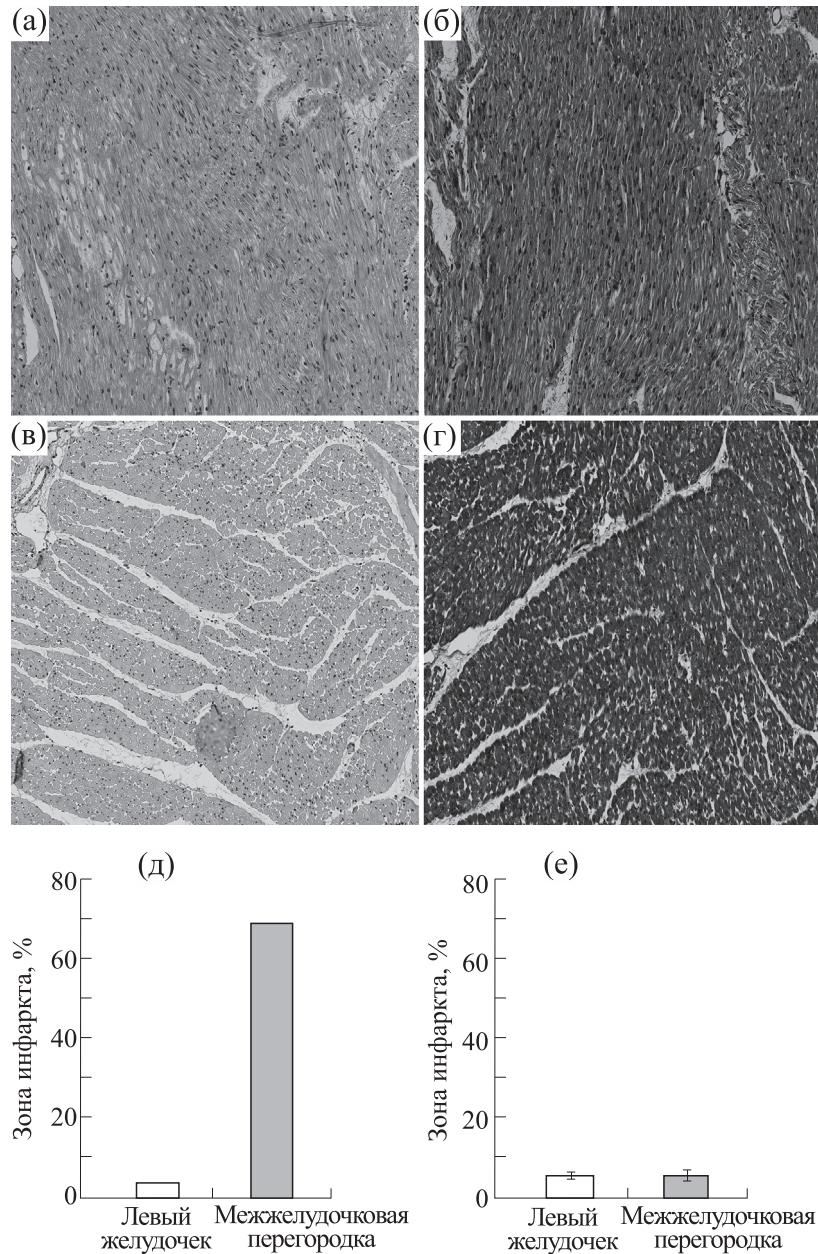
**Рис. 4.** Функциональная оценка изолированного сердца крысы после 24-часовой гипотермической консервации в консервирующем растворе «Кустодиола» и под давлением газовой смеси с монооксидом углерода по сравнению с интактным контролем. (а) – Репрезентативная обработанная фотография эксперимента; (б) – оценка инфарктной зоны срезов миокарда после 15 мин ретроградной перфузии методом окрашивания трифенилтетразолием хлоридом ( $n = 5$ ); (в) – общая продолжительность работы сердца от момента реперфузии до остановки сокращения предсердий ( $n = 5$ ). Данные представлены как средние значения  $\pm$  стандартное отклонение.

сердца в группе «СО», несмотря на в три-четыре раза более высокую длительность хранения по сравнению со стандартно используемыми в трансплантологической практике консервирующими растворами.

Следует также отметить, что длительная – до трех и более часов – продолжительность работы сердца на стенде как в контрольной, так и в опытных группах была связана в том числе с использованием в перфузионном растворе природного антиоксиданта пероксиредоксина-6, обеспечивающего снижение ишемически-реперфузионных повреждений [15]. Ни одно сердце после 24-часового хранения в консервирующем

растворе «Кустодиола» восстановить не удалось. По данным регистровых исследований и отчетов национальных служб донорства и трансплантации органов на сегодняшний день раствор гистидина-триптофана-кетоглутарата (НТК, «Кустодиол», Германия) наряду с раствором Университета Висконсина (США) являются двумя главными растворами (> 90% всех случаев трансплантации органов), используемыми в мире для статической холодовой консервации. Сравнение результатов трансплантации, выполненных с использованием этих консервирующих растворов, в течение многих лет является темой научных исследований и публикаций. При этом достоверных





**Рис. 5.** (а)–(г) – Световая микроскопия срезов сердца барана после 24-часовой гипотермической консервации под давлением газовой смеси с монооксидом углерода: окрашивание гематоксилином и эозином сердца в контрольной (а) и опытной (в) группах, окрашивание трихромом по Массону в контрольной (б) и опытной (г) группах, размер каждого снимка составляет 750 мкм в ширину; (д) – оценка инфарктной зоны срезов миокарда левого желудочка и межжелудочковой перегородки в группе «СО» в эксперименте № 1; (е) – оценка инфарктной зоны срезов миокарда левого желудочка и межжелудочковой перегородки в группе «СО» в экспериментах № 2–5 ( $n = 4$ ); данные представлены как средние значения  $\pm$  стандартное отклонение.

и клинически значимых преимуществ какого-либо одного консервирующего раствора на сегодняшний день не выявлено [16–18].

В России для гипотермического хранения органов преимущественно используется «Кустодиол». Нулевые результаты, полученные при его использовании в условиях 24-часовой консервации, были ожидаемы с учетом того, что данный

срок в разы превышает допустимые для «Кустодиола» сроки холодной ишемии сердца (4–6 ч). В то же время эти результаты подчеркивают преимущество газовой консервации.

Одной из главных целей исследования являлось изучение возможности масштабирования подхода газовой консервации с переходом от миокарда крысы массой 1.0–1.5 г к сердцу круп-

ных лабораторных животных, сопоставимому по размеру и массе с сердцем человека (220–300 г) для того чтобы оценить перспективы использования CO в клинической практике. Было неочевидным, окажется ли достаточно используемых режимов газовой консервации для адекватного насыщения и защиты тканей миокарда при резком, на два порядка, увеличении массо-объемных характеристик органа.

В качестве тест-объекта было выбрано сердце барана (вес животных 30–40 кг), имеющее массу 140–160 г, что сопоставимо с массой сердца человека. Первый эксперимент выявил недостаточность насыщения газом внутренних областей сердца, что было подтверждено анализом инфарктных зон срезов межжелудочковой перегородки методом окрашивания трифенилтетразолием хлоридом. Однако путем изменения условий консервации с раскрытием просветов аортального и легочного клапанов эту проблему удалось решить, и в последующих экспериментах инфарктные зоны во внутренних отделах сердца барана не выявлялись. Во всех пяти экспериментах в опытной группе сокращения сердца самопроизвольно восстанавливались после начала перфузии. Результаты гистологического анализа не показали значительных различий в сердцах барана контрольной и опытной групп. Миокард обеих групп сохранял нормальную структуру ткани и характеризовался как умеренные ишемически-реперфузионные повреждения трансплантата сердца.

Полученные результаты подтверждают перспективность использования газовой консервации с монооксидом углерода для консервации сердца крупных животных, а в дальнейшем и человека. Насколько нам известно, настоящее исследование является первым, подтверждающим данный факт на модели сердца лабораторного животного, чьи размеры и масса сопоставимы с таковыми у человека.

Рассматривая возможности использования газовых смесей на основе CO для консервации органов, необходимо затронуть вопросы безопасности их применения. CO – газ без цвета и запаха, который проявляет токсичность, связываясь с гемоглобином крови с образованием карбоксигемоглобина и предотвращая доставку кислорода в ткани. Он является одним из ключевых поражающих факторов при пожарах. В наших экспериментах пересаживаемый орган предварительно отмывали от крови консервирующими растворами, поэтому такой путь реализации токсического эффекта не затрагивался. Вместе с тем в дальнейшем необходимо будет подтвердить на модели крупных лабораторных животных, что после дегазации системы в тканях не остается остаточных

количеств газа, которые могли бы вызвать токсические эффекты после реперфузии.

В работе [12] был исследован уровень карбоксигемоглобина в крови крыс, которым была осуществлена гетеротопическая пересадка сердца, подвергнутого гипотермическому хранению под давлением CO; было показано отсутствие значимых различий в уровне карбоксигемоглобина в опытной и контрольной группах. В наших экспериментах для контроля возможных утечек газа использовали бытовые датчики CO. Анализ возможных сценариев разгерметизации камеры показывает, что с учетом используемых объемов газовой смеси такая разгерметизация не приведет к повышению уровня CO свыше предельно допустимой концентрации в рабочих помещениях площадью более 5 м<sup>2</sup>.

Как показано в нашем исследовании, результаты консервации сердца под давлением газовой смеси, содержащей монооксид углерода, существенно превосходят по максимальному времени консервации наиболее распространенный способ хранения в консервирующих растворах при температуре 4°C. Сегодня в мире активно разрабатывается еще один подход к хранению донорских органов, основанный на нормотермической перфузии оксигенированной донорской кровью, а также использовании систем активного поддержания температуры и мониторинга физиологического состояния органа. Многие из предложенных сегодня перфузионных комплексов представляют собой модернизированные аппараты экстракорпоральной мембранной оксигенации или искусственного кровообращения. Ряд экспериментальных и клинических исследований показал улучшение функции органов и исходов трансплантации при использовании таких машин.

Среди продуктов, которые находятся на завершающих стадиях клинических исследований, можно отметить систему Organox Metra (Organox, Великобритания) для консервации печени [19] и комплексы OCS Heart [20], OCS Liver [21], OCS Lung [22] для консервации сердца, печени и легких соответственно (Transmedics, США). Описанные эффекты включают в себя продление времени консервации до 30% без увеличения частоты плохой начальной функции трансплантата. Так, средняя продолжительность перфузии 75 из 93 пересаженных сердец при исследовании комплекса OCS Heart составила 6.35 ч [20]. Общими недостатками комплексных перфузионных систем являются сложная конструкция, большие габариты, низкая энергетическая автономность, высокая стоимость как основного аппарата (~15 млн руб. [23]), так и расходных материалов (~2,5 млн руб. на одну операцию), что ограничивает использование данных устройств. Развитие

подхода газовой консервации может предоставить новый метод хранения и транспортировки донорского органа, сопоставимый по стоимости с классической статической холодовой консервацией, но при этом существенно более эффективный.

В нашем исследовании мы использовали газовую смесь, в которую помимо монооксида углерода входит кислород. Общее давление газовой смеси составляло 6 атм при соотношении  $CO : O_2$ , равном 4 : 3. Использование кислорода как фактора, снижающего ишемически-реперфузионные повреждения сердца, имеет длительную историю. Так, с начала 1960-х гг. разрабатывается метод консервации донорского сердца *ex vivo*, заключающийся в нагнетании в коронарное русло увлажненного газообразного кислорода (персфуляция кислородом) [24]. Обоснование метода персфуляции состоит в обеспечении адекватной доставки кислорода в миокард во время транспортировки для снижения гипоксии. Показано, что антеградная кислородная персфуляция донорского сердца свиньи обеспечивает лучшее функциональное восстановление после орто- и гетеротопической трансплантации, чем холодовая консервация [25]. Поскольку использование каждого газа в отдельности не приводило к восстановлению сократимости сердца крысы после 24-часовой консервации (данные не приведены), мы подтвердили более ранние гипотезы о том, что оба газа необходимы для снижения патологических процессов в миокарде. Оптимизация состава смеси, соотношения используемых газов, давления, а также разработка автоматизированного комплекса хранения являются предметом наших дальнейших исследований. Для окончательного подтверждения эффективности и безопасности газовой консервации для хранения органов необходимы исследования с использованием биологических моделей орто- и гетеротопической пересадки на крупных лабораторных животных (бараны, свиньи и др.).

### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность В.К. Богданову за оказанную помощь при проведении хирургических операций на крупных животных, Н.П. Можейко за оказанную помощь при расшивке гистологических препаратов, а также Сектору оптической микроскопии и спектрофотометрии ЦКП ПНЦБИ РАН.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства образования и науки РФ (тема «Разработка новых подходов к криоконсер-

вации биологических объектов», рег. номер АААА-А17-117032050021-0).

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования проводили в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите животных 2010/63/EU. Экспериментальный протокол был одобрен этическим комитетом ИБК РАН.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Global Observatory on Donation and Transplantation*. URL: <http://www.transplant-observatory.org>.
2. С. В. Готье и С. М. Хомяков, Вестн. трансплантологии и искусственных органов **21** (3), 7 (2019).
3. R. S. Mangus, et al., *Transplantation* **86**, 298 (2008).
4. В. И. Шумаков, *Трансплантация сердца: руководство для врачей* (Медицинское Информационное Агентство, М., 2006).
5. M. C. Ott, J. R. Scott, A. Bihari, et al., *FASEB J.* **19** (1), 106 (2005).
6. J. S. Neto, A. Nakao, K. Kimizuka, et al., *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **287** (5), 979 (2004).
7. A. Nakao, A. M. Choi, and N. Murase, *J. Cell. Mol. Med.* **10** (3), 650 (2006).
8. M. D. Musameh, C. J. Green, B. E. Mann, et al., *J. Heart Lung Transplant.* **26** (11), 1192 (2007).
9. L. E. Otterbein, R. Foresti, and R. Motterlini, *Circ. Res.* **118** (12), 1940 (2016).
10. A. Nakao, J. S. Neto, S. Kanno, et al., *Am. J. Transplant.* **5** (2), 282 (2005).
11. A. Nakao, G. Faleo, H. Shimizu, et al., *Kidney Int.* **74** (8), 1009 (2008).
12. N. Hatayama, M. Inubushi, M. Naito, et al., *Sci. Rep.* **6**, 1 (2016).
13. N. Hatayama, S. Hirai, M. Naito, et al., *Sci. Rep.* **8** (1), 1 (2018).
14. Е. Е. Фесенко, Н. Э. Швирст, Е. Л. Гагаринский и др. Патент RU 2707532 (2019).
15. Н. В. Грудинин, В. К. Богданов, М. Г. Шарапов и др., Вестн. трансплантологии и искусственных органов **22** (2), 20 (2020).
16. Á. L. Szilágyi, P. Mátrai, P. Hegyi, et al., *World J. Gastroenterol.* **24** (16), 1812 (2018).
17. Y. Li, S. Guo, G. Liu, et al., *Artif. Organs* **40** (5), 489 (2016).
18. J. M. O'Callaghan, S. R. Knight, R. D. Morgan, and P. J. Morris, *Am. J. Transplant.* **12** (4), 896 (2012).
19. M. Manzia, L. Toti, C. Quaranta, et al., *Int. J. Surg. Rep.* **57**, 163 (2019).
20. J. N. Schroder, D. D'Alessandro, F. Esmailian, et al., *J. Heart Lung Transplant.* **38** (4), S42 (2019).
21. H. Mergental and G. R. Roll, *Clin. Liver Dis.* **10** (4), 97 (2017).

22. G. Loor, G. Warnecke, M. Villavicencio, et al., *J. Heart Lung Transplant.* **37** (Suppl. 4), S147 (2018).
23. *OCS Heart system for heart transplant, Medtech innovation briefing* (2016). URL: <https://www.nice.org.uk/advice/mib86/chapter/The-technology>.
24. T. M. Suszynski, M. D. Rizzari, W. E. Scott, et al., *J. Cardiothorac. Surg.* **8**, 105 (2013).
25. С. М. Минасян, М. М. Галагудза, Ю. В. Дмитриев и др., *Регионарное кровообращение и микроциркуляция* **13** (3), 4 (2014).

## Evaluation of Preservation of Rat Myocardium and Isolated Sheep Heart Following Prolonged (24 Hour) Hypothermic Preservation after Exposure to a Gaseous Mixture Composed of Carbon Monoxide and Oxygen

E.E. Fesenko (Jr.)\*, E.L. Gagarinsky\*, A.S. Averin\*, N.V. Grudinin\*\*, A.E. Gurin\*, N.V. Shishova\*, N.E. Shvirst\*, M.V. Goltyaev\*, and A.L. Kovtun\*\*\*

\**Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

\*\**Shumakov Federal Scientific Center of Transplantology and Artificial Organs, Shukinskaya ul. 1, Moscow, 123182 Russia*

\*\*\**Foundation for Advanced Research, Berezkhovskaya nab. 22/3, Moscow, 121059 Russia*

High organoprotective properties of a gaseous mixture of carbon monoxide (CO) and oxygen (O<sub>2</sub>) were proven after prolonged (24 hour) hypothermic preservation of papillary muscle and isolated rat heart at 4°C. It was shown that hypothermic preservation in a high-pressure gaseous mixture of CO and O<sub>2</sub> (6 atm.) is effective in restoring the contractile activity of the rat heart after 24 hours of storage at 4°C. The isolated, retrograde perfused Langendorff heart performed physically relevant mechanical work, the duration of which was similar to that of the intact control. When heart was stained with triphenyltetrazolium chloride, no infarcted regions of the myocardium were detected. We found that tissue is able to sustain function at a high level after preservation in response to electrically stimulated contractile activity of the papillary muscles of the heart. In the test group, the relationship between frequency/intensity – the degree of potentiation effect induced by a pause – a response to stimulation with isoproterenol corresponds to that of normal rat myocardium, on the whole. For the first time, preservation of the sheep heart comparable in size and weight to a human heart has been successfully applied using a gaseous mixture composed of carbon monoxide and oxygen. In all experiments in the test group, a normal heartbeat spontaneously restored after the start of perfusion. There were no significant histological differences between sheep hearts from the test and control groups. The myocardium in the test group maintained a normal tissue structure. We have expanded a CO preservation approach to sheep heart, its 24-hour preservation time is 4 times longer than the maximum preservation time of standard static cold storage. The results obtained on the large laboratory animal heart model show that the proposed hypothermic preservation appears helpful for prolonged storage of the human heart..

*Keywords: carbon monoxide, oxygen, gas, organ, transplantation, storage, heart, rat, sheep, preservation, hypothermia*