

Научный журнал.

Основан в 2005 году ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»

Журнал зарегистрирован Комитетом РФ по печати
Свидетельство о регистрации: ПИ № ФС77-21324
09.06.2005г.

Подписной индекс 57995 в Каталоге «Издание органов научно-технической информации» ОАО «Роспечать»

Журнал включен в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук (редакция — март 2010 года)

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

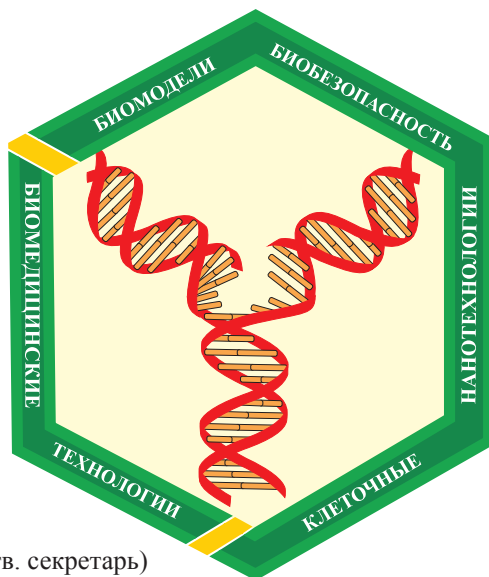
Главный редактор Н.Н.Каркищенко

В.Н. Каркищенко (зам. гл. редактора),

Е.Б. Шустов (зам.гл. редактора), Н.В. Станкова (отв. секретарь)

К.В. Анохин (Москва)
Е.Е. Ачкасов (Москва)
Е.Ю. Бонитенко (Санкт-Петербург)
А.Т. Быков (Сочи)
Витан Влахов (Болгария)
В.М. Говорун (Москва)
А.М. Дыгай (Томск)
Г.Д. Капанадзе (Светлые горы, МО)
М.Ф. Киселев (Москва)
Р.С. Куздембаева (Казахстан)
В.Г. Кукес (Москва)
С.Л. Люблинский (Обнинск)
Ю.С. Макляков (Ростов-на-Дону)
Е.Л. Матвеев (Светлые горы, МО)

А.И. Мирошников (Пушино, МО)
А.Н. Мурашов (Пушино, МО)
В.Б. Назаров (Химки, МО)
М.А. Пальцев (Москва)
А.С. Радилов (Санкт-Петербург)
Г.В. Раменская (Москва)
В.Р. Рембовский (Санкт-Петербург)
Д.А. Сычев (Москва)
В.П. Фисенко (Москва)
Ю.В. Фокин (Светлые горы, МО)
Д.Ф. Хритинин (Москва)
Б.Д. Цыганков (Москва)
Д.Б. Чайванов (Москва)
Е.В. Ших (Москва)



Охраняется Законом Российской Федерации № 5351-1
«Об авторском праве и смежных правах» от 9 июля 1993 года
и иными нормативно-правовыми актами. Воспроизведение
всего издания, а равно его части (частей) без письменного
разрешения издателя влечет ответственность в порядке,
предусмотренном действующим законодательством.

Адрес редакции:

143442, Московская область,
Красногорский р-н, п. Светлые горы,
владение 1
Тел.: 8 (495) 561-52-64

Отпечатано в типографии «Айсинг»
199406, Санкт-Петербург, ул. Гаванская, д. 18
Подписано в печать 15.09.2014
Тираж 3 000 экз.



Моделирование постинфарктной сердечной недостаточности путем окклюзии левой коронарной артерии у крыс: техника и методы морфофункциональной оценки

А.А. Карпов^{1,3}, Д.Ю. Ивкин^{1,2}, А.В. Драчева³, Н.Н. Питухина²,
Ю.К. Успенская³, Д.Д. Ваулина⁴, И.С. Усков¹, Ш.Д. Эйвазова³,
С.М. Минасян^{1,3}, Т.Д. Власов³, А.В. Бурякина², М.М. Галагудза^{1,3}

¹ – ФГБУ «ФМИЦ им. В.А. Алмазова», Санкт-Петербург

² – ГБОУ ВПО СПХФА МЗ РФ, Санкт-Петербург

³ – ГБОУ ВПО «ПСПГМУ им. акад. И.П. Павлова», Санкт-Петербург

⁴ – ФБГУН «ИМЧ им. Н.П. Бехтеревой» РАН, Санкт-Петербург

Контактная информация: Карпов Андрей Александрович, a--karpoff@mail.ru

В статье обсуждены основные методологические особенности выполнения моделей постинфарктной хронической сердечной недостаточности путем перманентной и временной окклюзии коронарной артерии, а также наиболее эффективные морфофункциональные подходы к оценке постинфарктных изменений миокарда.

Ключевые слова: хроническая сердечная недостаточность, инфаркт миокарда, ишемически-реперфузионное повреждение, эхокардиография, RV-петли, перфузия изолированного сердца.

Введение

На сегодняшний день, по данным ВОЗ, инфаркт миокарда (ИМ) занимает лидирующее место среди причин смерти от сердечно-сосудистых заболеваний. Безвозвратная утрата кардиомиоцитов ведет к развитию постинфарктной хронической сердечной недостаточности (ПИ ХСН), что снижает качество и продолжительность жизни. Несмотря на активное развитие фармакологических подходов в лечении ПИ ХСН, радикального решения этой проблемы добиться не удастся. Необходим поиск новых подходов в лечении ИМ, позволяющих

сохранить сократительную функцию сердца.

В связи с этим, большой интерес представляют различные экспериментальные модели, воспроизводящие ишемически-реперфузионное повреждение. В реальной клинической практике зачастую невозможно выполнить раннюю реваскуляризацию (тромболизис, коронаропластика), поэтому не теряют своей актуальности модели перманентной ишемии. Эти модели позволяют более детально изучить патофизиологические процессы, происходящие в миокарде при поражении коронарного русла. Также с

их помощью возможно оценить эффективность различных фармакологических агентов и кардиохирургических вмешательств, направленных на сохранение миокарда.

Одним из наиболее точных и показательных подходов к моделированию ПИ ХСН является наложение лигатуры на левую коронарную артерию у крыс [12].

Сложность и многогранность изменений структуры и функциональных показателей сердца в разные периоды после ишемического или ишемически-реперфузионного повреждения потребовали поиска современных подходов к выявлению и оценке этих изменений.

В последние годы в экспериментальной медицине и фармакологии активно используется ряд морфо-функциональных методик, в частности: электрокардиография, трансторакальная эхокардиография, катетеризация камер сердца с регистрацией циклов «объем-давление», перфузия изолированного миокарда, морфологические методы [8].

Целью настоящей работы явилась детальная сравнительная оценка способов моделирования ишемического и ишемически-реперфузионного повреждения миокарда с последующей оценкой его выраженности с помощью различных инструментальных методов.

Материалы и методы

Моделирование постинфарктной сердечной недостаточности

Эксперименты были выполнены на крысах-самцах линии Wistar массой 200-250 г (питомник «Рапполово», Ленинградская область), содержащихся в условиях 12/12-часового свето-темнового режима и получавших стандартный корм и питьевую воду *ad libitum*.

Все эксперименты были проведены в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных» (публикация Национального Института Здоровья США, № 85-23) и были одобрены локальным этическим комитетом.

Моделирование постинфарктной хронической сердечной недостаточности включает в себя ряд обязательных этапов:

- 1) наркотизация,
- 2) искусственная вентиляция легких,
- 3) торакотомия,
- 4) моделирование перманентного ишемического или ишемически-реперфузионного повреждений.

Наркотизация

Основными путями введения наркоза для описываемой модели являются ингаляционный и инъекционный (внутривенный, внутрибрюшинный, внутримышечный) (табл. 1).

Таблица 1

Сравнительная характеристика ингаляционного и инъекционного путей введения наркоза

Ингаляционный наркоз	Инъекционный наркоз
Преимущества	
Легкость управления глубиной наркоза; окончание действия сразу после отключения животного от дыхательного контура	Техническая легкость выполнения; не требует специальной аппаратуры
Недостатки	
Требуется специальное дорогостоящее оборудование; часто требуется парентеральная премедикация – например, перед интубацией	Сложность управления глубиной сна, риск развития кардиальных и дыхательных осложнений; фиксированное время длительности наркотического сна

На сегодняшний день в качестве препаратов для наркоза преимущественно используют Хлоралгидрат, Кетамин, Тиопентал натрия, Пентобарбитал, Изофлуран и др. Несколько менее востребованными при операциях на грызунах являются Ксилазин, Золетил, Пропофол. Ксилазин (Рометар, Ксила) в моноведении вызывает только седацию и миорелаксацию без сна. Наркоз при однократном введении Пропофола (Диприван) продолжается всего 2-3 мин, в связи с чем требуется непрерывная его инфузия. Использование Золетила (Тилетамина гидрохлорид + Золазепама гидрохлорид) требует внутримышечного введения.

В данной работе был использован Хлоралгидрат, который вводился внутривентрально в дозе 450 мг/кг во время операции. Продолжительность наркоза составляла, в среднем, 1-1,5 часа. Животные располагались на термостатируемом столике.

Искусственная вентиляция легких (ИВЛ)

ИВЛ является обязательным условием выполнения экспериментальных моделей с нарушением герметичности грудной клетки, т.к. при вскрытии единой плевральной полости у крыс дальнейшее самостоятельное расправление легких невозможно.

В данной работе ИВЛ осуществлялась с помощью аппарата SAR-830/AP (США). Частота дыхания: 60/мин, дыхательный объем: 3 мл/100 г массы тела.

Существует два основных способа подключения ИВЛ к дыхательной системе животного:

1) интубация трахеи (интубационная трубка проводится в трахею без нарушения ее целостности, проводя через голо-
совые связки);

2) трахеостомия (трахеостомическая трубка проводится через разрез между кольцами трахеи).

Интубация трахеи

Этапы:

1) обработка гортани 2% р-ром Лидокаина для подавления вагусных реакций;

2) визуализация гортани путем переразгибания шейного отдела позвоночника (продольная ось головы, совпадает с продольной осью тела крысы);

3) установка проводника в трахею (во время открытия голосовой щели в фазу вдоха);

4) установка интубационной трубки в трахею по проводнику;

5) удаление проводника;

6) подключение интубационной трубки к ИВЛ.

Трахеостомия

Этапы:

1) разрез кожи по средней линии в области шеи;

2) разведение краев раны и собственных мышц шеи, визуализация трахеи;

3) рассечение ткани передней стенки трахеи в межхрящевом пространстве;

4) установка трахеостомической трубки через образовавшееся отверстие;

5) подключение трахеостомической трубки к ИВЛ.

После завершения эксперимента:

6) удаление трахеостомической трубки;

7) ушивание трахеостомического отверстия узловым швом (шовный материал – пролен 6/0);

8) ушивание операционной раны области шеи;

9) обработка шва послеоперационной раны антисептиком.

Для хронических моделей интубация трахеи является наиболее предпочти-

тельным и физиологичным вариантом, однако выполнение этой манипуляции сопряжено с рядом сложностей (риск интубации пищевода, остановка сердца при раздражении вагусных рецепторов гортани) и требует значительного навыка экспериментатора (табл. 2).

Торакотомия

Доступ к сердцу обычно производится через четвертое межреберье с предварительным L-образным разрезом кожи от верхнего края тела грудины до мечевидного отростка по средней линии и далее по ходу VII ребра до средней аксиллярной линии и с разведением грудных мышц (рис. 1).

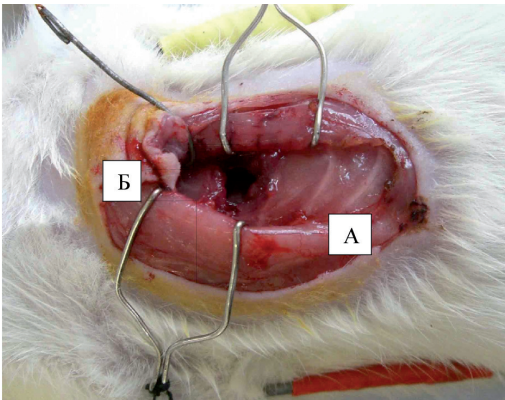


Рис. 1. Доступ к сердцу через четвертое межреберье.
А – передне-боковая поверхность сердца; Б – ранорасширители, разводящие края раны.

Таблица 2

Сравнительная характеристика интубации трахеи и трахеостомии при проведении ИВЛ

Интубация трахеи	Трахеостомия
Преимущества	
Методика выбора для хронических экспериментов; физиологична: не повреждает целостности трахеи	Простота исполнения методики
Недостатки	
Требует высокой квалификации экспериментатора; риск осложнений во время проведения интубации (интубация пищевода, остановка сердца на фоне раздражения вагусных рецепторов гортани)	Нарушает целостность трахеи и мягких тканей области шеи (при выполнении хронического эксперимента требуется ушивание); частые поздние осложнения (гнойно-воспалительные процессы в области ушивания трахеи и мягких тканей, формирование свищей, послеоперационный стеноз трахеи)

Моделирование перманентного ишемического повреждения

После осуществления торакотомии через четвертое межреберье производилась визуализация сердца. Далее, тупым способом, с помощью браншей анатомических пинцетов удалялся перикард.

На границе свободного края ушка левого предсердия визуализировалась левая коронарная артерия (ЛКА), под которую подводилась лигатура (пролен 6/0, Ethicon, Германия), непосредственно у края ушка левого предсердия.

Размер инфаркта миокарда (ИМ) сильно зависит от уровня перевязки: при выполнении высокой перевязки ЛКА (под ушком левого предсердия (ЛП)) размер ишемии обычно значительный и отличается низкой вариабельностью, однако при этом типе наложения лигатуры имеется выраженное нарастание приоперационной и ранней послеоперационной смертности. При более низкой перевязке (на 1-2 мм ниже свободного края ушка ЛП) отмечается возрастание вариабельности и уменьшение размера

ишемии, в то же время отмечается большая выживаемость животных после операции.

В ходе эксперимента у животных рекомендуется запись электрокардиограммы в стандартных отведениях до операции (рис. 2А) и через 10 мин после наложения лигатуры на левую коронарную артерию (рис. 2Б). Наступление ишемии верифицировали визуально и по электрокардиографическим критериям: элевации сегмента ST, наступлению ишемических аритмий.

Далее производилось послойное ушивание операционной раны. Шов на коже обрабатывали спиртовым 5% р-ром йода. После операции внутрибрюшинно производили инъекцию Цефтриаксона (50 мг/кг) для профилактики послеоперационных инфекционных осложнений.

Моделирование ишемически-реперфузионного повреждения

Существует целый ряд различных подходов к воспроизведению обрати-



Рис. 2. Изменения на электрокардиограмме в ходе эксперимента:

А – до наложения лигатуры на ствол левой коронарной артерии;

Б – через 10 мин после наложения лигатуры на ствол левой коронарной артерии.

мой окклюзии ЛКА. В данной работе использовался метод, включающий несколько этапов [5]:

1) подведение лигатуры под ЛКА, отрезание иголки, если это атравматический шовный материал;

2) два свободных конца лигатуры проводились через полиэтиленовую трубку малого диаметра;

3) натяжение концов нитки с последующей их фиксацией с помощью наложения зажима на полиэтиленовую трубку;

4) при необходимости реперфузии – снятие зажима.

Для снижения риска травматизации ткани миокарда между ним и полиэтиленовой трубкой укладывается небольшой кусочек трубки, сжатый посередине.

Методы оценки морфофункциональных показателей сердца

Трансторакальная эхокардиография

Эхокардиография (ЭхоКГ) является одним из самых информативных

визуализирующих методов исследования состояния миокарда в эксперименте *in vivo* (рис. 3). В последние годы он активно применяется для оценки анатомических и функциональных показателей деятельности сердца у крыс. Преимуществами этой методики являются неинвазивность, высокая точность, возможность многократного проведения (наблюдения показателей в динамике), а также легкость выполнения, что позволяет обследовать большое количество животных в течение непродолжительного времени [9].

Для морфофункциональных измерений используется ряд стандартных показателей (табл. 3). В данной работе использовалась эхокардиографическая ультразвуковая установка высокого разрешения (MyLabTouchSL 3116, Esaot; Италия). Для обеспечения необходимого качества изображения использовали сосудистые линейные датчики с частотой 13 МГц, глубина сканирования составляла 2 см.

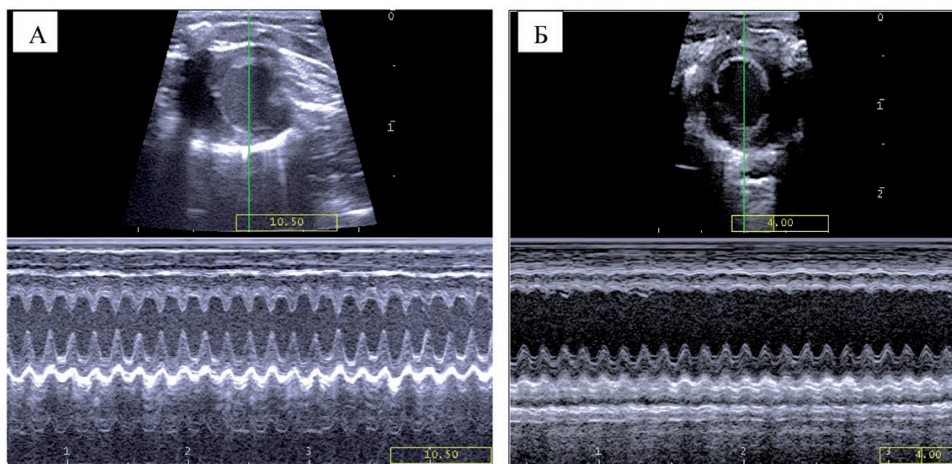


Рис. 3. Эхокардиографическое исследование, М-режим, короткая парастернальная позиция (PSAX). А – нативное сердце, Б – 3 недели после наложения лигатуры на левую коронарную артерию (акинезия передней стенки).

Таблица 3

Основные морфофункциональные показатели, оцениваемые при трансторакальном эхокардиографическом исследовании

Аббре- виатура показа- теля	Показатель	Референсные значения		
		Weytjens С., et al., 2006 [6]	Radovits T., et al., 2013 [7]	Kocsis G.F., et al., 2012 [8]
LVAWd ПСЛЖд	Left Ventricle Anterior wall during diastole Толщина передней стенки ЛЖ в диастолу	1,9±0,2 мм	1,87±0,03 мм	1,87±0,07 мм
LVAWs ПСЛЖс	Left Ventricle Anterior wall during systole Толщина передней стенки ЛЖ в систолу	2,9±0,3 мм	2,89±0,16 мм	3,31±0,05 мм
LVPWd ЗСЛЖд	Left Ventricle Posterior wall during diastole Толщина задней стенки ЛЖ в диастолу	1,8±0,2 мм	1,99±0,07 мм	2,18±0,07 мм
LVPWs ЗСЛЖс	Left Ventricle Posterior wall during systole Толщина задней стенки ЛЖ в систолу	3±0,2 мм	2,97±0,05 мм	3,77±0,11 мм
LVIDd КДД	Left Ventricle Internal diameter during diastole Конечный диастолический диаметр ЛЖ	7,6±0,6 мм	9,12±0,09 мм	7,25±0,17 мм
LVIDs КСД	Left Ventricle Internal diameter during systole Конечный систолический диаметр ЛЖ	4,5±0,9 мм	4,4±0,11 мм	3,77±0,2 мм
LVvoid КДО	Left Ventricle volume during diastole Конечный диастолический объем ЛЖ	0,69±0,16 мл	-	-
LVvolS КСО	Left Ventricle volume during systole Конечный систолический объем ЛЖ	0,15±0,07 мл	-	-
SV УО	StrokeVolume Ударный объем	-	0,257±0,010 мл	0,252±0,014мл
EF ФВ	Ejection fraction Фракция выброса	78±8%	61,2±1,8%	54,9±1,7%
SF ФУ	Fractional shortening Фракция укорочения ЛЖ, %	41±11%	39,1±2,1%	

Катетеризация левого желудочка с регистрацией давления и объема

Катетеризация камер сердца с регистрацией характеристик объема и давления, а также построением на их основе графических кривых зависимости (PV-loops) является признанным «золотым стандартом» прижизненной инвазивной оценки морфофункциональных показателей сердца.

В современных экспериментальных моделях на мелких животных используется два основных подхода к выполнению данной методики для оценки функции ЛЖ:

1. Каротидный доступ (эндоваскулярная катетеризация ЛЖ через правую сонную артерию). В этом случае катетер проводится ретроградно относительно тока крови, проникая в сердце через аортальный клапан.

2. Апикальный доступ, путем пункции верхушки сердца.

Каждый из указанных подходов имеет ряд преимуществ и недостатков (табл. 4).

Для исследования действия фармакологических агентов и выполнения хронического эксперимента катетеризация через правую сонную артерию является менее инвазивной, при этом состояние животных во время длительного эксперимента остается более стабильным. Каротидный доступ позволяет также катетеризировать сердце в моделях сердечной недостаточности, произведенной с помощью перевязки передней ветви ЛКА, т.к. при этой операции на верхушке сердца образуется рубец, что препятствует катетеризации сердца через верхушечный прокол.

Основные показатели, оцениваемые с помощью катетеризации ЛЖ

Благодаря прямой регистрации зависимости «давление-объем» внутри

Таблица 4

Сравнительная характеристика различных подходов к выполнению методики катетеризации ЛЖ

Каротидный доступ	Апикальный доступ
Преимущества	
Более стабильный; малотравматичный (не требует вскрытия грудной клетки), в связи с этим является методом выбора для хронических экспериментальных моделей	Легкость выполнения; возможность проведения даже в случае тяжелого атеросклероза каротидных артерий и аортального клапана, выраженной гипертрофии ЛЖ, крайней степени артериальной гипертензии
Недостатки	
Сложный в исполнении (риск кровотечения, требуется высокая квалификация экспериментатора)	Менее стабильный; большая потеря жидкости; требуется вскрытие грудной клетки; сложность выполнения в случае перехода рубца на область верхушки ЛЖ

ЛЖ возможно получение целого ряда мую, так и математически рассчитан- показателей, как измеряемых напря- ных (табл. 5, рис. 4).

Таблица 5

Основные морфофункциональные показатели, оцениваемые при катетеризации ЛЖ с регистрацией зависимости «давление-объем»

Аббре-виатура показателя	Полное название показателя	Примечания и формулы расчета	Диапазон референсных значений		
			Zakharova L., et al., 2010 [9]	Fomovsky G., et al., 2010 [10]	Khong F.L., et al., 2011 [11]
ESV КСО	End-systolic volume Конечный систолический объем	Параметр, регистрируемый напрямую	0,069±0,03 (мл)	0,24±0,12 (мл)	-
EDV КДО	End-diastolic volume Конечный диастолический объем	Параметр, регистрируемый напрямую	0,157±0,029 (мл)	0,48±0,16 (мл)	0,21±0,017 (мл)
ESP КСД	End-systolic pressure Конечное систолическое давление	Параметр, регистрируемый напрямую	122±7 (мм рт.ст.)	84,6±15 (мм рт.ст.)	-
EDP КДД	End-diastolic pressure Конечное диастолическое давление	Параметр, регистрируемый напрямую	6±0,3 (мм рт.ст.)	5,1±0,7 (мм рт.ст.)	4,62±0,51 (мм рт.ст.)
SV УО	Stroke Volume Ударный объем	SV=EDV-ESV	0,109±0,028 (мл)	-	-
CO СВ	Cardiac Output Сердечный выброс	CO=SV*HR	26±6 (мл/мин)	70±19 (мл/мин)	-
EF ФВ	Ejection Fraction Фракция выброса	EF=SV/EDV	66±10 (%)	52±11 (%)	-
dP/dtmax	Максимальная скорость изменения давления в желудочке	Показатель миокардиальной сократимости. Зависит от пред- и постнагрузки, ЧСС и ГЛЖ	6524±388 (мм рт.ст./с)	-	-
ESPVR ОКСД/О	End-systolic pressure-volume relationship Соотношение конечного систолического давления и объема	Наиболее надежный показатель миокардиальной сократимости, т.к. не зависит от пред- и постнагрузки, ЧСС	-	V0=0,04±0,11 (мл) Emax=675±385 (см вод.ст./мл)	-
EDPVR ОКДД/О	End-diastolic pressure-volume relationship Соотношение конечного диастолического давления и объема	Описывает кривую заполнения ЛЖ. Угол наклона кривой EDPVR в любой точке графика обратно пропорционален диастолической эластичности	-	-	0,026±0,004 Наклон – мм рт.ст./мкл

Примечание: данные авторов приведены к стандартным значениям.

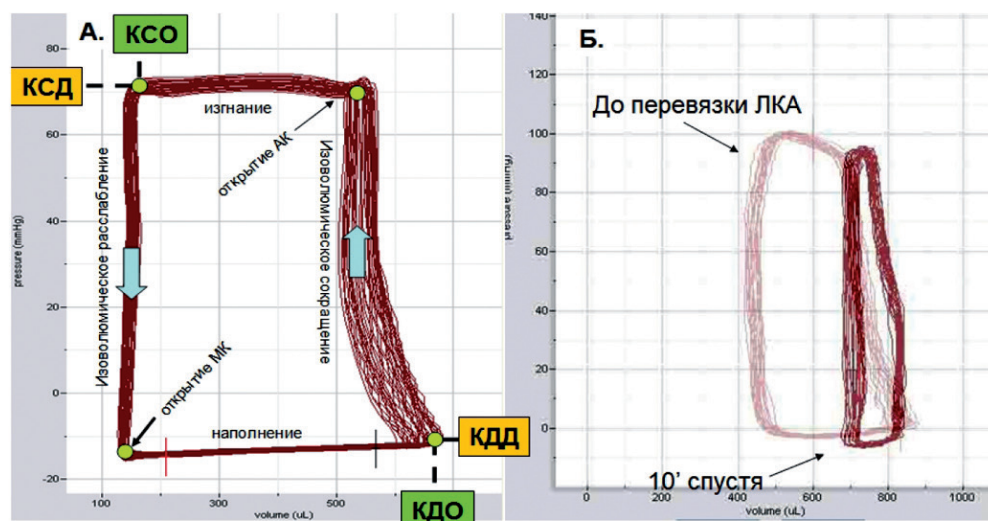


Рис. 4. Графическое изображение зависимости «давление-объем» во время катетеризации ЛЖ (PV-loops). А – принципиальная схема петли «давление – объем», где: АК – аортальный клапан, МК – митральный клапан; Б – сравнение PV-loop интактного сердца и спустя 10 мин после перевязки ЛКА; КСО – конечный систолический объем, КДО – конечный диастолический объем, КСД – конечное систолическое давление, КДД – конечное диастолическое давление.

Протокол проведения

Для инвазивной регистрации показателей давления и объема внутри ЛЖ и построения PV-петли был использован программно-аппаратный комплекс Advantage PV system (Science, США), состоящий из блока управления, аналого-цифрового преобразователя, PV-катетера и программного обеспечения для персонального компьютера. Крысы наркотизировались с помощью однократного внутрибрюшинного введения Хлоралгидрата (Acros Organics, США) в дозе 450 мг/кг.

▪ Каротидный доступ

В области шеи выполнялся разрез по средней линии. Паратрахеальные мышцы и грудиноключичнососцевидная мышца справа разводились тупым способом. Выделялась общая сонная артерия. На дистальный конец выделен-

ного отрезка артерии накладывалась лигатура. С помощью пункции сосудистой стенки катетер заводился в просвет сосуда и проводился ретроградно по ходу сосуда (рис. 5). Прохождение катетером аортального клапана характеризовалось изменением кривой давления и снижением диастолического давления до нулевых значений.

После регистрации гемодинамических показателей ЛЖ на сосуд ниже места пункции накладывалась лигатура. Производилось ушивание кожи. В качестве шовного материала использовался викрил 4-0 (Ethicon, Германия). Шов на коже обрабатывался настойкой йода (5%). После операции внутрибрюшинно производилась инъекция Цефтриаксона (50 мг/кг) для профилактики послеоперационных инфекционных осложнений.

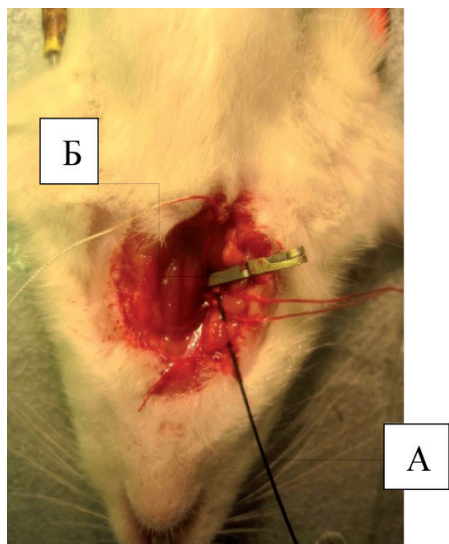


Рис. 5. Заведенный в просвет правой сонной артерии PV-катетер. А – PV-катетер; Б – зажим, наложенный на сосуд.

▪ Апикальный доступ

После наркотизации лабораторного животного (по схеме, описанной выше) производился разрез кожи и мышц передней брюшной стенки непосредственно ниже мечевидного отростка грудины, начиная от средней линии до левой средней подмышечной линии. Далее разрез продлялся на грудную клетку с пересечением 2-3-х нижних ребер и рассечением диафрагмы, тем самым обеспечивая доступ к верхушке сердца. Перикард рассекался тупым способом.

Для заведения PV-катетера в полость ЛЖ выполнялось пункционное отверстие с помощью инъекционной иглы 21G, с последующим быстрым проведением катетера через образовавшийся канал в ткани миокарда.

Если постинфарктный рубец распространяется на верхушку сердца, пункция ЛЖ должна проводиться предельно

внимательно, т.к. в этом случае неизбежно кровотечение из неспадающегося отверстия. Для остановки остаточного кровотечения после заведения катетера целесообразно использовать гемостатический материал, для этих целей в данной работе использовалась гемостатическая коллагеновая губка (Белкозин, Россия).

Модель изолированного сердца, перфузируемого по Лангендорфу

При отсутствии возможности выполнения ЭхоКГ и катетеризации ЛЖ в качестве метода оценки функциональных показателей сердца может рассматриваться методика изолированного сердца, перфузируемого по Лангендорфу.

Протокол проведения

Через 21 день после моделирования ишемически-реперфузионного повреждения (40 мин ишемии) животных наркотизировали с помощью Хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг. Грудная клетка вскрывалась широким чрездиафрагмальным билатеральным доступом, быстро вырезалось сердце и помещалось в ледяной (2–4°C) раствор Кребса-Хенселейта с гепарином, содержащий (в mM): глюкозы – 11; NaCl – 118; KCl – 4,7; CaCl₂ – 3,0; MgSO₄ – 1,2; KН₂PO₄ – 1,2; NaHCO₃ – 25.

После остановки сердца его присоединяли к аппарату Лангендорфа и осуществляли ретроградную перфузию через канюлю, введенную в аорту, раствором Кребса-Хенселейта под постоянным давлением гидростатического столба 80 мм рт. ст. Температуру перфузионного раствора, насыщенного газовой смесью, содержащей 95% O₂ и 5% CO₂, поддерживали равной 37±0,5°C,

рН раствора – 7,4. После завершения подготовки препарата изолированного сердца его помещали в термостатическую камеру. Тотальная ишемия воспроизводилась путем временной остановки поступления перфузата к сердцу. Длительность тотальной ишемии в эксперименте составила 30 мин, последующая реперфузия – 120 мин. В ходе эксперимента регистрировали исходные функциональные показатели изолированного сердца, а именно: систолическое, конечно-диастолическое и пульсовое давление в левом желудочке (ЛЖ), частоту сердечных сокращений и коронарный поток. Для выявления снижения функционального резерва миокарда после ишемического/ишемически-реперфузионного повреждения рекомендуется использовать эпизод глобальной ишемии. В ходе периода глобальной ишемии осуществляли мониторинг среднего давления в ЛЖ, что позволило оценивать амплитуду и скорость наступления ишемической контрактуры. Регистрация гемодинамических показателей проводилась с помощью программного обеспечения PhysExp [2].

Гистологическое исследование

После прижизненной оценки морфофункциональных показателей сердца животных подвергали эвтаназии и забирали сердце для последующего гистологического анализа. Сердца фиксировались в 10% забуференном формалине. Гистологические препараты окрашивали гематоксилин-эозином (рис. 6А, Б). Для более детального исследования соединительнотканного рубца ЛЖ использовалась окраска SiriusRed (рис. 6В). Препараты изучали с помощью микроскопа Axiostarplus (CarlZeiss, Германия) при увеличении от 5 до 40. Проводился морфометрический анализ площади рубцовой ткани. Результаты микроскопии оценивали с помощью программного обеспечения «ВидеоТест-Морфология» (ВидеоТест, СПб).

Обработка полученных данных

Статистическую достоверность различий функциональных и морфологических данных между группами оценивали с использованием программного пакета Statistica (критерий Манна-Уитни). Значения $p < 0,05$ рассматривали в качестве достоверных.

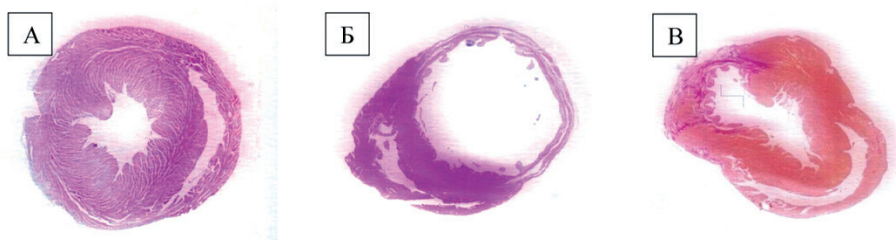


Рис. 6. Поперечный срез сердца. А – контрольная группа, без перевязки ЛКА (окраска гематоксилин-эозин); Б – сердце спустя 3 недели после перевязки ЛКА (окраска гематоксилин-эозин), выявляются трансмуральные рубцовые изменения передней, задней и боковой стенок ЛЖ, а также выраженная дилатация его камеры; В – сердце спустя 3 недели после перевязки ЛКА (окраска SiriusRed). Стрелкой показан рубец в области боковой стенки ЛЖ.

Полученные данные также обрабатывались с помощью программного обеспечения Labscribe 2.2 (Informer Technologies, Inc., США) (рис. 7).

Результаты и их обсуждение

Трансторакальная эхокардиография
Результаты проведенных измерений отражены в табл. 6. Ряд дополнительных показателей, измерения которых не производилось в данном исследовании, представлен ранее в табл. 3.

Отмечались достоверные различия как морфологических показателей ремоделирования сердца (КДР, КСР), так и ФВ между группой контрольных животных и группой ПИ ХСН (рис. 8).

Таблица 6
Морфофункциональные показатели здорового сердца крысы и через 3 недели после моделирования ПИ ХСН по данным ЭхоКГ

Показатели	Контроль	ПИ ХСН
ПСЛЖД (мм)	1,8±0,12	1,6±0,35
ПСЛЖс (мм)	3,2±0,09	Акинезия
ЗСЛЖД (мм)	1,8±0,11	2,4±0,23
ЗСЛЖс (мм)	3,0±0,18	3,2±0,34
КДР (мм)	4,9±0,13	7,8±0,81*
КСР (мм)	1,2±0,06	6,2±1,1*
УО (мл)	0,46±0,051	0,32±0,168
ФВ (%)	71,3±5,21	20,2±6,32*

Примечание: * – достоверное отличие от группы контроля (p< 0,05).

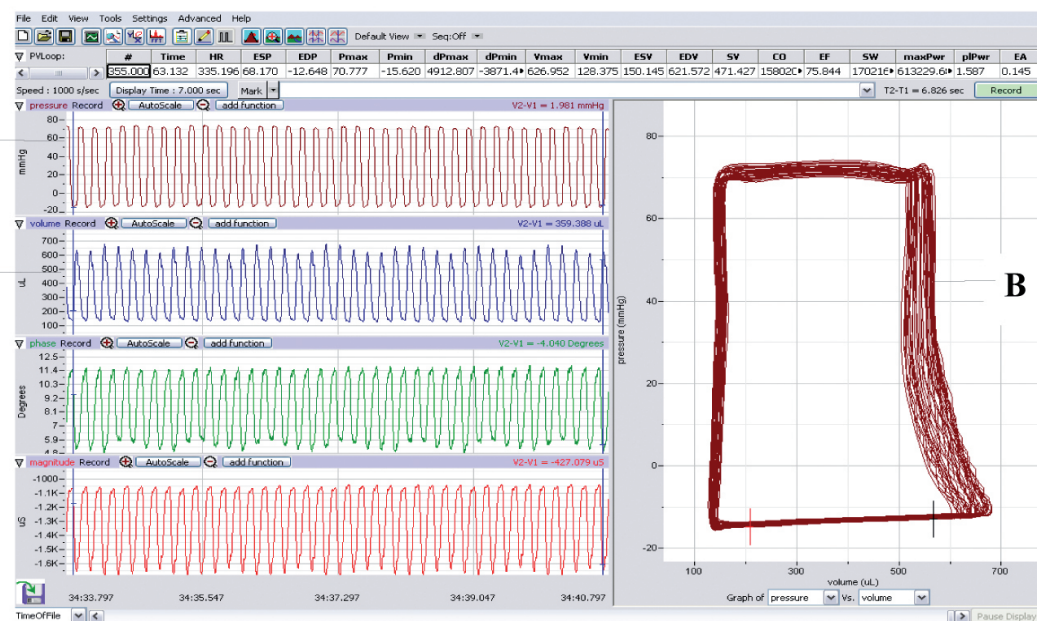


Рис. 7. Внутрисердечные показатели здорового животного. PV-катетер установлен в полость левого желудочка. Регистрация проводится с помощью программного обеспечения Labscribe 2.2. А – регистрация изменения давления в левом желудочке; Б – регистрация изменения объема в левом желудочке; В – PV-петля.

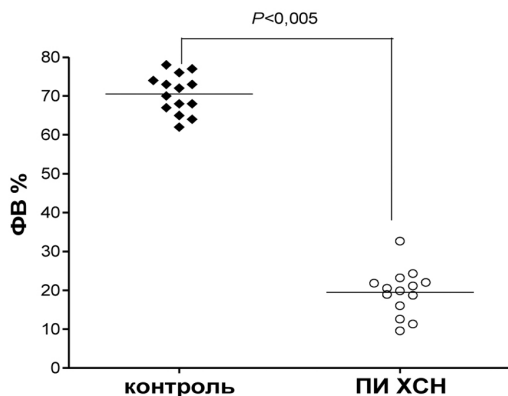


Рис. 8. Значения фракции выброса в группах контроля и ПИ ХСН.

Катетеризация левого желудочка с регистрацией давления и объема

В качестве иллюстрации приводим данные наших экспериментов по оценке морфофункциональных показателей сердца после моделирования ПИ ХСН.

Для моделирования ПИ ХСН крысам-самцам линии Wistar массой 200-240 г (7 особей) была произведена перманентная перевязка ветви ЛКА. Через 21 день после моделирования ишемического повреждения выполнялась катетеризация ЛЖ с регистрацией давления и объема с помощью каротидного доступа. Строилась графическая кривая зависимости «давление-объем» левого желудочка, а также определялся ряд показателей функции сердца. В качестве контроля использовались ложнооперированные крысы линии Wistar той же массы.

Полученные результаты отражены в табл. 7. Ряд дополнительных показателей, измерения которых не производилось в данном исследовании, представлен ранее в табл. 5.

Из табл. 7 видны значимое снижение ФВ ($p<0,05$) в группе ПИ ХСН, а также увеличение КДО ($p<0,05$) и КСО ($p<0,05$), что указывает на выраженное ремоделирование в постинфарктном периоде. Значимых различий в уровне УО и СВ выявлено не было.

Таблица 7
Морфофункциональные показатели здорового сердца крысы и через 3 недели после моделирования ПИ ХСН по данным катетеризации ЛЖ с регистрацией давления и объема

Показатель	Контроль	ПИ ХСН
Масса животного (г)	200-250	200-250
ЧСС (уд. в мин)	298±49,0	285±75,1
КСД (мм рт. ст.)	112±30,6	67±15,2
КДД (мм рт. ст.)	1±7,1	11±2,7
КСО (мкл)	121±25,3	326±76,2*
КДО (мкл)	443±36,2	576±51,3*
УО (мкл)	332±108,3	250±119,1
СВ (мл/мин)	92±45,2	70±44,8
ФВ (%)	69±11,3	42±10,6*

Примечание: * – достоверное отличие от группы контроля ($p<0,05$).

Модель изолированного сердца, перфузируемого по Лангендорфу

Несмотря на имеющееся ишемически-реперфузионное повреждение миокарда, исходное систолическое и пульсовое давление в ЛЖ в опытной и контрольной группах достоверно не отличались. На 20-й мин тотальной ишемии давление в ЛЖ в экспериментальных группах составило: контрольный инфаркт – 54±23 мм рт. ст., ложнооперированные животные – 82±10 мм рт. ст.; на 30-й мин: контрольный инфаркт – 53±22 мм рт. ст., ложноопе-

рированные животные – 73 ± 12 мм рт. ст. (рис. 9). Эти данные косвенно свидетельствуют о степени сохранности миокарда, т.к. степень ишемической контрактуры коррелирует с данным показателем.

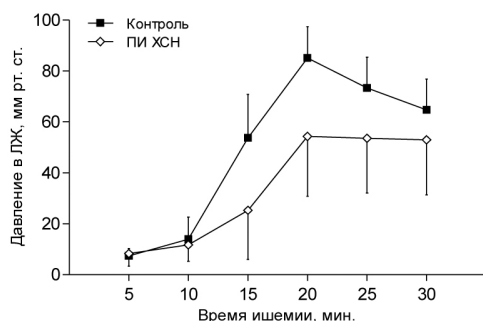


Рис. 9. Изменение ишемической контрактуры во время глобальной ишемии при перфузии изолированного сердца по Лангендорфу.

Гистологическое исследование

Размер рубца в группе ишемически-реперфузионного повреждения (20 животных) через 3 недели после перевязки ЛКА составил $37 \pm 3\%$. В контрольной группе (15 животных), где производилась ложная операция с рассечением перикарда, но без перевязки ЛКА, рубцовых изменений выявлено не было.

Оценка биохимических показателей

Для оценки биохимических изменений вследствие ишемического повреждения миокарда производили забор ткани сердца и плазмы крови спустя сутки после перевязки ЛКА. Биохимические показатели, определенные по стандартным методикам [3, 1], приведены в табл. 8.

Таблица 8

Уровень маркёров повреждения миокарда в острой стадии ишемического повреждения в плазме и ткани сердца

Показатель	Интактный контроль	Группа инфаркта
Миокард		
Креатинфосфат, ммоль/г	$7,72 \pm 0,50$	$4,67 \pm 0,58^*$
АТФ, ммоль/г	$4,31 \pm 0,10$	$2,49 \pm 0,09^*$
АДФ, ммоль/г	$0,84 \pm 0,03$	$0,89 \pm 0,02$
АМФ, ммоль/г	$0,39 \pm 0,02$	$0,64 \pm 0,03^*$
Лактат, ммоль/г	$3,86 \pm 0,07$	$4,99 \pm 0,25^*$
Пируват, ммоль/г	$0,27 \pm 0,05$	$0,18 \pm 0,09^*$
Каталаза, ЕД/мг белка	$0,083 \pm 0,008$	$0,028 \pm 0,008^*$
Глутатион, ммоль/г белка	$38,18 \pm 0,32$	$23,19 \pm 1,09^*$
Малоновый диальдегид, ммоль/г	$17,47 \pm 3,10$	$35,75 \pm 5,80^*$
Плазма		
Глюкоза, ммоль/л	$8,61 \pm 0,41$	$8,15 \pm 0,39$
Холестерин, ммоль/л	$2,19 \pm 0,10$	$2,59 \pm 0,12$
Мочевина, ммоль/л	$8,09 \pm 0,39$	$4,48 \pm 0,21^*$
Креатинин, ммоль/л	$46,10 \pm 2,20$	$53,30 \pm 2,50$
Общий билирубин, ммоль/л	$7,51 \pm 0,36$	$9,11 \pm 0,43$
Общий белок, г/л	$66,00 \pm 3,10$	$65,30 \pm 3,10$
АЛТ, нмоль/л	$49,10 \pm 2,40$	$150,50 \pm 8,90^*$
АСТ, нмоль/л	$149,9 \pm 9,10$	$448,40 \pm 21,80^*$
КФК, нмоль/л	7296 ± 597	$18789 \pm 1616^*$
Щелочная фосфатаза, нмоль/л	$316,0 \pm 16,30$	$314,60 \pm 15,50$

Примечание: * – достоверное отличие от группы контроля ($p < 0,05$).

Закключение

Проблемы ишемического повреждения миокарда не теряют своей актуальности, как не теряет своей актуальности

необходимость исследования самого процесса этого повреждения и путей воздействия на него. В доклинических исследованиях моделирование ишемического повреждения с помощью наложения лигатуры на ЛКА остается неотъемлемой частью исследования этого процесса. Благодаря высокой точности воспроизведения и хорошим результатам выживаемости данная модель стала «золотым стандартом» данного направления. Более того, учитывая современные тенденции в подходах к лечению острого коронарного синдрома в клинической практике (активное внедрение методик реваскуляризации (тромболизис, коронаропластика) в ранние сроки ишемии), все большую популярность приобретает модель ишемически-реперфузионного повреждения миокарда. Данный факт позволил адаптировать экспериментальные технологии к современным тенденциям развития клинической медицины.

Представленные в этой работе инструментальные методы исследования позволяют с высокой точностью регистрировать ишемическое повреждение, наблюдая в дальнейшем в динамике процессы формирования рубца и ремоделирования миокарда.

Глубокое понимание особенностей и преимуществ каждой из представленных методик позволит экспериментатору достичь желаемых результатов и в полной мере раскрыть возможности модели ишемического или ишемического-реперфузионного повреждения миокарда у крыс в хроническом эксперименте.

Список литературы

1. **Кашина Е.А.** Изыскание фармакологических препаратов, улучшающих энергетический обмен и активирующих восстановительные процессы в миокарде. Автореф. дис... канд. мед. наук. - СПб. 1994. 22 с.
2. **Королев Д.В., Александров И.В., Галагудза М.М. и др.** Автоматизация получения и обработки данных физиологического эксперимента // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2008. Т. 7. № 2(26). С. 79-84.
3. **Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотницкая Р.П.** Лабораторные методы исследования в клинике. - М.: Медицина. 1987. 368 с.
4. **Fomovsky G.M., Holmes J.W.** Evolution of scar structure, mechanics, and ventricular function after myocardial infarction in the rat // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 2010. Vol. 298. № 1. P. 221-8.
5. **Karpov A.A., Uspenskaya Y.K., Minasian S.M., et al.** The effect of bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cell transplantation on myocardial remodelling in the rat model of ischaemic heart failure // Int. J. Exp. Pathol. 2013. Vol. 94. № 3. P. 169-77.
6. **Khong F.L., Zhang Y., Edgley A.J., et al.** 3',4'-Dihydroxyflavonol antioxidant attenuates diastolic dysfunction and cardiac remodeling in streptozotocin-induced diabetic m(Ren2)27 rats // PLoS One. 2011. Vol. 6. № 7.
7. **Kocsis G.F., Sárközy M., Bencsik P., et al.** Preconditioning protects the heart in a prolonged uremic condition // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 2012. Vol. 303. № 10. P. 1229-36.
8. **Radovits T., Oláh A., Lux Á., et al.** Rat model of exercise-induced cardiac hypertrophy: hemodynamic characterization using left ventricular pressure-vol-

- ume analysis // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 2013. Vol. 305. № 1. P. 124-34.
9. *Ribeiro H.B., Okoshi K., Cicogna A.C., et al.* Follow-up study of morphology and cardiac function in rats undergoing induction of supraaortic stenosis // Arq. Bras. Cardiol. 2003. Vol. 81. № 6. P. 569-75.
10. *Weytjens C., Cosyns B., D'hooge J., et al.* Doppler myocardial imaging in adult male rats: reference values and reproducibility of velocity and deformation parameters // Eur. J. Echocardiogr. 2006. Vol. 7. № 6. P. 411-7.
11. *Zakharova L., Mastroeni D., Mutlu N., et al.* Transplantation of cardiac progenitor cell sheet onto infarcted heart promotes cardiogenesis and improves function // Cardiovasc. Res. 2010. Vol. 87. № 1. P. 40-9.
12. *Zornoff L.A., Paiva S.A., Minicucci M.F., et al.* Experimental myocardium infarction in rats: analysis of the model // Arq. Bras. Cardiol. 2009. Vol. 93. № 4. P. 434-40.

Rat model of post-infarct heart failure by left coronary artery occlusion: technical aspects, functional and morphological assessment

**A.A. Karpov, D.Yu. Ivkin, A.V. Dracheva, N.N. Pitukhina,
Yu.K. Uspenskaya, D.D. Vaulina, I.S. Uskov, Sh.D. Eyvazova,
S.M. Minasyan, T.D. Vlasov, A.V. Buryakina, M.M. Galagudza**

This article describes the main methodological issues related to modeling of post-infarct heart failure by permanent and temporary occlusion of the left coronary artery, and also the most effective morphological and functional approaches to the assessment of post-infarct myocardial changes.

Key words: chronic heart failure, myocardial infarction, ischemia-reperfusion injury, echocardiography, PV-loops, perfusion of the isolated heart.