

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

М.М.Мандрик, А.Н.Туров, П.М.Ларионов,
М.Б.Васильева, Е.А.Покушалов, Д.В.Субботин

ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ ДОНОРСКОГО СЕРДЦА ДО МОМЕНТА ТРАНСПЛАНТАЦИИ

ФГУ «Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени академика Е.Н. Мешалкина Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию», Новосибирск, Россия

С целью исследования электрофизиологического состояния и реакций специализированного и рабочего миокарда донорского сердца на острую гипоксию изучены 30 изолированных сердец белых беспородных крыс при воздействиях внешних условий, аналогичных таковым при изъятии и хранении донорского сердца до момента его трансплантации.

Ключевые слова: белые беспородные крысы, изолированное сердце, трансплантация сердца, гипоксия миокарда, электрофизиологические характеристики, автоматизм, проводимость

To study the electrophysiological state and responses of specialized and contracting myocardium of donor heart to acute hypoxia under conditions similar to extraction and storage of the donor heart until its transplantation, the experiments were carried out on 30 male cross-breed rats.

Key words: mongrel white rats, isolated heart, heart transplantation, myocardial hypoxia, electrophysiological characteristics, automatism, conduction.

Жизнеспособность изолированного сердца является интегральной характеристикой, в основе которой лежит структурная целостность кардиомиоцитов [10], их ферментных комплексов [5], сохранение работы ионных насосов [6], сократительного аппарата клетки [8], функционирование митохондрий и сохранность генетического аппарата [13]. Необходимость диагностики состояния миокарда перед трансплантацией сердца определяет важность детальной и разноплановой оценки его жизнеспособности. Однако в клинической практике нет универсальной подобной системы оценки качества трансплантатов [4]. До настоящего времени нет работ, касающихся электрофизиологических (ЭФ) реакций специализированного и рабочего миокарда на гипоксию, сопровождающую период до момента трансплантации сердца. В то же время такое изучение представляется нам чрезвычайно важным, поскольку оно возможно прольёт свет на феномены дисфункции синусового узла, атриовентрикулярной блокады, фибрилляции желудочков донорского сердца [11].

Целью данной работы было исследование электрофизиологического состояния и реакций специализированного и рабочего миокарда донорского сердца на острую гипоксию. Для этого в условиях острого эксперимента изолированные сердца животных (крыс) подвергали воздействию внешних условий, аналогичных таковым при изъятии и хранении донорского сердца до момента его трансплантации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент проводился на 30 самцах белых беспородных крыс. В условиях экспериментальной операции под эфирным наркозом проводилась декапитация животных. Сердце наркотизированной крысы извлекалось путем левосторонней торакотомии. При этом

после вскрытия перикарда производилось выделение магистральных сосудов, наложение зажимов с последующим лигированием обеих полых вен, аорты, легочного ствола и легочных вен и выполнялось изъятие сердца. Изолированное сердце помещалось в холодный RPMI-1640 при +4°C.

Эксперименты выполнены с соблюдением правил биоэтики (Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, 1986 г.). Статистическая обработка проводилась при помощи компьютерной программы Statistica 6.0.

Определение терминов

Наличие или отсутствие сократимости камер сердца констатировалось по единогласному мнению трёх врачей-экспертов. Активная систола предсердий определялась как консолидированное движение видимой части предсердной эпикардальной поверхности (ушко и свободная стенка правого предсердия), активная систола желудочков - как консолидированное движение видимой части желудочковой эпикардальной поверхности (передняя и боковая стенки правого желудочка). За синусовый ритм мы считали стабильно ритмичные сокращения изолированного сердца с предсердно-желудочковой синхронизацией. Полную атриовентрикулярную (АВ) блокаду определяли как полную АВ десинхронизацию с активными спонтанными ритмичными систолами предсердий и желудочков независимо друг от друга, когда частота предсердных сокращений превышала частоту желудочковых.

Желудочковую асистолию определяли по прекращению спонтанных сокращений желудочков и отсутствию активных желудочковых систол на протяжении 10 сек. Предсердную асистолию определяли по прекращению спонтанных сокращений предсердий и отсутствию

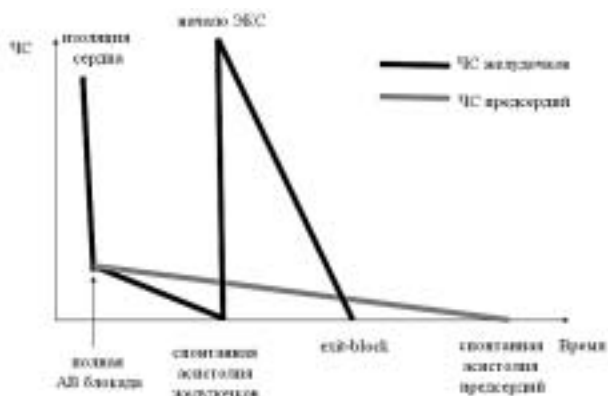


Рис. 1. Схема эксперимента.

активных предсердных систол на протяжении 10 сек. Эффективность электрокардиостимуляции (ЭКС) констатировали при возобновлении ритмичных активных предсердных/желудочковых систол с началом ЭКС.

Структура эксперимента

В случае стабильных ритмичных сокращений изолированного сердца с предсердно-желудочковой синхронизацией производилась констатация синусового ритма и в динамике на протяжении всего эксперимента оценивали хронотропную реакцию синусового узла на гипоксию (см. рис. 1). Момент возникновения полной АВ блокады характеризовал прекращение предсердно-желудочковой проводимости. В дальнейшем проводилось наблюдение за спонтанными сокращениями правого желудочка до момента их прекращения, что характеризовало затухание спонтанного желудочкового автоматизма (гибель водителей ритма II-III порядка).

После чего проводилась ЭКС при помощи электрокардиостимулятора ЭКСД-01Л (Биоток, Томск, Россия) через активный биполярный электрод-спираль, вкрученный в миокард передней стенки правого желудочка ближе к верхушке. ЭКС проводилась при постоянных энергетических характеристиках импульса: амплитуда 99 мА и длительность импульса 10 мс с частотой 160 импульсов в минуту. Об электрическом «захвате» миокарда судили по возобновлению ритмичных сердечных сокращений с частотой 160 в минуту, по прекращении которых констатировали критическое возрастание эффективного рефрактерного периода желудочков и утрату внутрижелудочковой проводимости с формированием exit-блока.

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Хронотропная реакция синусового узла

Частота сердечных сокращений (ЧСС) на интракорпоральном этапе (по вскрытии перикарда) составляла 140 ударов в минуту. После изоляции сердца частота сокращения (ЧС) предсердий стремительно уменьшалась на протяжении первых минут и к 5 минуте она составляла 26 ± 2 уд/мин (снижение на $81,4 \pm 14,3\%$). Асистолия предсердий регистрировалась к $36,5 \pm 7,5$ мин. (см. рис. 2).

Дромotropная реакция АВ соединения

После изоляции сердца на протяжении $6,1 \pm 3,1$ мин. наблюдалось совместное сокращение желудочков и предсердий. Затем мы наблюдали разобщение сокращений предсердий и желудочков в течение $20,25 \pm 4,5$ мин., свидетельствующее о возникновении полной поперечной блокады сердца.

Батmotронная реакция миокарда желудочков

После констатации полной АВ блокады проводили мониторинг частоты замещающего желудочкового ритма, который представлен на рис. 2 и свидетельствовал о функции замещающего автоматизма миокарда желудочков. Автоматизм желудочков плавно ослабевал, до наступления их асистолии к $24,1 \pm 3,8$ мин., что было свидетельством невозможности проявлять спонтанный автоматизм (спонтанная асистолия).

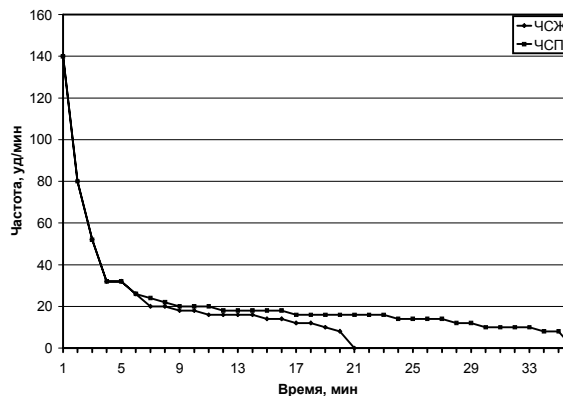


Рис. 2. Динамика частоты спонтанных желудочковых (ЧСЖ) и предсердных (ЧСП) сокращений.

Дромotropная реакция миокарда желудочков

После наступления асистолии желудочков, начинали асинхронную электростимуляцию правого желудочка и при подтверждении её эффективности считали сохранённой функцию проведения на границе электрод/миокард, а также по рабочему желудочковому миокарду. В дальнейшем на фоне продолжающейся ЭКС с теми же параметрами наблюдали ступенчатое уменьшение ЧС желудочков с сохранением её ритмичности (по типу выпадения стимулирующих импульсов 2:1 - 3:1 - 4:1 - 5:1, то есть последовательное проведение лишь каждого второго, затем каждого третьего, четвёртого, пятого импульса и т.д.) до повторного наступления желудочковой асистолии (асистолия exit-блока), которая обычно возникала через $24,1 \pm 3,75$ мин. Динамика ухудшения внутрижелудочковой проводимости представлена на рис. 3.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Динамика гипоксической дисфункции проводящих структур представлена на рис. 4, из которого прослежи-

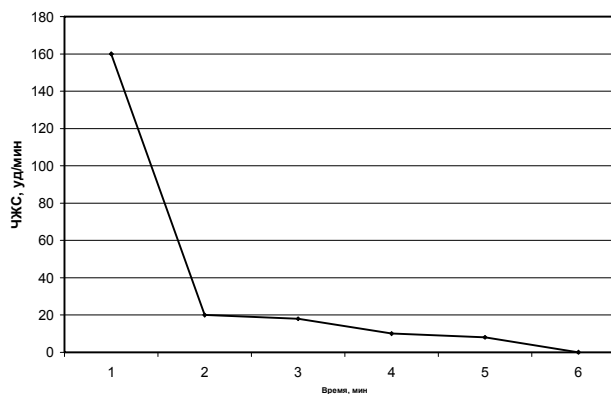


Рис. 3. Динамика состояния внутрижелудочковой проводимости при проведении электрокардиостимуляции с частотой 160 импульсов в минуту.

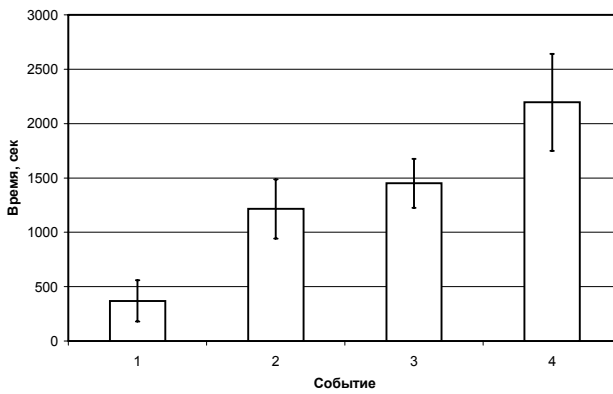


Рис. 4. Динамическая последовательность электрофизиологических изменений в процессе острой экспериментальной гипоксии: 1 - момент наступления полной АВ-блокады, 2 - остановка водителей желудочкового ритма, 3 - полная блокада выхода (total exit-bloc), 4 - прекращение активности синусового узла. Объяснения в тексте.

ваится следующая закономерность. Депрессия хронотропной функции синусового узла начиналась с первых секунд эксперимента. АВ-проведение прекращалось к $6,1 \pm 3,1$ мин., а генерация спонтанных желудочковых возбуждений к $20,25 \pm 4,5$ мин. Невозможность «захвата» миокарда при помощи электростимуляции, свидетельствующая о наступлении total exit-bloc, наблюдалась нами к $24,1 \pm 3,75$ мин. и, наконец, остановка спонтанного предсердного ритмовождения констатировалась к $36,6 \pm 7,4$ мин. Подобная закономерность позволяет говорить о временных и качественных различиях электрофизиологических реакций структур сердца на острую гипоксию в момент забора и сохранения донорского сердца. Выявление таких различий не является принципиально новой информацией. Они были обнаружены и подробно описаны во время углубленной гипотермии, искусственного кровообращения [3]. Выявлена разнонаправленная электрофизиологическая реакция синусового узла и АВ-соединения, предсердного и желудочкового миокарда в послеоперационном периоде в ответ на кардиохирургическую травму [2], показаны качественные различия в постнатальном электрофизиологическом онтогенезе проводящей системы [1]. В то же время, такая закономерность, описанная нами в во время острой гипоксии, демонстрируется впервые.

Ограничение исследования

Остаётся открытым вопрос о возможности интеграции полученных данных в единую динамическую шкалу гипоксической дисфункции проводящей системы сердца, поскольку полученные сведения отражают различные её этапы. В частности, момент урежения синусового ритма отражает начальную реакцию синусового узла, а момент наступления полной АВ-блокады - полное прекращение функционирования АВ-соединения, то есть финал ухудшения предсердно-желудочковой проводимости. Подобно дромотропной реакции АВ соединения, мы не смогли проследить всю хронологию внутрижелудочковой проводимости, поскольку электростимуляция начиналась лишь по прекращению спонтанного желудочкового автоматизма. На этом основании мы считаем целесообразным оценивать электрофизиологическую ди-

намику по «конечной» точке, то есть по моменту полного прекращения функции. С этих позиций хронология описанных событий может быть представлена следующим образом. В плане гипоксической депрессии электрофизиологических функций: АВ проводимость - желудочковый автоматизм - желудочковая возбудимость - синусовый/предсердный автоматизм. Таким образом, первым наблюдалось «выключение» АВ соединения, затем желудочкового миокарда и, наконец, последней регистрировалась утрата синусового автоматизма. Эти результаты согласуются с данными других авторов [12], показавших большую резистентность синусового узла к хроническим повреждающим факторам и его высокие резервы при гипертрофии и прогрессирующей предсердной дилатации.

Дискуссионным является вопрос электрофизиологической интерпретации полученных данных. Причина прекращения «электрического захвата» правого желудочка: внутрижелудочковая блокада, нарушение способности миокарда возбуждаться или сокращаться (электро-механическая диссоциация) может быть предметом дальнейших обсуждений, поэтому рациональным определением данного состояния считаем «exit-блок». Эти же три причины (утрата автоматизма, внутрипредсердная блокада, электро-механическая диссоциация) могли быть причиной предсердной асистолии. Генез предсердного ритма также не подвергался нами электрокардиографическому анализу. Не исключено, что в процессе эксперимента могла произойти смена предсердного водителя ритма, что не доступно визуальному определению. В своей интерпретации «синусового» ритма мы исходили из последовательного «затухающего» снижения частоты предсердных сокращений.

Метод визуального определения типа ритма (синусовый ритм, полная АВ-блокада, асистолия) может быть подвергнут критике со стороны других авторов. В то же время точность зрительной констатации этих состояний является очевидной. Проведение же электрофизиологического контроля подразумевает фиксацию двух и более диагностических электродов к миокарду предсердия и желудочков, множественных игольчатых «микроэлектродов» для верификации уровня наступления АВ блокады и нескольких десятков эпикардальных электродов для определения топографии предсердного автоматизма. Эти манипуляции значительно удлинит и исказит бы ход исследования, поскольку наиболее важные электрофизиологические изменения происходили именно в первые минуты эксперимента. В то же время установление отдельных механизмов описанных событий требует включения в последующие протоколы эксперимента электрофизиологических методик: регистрация электрограмм, программированная электростимуляция, последовательный мэпинг.

Все исследования проводились на крысах, и очевидно, что их результаты не могут быть экстраполированы на человека, хотя и дают почву для дальнейшего изучения влияния гипоксии на различные отделы сердца у человека. Не исключено, что условиях эксперимента не были абсолютно идентичны условиям забора и хранения сердца-трансплантата, что могло повлиять на результаты эксперимента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Различные отделы сердца обладают разной устойчивостью к ишемии и острой гипоксии, сопровождающих процесс изъятия донорского сердца, что необходи-

мо учитывать для анализа генеза «аритмий трансплантированного сердца». Устойчивость проводящих структур к этим факторам возрастает в направлении: атриовентрикулярное соединение - миокард желудочков - миокард предсердий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Панфилов С.В., Туров А.Н., Горбатов Ю.Н. и др. Электрофизиологическая характеристика проводящей системы сердца при дефектах межжелудочковой перегородки у детей грудного возраста // Патология кровообращения и кардиохирургия. - 2001. - №3. - С. 36-41.
2. Туров А.Н. Электрофизиология проводящей системы сердца при дефектах межжелудочковой перегородки у детей раннего возраста // Автореф. к.м.н. - Новосибирск, 2003. - 17 с.
3. Янченко Я.Н. Нарушения автоматизма и проводимости при коррекции врождённых пороков сердца // Автореф. к.м.н. - Новосибирск, 1999. - 15 с.
4. Hyde J.A.J., Rooney S.J., Pitt M.P.I. et al. Immunohistochemical identification of complement membrane attack complex and subclinical ischemia in donor heart. 12th Annual Meeting of the EACTS, pp. 60-64, 1998.
5. Depre C., Vanoverschelde J-L.J., Taegtmeyer H. Glucose for the Heart // Circulation. 1999;99:578-588.
6. Ferrari R. Pathophysiological vs biochemical ischaemia: a key to transition from reversible to irreversible damage // European Heart Journal Supplements, 3 (Supplement C), C2-C10. 2001
7. Jacquet L, Ziady G, Stein K, et al. Cardiac rhythm disturbances early after orthotopic heart transplantation: prevalence and clinical importance of the observed abnormalities // J Am Coll Cardiol 1990;16:832-7.
8. Iwai K., Hori M., Kitabatake A. et al. Disruption of microtubules as an early sign of irreversible ischemic injury. Immunohistochemical study of in situ canine hearts // Circ. Res. 67: 694-706, 1990
9. Hein S, Scheffold T, Schaper J. Ischemia induces early changes to cytoskeletal and contractile proteins in diseased human myocardium // J Thorac Cardiovasc Surg 1995; 110: 89-98.
10. Levraut J, Iwase H., Shao Z.-H. et al. Cell death during ischemia: relationship to mitochondrial depolarization and ROS generation // Am J Physiol Heart Circ Physiol, Vol. 284, Issue 2, H549-H558, February 2003
11. Pinski S.L., Bredikis A.J., Winkel E. et al. Radiofrequency Catheter Ablation of Atrial Flutter After Orthotopic Heart Transplantation: Insights into the Redefined Critical Isthmus // J Heart Lung Transplant 1999;18:292-296.
12. Sanders P., Kistler P., Morton J. B. et al. Remodeling of Sinus Node Function in Patients With Congestive Heart Failure: Reduction in Sinus Node Reserve // Circulation, Aug 2004; 110: 897 - 903.
13. Weinberg J.M., Venkatachalam M.A., Roeser N.F. et al. Anaerobic and aerobic pathways for salvage of proximal tubules from hypoxia-induced mitochondrial injury // Am J Physiol Renal Physiol. -2000. - Vol. 279, 5. - 927-943.

ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ ДОНОРСКОГО СЕРДЦА ДО МОМЕНТА ТРАНСПЛАНТАЦИИ

М.М.Мандрик, А.Н.Туров, П.М.Ларионов, М.Б.Васильева, Е.А.Покушалов, Д.В.Субботин

С целью исследования электрофизиологического (ЭФ) состояния и реакций специализированного и рабочего миокарда донорского сердца на острую гипоксию при условиях, аналогичных таковым при изъятии и хранении донорского сердца до момента его трансплантации, проведены эксперименты на 30 самцах белых беспородных крыс. Под эфирным наркозом проводилась декапитация животных, сердце извлекалось путем левосторонней торакотомии. При этом после вскрытия перикарда производилось выделение магистральных сосудов, наложение зажимов с последующим лигированием обеих полых вен, аорты, легочного ствола и легочных вен и выполнялось изъятие сердца. Изолированное сердце помещалось в холодный RPMI-1640 при +4°C.

Сократимость камер сердца констатировалось тремя врачами-экспертами. Активные систолы предсердий и желудочков определялись визуально. За синусовый ритм мы считали стабильно ритмичные сокращения изолированного сердца с предсердно-желудочковой синхронизацией. Полную атриовентрикулярную (АВ) блокаду определяли как полную АВ десинхронизацию с активными спонтанными ритмичными систолами предсердий и желудочков независимо друг от друга, когда частота предсердных сокращений превышала частоту желудочковых.

Желудочковую асистолию определяли по прекращению спонтанных сокращений желудочков и отсутствию активных желудочковых систол на протяжении 10 сек. Предсердную асистолию определяли по прекращению спонтанных сокращений предсердий и отсутствию активных предсердных систол на протяжении 10 сек. Эффективность электрокардиостимуляции (ЭКС) констатировали при возобновлении ритмичных активных предсердных/желудочковых систол с началом ЭКС.

Частота сердечных сокращений на интракорпоральном этапе составляла 140 ударов в минуту. После изоляции сердца частота сокращения (ЧС) предсердий стремительно уменьшалась на протяжении первых минут и к 5 минуте она составляла 26 ± 2 уд/мин (снижение на $81,4 \pm 14,3\%$). Асистолия предсердий регистрировалась к $36,5 \pm 7,5$ мин. После изоляции сердца на протяжении $6,1 \pm 3,1$ мин. наблюдалось совместное сокращение желудочков и предсердий, затем - разобщение сокращений предсердий и желудочков в течение $20,25 \pm 4,5$ мин. Автоматизм желудочков плавно ослабевал, до наступления их асистолии к $24,1 \pm 3,8$ мин., что было свидетельством невозможности проявлять спонтанный автоматизм (спонтанная асистолия). После наступления асистолии желудочков, начинали асинхронную электростимуляцию правого желудочка и при подтверждении её эффективности считали сохранённой функцию проведения на границе электрод/миокард, а также по рабочему желудочковому миокарду. В дальнейшем на фоне продол-

жающейся ЭКС с теми же параметрами наблюдали ступенчатое уменьшение ЧС желудочков с сохранением её ритмичности (по типу выпадения стимулирующих импульсов 2:1 - 3:1 - 4:1 - 5:1, то есть последовательное проведение лишь каждого второго, затем каждого третьего, четвёртого, пятого импульса и т.д.) до повторного наступления желудочковой асистолии (асистолия exit-блока), которая обычно возникала через $24,1 \pm 3,75$ мин.

Таким образом, различные отделы сердца обладают разной устойчивостью к ишемии и острой гипоксии, сопровождающих процесс изъятия донорского сердца, что необходимо учитывать для анализа генеза «аритмий трансплантированного сердца». Устойчивость проводящих структур к этим факторам возрастает в направлении: атриовентрикулярное соединение - миокард желудочков - миокард предсердий.

ELECTROPHYSIOLOGICAL STATE OF DONOR HEART PRIOR TO TRANSPLANTATION

M.M. Mandrik, A.N. Turov, P.M. Larionov, M.B. Vasil'eva, E.A. Pokushalov, D.V. Subbotin

To study the electrophysiological state and responses of specialized and contracting myocardium of donor heart to acute hypoxia under conditions similar to removal and storage of the donor heart until its transplantation, the experiments were carried out on 30 male cross-breed rats. Under ether anesthesia, the animals were decapitated and hearts were taken out by a technique of left-side thoracotomy. After pericardial dissection, the great vessels were isolated and clipped, then superior and inferior vena cava, aorta, pulmonary trunk, and pulmonary veins were ligated and the heart was extracted. An isolated heart was stored in clod RPMI-1640 solution at a temperature of $+4^{\circ}\text{C}$.

The contractility of heart chambers was verified by three medical experts. Active systoles of atria and ventricles were visually assessed. The sinus rhythm was considered as stable rhythmic contractions of an isolated heart with atrio-ventricular synchronization. The complete atrio-ventricular block was defined as complete atrio-ventricular desynchronization with active independent spontaneous rhythmic systoles of atria and ventricles when atrial rate was higher than ventricular rate.

The ventricle asystole was considered to be cessation of spontaneous ventricular contractions and absence of active ventricular systoles during a 10-second period. The atrial asystole was considered as cessation of spontaneous atrial contractions and absence of active atrial systoles during a 10-second period. The efficacy of cardiac pacing was established in the case of resumption of active rhythmic atrial/ventricular systoles after onset of pacing.

At the intracorporal stage, the heart rate was 140 bpm. In the course of first minutes following the heart isolation, atrial heart rate abruptly decreased, being 26 ± 2 bpm by the 5th minute (decrease by $81.4 \pm 14.3\%$). Atrial asystole was recorded by a 36.5 ± 7.5 minute. After heart isolation, the ventricles and atria contracted jointly for 6.1 ± 3.1 min, then, they were contracted independently for 20.25 ± 4.5 min. The ventricular automatism decreased gradually and the asystole developed by 24.1 ± 3.8 min, the latter evidence of an inability to spontaneous automatism (spontaneous asystole). After the onset of ventricular asystole, asynchronous right ventricular pacing was started. In the case of effectiveness of pacing, the conduction at the edge electrode/myocardium as well as through the contractile ventricular myocardium was considered as preserved. At the background of subsequent pacing with the same parameters, a gradual decrease with the ventricular pacing rate of preserved rhythmicity occurred (omission of stimulated impulses 2:1 – 3:1 – 4:1 – 5:1, i.e. a consecutive conduction of only one from two, three, four, and five impulses etc.) till recurrence of ventricular asystole (exit-block asystole) which usually developed 24.1 ± 3.75 min later.

Thus, different parts of heart have different tolerance to ischemia and acute hypoxia that accompanies the removal of donor heart. This fact can be taken into consideration when analyzing the origin of “transplanted heart arrhythmias”. The tolerance of conducting structures to the above mentioned factors increases to the direction: atrioventricular junction - ventricular myocardium – atrial myocardium.