

**Автономная некоммерческая общеобразовательная  
организация "Физтех-лицей"  
(АНОО «Физтех-лицей» им. П.Л. Капицы)**

**XX научно-практическая  
конференция**

**«Старт в инновации»**

**Разработка условий содержания сердца для  
длительного сохранения**

Выполнили:  
Кантария Давид, 9Б  
Руководитель: Слотвицкий М. М.,  
аспирант лаборатории возбудимых систем МФТИ

Московская область, г. Долгопрудный

2021 г.

## Оглавление

|   |    |
|---|----|
| 1. Введение.....  | 3  |
| 2. Литературный обзор .....                                       | 4  |
| 2.1. Сердечная недостаточность и ишемия .....                     | 4  |
| 2.2. Критерии отбора донорского сердца .....                      | 5  |
| 2.3. Постоперационные риски и длительное сохранение .....         | 7  |
| 2.4. Оптическое картирование и метод регистрации NADH.....        | 8  |
| 3. Практическая часть .....                                       | 9  |
| 3.1. Методы и материалы исследования.....                         | 9  |
| 3.2. Основные результаты работы.....                              | 11 |
| 3.2.1. Конструирование установки постоянной перфузии .....        | 11 |
| 3.2.2. Проверка установки с помощью метода регистрации NADH ..... | 12 |
| 4. Заключение и выводы .....                                      | 14 |
| 5. Список литературы .....  | 14 |

# 1. Введение

За последние пятьдесят лет сердечная трансплантация стала золотым стандартом лечения для пациентов с терминальной стадией сердечной недостаточности и единственным решением для пациентов, позволяющим восстановить примерно 70% качества их жизни. Несмотря на то, что количество случаев трансплантации сердца ежегодно увеличивается во всем мире, сохраняется дефицит в наличии органов, что подтверждается значительной смертностью пациентов, находящихся в списке ожидания. Ситуация также усугубляется с ростом среднего возраста населения. Ощущается острая необходимость развития качества медицинской помощи при сердечной недостаточности и распространения использования механической поддержки кровообращения для ожидающих пациентов. Исходя из статистики, спрос на донорские сердца значительно превосходит количество жизнеспособных донорских сердец. Одной из основных причин такого маленького предложения донорских сердец является то, что около 60% сердец по разным причинам являются непригодными для аллотрансплантации.

Меня заинтересовала эта тема, и я решил создать систему постоянной перфузии, поддерживающую жизнеспособность и насосную функцию сердца.

Область исследования:

Цель работы: Разработка метода диагностики функциональности сердца, который в будущем способствует снижению смертности пациентов, перенесших трансплантацию сердца. Данная часть проекта посвящена созданию условий и на их базе установки для длительного сохранения сердца.

Задачи:

- Апробация и подбор методов оценки функциональности сердечной ткани, для расширения представления о возможных осложнениях и повреждениях, особенно ишемических.
- Определение условий длительного сохранения сердца и условий регистрации сигнала.
- Исследование и сравнение различных видов длительного сохранения сердца перед трансплантацией с целью выявления лучшего.
- Создание установки для длительного сохранения и одновременной регистрации флуоресцентных сигналов

Ожидаемый результат представляет собой систему оценки сохранности донорского сердца в процессе длительного сохранения перед трансплантацией. В частности, систему для поддержания жизнеспособности сердца с непосредственной регистрацией необходимых сигналов.

## **2. Литературный обзор**

На данный момент существует проблема нехватки донорских сердец для трансплантации, а также проблема постоперационных аритмий. Данные проблемы решаются расширением и грамотным построением критериев отбора и сбором информации о функциональности донорского сердца на каждом этапе длительного сохранения до трансплантации.

### **2.1. Сердечная недостаточность и ишемия**

Согласно отчету Евротрансплантации трансплантация сердца является четвертой по количеству операций по трансплантации, число доноров в последнее десятилетие немного уменьшилось [1,2].

Операция по трансплантации человеческого сердца была впервые проведена в ЮАР Кристианом Бернардом в 1967 году. Пациент, которому была совершена пересадка, умер через 18 дней. Операция до сих пор является крайней мерой в случаях очень тяжелого набора заболеваний, приводящего к острой сердечной недостаточности, не поддающегося медикаментозному лечению. Постоперационный период также тяжелый и сопряжен с огромным количеством рисков. В отчете ISLHT за 2019 год средняя продолжительность жизни пациентов после трансплантации превышает 12 лет, что является одним из самых больших достижений процедуры трансплантации.

Сердце представляет собой своеобразный насос, из чего следует его основная функция- перекачивание крови. Сердце устроено таким образом, что для реализации этой функции, области сердца последовательно активируются: пейсмекер, предсердия, AV, желудочки

Сокращение, как было показано выше вызвано слаженной работой по передаче электромеханического возбуждения кардиомиоцитами. Любое отклонение от нормальной

передачи этого возбуждения называют аритмиями. Такие отклонения могут быть неопасны, например, с предсердными аритмиями человек может жить более 10 лет, даже не зная о своей болезни. Наиболее опасны желудочковые тахикардии, которые чаще всего приводят к летальному исходу. Одной из причин возникновения таких аритмий могут быть реентри - режим возбуждения, при котором волна возбуждения циркулирует по кругу. Однако при ишемии такие реентри могут возникать чаще и на препятствиях меньшего размера. Главным образом, это происходит из-за изменения скорости проведения волны возбуждения и изменения потенциала действия при ишемии. В результате поврежденный участок становится неоднородностью, из-за которого и вследствие уменьшения потенциала действия отдельного кардиомиоцита возникают реентри [3,4], что в масштабе сердца приводит к нарушению работы сердца и фибрилляции.

## 2.2. Критерии отбора донорского сердца

Операция по трансплантации человеческого сердца была впервые проведена в ЮАР Кристианом Бернардом в 1967 году. Пациент, которому была совершена пересадка, умер через 18 дней. Операция до сих пор является крайней мерой в случаях очень тяжелого набора заболеваний, приводящего к острой сердечной недостаточности, не поддающегося медикаментозному лечению.

В России по данным на 2019 год было проведено 337 операций, а в листе ожидания сердца состоят 900 потенциальных выбранных реципиентов. Средний срок ожидания сердца у нас составляет 2,9 лет, при чем с каждым годом количество потенциальных реципиентов увеличивается примерно в 2 раза [7,8].

Фундаментальной причиной неизбежности процесса роста потребности пересадки является тот факт, что потенциал сердечной ткани к ауторегенерации заключается, предположительно, в наличии в сердце небольшого количества собственных стволовых клеток и, как следствие, крайне невысок [6]. Глобально существует несколько причин, по которым пересадка сердца может быть неудачной: неправильный подбор донорского органа, отторжение органа и послеоперационные аритмии.

Недостаток донорских сердец делает неизбежным компромисс по подбору пары донор-пациент. Единственным способом облегчить ситуацию является увеличение пула

донорских сердец за счёт более тщательной диагностики работоспособности органа и улучшения методов транспортировки и длительного сохранения перед операцией.

Часть проведенных клинических исследований продемонстрировала, что определяющим фактором успеха при пересадке сердца является прежде всего здоровье пациента, получающего сердце, чем донора

Наиболее общими являются Маастрихтские критерии (измененные в 2011 году), которые базируются на категориях смерти донора: DCD (Donation after circulatory death или эффективные доноры) и DBD (Donation after brain death или доноры со смертью мозга). Дело в том, что для категории DBD отсутствуют или минимальны риски, связанные с временем тепловой ишемии (WIT, warm ischemic time). Для категории DCD все зависит от причины смерти, которые также для удобства разбили на категории:

1. Смерть до прибытия в больницу
2. Неудачная реанимация
3. Сердечная смерть после отмены мер по поддержанию жизни
4. Неожиданная смерть больного, находящегося на лечении в больнице, после неудачной реанимации

Чаще всего для DCD используются доноры категории 3, так как данная категория наиболее контролируемая с точки зрения времени тепловой ишемии.

Таким образом, основным критерием оценки функциональности сердца является приблизительное время тепловой ишемии, которое оценивает врач без анализов. Для меньших рисков используют доноров из категории DBD, так как органы для данной категории почти не подвержены физиологическим изменениям, связанными со смертью мозга и внутричерепной гипертензией.

Это в первую очередь такие критерии, как: возраст донора; диабет и гипертония; донорская история наркомании; соотношение параметров веса и роста донора к реципиенту; стабильная гемодинамика; история травмы грудной клетки; серология HCV / HBV / ВИЧ; экспрессия тропонина I. К исследованиям донорского сердца при подборе донора относятся: ожидаемое время холодной ишемии; ИБС (ишемическая болезнь сердца); сердечные нарушения; инфузия дофамина или добутамина; гипертрофия левого желудочка; сердечно-легочная реанимация; ЭКГ [1]

Наиболее значительным фактором является возможное время сохранения сердца, которое врач предсказывает на основании основных расширенных или стандартных критериев отбора.

### 2.3. Постоперационные риски и длительное сохранение

Основными причинами смертности у этих пациентов являются дисфункция трансплантата постоперационные аритмии в первые 30 дней, инфекционные причины в первый год и почечная недостаточность и васкулопатия трансплантата сердца в долгосрочной перспективе. Первые 30 дней, как и в последующий год жизни ключевую роль высокой смертности после трансплантации играют постоперационные аритмии и дисфункция сердца [9]. Продолжительное время ишемии трансплантата (4 часа и более) может привести к повреждению проводящей системы сердца. В зависимости от характера повреждений, последствия могут проявиться как в раннем (30 дней), так и в позднем (1 год) постоперационном периодах. При этом повышается и риск хронического отторжения, вызванного усиленной активацией эндотелия трансплантата. Отторжение органа является одной из проблем, которые также продолжают мешать выживанию пациентов [2]. Существует два основных вида отторжений: хроническое или острое отторжение (ACR, Acute Cellular Rejection) и гуморальное отторжение (антитело-опосредованное, AMR, Antibody-mediated Rejection). ACR и AMR являются важными факторами в прогнозе реципиентов, но данные отторжения в целом снизились из-за эффективного иммуносупрессивного лечения.

Стратегии оптимального сохранения аллотрансплантата основаны на минимизации времени холодной ишемии. Ишемия, превышающая 4 часа, значительно увеличивает риск первичной дисфункции трансплантата, что связано с 8% -ной смертностью через 30 дней и повышенной смертностью через 5 и 15 лет после трансплантации. Стандартная стратегия сохранения, на основе которой введено понятие «холодная ишемия», состоит в том, что донорское сердце промывают консервационным раствором *in vivo*, быстро отделяют от донора и хранят в холодном физиологическом растворе или консервационном промывочном растворе при 4 °C. Считается, что этот метод замедляет метаболическую активность миокарда достаточно сильно, чтобы минимизировать образование очагов ишемического-реперфузионного повреждения у аллотрансплантатов от доноров младше 40 лет. В настоящее время такое холодное статическое хранение донорского сердца остается стандартной практикой в большинстве трансплантационных отделений. В таком виде орган транспортируют в больницу-получатель для имплантации.

Сердца, сохраняемые по этому методу, имеют переносимый ишемический период от 4 до 6 часов, после которого разрушение органа приводит к более высокому риску отказа трансплантата и худшим исходам у реципиента. Кроме того, с использованием существующего метода сохранения сердца, донорское сердце оценивается исключительно *in vivo*, то есть без дальнейшей оценки после того, как сердце остановлено и поставлено на длительное сохранение и без учета любых заболеваний или травм, которые могли иметь место во время процесса извлечения или в пути. Несмотря на это, сердца, сохраненные таким способом, показали стабильные результаты после трансплантации.

Появление машинной перфузии *ex-situ* позволяет реанимировать и оценивать органы до трансплантации на предмет функциональности. Впервые использование машинной перфузии во время трансплантации привело к успешной трансплантации сердца DCD с транспортировкой в 2014 году в больницы Святого Винсента, Сидней, Австралия. На сегодняшний день было выполнено более 100 успешных DCD-трансплантаций сердца в 6 отделениях в Австралии, Великобритании и Бельгии. В отличие от холодного сохранения, использование машинной перфузии при закупке донорского сердца в настоящее время ограничено несколькими центрами в Соединенных Штатах и Европе. В настоящее время существует только одно устройство, доступное для клинического применения- это Transmedic Organ Care System (OCS). Эта система использует комбинацию донорской крови и запатентованного раствора в качестве перфузата для сердца при легкой гипотермии (34 °C), почти при нормотермии. Для нормотермической перфузии необходимы растворы особого состава, так как поддерживается постоянное давление, содержание газов и температура. Сам прибор позволяет проводить измерения следующих физиологических параметров: ЭКГ, гематокрит, SaO<sub>2</sub>, аортальный кровоток, аортальное давление, коронарный поток и температура. Для содержания сердца также проводятся рутинные измерения содержания газов в крови, включая уровень лактата. Преимущество нормотермической перфузии заключается в ее способности реанимировать сердце, что позволяет врачу дать функциональную оценку донорского сердца непосредственно перед трансплантацией. В настоящее время для определения жизнеспособности органов используется комбинация визуального контроля, параметров обмена веществ и потока.

#### 2.4. Оптическое картирование и метод регистрации NADH

Оптическое картирование – это высокочувствительный метод визуализации процессов в ткани с помощью различных флуоресцентных красителей или естественной



флуоресценции. С помощью данного метода можно с высоким временным и пространственным разрешением увидеть распространение волны возбуждения в сердце. Для таких целей используются стимулирующие электроды и потенциал или кальций зависимые красители. В данной работе использовалось картирование свечения NADH.

NADH или никотинамидадениндинуклеотид по сути является переносчиком электрона при окислительном фосфорилировании (при этом  $\text{NAD}^+$  окисляется до NADH). При ишемии падает уровень кислорода, конечного акцептора электрона, поэтому уровень NADH в цитоплазме растет. Спектр его поглощения в районе 360 нм (ультрафиолет), спектр излучения в районе 485 нм (синий). Таким образом, накопление NADH свидетельствует об ишемии или других метаболических нарушениях [5]. Накопление NADH при ишемии проиллюстрировано на рисунке 1.

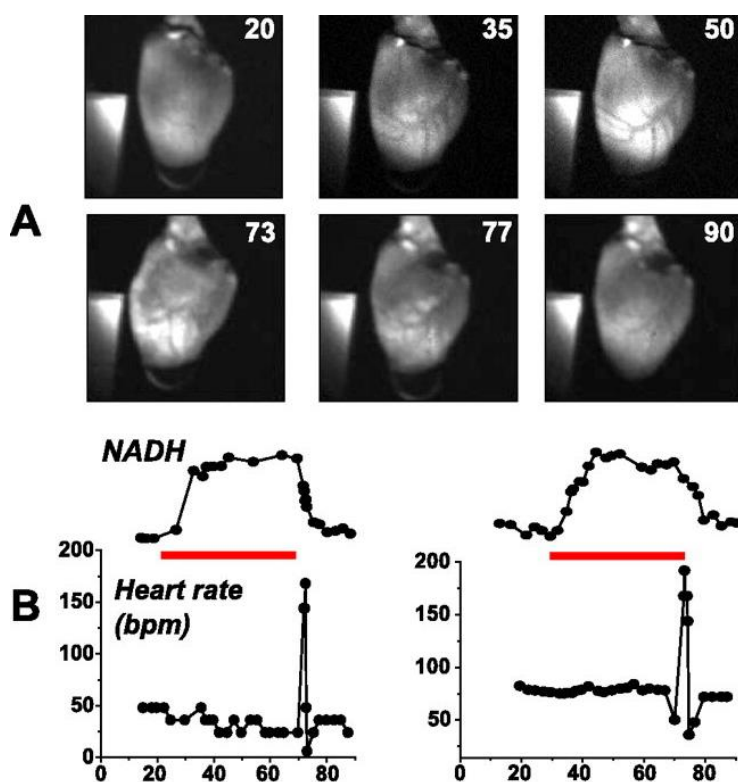


Рисунок 1. Накопление и флюоресценция NADH в сердце. Красная прямая – период ишемии. Иллюстрация взята из [5].

### 3. Практическая часть

#### 3.1. Методы и материалы исследования

В данной работе использовались следующие методы:

- Оптическое картирование с системой стимулирующих и регистрирующих электродов
- Работа с кардиоплегическими растворами
- Работа с неонатальными кардиомиоцитами крысы и с животными
- Определение участков ишемии с помощью NADH-картирования
- Перфузия по Лангендорфу

Для реализации цели работы был составлен следующий план эксперимента:

- Определение условий оптимального содержания сердца в процессе перфузии, целесообразность постоянной перфузии
- Конструирование системы постоянной перфузии сердца с учетом этих условий
- Конструирование камеры для содержания сердца при длительной постоянной перфузии
- Проверка установки для длительного сохранения с помощью нормотермического кардиоплегического раствора «Нормакор»
- Проверка конструкции для поддержки функциональности сердца в контрольном случае

Для конструирования установки постоянной перфузии брался за основу метод перфузии по Лангендорфу. Сама перфузионная установка состояла из следующих основных частей:

- насос Masterflex L/S Digital Drive, 600 rpm с 2 кругами обращения
- нагреватель-термостат Cole-Parmer Polystat Standard 6.5 литров
- оксигенатор с регулятором и баллоном O<sub>2</sub>
- bubble-trap, ловушка для пузырей воздуха (в сердце не должно попадать пузырей, так как это вызовет ишемию)
- Термоплет для поддержания температуры самой камеры для сердца
- Соединения и трубки

Разработка камеры проводилась на основе полидиметилсилоксана или PDMS.

Приготовление PDMS осуществлялось следующим способом:

- Добавить 1 грамм фермента на 10 грамм базы PDMS
- Тщательно размешать фермент в течение 5 минут до его равномерного распределения в базе
- Поставить в печь на 70 °С примерно на полтора часа до полной полимеризации субстанции

Регистрация флуоресценции NADH осуществлялась с помощью:

- Блок высокоскоростной камеры PCO и сама камера
- Предметный микроскоп с большой собирающей линзой.
- Блок лазера (488nm, 200mW)
- Система призм и светофильтров (внутри предметного микроскопа)

- Регулируемый стол для резервуара с сердцем
- Компьютер с программным обеспечением камеры

В данной работе использовались сердца лабораторных крыс. Все операции проводились с помощью стерилизованных хирургических инструментов. Канюлирование сердца проводилось через главную аорту. Сердце привязывалось к канюле с помощью хирургических чистых нитей.

Прокачиваемой жидкостью был раствор солей Тирода, который содержит: NaCl 0,8%, KCl 0,02%, CaCl<sub>2</sub> 0,02%, NaHCO<sub>3</sub> 0,01%, MgCl<sub>2</sub> 0,01%, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,005%, Глюкоза 0,1%. В данной работе использовалась готовая покупная смесь.

## 3.2. Основные результаты работы

### 3.2.1. Конструирование установки постоянной перфузии

В данной работе были определены основные условия для содержания сердца без потерь его функциональности:

- Постоянная перфузия с оптимальным давлением в желудочках для сохранения насосной функции сердца
- Постоянная температура около 37 °С
- Постоянное поддержание кислорода под определенным давлением не менее 95 % в прокачиваемой жидкости
- Прокачиваемая жидкость должна быть близка по ионному составу к крови и постоянным pH 7,2. В работе использовался раствор солей Тирода.

Данные параметры перманентно контролируются в созданной конструкции с помощью pH-метра, насоса, термостата, оксиметра. По сути сконструированная система поддерживает набор естественных для сердца параметров, представляя собой замену круга кровообращения (Рисунок 2). Важно, подбирать скорость перфузии таким образом, чтобы не было повышенного давления в желудочках сердца. Также само сердце должно длительно находиться в изолированных условиях.



Рисунок 2. Общая схема сконструированной установки по постоянной перфузии сердца.

Таким образом, было решено сделать собственную камеру для длительного содержания сердца (Рисунок 3). Камера может быть полностью заполнена жидкостью, что необходимо для некоторых способов длительного сохранения. Так же камера обладает несколькими креплениями для трубок, что позволяет эффективно осуществлять откачку жидкости, контролируя ее уровень в оксигенаторе и пузырьковой ловушке. В пузырьковой ловушке всегда должна быть жидкость, иначе в сердце попадет воздух, что приведет к его гибели. Также мягкость полимера позволяет легко манипулировать сердцем в камере, не повреждая его и не создавая лишнего давления. Также было решено снабдить камеру термоплетом, то есть нагревательной пластинкой, чтобы поддерживать 37 °С также и в самой камере. Канюля с сердцем подключается непосредственно к выходу из пузырьковой ловушки.

Для введения кардиopleгии в установку может подключаться дополнительная пузырьковая ловушка. Введение кардиopleгии также может осуществляться заменой резервуара в термостате.

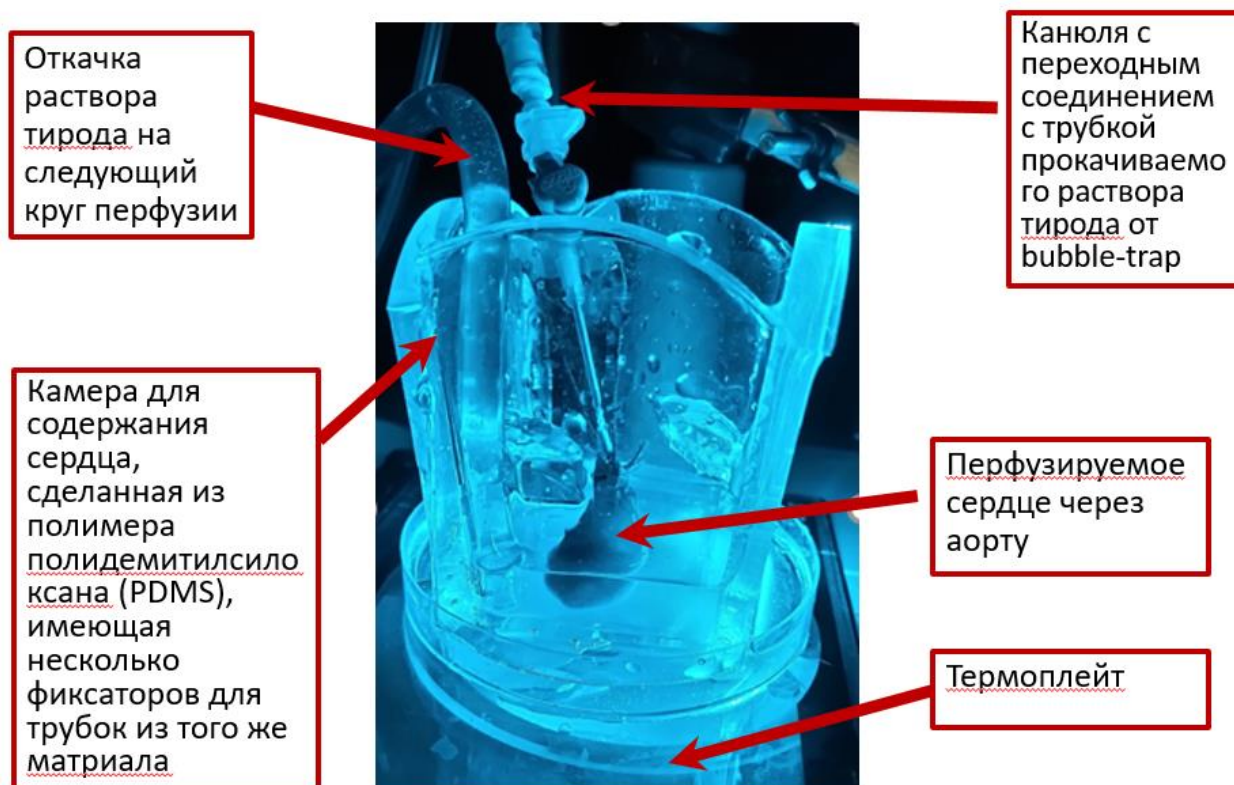


Рисунок 3. Конструкция камеры для длительной перфузии сердца.

### 3.2.2. Проверка установки с помощью метода регистрации NADH

Неинвазивный способ оценки жизнеспособности сердца базируется на том факте, что ишемическим процессам в миокарде сопутствует накопление молекул NADH. NADH обладает собственной флюоресценцией с длиной волны 460nm (синий цвет) под действием ультрафиолета (350nm). Таким образом, в основе собранной установки лежит

соответствующий лазер, оптическая система линз и высокоскоростная камера PCO для регистрации флуоресцентных сигналов. Метод был опробован на перфузируемом сердце, подтвердив возможность визуализации локальной ишемии. Даже при низкой амплитуде собственной флуоресценции NADH, собранная установка позволяет записать сигнал с частотой 100 кадров в секунду.

Собранная установка по перфузии сердца поддерживает все необходимые параметры для кратковременного сохранения сердца. При выключении перфузии наблюдался резкий рост накопления NADH, то есть появление ишемии. Регистрация в случае выключения перфузии по протоколу как на рисунке 4 длилась 5 минут. Также делались короткие видео-фрагменты по 20 секунд в течение 30 минут после выключения перфузии на 10 минут. Через 10 минут после выключения перфузии наблюдались значительные ухудшения насосной функции сердца. Сокращения становились слабее. После включения перфузии насосная функция частично восстанавливалась через 5 минут.

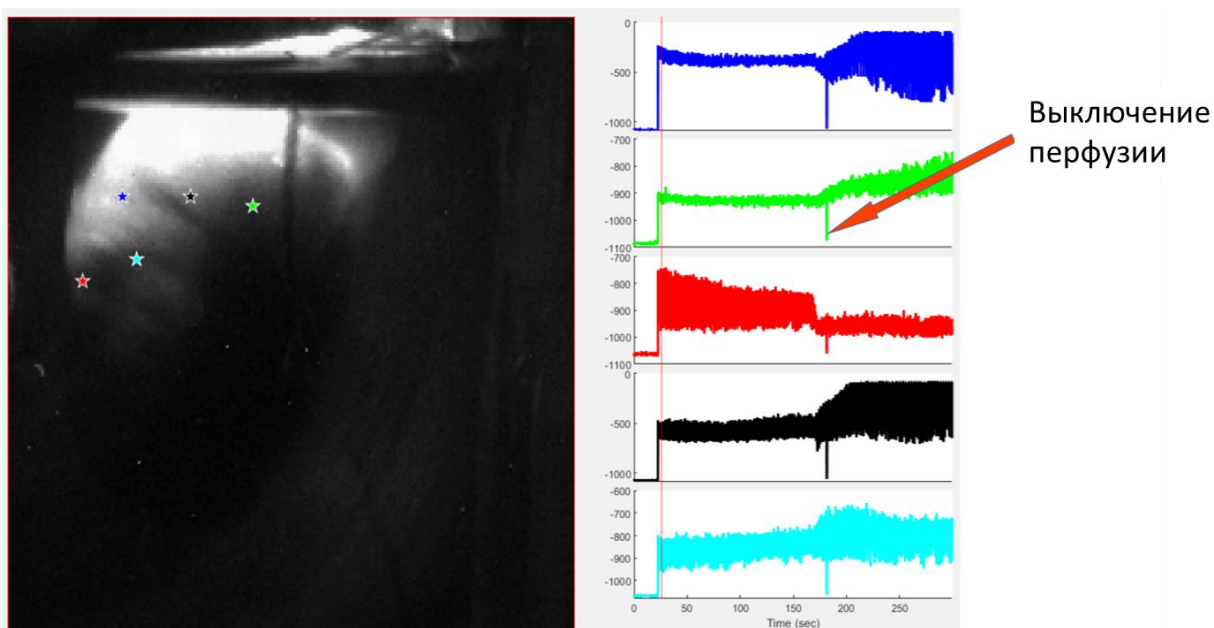


Рисунок 4. Регистрация флуоресценции NADH в разных частях сердца при выключении перфузии. Разные места регистрации обозначены разными цветами и соответствующими цветом треками. Графики отражают интенсивность флуоресценции NADH.

Также в данной работе была произведена валидация собранной установки с помощью кардиопегического нормотермического раствора «Нормагор». «Нормагор» разводился 1:5 согласно инструкции изготовителя. Каждые полчаса осуществлялась регистрации флуоресценции NADH в течение 30 секунд свечения лазером и записи видео. За 4 часа содержания сердца в кардиоплегии видимого накопления NADH после отмыва раствора не произошло (Рисунок 5). Также насосная функция после отмыва раствора полностью восстановилась.

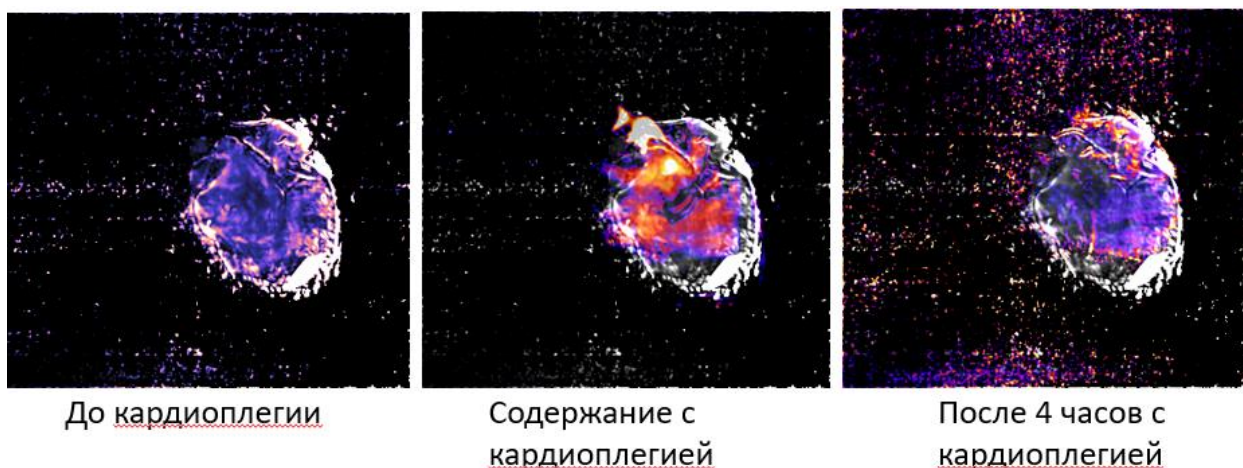


Рисунок 5. Регистрация флуоресценции NADH до, во время и после 4 часов перфузии с кардиopleгическим раствором «Нормакор»

#### 4. Заключение и выводы

В данной работе:

- Была сконструирована и валидирована система постоянной перфузии для длительного содержания сердца
- Были подобраны условия длительного содержания сердца для кардиopleгического раствора «Нормакор».

В дальнейшем будут выявлены критерии обратимости функциональных изменений сердца при различных способах длительного сохранения. В перспективе на базе данной работы будет собрана система для неинвазивной проверки функциональности сердца при любых операциях на открытом сердце. Система решает 2 основные мировых проблемы трансплантации: качественный отбор доноров; операционные и постоперационные осложнения.

#### 5. Список литературы

1. Beuth, J., Falter, F., Ribeiro, R. V. P., Badiwala, M., & Meineri, M. (2019). New strategies to expand and optimize heart donor pool: ex vivo heart perfusion and donation after circulatory death: a review of current research and future trends. *Anesthesia & Analgesia*, 128(3), 406-413.
2. Lobo, M. C. (2019). Indications and outcome in adult heart transplantation.
3. Dobson GP, Faggian G, Onorati F, Vinten-Johansen J. Hyperkalemic cardioplegia for adult and pediatric surgery: end of an era? *Front Physiol.* 2013;4: 228.
4. Kadota S, Minami I, Morone N, Heuser JE, Agladze K, Nakatsuji N. Development of a reentrant arrhythmia model in human pluripotent stem cell-derived cardiac cell sheets. *Eur Heart J.* 2013;34: 1147–1156.

5. Matthew Kay, Luther Swift, Brian Martell, Ara Arutunyan, and Narine Sarvazyan. Locations of ectopic beats coincide with spatial gradients of NADH in a regional model of low-flow reperfusion *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2008 294:5, H2400-H2405
6. Bearzi C. et al. Human cardiac stem cells // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2007. – Т. 104. – №. 35. – С. 14068-14073
7. Жульков М. О. и др. Современное состояние проблемы и результаты ex vivo перфузии донорских сердец // *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. – 2020. – Т. 21. – №. 4. – С. 143-146.
8. Моторина С. А., Проскурова Е. В., Клейменова Ю. Ю. Трансплантология сердца—возможности, перспективы, реальность // *Под редакцией д. б. н. ОВ Баковецкой*. – 2019. – С. 85.
9. Thajudeen A. et al. Arrhythmias after heart transplantation: mechanisms and management // *Journal of the American Heart Association*. – 2012. – Т. 1. – №. 2. – С. e001461
- 10.