

УДК 616.127:616.12-018.1

ОЦЕНКА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ МИОКАРДА МЕТОДОМ ВЫДЕЛЕНИЯ КАРДИОМИОЦИТОВ

Корда А.В., Анисович М.В., Кардаш О.Ф.

ГУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси», г. Минск

Актуальность: Основным методом лечения терминальных стадий заболеваний человека является пересадка органов. Важнейшим фактором, определяющим успех трансплантации, является использование исходно полноценного донорского органа. Между тем после воздействия гипоксии в организме донора, операционной травмы на этапе изъятия и трансплантации, а также воздействия холодовой ишемии на этапе консервации и транспортировки – донорский орган часто оказывается не в состоянии адекватно и немедленно функционировать после трансплантации. Наличие неблагоприятного метаболического фона в организме реципиента лишь усугубляет опасность пересадки первично компрометированного трансплантата.

Следовательно, одним из лимитирующих факторов трансплантации органов человека является жизнеспособность донорских органов. Особенно остро стоит этот вопрос в отношении сердца. В настоящее время для оценки жизнеспособности сердца используется гистологическое исследование миокарда. Однако метод является затратным по времени, поэтому актуальна разработка методик, быстро оценивающих состояние миокарда.

Цель: Изучить возможность оценки жизнеспособности миокарда методом выделения кардиомиоцитов.

Материал и методы: Использовались сердца крыс линии Wistar (1-4 дня от рождения). Выделение проводилось последовательным выполнением следующих операций: отмывание сердца холодным раствором Кребса-Хенселейта без кальция на сокращающемся сердце *in vivo*, суспензирование в растворе Кребса-Хенселейта с кальцием, ферментативная обработка коллагеназой тип 1 с бычьим сывороточным альбумином [1,2]. Для оценки жизнеспособности миокардиоцитов (МКЦ) осуществлялось окрашивание суспензии трепановым синим. Погибшими считались МКЦ, окрашенные в синий цвет. Подсчет клеток крови и МКЦ проводился в камере Горяева в течение 30 минут после приготовления суспензии (контроль), через 2, 3, 4 часа инкубации в растворе Кребса-Хенселейта с кальцием при нормальных условиях (тепло) – $t\ 20-25^{\circ}\text{C}$, через 2, 3, 4, 6 часов инкубации в растворе Кребса-Хенселейта с кальцием при низкой температуре (холод) – $t\ 1-4^{\circ}\text{C}$.

Статистическая обработка проводилась с использованием однофакторного анализа ANOVA пакета программ STATISTICA 8.0 (Statistica Inc., США). Данные представлены в % соотношении. Для сравнения между группами использовался критерий Ньюмена-Кейлса. Уровень доверительной вероятности $p < 0,05$ расценивался как статистически значимый.

Результаты и обсуждение: Методика отмывания сердца раствором Кребса-Хенселейта на сокращающемся сердце *in vivo* позволяет удалить из миокарда практически все клетки крови (99%), также как и при методике отмывания сердца на аппарате Лангердофф. Количество погибших клеток через 30 минут после приготовления суспензии в растворе Кребса-Хенселейта составляет 41% (рис. 1). При инкубации суспензии в растворе Кребса-Хенселейта при нормальных условиях количество погибших клеток увеличивается пропорционально времени инкубации. Экспозиция в течение 3 часов при нормальных условиях вызывает 1,5-кратное увеличение числа погибших клеток в суспензии. Через 4 часа инкубации при нормальных условиях в препарате сердца крыс линии Wistar отсутствуют живые КМЦ.

Хранение суспензии КМЦ в растворе Кребса-Хенселейта при температуре 1-4⁰С приводит к достоверному ($p=0,029$) уменьшению числа погибших клеток по сравнению с их инкубацией при нормальных условиях. Полная гибель клеток при хранении суспензии в растворе Кребса-Хенселейта при низкой температуре наблюдается в более поздние сроки – через 6 часов, что соответствует ранее выполненным работам, указывающим на невозможность восстановления функции сердца после 6 часов его хранения [3].

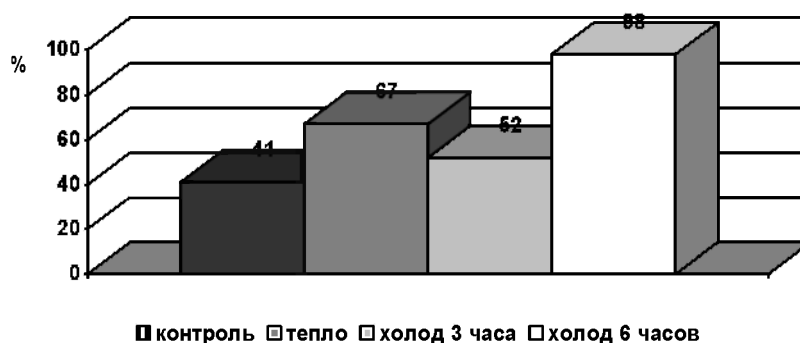


Рисунок 1 – Жизнеспособность миокарда в зависимости от времени и температуры хранения

Выводы: Методика отмывания сердца *in vivo* позволяет удалить клетки крови столь же эффективно, как и методика отмывания сердца *ex vivo*. Метод выделения кардиомиоцитов может использоваться для оценки жизнеспособности миокарда в эксперименте, а так же для исследований эффективности консервирующих растворов.

Литература:

1. Адамс, Р. Методы культуры клеток для биохимиков. Перевод Москва «Мир», 1983 – 263 с.
2. Культура животных клеток. Методы: Перевод с англ. / под ред. Фрэшни Р. – М: мир 1989. – 333 с.

3. Conservation of phosphorylation state of cardiac phosphofructokinase during in vitro hypothermic hypoxia / R. Pulis, B. Wu, N. Kneteman, T. Churchill // Am.J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2000. – Vol. 279, Issue 5. – P. 2151-2158.

ESTIMATION OF MYOCARDIAL VIABILITY BY CARDIOMYOCYTE ISOLATION

Korda AV, Anisovich MV, Kardash O.F.

Myocardial viability was assessed by the cardiomyocyte isolation with preliminary in vivo perfusion of beating heart. It is revealed that in vivo heart perfusion by Krebs-Hanselate solution remove blood cell from myocardium as effective as ex vivo perfusion. It is shown that cell death in medium without metabolic substances (MWOMS) occurs in 41%. Storage of cardiomyocytes (CM) in MWOMS under room temperature produced total cell death after 4 hours. Incubation CM in MWOMS under cool condition (1-4°C) slows cell death down 6 h.