



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

А.А. Карпов<sup>1,3</sup>, Д.Ю. Ивкин<sup>1,2</sup>, А.В. Драчева<sup>3</sup>, Н.Н. Питухина<sup>2</sup>,  
Ю.К. Успенская<sup>3</sup>, Д.Д. Ваулина<sup>4</sup>, И.С. Усков<sup>1</sup>, Ш.Д. Эйвазова<sup>3</sup>,  
С.М. Минасян<sup>1,3</sup>, Т.Д. Власов<sup>3</sup>, А.В. Бурякина<sup>2</sup>, М.М. Галагудза<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> – ФГБУ «ФМИЦ им. В.А. Алмазова», Санкт-Петербург

<sup>2</sup> – ГБОУ ВПО СПХФА МЗ РФ, Санкт-Петербург

<sup>3</sup> – ГБОУ ВПО «СПГМУ им. акад. И.П. Павлова», Санкт-Петербург

<sup>4</sup> – 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 удается. Необходим поиск новых подходов в ле-

чении 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 пораже-

нии 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 использованием 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**

<b>Ингаляционный наркоз</b>	<b>Инъекционный наркоз</b>
<b>Преимущества</b>	
Легкость управления глубиной наркоза; окончание действия сразу после отключения животного от дыхательного контура	Техническая легкость выполнения; не требует специальной аппаратуры
<b>Недостатки</b>	
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 + Золазепам гидрохлорид) требует внутримышечного введения.

В данной работе был использован Хлоралгидрат, который вводился внутрибрюшинно 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 голозовые 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:

б) 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).

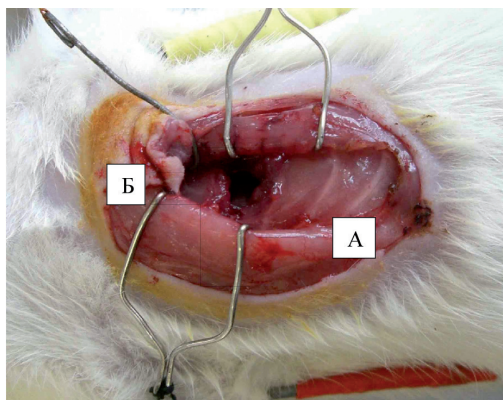

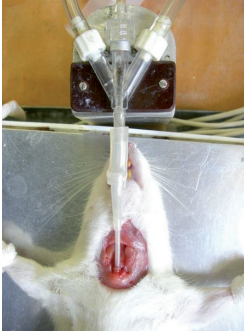


Рис. 1. Доступ к сердцу через четвертое межреберье.  
А – передне-боковая поверхность сердца;  
Б – ранорасширители, разводящие края раны.

Таблица 2

### Сравнительная характеристика интубации трахеи и трахеостомии при проведении ИВЛ

Интубация трахеи	Трахеостомия
<b>Преимущества</b>	
Методика выбора для хронических экспериментов; физиологична: не повреждает целостности трахеи	Простота исполнения методики
<b>Недостатки</b>	
Требует высокой квалификации экспериментатора; риск осложнений во время проведения интубации (интубация пищевода, остановка сердца на фоне раздражения вагусных рецепторов гортани)	Нарушает целостность трахеи и мягкой тканой области шеи (при выполнении хронического эксперимента требуется ушивание); частые поздние осложнения (гнойно-воспалительные процессы в области ушивания трахеи и мягкой 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 (ЛПП)) 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 ЛПП) 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% раствором 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 обратной окклюзии ЛКА. В данной работе

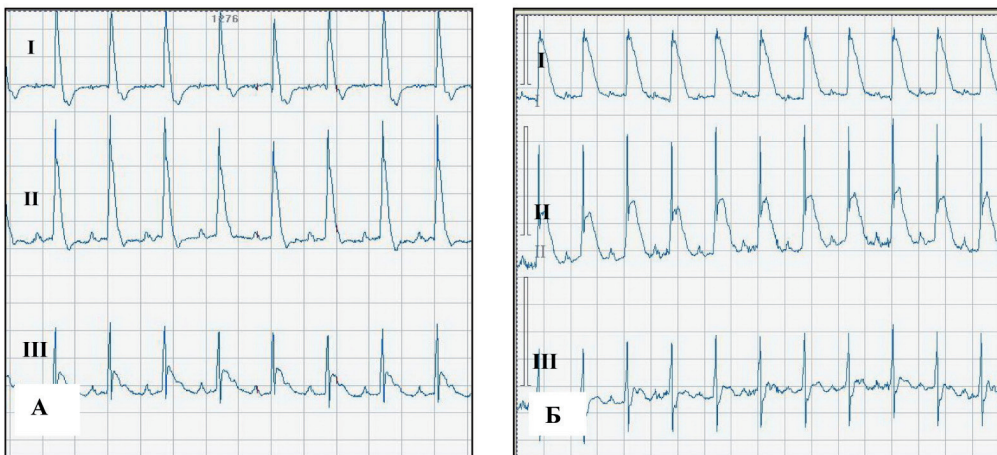


Рис. 2. Изменения на электрокардиограмме в ходе эксперимента:

А – до наложения лигатуры на ствол левой коронарной артерии;

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



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 визу-

ализирующих 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.

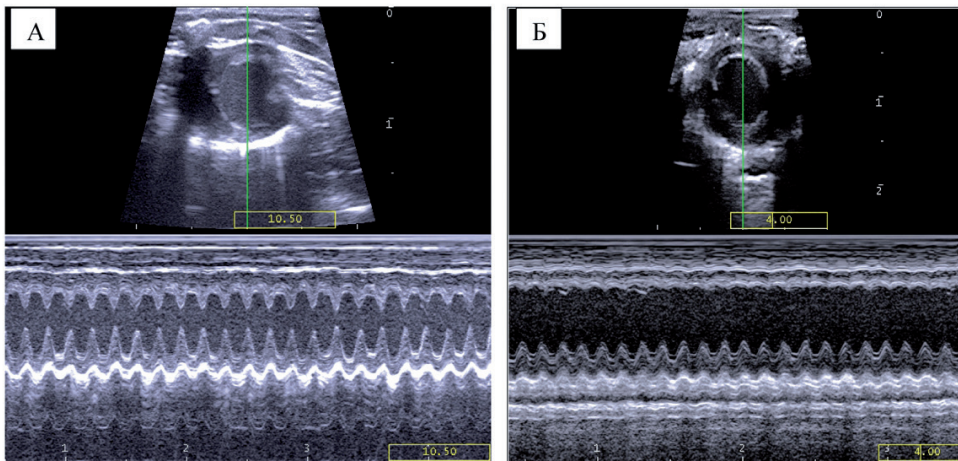


Рис. 3. Эхокардиографическое исследование, М-режим, короткая парастернальная позиция (PSAX). А – нативное сердце, Б – 3 недели после наложения лигатуры на левую коронарную артерию (акинезия передней стенки).

Основные морфофункциональные показатели, оцениваемые при трансторакальном эхокардиографическом исследовании

Аббре-виатура показателя	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	-	-
LVvoidS 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±0,014 мл
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 ЛЖ

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



возможно получение целого ряда показателей, как измеряемых напрямую, так и математически рассчитанных (табл. 5, рис. 4).

Таблица 5

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

Аббревиатура 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./мл

Примечание: данные авторов приведены к стандартным значениям.

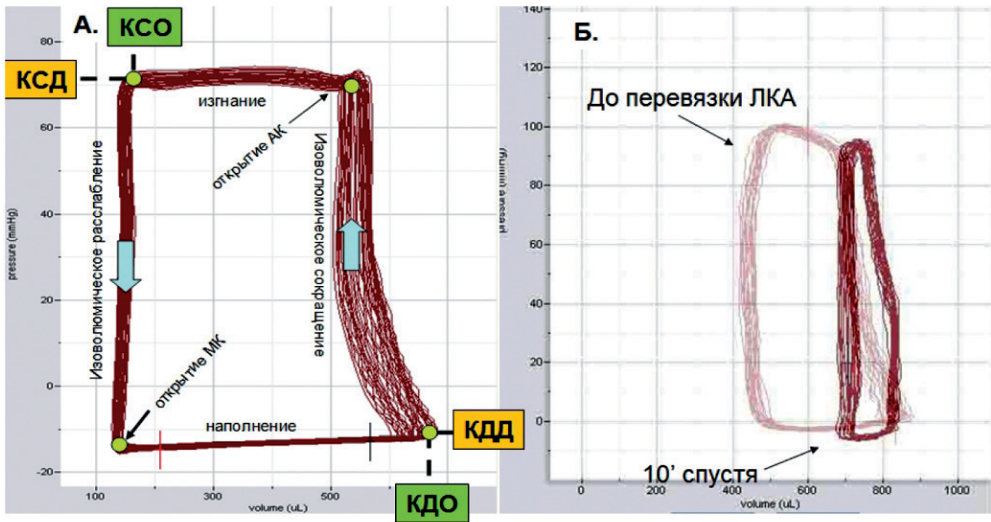


Рис. 4. Графическое изображение зависимости «давление-объем» во время катетеризации ЛЖ (PV-loops). А – принципиальная схема петли «давление – объем», где: АК – аортальный клапан, МК – митральный клапан; Б – сравнение PV-loop интактного сердца и спустя 10 мин после перевязки ЛКА; КСО – конечный систолический 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 внутривенного 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 внутривенно производилась инъекция Цефтриаксона (50 мг/кг) для профилактики послеоперационных инфекционных осложнений.

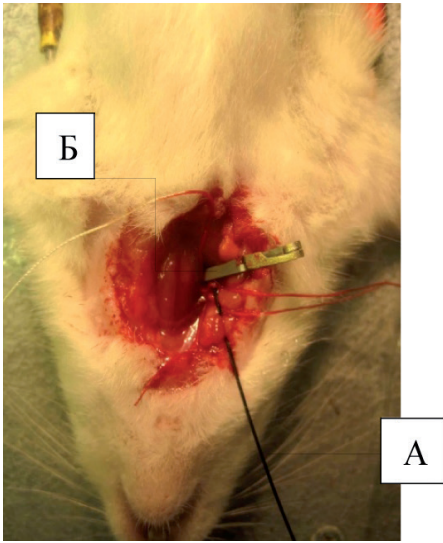


Рис. 5. Заведенный в просвет правой сонной артерии PV-катетер. А – PV-катетер; Б – зажим, наложенный на сосуд.

#### ▪ 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 пре-

дельно внимательно, т.к. в этом случае неизбежно кровотечение из неспадающего 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; CaCl<sub>2</sub> – 3,0; MgSO<sub>4</sub> – 1,2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,2; NaHCO<sub>3</sub> – 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% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub>, поддерживали равной 37±0,5°C, pH 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.

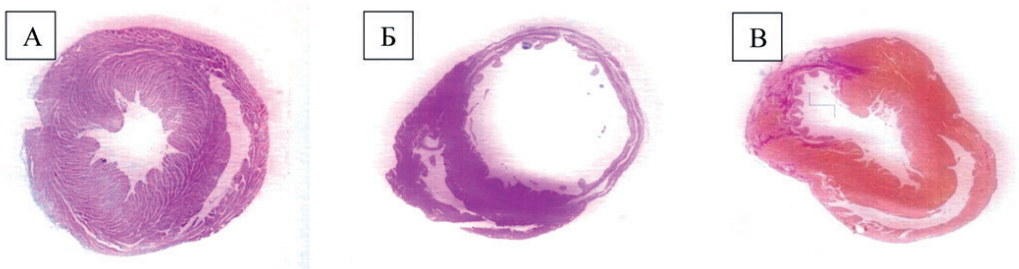


Рис. 6. Поперечный срез сердца. А – контрольная группа, без перевязки ЛКА (окраска гематоксилин-эозин); Б – сердце спустя 3 недели после перевязки ЛКА (окраска гематоксилин-эозин), выявляются трансмуральные рубцовые изменения передней, задней и боковой стенок ЛЖ, а также выраженная дилатация его камеры;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

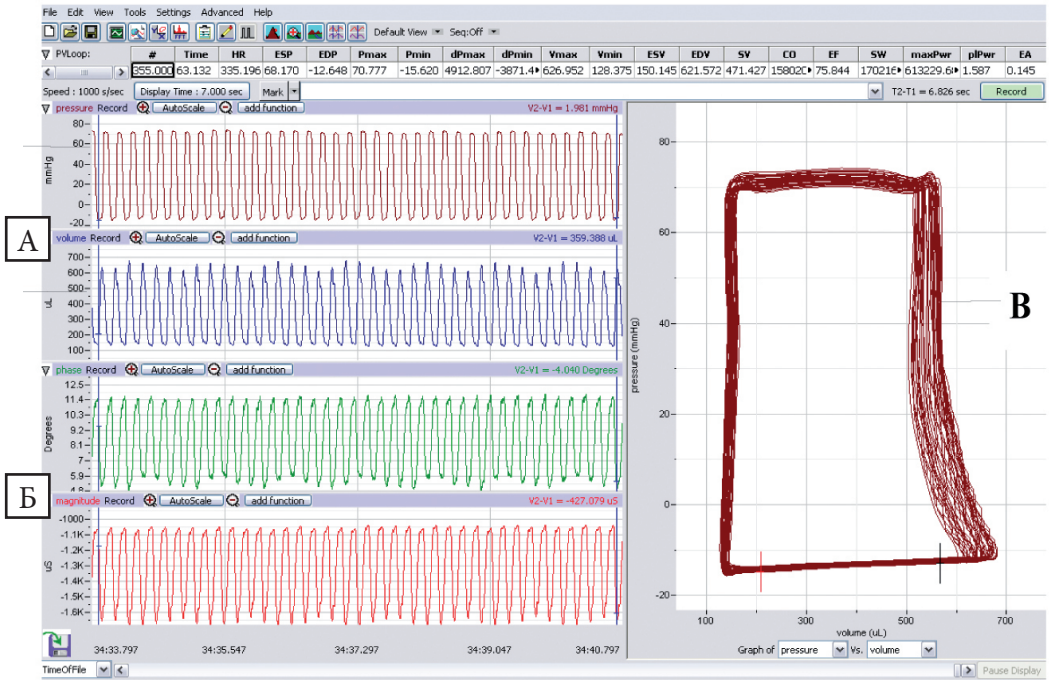


Рис. 7. Внутрисердечные показатели здорового животного. PV-катетер установлен в полость левого желудочка. Регистрация проводится с помощью программного обеспечения LabScribe 2.2. А – регистрация изменения давления в левом желудочке; Б – регистрация изменения объема в левом желудочке; В – PV-петля.

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).



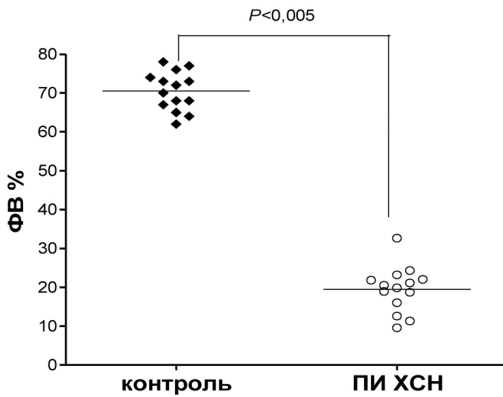


Рис. 8. Значения фракции выброса в группах контроля и ПИ ХСН.

### 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, представлено 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

–  $53 \pm 22$  мм рт. ст., ложнопериорированные животные –  $73 \pm 12$  мм рт. ст. (рис. 9). Эти данные косвенно свидетельствуют о степени сохранности миокарда, т.к. степень ишемической контрактуры коррелирует с данным показателем.

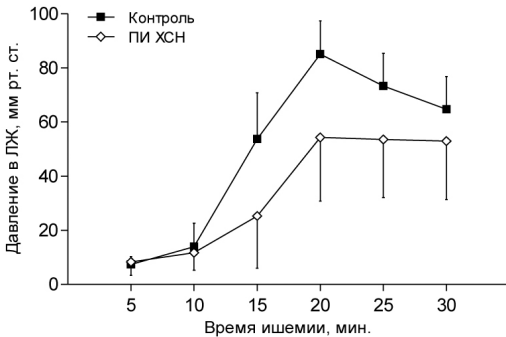


Рис. 9. Изменение ишемической контрактуры во время глобальной ишемии при перфузии изолированного сердца по Лангендорфу.

### 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	$7296 \pm 597$	$18789 \pm 1616^*$
Щелочная фосфатаза, нмоль/л	$316,0 \pm 16,30$	$314,60 \pm 15,50$

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

## Заключение

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 ревазуляризации (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., Галагузда 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-volume 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 supra-valvular aortic 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.