

## **Подготовительный этап глубокого обратимого охлаждения органов и целых животных.**

*Пульвер А. Ю., Рылькова Л. Н., Пульвер Н. А., Артюхов И. В., Перегудов А. Г.*

*Институт Биологии Старения, Россия  
pulver@bioaging.ru*

### **Вступление**

Охлаждению биологического объекта до криогенных температур предшествует стадия его охлаждения до 4-0°C при обязательном отсутствии дополнительных повреждений. Этот этап имеет важность не меньшую, чем собственно замораживание/витрификация, и последующее согревание.

Нам представляется, что проводить начальный этап подготовки органов к последующей криоконсервации удобнее всего прямо в организме донора. Подобная методика подготовки (в силу дефицита донорских органов при гигантском на них спросе) должна позволять производить мультиорганный забор, как это более 20 лет и происходит в клинической трансплантологии [Belzer & Southard 1988; Baumgartner, Williams et al. 1989; Bachet, Guilmet et al. 1991; Taylor, Rhee et al. 2005], когда “подготавливается” сразу весь организм.

Данная методика очень похожа на использование искусственного кровообращения на фоне гипотермии [Baumgartner, Silverberget al. 1983] или глубокой гипотермии [Connolly, Roy et al. 1965; Barratt-Boyes, Neutze et al. 1976; Southwick & Dalglish 1980; Ergin, O'Connor et al. 1982; Bachet, Guilmet et al. 1991] в кардиохирургии. Еще большая схожесть отмечается с методом использования гипотермии в сочетании с искусственным кровообращением при временной замене крови на искусственный перфузат. Это применялось в последней четверти XX века – например, при лечении сепсиса [Klebanoff 1972], или отравления угарным газом [Agostini, Ramirez et al. 1974] – в связи с недостаточным на тот момент развитием иных детоксикационных методик.

Существующие на сегодняшний день методы подготовки к мультиорганному забору органов [Taylor, Rhee et al. 2005, Ramsay 2013] построены на тех же принципах, но с использованием более низкой температуры (10-15°C)[Baumgartner, Williams et al. 1989].

### **История вопроса**

Клиническое применение гипотермии стало возможно благодаря возросшему во второй половине XX века интересу к гибернации млекопитающих.

Первые же опыты показали возможность обратимой холодовой ишемии до околонулевых температур негибернирующих млекопитающих – крыс [Smith 1959; Andrews 2007] и даже собак [Gollan, Tysinger et al. 1955] (хотя последнее, на наш взгляд, сомнительно). И гибернирующих (хомяков), вплоть до отрицательных температур (-6°C) [Andjus 1955; Smith 1956, 1959]. Животных охлаждали путем погружения в ледяную баню, сопровождая это легочной вентиляцией. Выживаемость достигалась в тех случаях, когда согревание начинали локально с области проекции сердца на грудную клетку – разогретыми шпателями, струей жидкости или даже микроволновым излучением. Общее время клинической смерти достигало от 30 минут до полутора часов.

Существенно улучшить результаты (увеличить время клинической смерти от 1 до 5-6 часов в некоторых случаях) удалось, начиная с 60-х годов XX века, при помощи экстракорпорального кровообращения, которое позволяло как варьировать скорость охлаждения и согревания, так и заменять после достижения околонулевых температур кровь на перфузат, близкий по составу к внутриклеточному. Подобные составы используются в настоящее время для бесперфузионного сохранения трансплантов.

Самыми популярными экспериментальными моделями являлись крысы [Alexander & Al Ani 1983; Sasaki, Takigami 1996; Fabre, Zegdi et al. 2001; Ma, Yang et al. 2003; Moehrlen, Stammberger et al 2003; Jungwirth, Mackensen et al. 2006; Gunzinger, Wildhirt et al. 2007; de Lange, Yoshitani et al.

2008] и собаки [Jesch, Sunder-Plassmann 1975; Haneda, Thomas et al. 1986; Kiyoshi, Thomas et al. 1986; Bailes, Leavitt et al. 1991; Neely & Haining 1994; Nozari, Safar et al. 2004]. Реже использовались свиньи [Neely, Haining et al. 1968; Klebanoff & Phillips 1969; Haff, Klebanoff et al 1975; Casas, Alam et al. 2007].

Такого рода исследования и позволили совершить переворот как в кардиохирургии, так отчасти и в трансплантологии [Belzer & Southard 1988; Ramsay 2013].

### Направление наших исследований

Для подготовки донорских органов к забору и их дальнейшей криоконсервации наиболее удобным нам представляется разработка своего варианта методики обратимой холодной ишемии при 2°C – -7°C с заменой крови на перфузат, близкий по составу к растворам для холодной бесперфузионной консервации органов.

Разработка метода планируется на крысах. Впоследствии, с минимальными модификациями он будет адаптирована к применению на свиньях и впоследствии на человеческих кадаврах (трупах-донорах), что позволит улучшить качество получаемых трансплантов, а заодно и частично подготовить их к криоконсервации.

В этих рамках нами уже освоен подготовительный этап: обратимая холодная ишемия крыс при минимальной температуре 2-3°C (рис. 1) с длительностью клинической смерти до 2 часов (рис. 3) и согревания грудной клетки струёй жидкости (рис. 2) с последующей реанимацией (рис. 4).

В 20-30 % случаев после оживления имело место "обморожение" передних, и изредка задних лап. Большой возраст и любые легочные заболевания, крайне негативно сказываются на выживаемости. Чтобы пережить вышеописанную процедуру крыса должна быть молодой и здоровой.



Рисунок 1. Окончание этапа охлаждения



Рисунок 2. Согревание струей воды

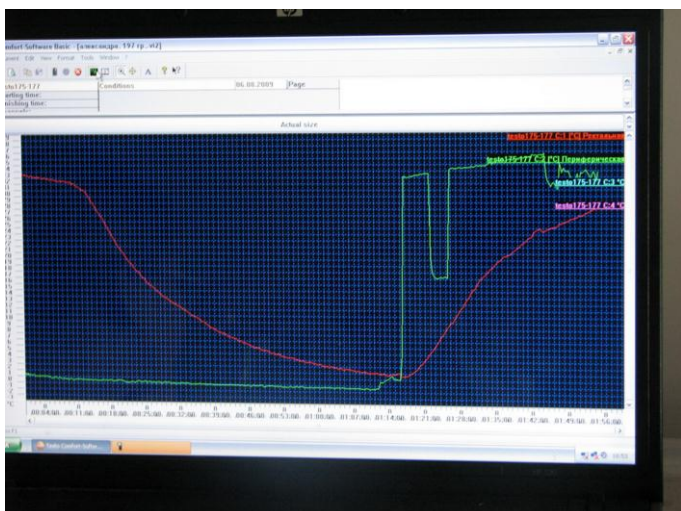


Рисунок 3. Типовой график охлаждения-согревания



Рисунок 4. Финальный этап согревания

В состав разрабатываемой нами системы системы будет входить полноценный миниатюрный АИК (аппарат искусственного кровообращения) со скоростью перфузии 1-50 мл/мин, включающий в себя роликовые насосы, модуль газообмена (оксигенатор), теплообменник, модуль контроля скорости тока жидкости, перфузионного давления и детекции микропузырьков. А также отдельный ионообменный блок с возможностью диализа и ультрафильтрации, с дополнительным модулем контроля газов и электролитов перфузата (как минимум - pH, pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>, pK<sup>+</sup>, pNa<sup>+</sup>, pCa<sup>2+</sup>).

Эта система будет использована для разработки модификаций состава перфузата, способствующих улучшению выживаемости после криоконсервации. Помимо улучшения ионного состава, необходимо предусмотреть меры, направленные на нейтрализацию активных форм кислорода, активацию каскадов апоптоза и развития реперфузионного синдрома после замораживания за счет использования:

- различных типов антиоксидантов, в том числе комплексообразователей (антагонистов железа);
- ингибиторов каспаз, сериновых протеаз, матриксных металлопротеиназ, липоксигеназ и т. д.
- блокаторов различных ионных каналов;
- антагонистов кальция и NMDA-рецепторов;
- особое внимание будет уделено применению газообразных органопротекторов – ксенона [Ma, Yang et al. 2003; Артюхов, Пульвер et al. 2014], H<sub>2</sub>S [Blackstone, Morrison et al. 2005; Baumgart, Georgieff et al. 2008] и др.

В конечном счете это должно позволить как увеличить длительность обратимой холодной ишемии опытных организмов, так и улучшить качество криоконсервации органов.

## Литература

1. Agostini JC, Ramirez RG, Albert SN, Goldbaum LR, Absolon KB. Successful reversal of lethal carbon monoxide intoxication by total body asanguineous hypothermic perfusion. *Surgery* **1974**;75:213-9.
2. Alexander B, Al Ani HR. Prolonged partial cardiopulmonary bypass in rats. *J Surg Res* 35 (**1983**) 28-34.
3. Bachet J, Guilmet D, Goudot B, Termignon JL, Teodori G, Dreyfus G, Brodaty D, Dubois C, Delentdecker P. Cold cerebroplegia. A new technique of cerebral protection during operations on the transverse aortic arch. *J Thorac Cardiovasc Surg.* **1991 Jul**;102(1):85-93; discussion 93-4.
4. Bailes JE, Leavitt ML, Teeple E Jr, et al. Ultraprofound hypothermia with complete blood substitution in a canine model. *J Neurosurg* **1991**;74:781-8.
5. Barratt-Boyes BG, Neutze JM, Clarkson PM, et al. Repair of ventricular septal defect in the first two years of life using profound hypothermia-circulatory arrest techniques. *Ann Surg* **1976**;184:376.
6. Baumgartner WA, Silverberg GD, Ream AK, Jamieson SW, Tarabek J, Reitz BA. Reappraisal of cardiopulmonary bypass with deep hypothermia and circulatory arrest for complex neurosurgical operations. *Surgery* **1983**;94:242-9.
7. Baumgartner WA, Williams GM, Fraser CD Jr, Cameron DE, Gardner TJ, Burdick JF, Augustine S, Gaul PD, Reitz BA. Cardiopulmonary bypass with profound hypothermia. An optimal preservation method for multiorgan procurement. *Transplantation.* **1989 Jan**; 47(1):123-7.
8. Belzer FO, Southard JH. Principles of solid organ preservation by cold storage. *Transplantation* **1988**;45:673.
9. Connolly JE, Roy A, Guernsey JM, Stemmer EA. Bloodless surgery by means of profound hypothermia and circulatory arrest. *Ann Surg* **1965**;162:724-36.
10. de Lange F, Yoshitani K, Podgoreanu MV, Grocott HP, Mackensen GB. A novel survival model of cardioplegic arrest and cardiopulmonary bypass in rats: a methodology paper. *J Cardiothorac Surg* 3 (**2008**) 51.
11. Ergin MA, O'Connor J, Guinto R, et al. Experience with profound hypothermia and circulatory arrest in the treatment of aneurysms of the aortic arch. *J Thorac Cardiovasc Surg* **1982**;84:649-55.

12. Fabre O, Zegdi R, Vincentelli A, Cambillaud M, Prat A, Carpentier A, Fabiani JN. A recovery model of partial cardiopulmonary bypass in the rat. *Perfusion* 16 (2001) 215-20.
13. Gollan F, Tysinger DS Jr, Grace JT, Kory RC, et al. Hypothermia of 1.5 C in dogs followed by survival. *Amer J Physiol* 1955;181:297-303.
14. Gunzinger R, Wildhirt SM, Schad H, Heimisch W, Mendler N, Grammer J, Lange R, Bauernschmitt R. A rat model of cardiopulmonary bypass with cardioplegic arrest and hemodynamic assessment by conductance catheter technique. *Basic Res Cardiol* 102 (2007) 508-517.
15. Haff RC, Klebanoff G, Brown BG, Koreski WR. Asanguineous hypothermic perfusion as a means of total organism preservation. *J Surg Res* 1975;19:13-9.
16. Haneda K, Thomas R, Sands MP, Breaseale DG, et al. Whole body protection during three hours of total circulatory arrest: An experimental study. *Cryobiol* 1986;23:483-94.
17. Jesch F, Sunder-Plassmann L, Pohl U, Messmer K. Total body washout (TBW) and circulatory arrest in profound hypothermia. In: Messmer K, Schmid- Schebein H, eds. *Intentional Hemodilution, Biblthca Haemat, Vol 41. Basel, Switzerland: 1975;209-24.*
18. Jungwirth B, Mackensen GB, Blobner M, Neff F, Reichart B, Kochs EF, Nollert G. Neurologic outcome after cardiopulmonary bypass with deep hypothermic circulatory arrest in rats: description of a new model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 131 (2006) 805-12.
19. Kiyoshi H, Thomas R, Sands MP, et al. Whole body protection during three hours of total circulatory arrest: An experimental study. *Cryobiol* 1986;23:483-94.
20. Klebanoff G, Phillips J. Temporary suspension of animation using total body washout and hypothermia: A preliminary report. *Cryobiol* 1969;6:121-5.
21. Klebanoff G. Infectious hepatitis complicated by coma: principles of management including the adjunctive use of asanguineous hypothermic total body perfusion. *Resuscitat* 1972;1:327-33.
22. Ma H, Yang J, Lynch N, Franks P, Maze M, Grocott HP. Xenon attenuates cardiopulmonary bypass-induced neurologic and neurocognitive dysfunction in the rat. *Anesthesiol* 98 (2003) 690-8.
23. Moehrlen U, Stammberger U, Moehrlen C, Schmid RA. Partial cardiopulmonary bypass in rats using a hollow fibre oxygenator. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2 (2003) 603-6.
24. Neely WA, Haining JL. Survival after suspension of perfusion during asanguineous cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1968;5:222-7.
25. Sasaki, S. Takigami, K. Shiiya N., and K. Yasuda, Partial cardiopulmonary bypass in rats for evaluating ischemia-reperfusion injury. *ASAIO J* 42 (1996) 1027-30.
26. Smith AU. Studies on golden hamsters during cooling to and rewarming from body temperatures below 0 C. II. Observations during and after resuscitation. *Proc Roy Soc B* 1956;145:407-426.
27. Smith AU. Viability of supercooled and frozen mammals. *Ann NY Acad Sci* 1959;80:291-300.
28. Southwick FS, Dalglish PH Jr. Recovery after prolonged asystolic cardiac arrest in profound hypothermia. *JAMA* 1980;243:1250-3.
29. Taylor MJ, Bailes JE, Elrifai AM, Shih TS, Teeple E, Leavitt ML, Baust JC, Maroon JC. Asanguineous whole body perfusion with a new intracellular acellular solution and ultraprofound hypothermia provides cellular protection during 3.5 hours of cardiac arrest in a canine model. *ASAIO J.* 1994 **Jul-Sep**;40(3):M351-8.
30. Ramsay M. Advances in transplantation 1940-2014. *Anesthesiology clinics* 2013; 31: 645-58.
31. Andjus RK. Suspended animation in cooled, supercooled and frozen rats. *J Physiol* 1955 128(3): 547-556.
32. Andrews MT. Advances in molecular biology of hibernation in mammals. *Bioessays* 2007; 29(5): 431-440.
33. Baumgart R, Georgieff M, et al. Cardioprotection by Hydrogen Sulfide: Suspended Animation, Inflammation, and Apoptosis" *Shock* 2008.
34. Blackstone E, Morrison M et al. H2S induces a suspended animation-like state in mice. *Science* 2005 308(5721): 518.

35. Casas, F, Alam H et al. A portable cardiopulmonary bypass/extracorporeal membrane oxygenation system for the induction and reversal of profound hypothermia: feasibility study in a Swine model of lethal injuries. *Artif Organs* **2005** 29(7): 557-563.
36. Nozari A, Safar P et al. Suspended animation can allow survival without brain damage after traumatic exsanguination cardiac arrest of 60 minutes in dogs. *J Trauma* **2004** 57(6): 1266-1275.
37. Taylor MJ, Rhee P, et al. Design of preservation solutions for universal tissue preservation in vivo: demonstration of efficacy in preclinical models of profound hypothermic cardiac arrest. *Transplant Proc* **2005** 37(1): 303-307.
38. Артюхов ИВ, Пульвер АЮ, et al. Предполагаемые механизмы криопротективного действия ксенона: результаты молекулярного моделирования. *БИОФИЗИКА ЖИВОЙ КЛЕТКИ* **2014** 10: 28-31.