

无心跳供体心脏移植热缺血时限的实验研究

杨军峰, 肖学钧, 章庆春, 吴岳恒 (广东省人民医院 广东省心血管病研究所心外科, 广州 510080)

摘要: 目的 探讨未经药物预处理的无心跳供体心脏移植成功的热缺血时限。方法 实验犬 30 只, 供体和受体组各 5 只, 对照组: 心脏以 0 组氨酸-色氨酸-酮戊二酸溶液 (histidine-tryptophan-ketoglutarate solution, HTK) 500 ml 主动脉根部灌注, 心脏停跳后切取供心, 置于 0 HTK 液中保存 2 h; 热缺血 16 min 组: 心脏缺氧停跳后热缺血 16 min, 用 0 HTK 液 500 ml 灌注冲洗冠状动脉, 切取供心, 置于 0 HTK 液中保存 2 h; 热缺血 18 min 组: 心脏缺氧停跳后热缺血 18 min, 灌注及保存方法同热缺血 16 min 组。以标准心脏移植方法进行原位移植, 监测供体心脏移植前后的血流动力学指标、心脏质量, 测定心肌酶等指标, 电镜观察心肌组织超微结构改变。结果 心脏移植实验中对对照组及热缺血 16 min 组均可成功复跳、脱离体外循环辅助, 血流动力学指标差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。热缺血 18 min 组仅有 2 例可以脱机, 与对照组及热缺血 16 min 组相比, 左心室舒张末期压升高、 $-dp/dt_{\max}$ 下降较明显, 与对照组差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 但与 16 min 组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 心脏质量及心肌酶明显升高 ($P < 0.05$), 电镜观察超微结构破坏明显。结论 常温热缺血 16 min 的供心有可能被成功用于心脏移植。

关键词: 无心跳供体; 犬; 热缺血; 原位心脏移植

中图分类号: R654.2 文献标识码: A 文章编号: 1007-9688 (2008) 04-0278-04

Time limit of normothermic ischemia in canine heart transplantation from non-heart-beating donors

YANG Jun-feng, XIAO Xue-jun, ZHANG Qing-chun, WU Yue-heng

(Department of cardiac surgery, Guangdong Provincial Cardiovascular Institute, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou 510080, China)

Abstracts: Objectives To study the time limit of normothermic ischemia of non heart beating donors (NHBDs) hearts from hypoxic cardiac arrest and without donors pretreatment which could transplant successfully. Methods Thirty adult dogs were divided into control group, normothermic ischemia 16 min group and normothermic ischemia 18 min group ($n=10$ for each group, including 5 for donors and 5 for recipients, respectively). In control group, cardiac arrest was induced by HTK solution (0, 500 ml) perfusion, canine heart was stored for 2 h with HTK solution at 4 °C; in 16 min group, normothermic ischemia 16 min in situ after hypoxic cardiac arrest, canine hearts was perfused and stored for 2 h with HTK solution at 4 °C; in 18 min group, normothermic ischemia 18 min in situ after hypoxic cardiac arrest, canine hearts was perfused and stored at 4 °C for 2 h with HTK solution. Then orthotopic transplantation was performed. Hemodynamic changes, enzyme activities, and heart weight were examined. Results Control group and normothermic ischemia 16 min group could wean from cardiopulmonary bypass successfully; In normothermic ischemia 18 min group, only 2/5 could wean from cardiopulmonary bypass, LVEDP ascends and $-dp/dt_{\max}$ descends obviously, there are statistical variance ($P < 0.05$) compared with control group, enzyme, heart weight and ultrastructure get worse compared with other two groups. Conclusions NHBDs heart of normothermic ischemia 16 min in situ after hypoxic cardiac arrest could transplante successfully.

Key words: Non-heart-beating donors; Canine; Orthotopic heart transplantation; Normothermic ischemia

收稿日期: 2008-06-12

作者简介: 杨军峰 (1979-), 男, 医师, 广东心血管病研究所心外科硕士研究生; 研究方向为无心跳供体的心脏移植; E-mail: docyfj@163.com

通讯作者: 肖学钧, 主任医师; 研究方向为心脏瓣膜病及心脏移植; E-mail: xiaoxuejun@tom.com

心脏移植已成为治疗终末期心脏病的行之有效方法, 心脏移植的半寿期 (half-life) 已经达到了 10 年^[1], 目前, 全球每年心脏移植的数量在 3 100 例左右, 限制其发展的主要问题是心脏供体的匮乏, 而未经药物预处理的无心跳供体 (non-heart-beating donors, NHBDs) 心脏的利用为心脏移植提供了新的供体来源。本课题通过犬的心脏移植动物实验, 来探讨 NHBDs 心脏可以用于心脏移植的热缺血时限。

1 材料和方法

1.1 实验动物

实验犬 30 只, 体质量 (15 ±3) kg, 随机分为对照组、热缺血 16 min 组和热缺血 18 min 组, 每组供体和受体各 5 只, 体质量相差小于 20%。

1.2 心脏移植

1.2.1 无心跳供体心脏模型 供体犬麻醉成功后, 气管内插管, 呼吸机辅助呼吸, 监测体温、中心静脉压和动脉血压。胸骨正中切口开胸, 全身肝素化 (3~4 mg/kg), 经左心室心尖部插管, 连接测压装置, 记录左心室血流动力学指标, 分别于主动脉、肺动脉测压, 测量心输出量。经右心房插入冠状静脉窦逆插管采血, 留作心肌酶监测。停呼吸机, 使心脏缺氧停跳。停跳后, 心脏留置原位, 常温热缺血 16、18 min, 完成 NHBDs 模型。

1.2.2 供心的切取、修整和保存 心脏停跳达到预定时间后, 升主动脉根部插灌注针, 阻断升主动脉, 主动脉根部灌注 0~4 组氨酸-色氨酸-酮戊二酸溶液 (histidine-tryptophan-ketoglutarate solution, HTK) 500 ml (25 ml/kg)。结扎上腔静脉, 分别切断上腔静脉、奇静脉、下腔静脉、右下、右上、左下、左上肺静脉、肺动脉和主动脉, 取出心脏置于 0℃ 冰冻生理氯化钠溶液中, 修剪整齐供心各吻合口, 将供心置于电子天平称重, 4℃ 冰箱中低温保存 2 h。

1.2.3 心脏移植 受体犬术前准备同供体。胸骨正中切口开胸, 全身肝素化 (3~4 mg/kg), 分别主动脉插管 (12 号), 上、下腔静脉插管 (14 号、16 号直角引流管), 建立体外循环。体外循环预充: 供体血 500 ml、肝素 20 mg、甲泼尼龙 250 mg。开始体外循环, 流量 80~100 ml/kg, 降温至 25~28℃。依次切开右心房、房间隔、左心

房、肺动脉和主动脉, 使受体仅残留左、右心房后壁和部分房间隔。

采用标准原位移植法进行移植, 按照左心房、房间隔、右心房、肺动脉、主动脉的顺序进行吻合。用多巴胺、去甲肾上腺素和异丙肾上腺素维持心率、稳定血压, 缝置起搏导线, 逐步撤除体外循环, 继续监测 30 min, 控制心率于 100 次/分左右, 经心大静脉采血进行心肌酶学测定, 记录血流动力学指标。沿吻合口剪除供心, 于冰冻生理氯化钠溶液中漂洗后放置于电子天平称重, 计算心脏质量移植前后增加的百分比。切取供心左心室前壁标本用于电镜检查。

对照组心脏移植采用 0~4℃ HTK 晶体液 500 ml (25 ml/kg) 灌停供心, 术前准备、供心的切取、保存、移植和实验数据的采集同实验组。

1.3 统计学处理

实验数据以均数 ± 标准差表示, 用 SPSS 11.5 统计软件行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心脏移植手术情况

各组组心脏吻合时间、主动脉阻断时间, 体外循环时间、并行体外辅助时间见表 1。

表 1 3 组心脏移植手术情况 (min)

组别	吻合时间	阻断时间	并行辅助时间	体外循环时间
对照组	57.0 ± 2.7	60.8 ± 3.7	48.4 ± 3.6	113.2 ± 6.9
热缺血 16 min	59.0 ± 2.9	63.6 ± 3.5	53.0 ± 3.4	120.6 ± 5.3
热缺血 18 min	58.2 ± 3.8 ¹⁾	62.8 ± 3.6 ¹⁾	72.8 ± 6.1 ^{1)*}	139.2 ± 7.0 ^{1)*}

与对照组相比较, $P > 0.05$; 与热缺血 16 min 组比较, ¹⁾ $P > 0.05$; 与对照组比较, * $P < 0.05$ 、与热缺血 16 min 组比较, ^{1)*} $P < 0.05$

2.2 血流动力学指标

复跳后对照组和热缺血 16 min 组均可撤离体外循环, 血流动力学指标两组差异无统计学意义。热缺血 18 min 组复跳后, 5 例中仅有 2 例可脱离体外循环辅助, 其余 3 例均无法脱机, 停机 30 min 后血流动力学指标比较, 左心室发展压峰值 (left ventricular peak developed pressure, LVPDP)、左心室压力上升最大速率 (positive first derivative pressure, +dp/dt_{max})、平均主动脉压 (mean aortic pressure, MAP)、平均肺动脉压

(mean pulmonary artery pressure, MPAP)、心输出量 (cardiac output, CO) 等指标稍有下降; LVEDP 升高、 $-dp/dt_{max}$ 下降较明显, 见表 1、2。

表 2 3 组供心停机 30 min 后心脏血流动力学指标

组别	对照组	热缺血 16 min 组	热缺血 18 min 组
HR (/min)	106±1	108±9	111±7 ^{·1)}
LVEDP(mmHg)	10.6±1.5	11.0±1.6	14.0±1.4 ^{·1)}
LVPDP(mmHg)	98.2±3.9	92.6±8.6	86.5±6.4 ^{·1)}
+dp/dt _{max} (mmHg/s)	1 877±131	1 781±136	1 642±85 ^{·1)}
-dp/dt _{max} (mmHg/s)	1 317±168	1 201±113	932±55 ^{·1)}
MAP(mmHg)	68±7	63±5	60±4 ^{·1)}
MPAP(mmHg)	18±2	19±2	21±1 ^{·1)}
CO (L/min)	0.9±0.2	0.8±0.2	0.7±0.1 ^{·1)}

缩略语 HR: heart rate, 心率; LVEDP: left ventricular end diastolic pressure, 左心室舒张末期压; LVPDP: left ventricular peak developed pressure, 左心室发展压峰值; +dp/dt_{max}: positive first derivative pressure, 左心室压力上升最大速率; -dp/dt_{max}: negative first derivative pressure, 左心室压力下降最大速率; MAP: mean aortic pressure, 平均主动脉压; MPAP: mean pulmonary artery pressure, 平均肺动脉压; CO: cardiac output, 心输出量

与对照组相比较, $P>0.05$; 与热缺血 16 min 组比较, ¹⁾ $P>0.05$; 与对照组比较, ^{*} $P<0.05$

2.3 心脏质量变化

3 组供心移植后心脏质量均有所增加, 但热缺血 16 min 组和热缺血 18 min 组心脏重量增加更为明显, 同对照组比较, 心脏质量增加百分比增高, 见表 3。

表 3 3 组供心移植前后重量对比

组别	移植前质量(g)	移植后质量(g)	增加百分比(%)
对照组	101±6	109±5	8.8±2.2
热缺血 16 min 组	112±12	129±15 [*]	15.7±1.9 [*]
热缺血 18 min 组	109±13 ^{·1)}	133±15 ^{·1)}	18.4±3.3 ^{·1)}

与对照组比较, $P>0.05$, ^{*} $P<0.05$; 与热缺血 16 min 组比较, ¹⁾ $P>0.05$

2.4 心肌酶学改变

移植后热缺血 16 min 组和 18 min 组与对照组比较, 肌酸激酶 (creatine kinase, CK)、心肌型肌酸激酶 (CK-MB)、乳酸脱氢酶 (lactic dehydrogenase, LDH)、乳酸脱氢酶同工酶 (LDH-1) 均增高, 见表 4。

2.5 电镜改变

实验结束时取左心室心尖部心肌组织 (1

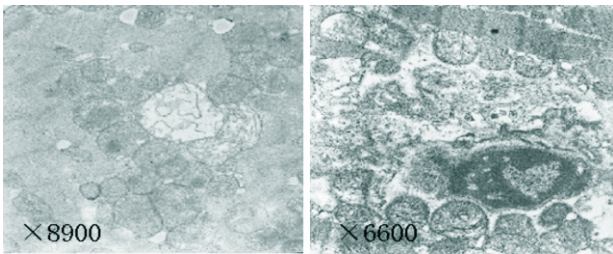
表 4 3 组供心移植后 30 min 心肌酶学对比 U/L

组别	CK	CK-MB	LDH	LDH-1
对照组	1 148±185	87±13	697±97	151±17
热缺血 16 min 组	1 542±114	123±6	1 069±42	185±26
热缺血 18 min 组	1 741±12 ^{·1)}	152±12 ^{·1)}	1 243±19 ^{·1)}	219±23 ^{·1)}

缩略语 CK: creatine kinase, 肌酸激酶; CK-MB: 心肌型肌酸激酶; LDH: lactic dehydrogenase, 乳酸脱氢酶; LDH-1: 乳酸脱氢酶同工酶-1

与对照组比较, $P<0.05$, ^{*} $P<0.05$; 与热缺血 16 min 组比较, ¹⁾ $P<0.05$

mm³), 立即置于 4 戊二醛固定液中固定, 30%~100%乙醇逐级脱水、环氧树脂包埋、超薄切片及醋酸铀、柠檬酸铅双重染色, 透射电镜观察发现, 热缺血 18 min 组细胞损害程度明显重于对照组及热缺血 16 min 组, 心肌细胞核固缩明显, 肌节消失, 肌丝大量溶解, Z 线紊乱, 心肌闰盘分离, 线粒体明显水肿扩张, 组织水肿明显。热缺血 16 min 组和对照组相比, 细胞超微结构有轻度的损害。电镜下观察到, 热缺血 18 min 组细胞损害程度明显重于对照组及热缺血 16 min 组, 心肌细胞核固缩明显, 肌节消失, 肌丝大量溶解, Z 线紊乱, 心肌闰盘分离, 线粒体明显水肿扩张, 组织水肿明显。热缺血 16 min 组和对照组相比, 细胞超微结构有轻度的损害。见图 1。



左图示热缺血 16 min 组的心肌细胞线粒体轻度肿胀, 间质水肿 (×8900); 右图示热缺血 18 min 组心肌细胞线粒体及间质水肿明显 (×6600)

图 1 热缺血 16~18 min 心肌透射电镜下形态

3 讨论

NHBDs 心脏是指供体心脏停止跳动后经历一段热缺血后获得的心脏, 由于心脏经历热缺血, 供体的质量及移植效果相对较差, 但是如果热缺血时间较短, 经过适当的心肌保护措施, NHBDs 心脏还是有可能利用, 采用 NHBDs 心脏进行心

脏移植, 心脏供体可能会增加 4%~6%^[2]。

NHBDs 心脏模型多采用放血导致的缺血停跳模型^[3], 和临床常见的缺氧停跳模型相比, 缺血停跳时由于减轻了心脏的膨胀, 明显减轻心肌的损伤^[4], 虽然移植后的效果较缺氧停跳模型更佳, 但不能更好的模拟临床中实际情况。药物预处理和脱白细胞等虽然可以延长 NHBDs 心脏的热缺血时间, 但在临床实际应用难度较大。本实验采用窒息诱导心脏停跳, 未用任何药物预处理, 采用 HTK 液进行心肌保护, 更好的模拟了临床中的实际情况。

HTK 液是一种低 K^+ , 低 Na^+ , 无 Ca^{2+} 含有组氨酸缓冲系统的新型的心肌保护液, 易于组织扩散, 可以有效防止内皮细胞肿胀、氧自由基的损伤。本课题采用 HTK 液灌注、保存心脏, 取得良好的效果, 与文献报道一致^[5]。

本研究热缺血 16 min 组在用多巴胺 ($3 \sim 10 \mu g \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$), 肾上腺素 ($0.01 \sim 0.05 \mu g \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$) 和异丙肾上腺素 ($0.01 \sim 0.1 \mu g \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$) 等持续泵入的情况下, LVEDP、MPAP 有轻度的升高, LVPDP、 $-dp/dt_{max}$ 、MAP、CO 等轻度下降 ($P > 0.05$), 表明热缺血 16 min 组移植术后心脏的收缩、舒张功能较对照组下降不明显。

热缺血 18 min 组 2 例在应用药物维持的情况下, 可以勉强撤离体外循环辅助, LVPDP、 $-dp/dt_{max}$ 、MAP、CO 等轻度下降, MPAP 轻度升高, 收缩功能较 16 min 组和对照组下降不明显; 而 LVEDP 则明显升高, $-dp/dt_{max}$ 明显下降, 表明热缺血 18 min 组术后心脏的舒张功能较对照组明显下降, 但 LVEDP、 $-dp/dt_{max}$ 等的变化和热缺血 16 min 组差异无统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 组供心移植后心脏质量均有所增加, 热缺血 16 min 组、18 min 组增加比对照组相明显, 提示水肿可能与长时间的热缺血有关。

Gaasch 等^[6]研究表明 NHBDs 心脏中舒张功能更易受到损害。舒张功能的异常也往往被认为是热缺血导致心脏移植失败的主要原因, 心肌水肿、心肌挛缩和血管功能异常等更会加重舒张功能的异常。本实验中, 热缺血 18 min 组虽然仅仅只比 16 min 组热缺血时间长 2 min, 但是差异有统计学意义, 3 例无法脱机的心脏移植术后收缩、舒张功能均明显较差, 心肌水肿明显, 无法

维持血压, 2 例脱离体外辅助的心脏移植后虽然心脏收缩功能较对照组及 16 min 组相比无明显下降, 但仍可见其心肌水肿较明显, 收缩功能下降不明显可能是由于大剂量的血管活性药物维持的缘故, 而其舒张功能指标较对照组相比则明显变差。心肌水肿会加重心脏舒张功能的下降。热缺血 16 min 组心脏移植术后虽然心肌水肿也比较明显, 但收缩功能指标和对照组相比下降并不明显, 对血管活性药物敏感。而其舒张功能指标则有明显下降, 与 18 min 组相近, 虽然和对照组相比差异无统计学意义, 但可以认为热缺血 16 min 已经是心脏舒张功能在正常范围内的临界时间, 如果热缺血时间进一步延长至 18 min, 则其舒张功能指标将明显下降。心肌酶学及电镜检查也可表明, 热缺血 18 min 心肌损伤明显重于热缺血 16 min 组, 而热缺血 16 min 组则更接近正常对照组。

本实验显示, 心脏停跳后热缺血 16 min 以内的心脏是有可能被成功用于心脏移植。

参考文献:

- [1] DAVID O, TAYLOR M D, LEAH B, et al. Registry of the international society for heart and lung transplantation: twenty-fourth official adult heart transplant Report-2007[J]. J Heart Lung Transplant, 2007, 26 (8): 769-781.
- [2] SINGHAL A K, ABRAMS J D, MOHARA J, et al. Potential suitability for transplantation of hearts from human non-heart-beating donors: data review from the gift of life donor program[J]. J Heart Lung Transplant, 2005, 24 (10): 1657-1664.
- [3] MARTIN J, LUTTER G, IHLING C, et al. Myocardial viability twenty-four hours after orthotopic heart transplantation from non-heart-beating donors[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2003, 125 (6): 1217-1228.
- [4] SCHEULE A M, JOST D, BEIERLEIN W, et al. Sodium-hydrogen inhibitor cariporide (HOE 642) improves in situ protection of hearts from non-heart-beating donors[J]. J Heart Lung Transplant, 2003, 22 (12): 1335-1342.
- [5] FISCHER J H, FUNCKE C, YOTSUMOTO G, et al. Maintenance of physiological coronary endothelial function after 3.3 h of hypothermic oxygen persufflation preservation and orthotopic transplantation of non-heart-beating donor hearts[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2004, 25 (1): 98-104.
- [6] GAASCH W H, BING O H, PINE M B, et al. Myocardial contracture during prolonged ischemic arrest and reperfusion[J]. Am J Physiol, 1978, 235 (6): H619-H627.