

МИНАСЯН С. М.^{1, 2}, ДМИТРИЕВ Ю. В.¹,
ГАЛАГУДЗА М. М.^{1, 2}, КАРПОВ А. А.^{1, 2},
БОБРОВА Е. А.¹, ВЛАСОВ Т. Д.^{1, 2}

Исследование инфаркт-лимитирующего эффекта консервирующих растворов на модели длительной холодовой консервации изолированного сердца крысы

¹Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр
197341, Россия, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, 2

²Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. акад. И. П. Павлова
197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6-8
e-mail: carkis@yandex.ru

Реферат

Одной из наиболее важных задач современной трансплантологии является сохранение морфофункционального состояния донорских органов в течение максимально длительного срока с момента изъятия их у донора до момента имплантации пациенту. Для решения этой задачи используются консервирующие растворы. Несмотря на большое количество прописей консервирующих растворов, до сих пор лимитирующим фактором, определяющим возможность имплантации сердца реципиенту, остается время после изъятия его у донора, ограниченное шестью часами. В настоящей работе на модели длительной холодовой консервации донорского сердца крысы изучены кардиопротективные эффекты наиболее широко применяемого в клинической практике консервирующего раствора Кустодиол и предложенного авторами нового консервирующего раствора на основе буфера Кребса-Хенселейта. Показано, что консервирующий раствор на основе буфера Кребса-Хенселейта сохранял кардиопротективную активность даже после восьмичасовой глобальной ишемии и имеет преимущество перед раствором Кустодиол по инфаркт-лимитирующему действию.

Ключевые слова: трансплантация сердца, кардиопротекция, ишемическое и реперфузионное повреждение миокарда, консервирующие растворы.

Введение

Методика консервации донорского сердца направлена на максимально полное сохранение его морфофункционального состояния от момента изъятия сердца у донора до начала его работы в организме реципиента. Применяющаяся в настоящее время методика консервации донорского сердца подробно описана в руководствах и учебниках. Несмотря на достигнутые успехи, в определенных условиях вследствие неадекватной консервации и/или длительной транспортировки возможно возникновение ишемического, а после трансплантации и реперфузионного повреждения (ИРП) донорских органов, что предопределяет необходимость совершенствования этой методики. Одним из путей улучшения результатов является разработка новых, эффективных консервирующих растворов (КР). В какой-то степени, остановка сердца больного во время его ятрогенной ишемии с экстракорпоральным кровообращением и консервация донорского сердца являются тождественными друг другу, поэтому применение кардиоплегических растворов в качестве консервирующих вполне оправдано и эффективно.

Ранее проведенные нами исследования показали достаточно высокую эффективность кардиоплегических растворов (КПР) на основе буферного раствора

Кребса-Хенселейта [1–3]. Они тестировались на модели перфузии изолированного сердца по Лангендорфу и показали хороший кардиопротективный потенциал при стандартном интермиттирующем режиме введения в течение всего срока ишемии сердца (согласно протоколу эксперимента, она составляла 1 час). Причем кардиопротективный эффект был значительным даже в условиях нормотермии, то есть без сопутствующего охлаждения раствора и дополнительного наружного охлаждения сердца. В связи с этим представляется актуальным исследование защитных свойств КПР данной линейки в условиях однократной инфузии перед длительной ишемией сердца в условиях наружного охлаждения, то есть исследование эффективности применения этих КПР в качестве консервирующих для донорского сердца.

Целью данной работы являлась сравнительная оценка инфаркт-лимитирующих эффектов КПР Кустодиол и КПР собственной прописи на основе буфера Кребса-Хенселейта (КПР 1).

Материал и методы исследования

Все эксперименты были проведены в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных» (публикация Нацио-

нального Института Здоровья, США №85–23) и были одобрены локальным этическим комитетом. Эксперименты выполнены на крысах-самцах стока Wistar массой 250–350 г, наркотизированных хлоралгидратом в дозе 450 мг/кг в соответствии с методикой, описанной нами ранее [4]. После изъятия сердца из грудной полости его подключали к модифицированному аппарату Лангендорфа. По окончании 10-минутного стабилизационного периода в течение 6 минут в коронарное русло вводился к охлажденный до +4 °С КПР Кустодиола или КПР 1. По окончании шестиминутного периода сердце вместе с аортальной канюлей снималось с аппарата Лангендорфа и помещалось в емкость с КПР, находящуюся в холодильной камере. В таких условиях сердце находилось в течение восьми часов. После окончания 8-часового периода сердце вновь подключалось к аппарату Лангендорфа и перфузировалось в течение 2 часов раствором Кребса-Хенселейта при температуре раствора 37 °С. По окончании периода реперфузии сердца нарезались на 5 равных по толщине поперечных срезов и в течение 15 минут окрашивались трифенилтетразолием хлоридом (ТТХ) [5]. Затем получали цифровые фотографии срезов. Размер инфаркта рассчитывался планиметрически по площади ТТХ-негативных зон при помощи программы Adobe Photoshop CS. Оценивали процентное отношение суммы площадей ТТХ-негативных зон к сумме общей площади сердца. Результаты представлены в виде «среднее±среднеквадратическое отклонение». Значимость различий оценивали с помощью U-критерия Манна-Уитни с использованием программы Statistica 10.0. Различия считались достоверными при $P < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Состав кардиоплегических растворов представлен в таблице 1.

По результатам проведенных экспериментов можно утверждать, что КПР 1 оказывал более вы-

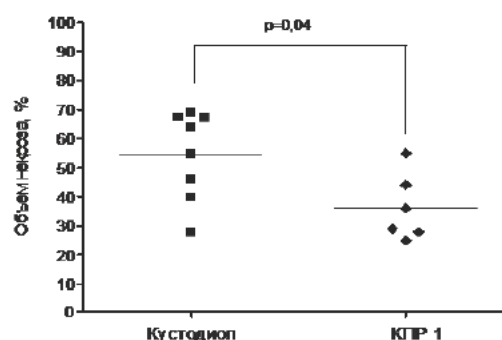


Рис. 1. Размер некроза миокарда в экспериментальных группах

раженный инфаркт-лимитирующий эффект, чем Кустодиол. Так, в группе Кустодиола размер некроза миокарда составил $54,6 \pm 15,2$, тогда как в группе КПР 1 размер некроза составил $37,8 \pm 12,0$ ($p = 0,04$). Размер некроза миокарда в экспериментальных группах представлен на рис. 1.

Между консервацией донорского сердца и его кардиоплегической остановкой во время кардиохирургической операции (которая тоже является консервацией) все же, существуют определенные различия. Во-первых — это продолжительность ишемии. Она достаточно редко превышает 2 часа во время операции и существенно больше в случае консервации донорского сердца. Во-вторых, при консервации донорского сердца инфузия КР проводится однократно, а эпизоды кардиopleгии проводятся каждые 15–20 минут. С другой стороны, в качестве донора выступает человек со здоровым сердцем, а миокард больного, которому проводится кардиохирургическая операция в большинстве случаев скомпрометирован заболеванием, что может снижать его устойчивость к ишемии. В целом, повреждение миокарда донорского сердца из-за длительности ишемии и однократного введения КПР представляется более значимым и предопределяет необходимость особенно эффективной кардиопroteкции. Поэтому

Состав кардиоплегических растворов (содержание компонентов в ммоль/л)

Таблица 1

Компоненты	Раствор на основе буфера Кребса–Хенселейта	Кустодиол
Натрий	143	15
Калий	25	10
Кальций	0,3	0,02
Магний	16	4
Маннитол	—	30
Гистидин	—	160
Глюкоза	11	—
Кетоглутарат	—	1
Триптофан	—	2
Бикарбонат	25	—
Дигидроортофосфат	1,2	—
pH	7,8	7,0–7,2
Осмолярность, мосм/л	380	310

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

для консервации донорского сердца должны использоваться только высокоэффективные КППР. С другой стороны, эффективная защита донорского сердца говорит о высоком кардиопротективном потенциале использованного КППР.

Одним из отличий КППР1 и Кустодиола является концентрация ионов натрия. В Кустодиоле она низкая, как и во всех внутриклеточных растворах, а в КППР1 (это внеклеточный раствор) — соответствует физиологической норме. Существуют преимущества и недостатки того и другого типа КППР, которые подробно описаны в соответствующих источниках. Нами ранее были проведены исследования их сравнительной эффективности при коротких сроках ишемии (1 час) при повторно-кратковременном введении, то есть в режиме типичной кардиоплегии. Результаты наших экспериментов показали преимущества внеклеточных растворов перед внутриклеточными [3]. При длительной 8-часовой ишемии с однократным введением КР разница между Кустодиолом и КППР1 не столь существенна, но все же внеклеточный КППР1 оказался несколько эффективнее внутриклеточного Кустодиола.

Отличительной положительной особенностью Кустодиола является мощная гистидиновая буферная система, значение которой в условиях длительной ишемии невозможно переоценить. В случае консервации донорского сердца на длительный срок она имеет значительно большее значение, чем при кар-

диоплегии. Буферные системы КППР1 представлены бикарбонатным и фосфатным буферами и в плане буферной емкости проигрывают кустодиолу, что является недостатком КППР1. Чем длительнее срок ишемии и меньше эпизодов инфузии раствора, тем большая буферная емкость требуется для эффективной кардиопротекции.

Положительной особенностью КППР1 является наличие в его составе глюкозы, которая способна обеспечить энергетический обмен в анаэробных условиях. Кустодиол глюкозы не содержит. Однако, в отличие от кардиоплегии, при которой возможно многократные инфузии КППР, при консервации органов в условиях длительной ишемии роль глюкозы в улучшении энергетического обмена кардиомиоцитов сомнительна. На наш взгляд, применительно к консервирующим растворам, необходимость включения в их состав глюкозы как энергетического субстрата еще требует дальнейшего изучения.

В целом, результаты экспериментов показали, что КППР1 превосходит по эффективности Кустодиол при консервации донорского сердца в эксперименте. В качестве дальнейшего пути улучшения кардиопротективных свойств КППР1 может рассматриваться разработка его модификации с усилением буферных систем.

Работа выполнена при поддержке гранта президента Российской Федерации по государственной поддержке ведущих научных школ за 2014 г. НШ — 1611.2014.7 и гранта РФФИ № 15-04-018138.

Литература

1. Минасян С. М., Бадриханова Л. Р., Курапеев Д. И. и др. Сравнительная оценка эффективности кардиоплегических растворов с различным содержанием глюкозы в эксперименте // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2008. Т. 7. № 2. С. 31–32.

2. Минасян С. М., Бадриханова Л. Р., Галагудза М. М. и др. Сравнительное исследование защитного эффекта гипотермии, ишемического preconditionирования и модифицированных кардиоплегических растворов при ишемии-реперфузии изолированного сердца крысы // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2008. Т. 7. № 2. С. 72–78.

3. Минасян С. М., Галагудза М. М., Васильева М. С. и др. Защита миокарда от глобальной ишемии-реперфузии с использованием кардиоплегического раствора на основе буфера Кребса–Хенселейта // Росс. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 2010. Т. 96. № 4. С. 353–361.

4. Минасян С. М., Галагудза М. М., Сонин Д. Л. и др. Методика перфузии изолированного сердца крысы // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2009. Т. 8. № 4. С. 54–59.

5. Fishbein M., Meerbaum S., Rit J. et al. Early phase acute myocardial infarction size quantification: validation of the triphenyltetrazolium chloride tissue enzyme staining technique // Am. Heart J. 1981. № 101 (5). P. 593–600.

UDK 616.127–005.8:612.115.38–092.4

Dmitriev Yu. V.², Minasian S. M.^{1,2}, Galagudza M. M.^{1,2}, Karpov A. A.^{1,2}, Bobrova E. A.¹, Vlasov T. D.^{1,2}

The investigation of infarct-limiting effects of preservation solutions in the rat model of long-time static cold storage of isolated rat heart

¹ North-West Federal Medical Research Centre
197341, Russia, Saint-Petersburg, Akkuratova str., 2

² First I. P. Pavlov Federal Medical University
197022, Russia, Saint-Petersburg, Lev Tolstoy str., 6-8
e-mail: carkis@yandex.ru

Abstract

One of the most important aims of modern transplantation is the preservation of the morphofunctional state of donor organs for as long as possible time after removing them from the donor prior to implantation into a patient. To solve this problem, heart preservation solutions are used. However, despite the large number of prescriptions of preservation solutions, the time, limited to six hours, after removing donor heart is still a limiting factor in determining the possibility of implanting heart into a patient. In this study, cardioprotective effects of widely used in clinical practice preservation solution HTK and new Krebs-Henseleit buffer-based preservation solution were studied in the rat model of prolonged static cold storage. It was shown that new Krebs-Henseleit buffer-based preservation solution protected the heart significantly even after an eight-hour global ischemia and has the advantage over Custodiol in the infarct-limiting action.

Keywords: heart transplantation, cardioprotection, ischemia-reperfusion injury, preservation solutions.

References

1. Minasjan S.M., Badrihanova L.R., Kurapeev D.I. et al. Cravnitel'naja ocenka jeffektivnosti kardioplegicheskikh rastvorov s razlichnym sodержaniem glukozy v jeksperimente [Comparative assessment of efficiency the cardioplegic solutions with various content of glucose in experiment] // Regionarnoe krovoobrashhenie i mikroциркуляция [Regional hemodynamics and microcirculation]. 2008. V. 7. N. 2. P. 31-32. [In Russian].
2. Minasjan S.M., Badrihanova L.R., Galagudza M.M. et al. Cravnitel'noe issledovanie zashhitnogo jeffekta gipotermii, ishemicheskogo pre kondicionirovaniya i modifitsirovannykh kardioplegicheskikh rastvorov pri ishemii-reperfuzii izolirovannogo serdca krysy [Comparative research of protective effect of a hypothermia, ischemic preconditioning and the modified cardioplegic solutions at ischemia-reperfusion of the rat's isolated heart] // Regionarnoe krovoobrashhenie i mikroциркуляция [Regional hemodynamics and microcirculation]. 2008. V. 7. N. 2. P. 72-78. [In Russian].
3. Minasjan S. M., Galagudza M. M., Vasil'eva M. S. et al. Zashhita miokarda ot global'noj ishemii-reperfuzii s ispol'zovaniem kardioplegicheskogo rastvora na osnove bufera Krebsa—Henseleita [Myocardial protection against global ischemia-reperfusion with use of cardioplegic solution on the basis of Krebs's — Henseleyt buffer] // Rossijskij fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenova [Russian journal of physiology (formerly I.M. Sechenov Physiological Journal)]. 2010. V. 96. N.4. P. 353-361. [In Russian].
4. Minasjan S.M., Galagudza M.M., Sonin D.L. et al. Metodika perfuzii izolirovannogo serdca krysy [Technique of the isolated rat's heart perfusion] // Regionarnoe krovoobrashhenie i mikroциркуляция [Regional hemodynamics and microcirculation]. 2009. V. 8. N. 4. P. 54-59. [In Russian].
5. Fishbein M., Meerbaum S., Rit J. et al. Early phase acute myocardial infarction size quantification: validation of the tripheniltetrazolium chloride tissue enzyme staining technique // Am. Heart J. 1981. V. 101(5). P. 593-600.