

на правах рукописи

АЛИХАНОВ САРДАР АМИРХАНОВИЧ

**«ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
ГИСТИДИНСОДЕРЖАЩИХ ДИПЕПТИДОВ В
КРИСТАЛЛОИДНОМ КАРДИОПЛЕГИЧЕСКОМ РАСТВОРЕ»**

(сердечно - сосудистая хирургия 14.00.44)

(анестезиология и реаниматология 14.00.37)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2009

Работа выполнена в Научном Центре сердечно-сосудистой хирургии
им. А.Н. Бакулева РАМН.

Научные руководители:

Доктор медицинских наук, профессор

Профессор, академик РАМН

Бокерия Лео Антонович

Доктор медицинских наук

Мовсесян Рубен Рудольфович

Официальные оппоненты:

***Иванов Алексей Сергеевич** – доктор медицинских наук, профессор, руководитель отделения хирургии врождённых пороков сердца Российского научного центра хирургии им. Б.В. Петровского РАМН*

***Григорьянц Рачик Гагикович** - доктор медицинских наук, руководитель отделения переливания крови Научного Центра сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева РАМН*

Ведущая организация: «Федеральный Научный Центр трансплантологии и искусственных органов им. В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития РФ.

Защита диссертации состоится «26» ____июня____ 2009 г. в «__» часов на заседании Диссертационного Совета Д 001.015.01. при Научном Центре сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева РАМН (121552, Москва, Рублёвское шоссе, 135, конференц-зал №2).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Научного Центра сердечно-сосудистой хирургии им А.Н.Бакулева РАМН.

Автореферат разослан «__» _____ 2008 г.

Учёный секретарь

Диссертационного Совета,

доктор медицинских наук

Газизова Динара Шавкатовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

С момента выполнения операций на открытом сердце в условиях искусственного кровообращения, сохранение жизнеспособности миокарда является одной из главных проблем хирургии сердца. Были предложены различные методы остановки сердца: методы фармакохолодовой и кровяной кардиopleгии (КП), электрические и др. методы. Сравнение эффективности защиты миокарда с помощью тех или иных методов являются основными темами большинства работ, посвящённых кардиopleгии.

До сих пор, вопросы состава КПР, коллоидно-осмотического давления и осмолярности, наличия биологически активных веществ, экспозиции и кратности введения, способов их доставки, давления при нагнетании, температурных режимов и т.д. остаются открытыми.

Оптимальным методом кардиopleгической защиты явилась бы ситуация, при которой ишемические повреждения миокарда, имеющие место до операции, подвергались бы обратному развитию в ходе выполнения защиты миокарда. Таким образом, одной из основных задач КП, с целью предупреждения ишемических повреждений, является повышение буферной ёмкости КПР, по возможности, естественными буферными субстратами. Основным недостатком кристаллоидных КПР по сравнению с растворами на основе крови является отсутствие естественных буферных систем, для нейтрализации кислых продуктов метаболизма, образующихся при ишемии миокарда.

Как известно, белковые буферы предпочтительнее для стабилизации внутриклеточного рН, метаболизма и лучше способствуют восстановлению сократительной способности миокарда, по сравнению с

бикарбонатным буфером, который используется в кристаллоидных растворах внеклеточного типа. Исходя из этого, было бы разумно использовать в КПР белковые буферы, обладающие сродством с белковыми системами миокарда. Оптимальным КПР может считаться раствор, в котором используются несколько буферных субстратов. Из известных дипептидов, обладающих высокой буферной активностью, целесообразно использование карнозина, состоящего из β -аланина L-гистидина, его производного – N-ацетилкарнозина, и L-гистидина. Такое сочетание позволило бы повысить буферную ёмкость раствора с поддержанием в физиологических пределах pH и осмолярности.

Цель исследования:

Теоретически обосновать и экспериментально апробировать новый состав кардиоплегического раствора на основе естественных дипептидов.

Задачи исследования:

1. Провести теоретическое обоснование использования дипептидов в составе кардиоплегического раствора.
2. Разработать модель для проведения экспериментального обоснования и апробации нового кардиоплегического раствора.
3. Провести комплексную оценку эффективности нового раствора с использованием мониторинга сердечной деятельности, а также методов биохимического и морфологического исследования.
4. Провести сравнительную оценку эффективности различных кардиоплегических растворов на одной экспериментальной модели.

Научная новизна

В настоящей работе впервые проведено теоретическое обоснование использования природных дипептидов в составе кардиоплегического раствора внеклеточного типа. В результате теоретического обоснования

предложен новый состав кардиоплегического раствора на основе естественных дипептидов. Впервые определена эффективность сочетанного использования трёх дипептидов: карнозина, его ацетилированного производного и гистидина в КПР.

Практическая ценность исследования

Создана модифицированная модель изолированного сердца животного. Особенностью установки является проведение перфузии изолированного сердца двумя методами: по Langendorf и по Neely. Установка снабжена полиграфом для ЭФИ, модулем для ЭКГ, датчиком растворённого в крови (растворе) кислорода, датчиком давления, позволяющие с максимальной точностью изучить параметры работы изолированного сердца. Модульная организация установки позволяет настраивать систему для решения различных задач при каждом эксперименте. Появилась возможность экспериментально обосновать применение различных добавок в растворах для перфузии, с изучением их влияния на электрофизиологию сердца, с возможным последующим применением полученных результатов в клинической практике Центра.

Разработан новый КПР с использованием природных дипептидов, буферная емкость которого превышает многие существующие аналоги. Экспериментальное обоснование кардиопротекторных свойств карнозина, ацетилкарнозина, гистидина в гиперкалиевом КПР с пониженной концентрацией ионов кальция позволяет начать клиническое испытание нового гиперкалиевого КПР.

Основные положения, выносимые на защиту.

Использование гистидинсодержащих дипептидов в гиперкалиевом КПР, с пониженной концентрацией кальция, способствуют более эффективной защите миокарда по сравнению с раствором №3 НЦ ССХ и

раствором «Кустодиол», на модифицированной модели изолированного сердца крысы, в условиях длительной ишемии (480 минут), при гипотермии +12°C +14°C. Комплексное экспериментальное исследование работы изолированного сердца животного, включающее компьютерный мониторинг сердечной деятельности, определение биохимических и морфологических маркёров, позволяет оценить структуру и функцию сердца на этапах реперфузии.

Реализация результатов исследования

Теоретическое обоснование, а также результаты экспериментального исследования, позволили приступить к клинической апробации предложенного КПП. Оформлена заявка на изобретение. Разработанная и созданная модель изолированного сердца, может с успехом использоваться в других научных исследованиях.

Апробация работы

Материалы исследования были доложены и обсуждены: на XI и XII ежегодной научной сессии Научного Центра сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева с Всероссийской конференцией молодых ученых (Москва, 2007, 2008); на XIII Всероссийском Съезде сердечно-сосудистых хирургов (Москва, 2007); на V Конференции молодых ученых России с международным участием: "Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины" (Москва, 2008). Материалы исследования были доложены и обсуждены на Ученом Совете центра в 2008 году.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, принята заявка на изобретение.

Объём и структура диссертации

Объём диссертационной работы составляет 125 страниц машинописного текста. Диссертация состоит из введения, четырёх глав, заключения, выводов, практических рекомендаций и указателя литературы. Иллюстративный материал представлен 8 рисунками, 14 диаграммами и 29 таблицами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Материал и методы

В работе проанализирован материал 60 экспериментов на изолированном сердце крысы. Эксперименты проводили на базе биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, лаборатории кардиоплегии, лаборатории экспресс – диагностики биохимии и отдела патологической анатомии НЦ ССХ им. А.Н. Бакулева РАМН, в период с июня 2006 года по февраль 2007 года. С целью проведения сравнительного анализа эксперименты разделены на 3 группы: I группа – кардиоплегия осуществлялась раствором КЗ НЦ ССХ; II группа – кардиоплегия «НТК»-раствором; III группа – кардиоплегия «АСН»-раствором.

В эксперименте использовали сердца белых крыс, линии Вистар, самцов, массой от 300 до 350 грамм, в возрасте 5-6 месяцев.

Крысу декапитировали, затем фиксировали на препаровальном столике. Производили разрез кожи, брюшных мышц и диафрагмы. Захватив пинцетом мечевидный отросток, делали разрезы по обеим сторонам от грудины и обнажали сердце. Находили аорту и, как можно дистальнее, рассекали трахею и сосудистый пучок, подходящий к аорте. Сердце помещали в ванночку с раствором Кребса-Хензеляйта (+4°C).

Таблица № 1. Составные компоненты кардиоплегических растворов.

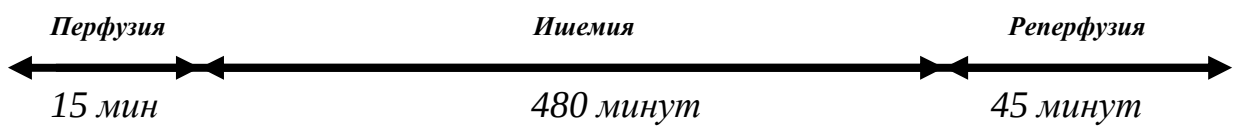
Компоненты (ммоль/л)	I группа (n = 20) раствор КЗ НЦ ССХ	II группа (n = 20) «НТК»-раствор	III группа (n = 20) «АСН»-раствор
<i>Натрий</i>	110	15	110
<i>Калий</i>	15	10	15
<i>Кальций</i>	0,09	0,02	0,03
<i>Магний</i>	16	4	16
<i>Маннит</i>	104	30	25
<i>Гистидин</i>	-	180/18	5
<i>Карнозин</i>	-	-	100
<i>Ацетилкарнозин</i>	-	-	40
<i>Глюкоза</i>	5,6	-	-
<i>Кетоглутарат</i>	-	1	-
<i>Триптофан</i>	-	2	-
<i>NaHCO₃</i>	24	-	-

Аорту очищали от пленок и соединительной ткани и отрезали непосредственно перед изгибом и местом отхождения плечевых и мозговых артерий. В результате образовывался остаток аорты, представляющий собой трубку длиной 5-6 мм, который натягивали на канюлю. Поверх аорты накладывали лигатуру, после чего сердце оказывалось фиксированным в установке для перфузии (от момента извлечения сердца до начала его перфузии проходило не более 3 минут). После чего следовал 15 минутный период адаптации сердца к условиям перфузии с непрерывной регистрацией всех параметров. Перфузия осуществлялась в соответствии с традиционной схемой Лангендорф

раствором Кребса – Хензеляйта (рН 7,3-7,4) при температуре 37°C. Затем прекращали перфузию, и вводили КПР с температурой +12°C - +14°C, в течение 5 минут, по 15-20 капель в минуту.

Сердце в ванночке с раствором Кребса – Хензеляйта помещали в камеру с температурой +7°C - +8°C на 480 минут, моделируя тотальную ишемию, после чего проводили реперфузию в течение 45 минут (Рис.1).

Рисунок № 1. Схема эксперимента на изолированном сердце крысы.



Буферную емкость рассчитывали по формуле (по ван Слайку):

$$\beta = \frac{db}{d \text{ pH}} = 2.303 \left(\frac{cK[\text{H}^+]}{(K + [\text{H}^+])^2} + [\text{H}^+] + [\text{OH}^+] \right) \approx 2.303 \frac{cK[\text{H}^+]}{(K + [\text{H}^+])^2}$$

где db - количество в эквивалентах сильного основания, добавленное к 1 л буферного раствора, c - общая молярная концентрация слабой кислоты и ее соли МА, K - константа диссоциации кислоты.

Оценка параметров сердечной деятельности.

Оценку сердечной деятельности проводили непрерывной регистрацией кривой давления в левом желудочке (ЛЖ). Для этого в полость ЛЖ через аорту вводился полиэтиленовый катетер толщиной 0.75 мм, заполненный жидкостью и подсоединённый к датчику давления. Сигнал датчика давления через предусилитель подавался на вход аналого-цифрового преобразователя компьютера каждые 5 миллисекунд (в среднем 100 точек на сердечный цикл) и регистрировался с помощью программы Pulsar (разработанной на кафедре ФЧЖ биологического факультета МГУ). Регистрация шла с частотой дискретизации аналогового сигнала 0.2 кГц,

что позволяло достаточно точно регистрировать кривую давления в ЛЖ. Затем, с помощью программы Pulsar рассчитывались следующие параметры: систолическое давление (СД, мм.рт.ст.), конечно - диастолическое давление (КДД, мм.рт.ст.), развиваемое давление – амплитуда, вычислялась как разница между СД и КДД, в мм.рт.ст.; частоту сердечных сокращений изолированного сердца (ЧСС, уд./мин). ЧСС вычислялась как величина, обратная длительности периода (Р) между максимумами давления в ЛЖ в минутах ($ЧСС=1/P$). Сократимость вычислялась как произведение амплитуды на ЧСС/мин, и выражалась в мм.рт.ст/мин. Также рассчитывали $+dp/dt \max$ и $-dp/dt \max$ – максимальную скорость фронта и спада пульсовой волны в ЛЖ. При анализе показателей сравнивали исходные значения работы изолированного сердца со значениями параметров сердечной деятельности на 15, 30 и 45 минутах реперфузии во всех группах. Достоверность различий между ними вычисляли с помощью критерия Манна – Уитни в программе Statistica 6.0.

Биохимическое исследование проводили взятием проб раствора оттекающего от правого сердца до введения КПП (проба 1). Остальные пробы забирались во время реперфузии в динамике на 15 (проба 2), 30 (проба 3) и 45 минутах (проба 4). Были изучены одни из важных биохимических критериев адекватности защиты миокарда: рН, рО₂, уровень лактата в оттекающем перфузате от «правого сердца». Исследования проводились на газовом анализаторе ABL 800 FLEX (Radiometer Medical ApS., Дания).

Таблица № 2. Значения рН и осмолярности КПП.

Параметры	раствор №3 НЦ ССХ	НТК-раствор	АСН-раствор
<i>рН</i>	7.7-7.8	7.02-7.2	7.2-7.4
<i>Осмолярность</i>	340-345 мосм/л	310 мосм/л	320-340 мосм/л

Гистохимическое исследование миокарда выполнено во всех группах. Для гистохимического исследования после реперфузии, сердце снимали с канюли и погружали на 20 секунд в петролейный эфир, охлаждённый до -70°C . Затем, в микротоме при -19°C , компании «Leica Microsystems CM1510» (Германия), изготавливали срезы толщиной 10 микрон всех исследованных сердец крыс. Срезы фиксировали на предметных стёклах в криостате, затем их окрашивали гематоксилином и эозином по Ван Гизон в модульном аппарате «Leica/Jung Autostainer XL» (Германия), а также гистохимически выявляли активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) по методу Nachlas. Определяли содержание нейтральных липидов при помощи масляного красного О (Oil red O) по Лилли с помощью микроскопа «Leica DM LS» (США).

В кардиомиоцитах оценивали степень развития и распространения жировой дистрофии (ЖД) и/или суданофилии:

А) Определяли выраженность ЖД: отсутствие очагов ЖД, диффузная суданофилия (ДС), мелкоочаговая мелкокапельная жировая дистрофия (ММЖД), крупноочаговая мелкокапельная жировая дистрофия (КМЖД), очаговая распространённая жировая дистрофия (ОРЖД), диффузная жировая дистрофия (ДЖД). В) Оценивали локализацию очагов повреждения: верхушка, передняя и задняя стенка, базальные отделы ЛЖ. С) И их расположение по слоям миокарда: ЖД в эпикардальном отделе и эндокардиальном отделе ЛЖ, интрамурально. D) По выраженности контрактурного повреждения определяли слабую, среднюю и выраженную степень повреждения миокарда.

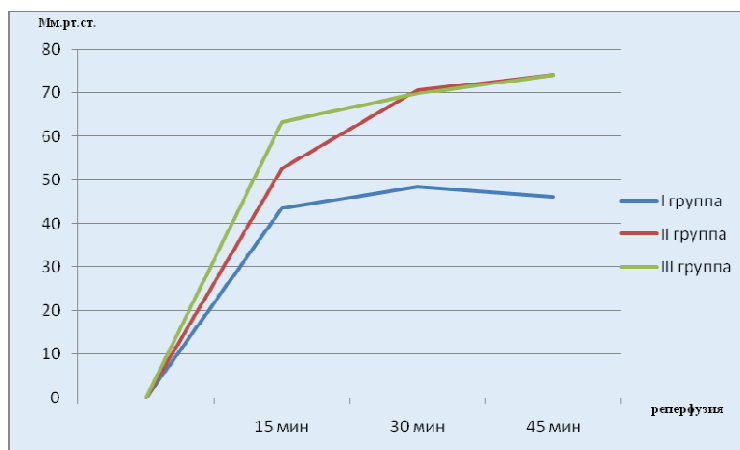
Результаты исследования и их обсуждение

При изучении буферной ёмкости, по данным теоретических расчётов, получены значения буферной ёмкости $30 \approx 33$ мэкв/л-ед.рН, при

pH 7.4 и осмолярности 320-340 мосм/л. При титровании, с измерением pH, в эксперименте при добавлении определённой концентрации сильного основания к 1 л буферного раствора наблюдали изменения pH на единицу. В результате подсчёта получили буферную ёмкость 35,7 мэкв/л·ед.pH., при тех же показателях pH, осмолярности и температуры.

Мониторинг показателей сердечной деятельности в режиме «онлайн», как и интраоперационное монитирование в клинике, является одним из наиболее доступных методов оценки работы изолированного сердца, а в клинике – как метод оценки системы кровообращения в режиме реального времени. В данном исследовании для оценки состояния миокарда в режиме реального времени использовали несколько показателей. Это, прежде всего величина **амплитуды**, отражающая давление в ЛЖ в единицу времени (диагр. 1).

Диаграмма № 1. Динамика средних значений амплитуды.



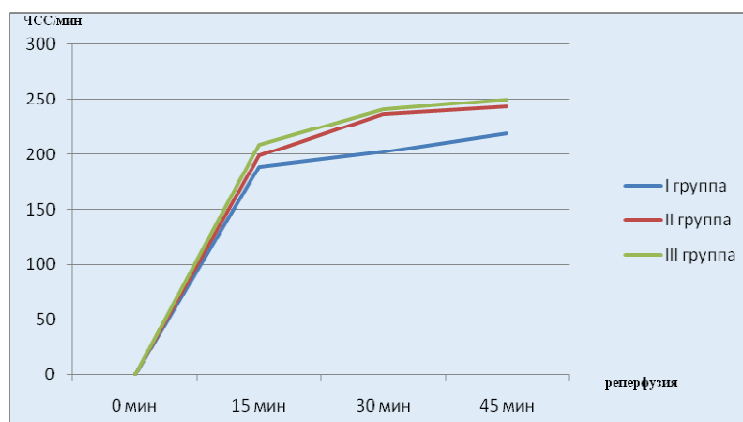
В I группе на всех этапах реперфузии значения амплитуды были достоверно низкими. Во II группе на первом этапе реперфузии амплитуда была сниженной по сравнению с III группой, но выше чем в I группе. На двух следующих основных этапах реперфузии во II группе отмечалось повышение средних значений амплитуды. В III группе на всех этапах реперфузии значения амплитуды были достоверно выше ($p < 0,05$), чем в I

группе. Во II и III группе показатели значений амплитуды достоверно не различались и оставались в пределах нормальных значений амплитуды.

Важным показателем сердечной деятельности в клинике и эксперименте является **ЧСС**. В данном исследовании за частоту сердечных сокращений принимали нормальные сокращения сердца (с одинаковой амплитудой на определённом равном расстоянии друг от друга) и экстрасистолы (внеочередные сокращения сердца с различной амплитудой), так как последние компенсировали сердечный выброс.

Во всех группах ЧСС была максимальная на последнем этапе реперфузии. Во I группе средняя ЧСС была достоверно меньше, по сравнению со II и III группой ($p < 0,05$). Во II и III группе достоверных различий по ЧСС не отмечалось.

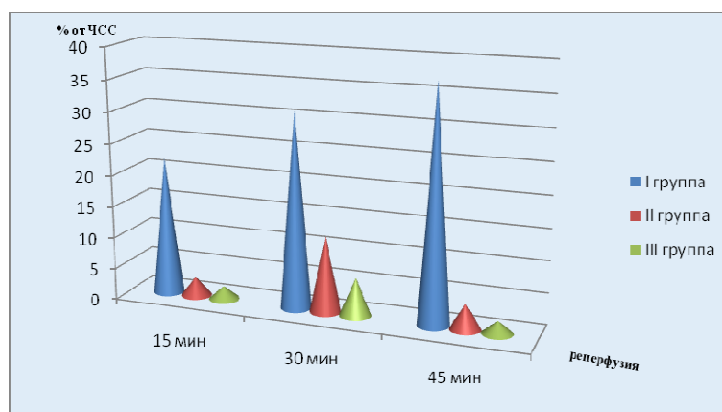
Диаграмма № 2. Динамика ЧСС на основных этапах реперфузии.



В клинической практике, как и в эксперименте, если в период реперфузии на ЭКГ регистрируются частые экстрасистолы, принято считать о неадекватной защите миокарда.

Минимальные нарушения ритма и единичные экстрасистолы в III группе, по-видимому, связано концентрацией магния в растворе «АСН» с минимальной концентрацией кальция.

Диаграмма № 3. Динамика экстрасистолии, % от общей ЧСС.



По мнению Grubbs R. D добавление магния в КПР снижает частоту развития послеоперационных аритмий и улучшает защиту миокарда несколькими способами. Например, способность магния контролировать как вход кальция в клетку, так и его высвобождение из мембраны сарколеммы, где кальций находится в связанном состоянии. По данным Buckberg G.D., применение магния в КПР с низкой концентрацией калия может вызвать асистолию, в связи с этим в растворе «АСН» концентрация калия и магния осталась такой же, как и в растворе КЗ.

Во всех группах отмечалась тенденция к увеличению $+dp/dt \max$ и $-dp/dt \max$, параллельно увеличению ЧСС, к концу реперфузии.

Таблица № 5. Динамика средних значений $+dp/dt \max$ на основных этапах реперфузии.

Этап реперфузии	I группа (раствор №3)	II группа (НТК-раствор)	III группа (АСН-раствор)
15 минут	1082±46	1458.6±59	1618.4±63
30 минут	1168±62	2197.8±52	2080.2±61
45 минут	1303.2±64	2374.6±62	2268.7±48

При анализе полученных данных, было отмечено, что максимальная скорость фронта (таб.5) и максимальная скорость спада пульсовой волны (таб.6) на 15 минуте реперфузии в III группе была достоверно больше,

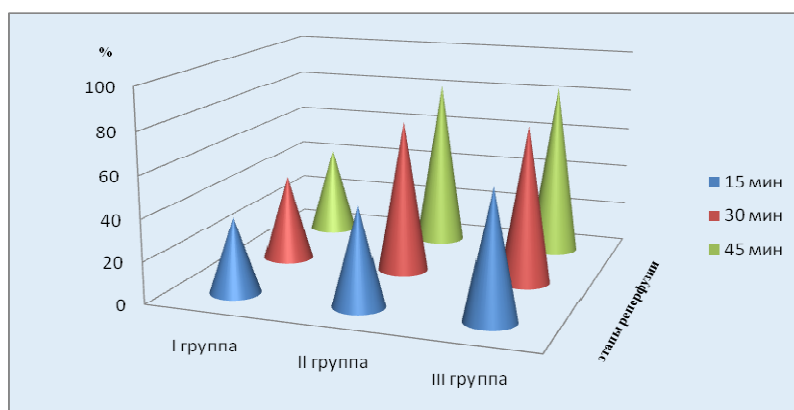
чем в I и II группах ($p<0,05$). Затем, на 30 минуте реперфузии, наблюдалось достоверное увеличение максимальной скорости фронта и спада пульсовой волны во II и III группе по сравнению с I группой ($p<0,00001$). На 45 минуте отмечалось увеличение $+dp/dt \max$ и $-dp/dt \max$ в трёх группах. Максимальная скорость фронта пульсовой волны во II и III группе была достоверно выше по сравнению с I группой ($p<0,00001$). При анализе средних значений максимальной скорости фронта и спада пульсовой волны на 30 и 45 минуте, достоверных различий между II и III группами отмечено не было.

Таблица № 6. Динамика средних значений $-dp/dt \max$.

Этап реперфузии	I группа (раствор №3)	II группа (НТК-раствор)	III группа (АСН-раствор)
15 минут	632.5 $\pm$ 42	997.1 $\pm$ 42	1232.5 $\pm$ 42
30 минут	828 $\pm$ 38	1501.3 $\pm$ 48	1498 $\pm$ 43
45 минут	951.5 $\pm$ 48	1657 $\pm$ 37	1627.8 $\pm$ 62

В эксперименте, сократительную способность миокарда мы изучали по показателям компьютерного мониторинга. Сердце крысы рассматривалось как сердце с высоким миокардиальным резервом, а не больное.

Диаграмма № 5. Динамика сократительной активности миокарда, % от исх. значений.



К началу реперфузии во всех группах отмечалась тенденция к увеличению сократительной способности миокарда от 15 минуты к 30 минуте реперфузии, и от 30 минуты к 45 минуте реперфузии. Сократимость миокарда ЛЖ в III группе была достоверно больше, чем в I ($p < 0,001$) и была достоверно больше, чем во II группе ($p < 0,05$).

Высокая сократительная активность во II группе по сравнению с I группой, объясняется наличием в растворе «Кустодиол» гистидина, его солянокислой фракции и триптофана. В эксперименте на крысах, на модели изолированного сердца, Алабовский В.В. с соавт., улучшали сократительную активность миокарда добавлением во внеклеточный раствор природного дипептида, N-ацетилкарнозина, существующий в определенной концентрации в здоровой сердечной мышце. По-видимому, хорошая сократимость миокарда в III группе, которая была выше сократимости в I и II группе, связано с добавлением в АСН-раствор N-ацетилкарнозина.

Биохимическая оценка состояния миокарда многими авторами выделяется как важный критерий для оценки эффективности защиты миокарда. В комплексе с компьютерным мониторингом, динамика биохимических показателей даёт более точное представление о функциональном состоянии сердечно-сосудистой системы.

Для оценки состояния метаболизма миокарда на основных этапах оперативного вмешательства были использованы биохимические показатели, информативность которых подтверждена в исследованиях, анализирующих состояние миокарда у больных во время операций на открытом сердце.

Критического снижения значений pH не наблюдалось ни в одной группе. Критическим принято считать снижение значений pH ниже 7.0,

когда происходит угнетение активности фермента фосфофруктокиназы, участвующего в превращении глюкозы в пируват, что является неотъемлемым этапом как аэробного, так и анаэробного гликолиза. Это приводит к быстрому истощению запаса макроэргических соединений.

Таблица № 8. Динамика рН, в отекающем от «правого сердца» растворе.

Этап реперфузии	I группа (раствор №3)	II группа (НТК-раствор)	III группа (АСН-раствор)
15 минут	7.223±0.02	7.251±0.03	7.338±0.06
30 минут	7.242±0.02	7.298±0.02	7.381±0.04
45 минут	7.281±0.04	7.341±0.04	7.381±0.05

В I группе значения рН в отекающем от «правого сердца» растворе в течение всего реперфузионного периода оставались низкими. Отмечалось достоверное снижение показателей рН в сторону ацидоза ($p < 0,001$), по сравнению со значениями рН в III группе. По-видимому, это связано с тем, что происходило вымывание недоокисленных продуктов метаболизма, накопленных за время кардиopleгической ишемии. Описание подобных изменений биохимических показателей в клинике связывают с синдромом «wash-out».

Во II группе значения рН на начальном этапе реперфузии оставались низкими. Как и в I группе отмечалось достоверное снижение показателей рН в сторону ацидоза ($p < 0,05$) по сравнению со значениями рН в III группе. К концу реперфузии, значения рН во II группе были достоверно выше, по сравнению со значениями рН в I группе.

При анализе кислотно-щелочного равновесия по величине рН в I и II группах отмечался ацидотический сдвиг, однако если в I группе сдвиг носил постоянный характер, то во II группе сдвига на последнем этапе реперфузии не наблюдали, что свидетельствует об обратимости

метаболического ацидоза по мере усиления сократительной активности миокарда.

В III группе уровень рН на всех этапах реперфузии оставался в пределах физиологических значений. Достоверных различий между показателями рН до введения КПР и на основных этапах реперфузии отмечено не было, что свидетельствует об эффективной защите миокарда в III группе. Значения рН в III группе были достоверно выше, по сравнению со значениями рН в I группе ($p < 0,001$) на всех этапах реперфузии и достоверно высокими, по сравнению со значениями рН во II группе ($p < 0,05$). Ацидоза в III группе не наблюдалось.

Одним из важных биохимических показателей, исследуемых в практике для оценки метаболического сдвига, является определение БЕ. Исследование величины показателя БЕ является определяющим фактором расчёта количества оснований, необходимого для коррекции их дефицита в экстрацеллюлярной жидкости. Однако, в данном исследовании, в качестве перфузионного раствора в системе изолированного сердца был раствор Кребса–Хензеляйта, а не кровь, где определение БЕ не существует. В нашем исследовании об адекватности миокардиального метаболизма можно судить по таким биохимическим критериям, как лактат и показателям обмена кислорода.

О потреблении кислорода миокардом можно косвенно судить по насыщению кислородом крови из коронарного синуса. В данном исследовании потребление миокардом кислорода косвенно судили по разнице pO_2 в притекающем к сердцу растворе и оттекающем от «правого сердца» растворе.

Таблица № 9. Динамика разницы pO_2 и лактата ($M \pm m$).

Время	Параметры	Кардиоплегические растворы			P
		КЗ	Кустодиол	АСН	
15 мин	pO_2 , ммНг	2.0 ± 0.94	9.0 ± 1.15	26 ± 1.41	$p_{(1,2)} < 0.0001_{(3)}$
	лактат, ммоль/л	0.37 ± 0.016	0.3 ± 0.04	0.15 ± 0.015	$p_3 < 0.05_{(1,2)}$
30 мин	pO_2 , ммНг	6 ± 0.96	9 ± 1.24	14 ± 1.67	$p_{(1,2)} < 0.0001_{(3)}$
	лактат, ммоль/л	0.32 ± 0.03	0.19 ± 0.04	0.07 ± 0.02	$p_3 < 0.05_{(1,2)}$
45 мин	pO_2 , ммНг	7 ± 1.76	11 ± 1.76	3 ± 1.67	$p_3 < 0.0001_{(1,2)}$
	лактат, ммоль/л	0.25 ± 0.03	0.15 ± 0.03	0.05 ± 0.02	$p_3 < 0.05_{(1,2)}$

Таким образом, динамика показателей КЩС на этапе перфузии и основных этапах реперфузии показала обратимость метаболического ацидоза по мере восстановления сократительной активности миокарда. При сравнении показателей КЩС на основных этапах реперфузии подтверждена эффективность кардиopleгии в III группе по сравнению с I и II группами, где проявления метаболического ацидоза были выражены.

Морфологическая картина препаратов в эксперименте явилась дополнением к полученным результатам компьютерного мониторинга и биохимического анализа. При проведении гистохимического анализа в некоторых препаратах отмечались изолированные выраженные контрактурные изменения в субэндокардиальном слое в области верхушки. Вероятно, эти изменения могли быть связаны и с контактным повреждением, от датчика, помещённого в ЛЖ.

Во всех препаратах I группы наблюдали более значительную выраженность контрактурных повреждений миокарда по сравнению с препаратами II и III группы. Во II группе контрактурные изменения

наблюдались преимущественно в субэпикардальном отделе, по сравнению с препаратами I группы, где они располагались субэпикардально, субэндокардально и интрамурально. В 2 препаратах III группы контрактурных повреждений не отмечали. В 13 препаратах III группы распределение контрактурных повреждений было таким же, как и в препаратах II группы, преимущественно в субэпикардальном слое ЛЖ. В 5 препаратах III группы, распределение контрактурных повреждений было таким же, как в I группе.

В *I группе* диффузная суданофилия, как предвестник ЖД, наблюдалась во всех препаратах. Во всех препаратах, обнаружены очаги ЖД с различной степенью её развития, от мелкоочаговых мелкокапельных участков до диффузного распространения. В I группе отмечено достоверное увеличение степени развития ЖД в 2,5 раза по сравнению с III группой ($p < 0,001$), где были обнаружены очаги ЖД только в 9 препаратах. Во *II группе* в 11 (55%) препаратах обнаружили участки диффузной суданофилии, которые были расположены преимущественно в субэндокардальном слое в области верхушки ЛЖ. Очаги ЖД во II группе были представлены мелкоочаговыми мелкокапельными, крупноочаговыми мелкокапельными и очаговыми распространёнными участками. Диффузной ЖД не обнаружено ни в одном препарате. В 11 препаратах II группы обнаружили участки ДС. Степень развития ЖД в препаратах II группы была достоверно выше в 1,5 раза по сравнению с III группой ($p < 0,05$), где очаги ЖД были обнаружены в 5 препаратах. В *III группе* диффузная суданофилия наблюдалась в 13 (65%) препаратах. В III группе очаги ЖД были расположены в виде мелкоочаговых и крупноочаговых мелкокапельных участков. Очаговой распространённой и диффузной ЖД в препаратах III группы не обнаружено.

На основании полученных результатов можно заключить, что ни при одном из применённых методов защиты миокарда, в условиях гипотермии и длительной ишемии не было идеального сохранения миокарда. Но в сравнительном аспекте, раствор, содержащий карнозин, ацетилкарнозин и гистидин, с пониженной концентрацией кальция лучше защищает миокард (количество повреждений миокарда резко снижено, особенно в субэпикардальном отделе.), чем раствор «Кустодиол» и раствор №3 НЦ ССХ.

Выводы

1. Теоретически обосновано использование естественных дипептидов в составе кардиоплегического раствора. Расчетная буферная емкость предложенного раствора составляет 33 – 35 мэкв/л·ед.рН., что в 1,5 раза превосходит буферную емкость крови.
2. Разработана модифицированная модель изолированного сердца, которая позволила наиболее адекватно провести сравнительное исследование по изучению кардиопротекторных свойств различных КПР, результаты которых подтвердились морфологическими и биохимическими исследованиями.
3. В сравнительном аспекте раствор «АСН», содержащий карнозин, ацетилкарнозин и гистидин, после длительной ишемии (480 минут) и гипотермии (+12°C – +14°C), способствует более эффективному восстановлению сердечной деятельности и повышению сократимости миокарда с минимальными нарушениями ритма и проводимости, по сравнению с растворами КЗ НЦ ССХ и «Кустодиол».
4. При использовании КПР «АСН» в постишемическом периоде отмечалось преобладание аэробного окисления, кислородная

задолженность и уровень лаката были минимальными ($III(0.05 \pm 0.02) < II(0.15 \pm 0.03) < I(0.25 \pm 0.03)$).

5. Гистохимическое исследование миокарда при различных способах защиты показало, что использование гиперкалиевого КПР «АСН» с пониженной концентрацией кальция способствует снижению контрактурных изменений в миокарде, а гистидинсодержащие дипептиды препятствуют образованию в очагах ишемии жировой дистрофии.

Практические рекомендации

1. При изучении эффективности защиты миокарда, после кардиоплегии, нового кристаллоидного КПР рекомендуется проводить сравнительную его оценку с наиболее известными растворами внеклеточного типа «Госпиталя Св.Томаса» и внутриклеточного типа «Кустодиола».
2. Для создания дополнительного противоишемического эффекта КПР рекомендуется добавление природных дипептидов в концентрациях: ацетилкарнозина 40 ммоль/л, карнозина 100 ммоль/л, гистидина 5 ммоль/л с поддержанием рН раствора в диапазоне от 7.2 до 7.6, осмолярности на уровне 320-340 мосм/л и буферной ёмкости свыше 20 мэкв/л*ед.рН.
3. В связи, с химической особенностью дипептидов, изменять рН кардиоплегического раствора в зависимости от температуры, как в кислую, так и в щелочную сторону, рекомендовано соблюдать температуру хранения кардиоплегического раствора от +8°C до +15°C.

4. Для снижения интенсивности метаболизма сердечной мышцы и предупреждения холодовой ишемической констрикции сосудов сердца рекомендуется введение КПП при температуре +12°C - +14°C.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДЕССЕРТАЦИИ:

1. Мовсесян, Р.Р. Дополнительный противоишемический эффект карнозина и его производных в кардиоплегическом растворе / Р.Р. Мовсесян, С.А. Алиханов, Э.Д. Нисневич и др. // Бюллетень НЦ ССХ им. А.Н. Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания». – 2008. – Том 9. – №1. – С. 98.
2. Мовсесян, Р.Р. Кардиопротекторный эффект гистидинсодержащих дипептидов при фармакохолодовой кардиоплегии / Р.Р. Мовсесян, С.А. Алиханов, Э.Д. Нисневич и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2008. – Том 145. – №3. – С. 291.
3. Алиханов, С.А. Оценка степени повреждения миокарда гистохимическим методом / С.А. Алиханов, Т.В. Артюхина, Р.А. Серов и др. // Бюллетень НЦ ССХ им. А.Н. Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания». – 2007. – Том 8. – №6. – С.208.
4. Алиханов, С.А. Экспериментальная оценка влияния на миокард кардиоплегического раствора №3 НЦ ССХ им. А.Н. Бакулева РАМН, кустодиола, и калиевого раствора на основе N-ацетилкарнозина, карнозина, и L-гистидина (ACH) в условиях длительной ишемии / С.А. Алиханов, Л.А. Бокерия, Р.Р. Мовсесян и др. // Бюллетень НЦ ССХ им. А.Н. Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания» - 2007. – Том 8. – №6. – С. 209.

5. Алиханов, С.А. Противоишемический эффект гистидиновых дипептидов при фармакохолодовой кардиоплегии на модели изолированного сердца крысы / С.А. Алиханов // Бюллетень НЦ ССХ им. А.Н. Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания». – 2008. – Том 9. – №3. – С. 118.
6. Бокерия, Л.А. Сравнительная оценка ацетилкарнозина и бикарбоната натрия в калиевом кардиоплегическом растворе (КПР) в условиях длительной ишемии / Л.А. Бокерия, Р.Р. Мовсесян, А.А. Болдырев* и др. // Бюллетень НЦ ССХ им. А.Н. Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания». – 2007. – Том 8. – №3. – С. 120.
7. Бокерия, Л.А. Изучение параметров работы сердца на модифицированной модели изолированного сердца крысы до и после кардиоплегии / Л.А. Бокерия, Р.Р. Мовсесян, В.Т. Костава и др. // Бюллетень НЦ ССХ им. А.Н. Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания». – 2008. – Том 9. – №6. – С. 221.