

УДК 577.3

ВЛИЯНИЕ КУСТОДИОЛА НА СОХРАННОСТЬ ИЗОЛИРОВАННОГО СЕРДЦА КРЫСЫ ПРИ ГАЗОВОЙ ГИПОТЕРМИЧЕСКОЙ КОНСЕРВАЦИИ ПОД ДАВЛЕНИЕМ СМЕСИ МОНООКСИДА УГЛЕРОДА И КИСЛОРОДА

© 2022 г. А.Е. Гурин*,#, Е.Л. Гагаринский*, Е.Е. Фесенко (мл.)*

*Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Пушкино Московской области, Институтская ул., 3

#E-mail: gurinae@pbcras.ru

Поступила в редакцию 01.08.2022 г.

После доработки 01.08.2022 г.

Принята к публикации 12.08.2022 г.

Проведена оценка влияния консервирующего раствора «Кустодиол» на сократимость и частоту сердечных сокращений изолированного сердца крысы при пролонгированной гипотермической (+4°C) газовой консервации под давлением 6.5 атм смеси монооксида углерода и кислорода с продолжительностью хранения 6, 12 и 24 ч. Показано, что «Кустодиол», являющийся золотым стандартом хранения сердца в России, не проявляет синергических эффектов при сочетанном использовании с консервирующей газовой смесью. После 12 ч хранения сократимость в группе «Кустодиол/газовая смесь» по показателю давления, развиваемого левым желудочком, снизилась до $34 \pm 9\%$ от показателя интактного контроля, принятого за 100%. В то же время в группе без «Кустодиола» данный показатель оказался достоверно выше, составив $61 \pm 9\%$. При сроках хранения 6 и 24 ч мы не зафиксировали достоверные отличия давления, развиваемого левым желудочком, в обеих группах при уровнях падения сократимости порядка 75% (6 ч) и 30% (24 ч) от контроля. Показана высокая сохранность сердца при консервации органа, не отмытого от крови. Данный факт может найти свое применение при длительной газовой гипотермической консервации с применением кровяной кардиопротекции или протекции с добавлением элементов крови к кристаллоидным растворам.

Ключевые слова: монооксид углерода, кустодиол, консервирующий раствор, газ, орган, хранение, сердце, крыса, консервация, гипотермия.

DOI: 10.31857/S0006302922050192, EDN: JKOUKG

Количество выполняемых трансплантаций сердца в России и мире ограничено в силу таких причин, как дефицит органов из-за строгих условий отбора доноров и малое время хранения трансплантата сердца. Используемый в клинической практике метод сохранения донорских органов – статическая холодовая консервация [1], в основе которого лежит синергическое действие гипотермии (4°C) и протективных консервирующих растворов, имеет ряд недостатков, главным из которых является малый срок хранения, составляющий для сердца всего 4–6 ч. В связи с этим в последнее время получили развитие такие направления исследований, как оптимизация существующих консервирующих растворов, кислородная перфузия и нормотермическая аппа-

ратная перфузия [2–4]. Одним из новых методов, обещающих перспективы серьезной пролонгации предельных сроков хранения донорского сердца, является газовая гипотермическая консервация под давлением газовых смесей на основе монооксида углерода.

Монооксид углерода привычно считается токсичным газом, обладающим высокой аффинностью к гемоглобину, за счет чего блокирует доставку кислорода кровью к тканям организма. Данная молекула относится к группе тканевых газовых мессенджеров и способна легко проникать через мембрану клеток, обладает высокой скоростью диффузии в тканях как при физиологических температурах, так и в условиях гипотермии. Показано, что эндогенный СО играет существенную роль в регуляции сосудистого тонуса, функции тромбоцитов, эндотелиальных клеток и апоптоза [5]. Ранее на биомодели изолированного сердца различных лабораторных животных было показано трех-четырёхкратное продление сроков хране-

Сокращения: ОГП – оксигенированная гипотермическая перфузия; ДРЛЖ – давление, развиваемое левым желудочком; НОРЕ – гипотермическая кислородная перфузия (Hypothermic oxygenated perfusion).

ния трансплантата под действием газовой смеси, состоящей из монооксида углерода и кислорода [6–8], значительно превышающее 4–6 ч, достигаемых в стандартных консервирующих растворах «Кустодиола» или «Виаспана» [9]. В России золотым стандартом в трансплантологической практике является «Кустодиол». Данный раствор обеспечивает приемлемую защиту от ишемических повреждений при погружении трансплантата в раствор при сроках хранения до 4 ч [10].

Как сочетаются использование консервирующего раствора и газовая консервация? Растворы, которые пробуют использовать для перфузии коронарного русла перед непосредственно газовой консервацией, разнятся, включая раствор Кребса–Хенселейта, «Виаспан» и др. [7, 11]. В исследовании, выполненном в нашей лаборатории [8], использовали раствор «Евро-Коллинз». Является ли пролонгация времени хранения органа результатом сочетанного действия монооксида углерода и консервирующего раствора или при хранении органа под избыточным давлением газовой смеси обработка органа консервирующим раствором не требуется? Целью данного исследования стал сравнительный анализ восстановления функциональной активности сердец, прошедших и не прошедших обработку раствором «Кустодиола», основным консервирующим агентом, применяемым в России, после газовой гипотермической консервации под избыточным давлением газовой смеси, состоящей из монооксида углерода и кислорода.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на половозрелых самцах крыс линии Вистар массой 230 ± 25 г ($n = 36$).

Экспериментальную газовую смесь готовили, как описано в методике [8]. После наркотизации крысы смесью, состоящей из 80 мкл препарата «Золетил 100» (Valdepharm, Франция) и 20 мкл препарата «Ксила» (Interchemie Werken "De Adelaar" B.V., Нидерланды), животное фиксировали на столике и проводили продольную срединную лапаротомию. Далее в нижнюю полую вену вводили раствор гепарина (ООО «Славянская аптека», Россия) объемом 1 мл из расчета 50 МЕ/мл. Спустя 5 мин проводили продольную срединную стернотомию и выделяли сердце с частью аорты длиной не менее 1 см. В рамках исследования был проведен анализ следующих групп:

I. Группа «Контроль» (3 крысы) – нативное сердце, не подвергавшееся хранению.

II. Группа «Кустодиол» (9 крысы) – хранение в стандартном консервирующем растворе «Кустодиол» (Dr. F.KOHLER CHEMIE GmbH, Герма-

ния) при температуре 4°C. Время хранения – 6, 12 и 24 часа.

III. Группа «Кустодиол+СО» (12 крысы) – хранение под давлением газовой смеси 6.5 атм, состоящей из СО и О₂ в соотношении 1 : 1 при 4°C после обработки раствором «Кустодиола». Время хранения – 6, 6 (ОГП, см. ниже), 12 и 24 ч.

IV. Группа «Кровь+СО» (12 крысы) – хранение под давлением газовой смеси 1.5 атм, состоящей из СО и О₂ в соотношении 1 : 1 при 4°C. Время хранения – 6, 6 (ОГП), 12 и 24 ч.

Для групп: II и III перед консервацией проводили остановку сердца при помощи охлажденного (4°C) раствора «Кустодиола». В аорту вводили канюлю и фиксировали ее лигатурой. Далее сердце промывали охлажденным консервирующим раствором в течение 5 мин на установке для перфузии по Лангендорфу собственного изготовления с подключенным термостатом MiniStat 230 (Huber, Германия). По достижении состояния кардиopleгии сердце снимали с канюли и помещали в камеру для консервации. В группе IV остановку сердца и отмывку его от крови не проводили, сразу после выделения орган помещали в камеру для консервации.

Камеру на основе химического реактора Vivor (Premex, Швейцария) (материал – сталь) [8] предварительно охлаждали до температуры 4°C. С целью поддержания влажности в камере во время консервации на дно наливали дистиллированную воду до уровня в 1 см. После помещения сердца в камеру проводили продувку последней экспериментальной газовой смесью с целью вытеснения воздуха. Далее плотно закрывали камеру и нагнетали газовую смесь до достижения требуемого избыточного давления. Камеру помещали в емкость, наполненную водой (4°C) для стабилизации температуры и убирали на хранение в холодильник (4°C). После хранения камеру извлекали из холодильника и проводили дегазацию в течение 15 мин, плавно в ручном режиме сбрасывая давление до атмосферного. Все работы с газом выполняли под вытяжкой.

Сердце крысы после консервации подключали к стенду isolated HEART-SR (Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH, Германия). Перфузию осуществляли оксигенированным раствором Тироде при температуре 37°C и давлении 80 мм рт. ст. В левый желудочек вводили латексный баллон собственного изготовления объемом 0.5 мл, подключенный к датчику для регистрации развиваемого давления и частоты сердечных сокращений. После 30-минутного периода стабилизации проводили снятие экспериментальных данных при помощи программного обеспечения isolated HEART. Исследуемые параметры регистрировали в интервале с тридцатой по сороковую минуты работы сердца на стенде. В данном

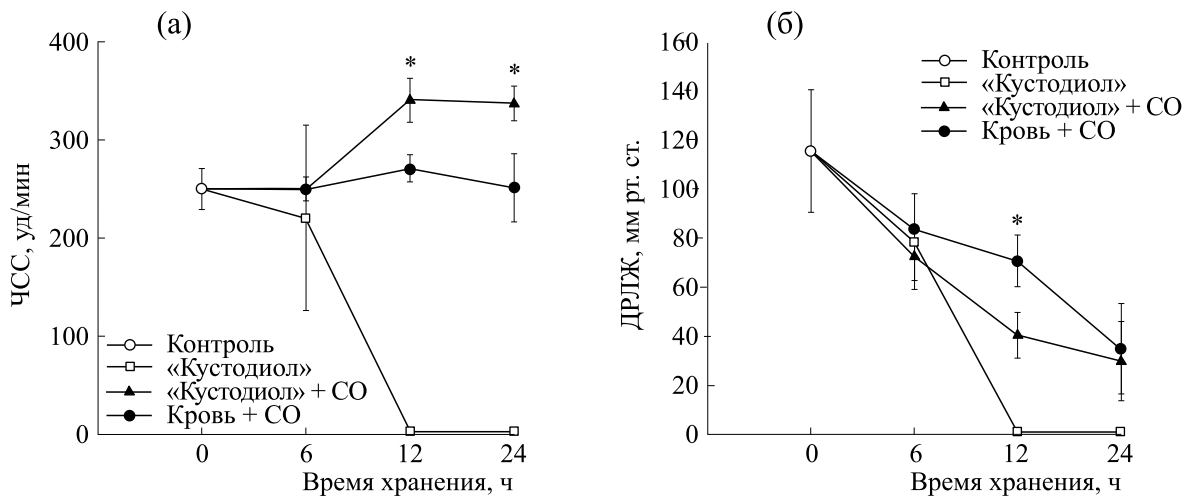


Рис. 1. Анализ сохранности изолированного сердца крысы после 6-, 12- и 24-часовой консервации при 4°C в группах: I «Контроль» ($n = 3$) – сердце, не подвергнутое процедуре консервации; II «Кустодиол» ($n = 9$) – хранение в консервирующем растворе «Кустодиол»; III «Кустодиол + CO» ($n = 9$) – хранение под давлением 6.5 атм газовой смеси CO/O_2 (1 : 1), после обработки органа консервирующим раствором «Кустодиол»; IV «Кровь+CO» ($n = 9$) – хранение под давлением 6.5 атм газовой смеси CO/O_2 (1 : 1). (а) – Частота сердечных сокращений, (б) – давление в левом желудочке. Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение, статистическую значимость различий оценивали с помощью U -критерия Манна–Уитни (* – $p < 0.01$), звездочки показывают достоверность различий экспериментальных данных между группами «Кустодиол+CO» и «Кровь+CO» на одинаковых временных интервалах.

временном промежутке отбирали 10 точек с диастолическим давлением в интервале от 5 до 10 мм рт. ст.

Для групп III «Кустодиол+CO», время хранения 6 часов и IV «Кровь+CO», время хранения 6 часов были проведены дополнительные эксперименты (6 крыс). После подключения сердца к стенду был добавлен период оксигенированной гипотермической перфузии (ОГП) раствором Тироде. Начальная температура раствора составляла 10°C, спустя 5 мин перфузии осуществляли плавный нагрев раствора до 37°C в течение 15 мин. После нагрева раствора и сердца до нужной температуры выполняли описанные ранее манипуляции.

Анализ данных проводили с помощью программного обеспечения SigmaPlot 12.5 (Systat Software Inc, США); данные выражали в виде среднего значения \pm стандартное отклонение. Значимость различий определяли с использованием U -критерия Манна–Уитни. Значения с $p < 0.05$ считали статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценка функциональной активности изолированного сердца крысы после 6–24 часов газовой гипотермической консервации. Показатели частоты сердечных сокращений в группе II «Кустодиол» регистрировали только после 6 ч гипотермического хранения. Они составили 220 ± 99 уд/мин (рис. 1а) при уровне нативного контроля 250 ± 21 уд/мин

(группа I «Контроль»). При 12-часовом и 24-часовом хранении сердце в группе «Кустодиол» не восстановило функциональную активность. В группе III «Кустодиол+CO» после 6 ч консервации показатель частоты сердечных сокращений составил 250 ± 12 уд/мин, после 12 и 24 ч консервации – 340 ± 22 и 365 ± 51 уд/мин соответственно. В группе IV «Кровь+CO» показатели достоверно не отличались от нативного контроля на всех временных интервалах гипотермической консервации, составив 249 , 272 ± 15 , 244 ± 54 уд/мин для 6, 12 и 24 ч хранения органа.

Анализ групп II «Кустодиол», III «Кустодиол+CO» и IV «Кровь+CO» со сроками хранения 6, 12 и 24 ч при температуре 4°C показал, что с увеличением времени консервации наблюдается постепенное снижение силы сокращения левого желудочка во всех представленных группах (рис. 1б). Так, спустя 6 ч консервации давление, развиваемое левым желудочком (ДРЛЖ), снизилось со 116 ± 25 мм рт. ст. (группа I «Контроль») до 79 ± 20 и 73 ± 10 мм рт. ст. для групп II «Кустодиол» и III «Кустодиол+CO». В группе IV «Кровь+CO» восстановление функциональной активности наблюдали только в одном эксперименте из трех; при этом среднее значение ДРЛЖ составило 84 мм рт. ст. После 12 ч хранения в группе II «Кустодиол» не регистрировали восстановления функциональной активности. В группах III «Кустодиол+CO» и IV «Кровь+CO» показатель ДРЛЖ составил 40 ± 10 и 71 ± 11 мм рт. ст. соответственно. Спустя 24 ч хранения показатели ДРЛЖ данных

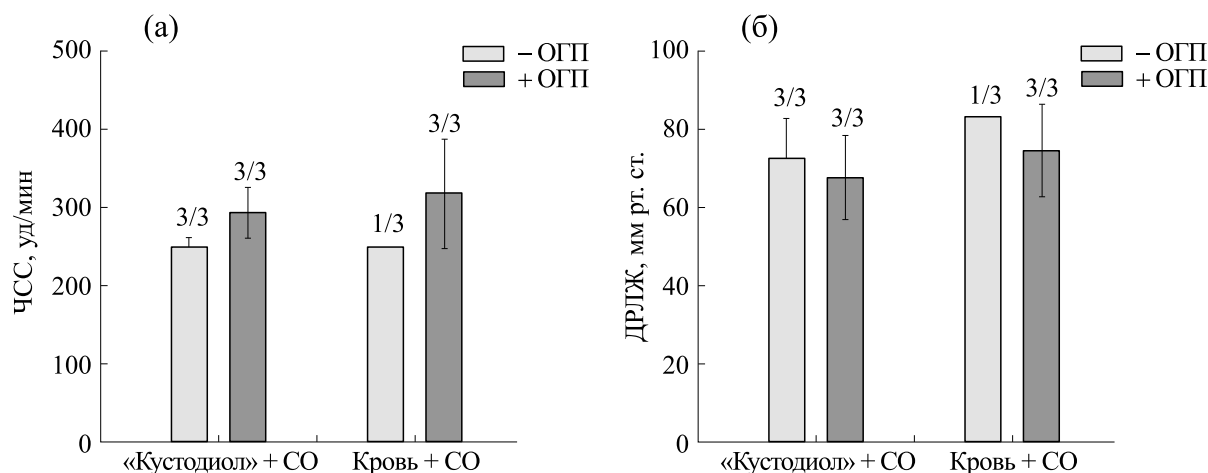


Рис. 2. Анализ сохранности изолированного сердца крысы после 6-часовой консервации при 4°C в группах: III «Кустодиол + СО» ($n = 3$) – хранение под давлением 6.5 атм газовой смеси СО/О₂ (1 : 1), после обработки органа консервирующим раствором «Кустодиол»; IV «Кровь + СО» ($n = 3$) – хранение под давлением 6.5 атм газовой смеси СО/О₂ (1 : 1); «-ОГП» – сердца, перфузированные по стандартному протоколу; «+ОГП» – сердца, подвергнутые оксигенированной гипотермической перфузии. (а) – Частота сердечных сокращений, (б) – давление в левом желудочке. Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение.

групп снизились до 31 ± 9 и 35 ± 19 мм рт. ст. соответственно.

Оценка влияния оксигенированной гипотермической перфузии на восстановление функциональной активности изолированного сердца крысы после 6-часовой газовой гипотермической консервации. С целью повышения выживаемости в группе «Кровь+СО» на временном интервале 6 ч было принято решение добавить в процесс восстановления сердца стадию короткой оксигенированной гипотермической перфузии. После введения ОГП все сердца экспериментальных групп III «Кустодиол+СО» и IV «Кровь+СО» восстановили функциональную активность и не имели достоверных отличий по показателям частоты сердечных сокращений и ДРЛЖ. Частота сердечных сокращений составила 293 ± 33 уд/мин в группе «Кустодиол+СО» и 318 ± 70 уд/мин в группе «Кровь+СО». Давление, развиваемое левым желудочком, составило при этом 68 ± 11 мм рт. ст. в группе «Кустодиол+СО» и 75 ± 12 мм рт. ст. в группе «Кровь+СО» соответственно (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

В данном исследовании нами была продемонстрирована важность тщательного подбора консервирующего кардиоплегического раствора при газовой гипотермической консервации сердца, на примере использования раствора «Кустодиола». «Кустодиол», являющийся наряду с «Виаспаном», одним из двух наиболее популярных растворов хранения донорских органов в мире [9] и основным консервирующим раствором в России [12], продемонстрировал относительно низкую эффек-

тивность при консервации сердца в газовой смеси СО+О₂. После 12 ч хранения показатель ДРЛЖ в группе III «Кустодиол+СО» снизился до $34 \pm 9\%$ от показателя интактного контроля, принятого за 100%. В то же время в группе IV «Кровь+СО» данный показатель оказался достоверно выше, составив $61 \pm 9\%$. При сроке хранения 24 ч мы не зафиксировали достоверных отличий ДРЛЖ в обеих группах. При этом частота сердечных сокращений в группе III «Кустодиол+СО» возросла после 12 ч хранения в среднем на $36 \pm 9\%$ от контроля, что может быть связано с компенсацией потери сократимости левого желудочка. Полученные результаты могут быть объяснены в аспекте известных и предполагаемых механизмов действия использованных в процессе консервации компонентов: газовой смеси и раствора «Кустодиола».

Монооксид углерода входит в группу тканевых газовых мессенджеров, обладает высокой реакционной способностью, играет важную роль в регуляции физиологических и патологических реакций, а также повышает эффективность консервации органов теплокровных животных, значимо пролонгируя срок гипотермического хранения. [7, 8, 13, 14]. К основным эффектам воздействия монооксида углерода на ткани относят сосудорасширяющие (регуляция тонуса гладкой мускулатуры), противовоспалительные, (регуляция экспрессии и высвобождения различных цитокинов) и антиапоптотические (ингибирование клеточного пути апоптоза в митохондриях при определенных условиях) [15]. О втором компоненте газовой смеси – кислороде известно, что он оказывает положительное влияние на сохранность

органа при консервации. Так, присутствие кислорода в растворе эсмолола при многодозной кристаллоидной кардиоплегии обеспечивает полную защиту миокарда в течении 90 мин при 37°C и превосходит классический способ консервации раствором St. Thomas. [16]. В работе [17] было показано, что многодозная кислородная холоднокровная кардиоплегия превосходит однократную дозу раствора «Кустодиола» в отношении сохранения систолической функции левого желудочка после 60-минутного пережатия аорты на модели свиньи. Ранее в работе [18] мы предположили, что протективное действие смеси газов при консервации обусловлено сочетанным действием на клеточное дыхание, которое приводит к поддержанию определенного предположительно сниженного, но стабильного уровня аэробного метаболизма в процессе консервации. Поддержание последнего не дает клеткам переключиться на анаэробный тип дыхания, сопровождающийся накоплением молочной кислоты, снижением продукции АТФ и далее каскадом гипоксических нарушений. Другим важным механизмом протективного действия газовой смеси может быть защита от апоптоза, т.к. апоптотическая гибель клеток трансплантата до и после реперфузии, с активацией инициаторных и эффекторных каспаз, оказывает значимую роль в инициировании воспаления и последующем некротическом повреждении тканей [19]. Монооксид углерода взаимодействует в клетке со множеством содержащих в своем составе переходные металлы (Fe, Cu) структур, основным из которых является гем [20]. Воздействуя на митохондрии, монооксид углерода путем снижения проницаемости мембраны, ингибирования высвобождения цитохрома C, подавления активации каспазы-3 и каспазы-9 предотвращает апоптоз при ишемии—реперфузии [21–24].

Действие раствора «Кустодиола» направлено на сохранение ионного баланса в условиях остановки работы Na^+/K^+ -насоса, вызванной истощением внутриклеточной АТФ, предотвращение клеточного отека за счет высокой осмолярности, снижение в целом энергетических потребностей ткани миокарда, что поддерживает восстановление сократительной функции сердца после имплантации и реперфузии [25]. По-видимому, описанные свойства в значительной мере теряют смысл в условиях поддержания стабильного уровня аэробного метаболизма в тканях. В то же время, часть компонентов, входящих в состав раствора, может стать источником цитотоксичности. Так, показано, что механизм токсичности гистидина, усиливающего осмотическую компоненту раствора «Кустодиола», обусловлен проникновением его в клетки и образования окислительно-восстановительных комплексов с клеточным хелатируемым железом с последующей

генерацией активных форм кислорода [26]. Недавно был описан новый тип токсического действия, связанный с действием хлоридов и Cl-активированной индукцией апоптоза [27].

В нашей работе в группе «Кровь+СО» при сроке хранения органа, равном 6 ч, наблюдалась быстрая остановка сердца в двух экспериментах из трех после подключения к перфузионному стенду. Было высказано предположение о необходимости удаления накопленных метаболитов и возможном ишемически-реперфузионном повреждении органа за счет более высокого уровня активности митохондриального комплекса при малом времени хранения, а также повышения уровня сукцината при тепловой ишемии до момента консервации. Для снижения возможных повреждающих факторов реперфузии мы использовали протокол медленного отогрева с перфузией холодным оксигенированным раствором в течении 5 мин при 10°C и последующем отогреве в течении 15 мин до 37°C. Все сердца восстановили функциональную активность левого желудочка; полученные данные достоверно не отличались в группах «Кровь+СО» и «Кустодиол+СО», составив при этом $64 \pm 11\%$ и $58 \pm 10\%$ ДРЛЖ от начального значения. Описанный выше подход гипотермической кислородной перфузии (Normothermic oxygenated perfusion –НОРЕ) в последнее время активно исследуется с целью улучшения состояния ишемизированных органов и их восстановления до момента трансплантации реципиенту. В различных исследованиях продемонстрировано положительное воздействие НОРЕ на уменьшение окислительного стресса, улучшение функции органов и снижение гибели клеток [28]. Применение НОРЕ в течении 3 ч способствует обращению вспять метаболического истощения печени крыс, вызванного гипотермическим хранением [28]. В исследовании [28] было показано, что одночасовое лечение НОРЕ после 60-минутной тепловой ишемии *in situ* с последующим 6-часовым хранением в холоде привело к улучшению выживаемости печени свиней после трансплантации. В результате использования данного подхода не наблюдалось ни одного случая первичной нефункциональности, определяемой тяжелой коагулопатией, отсутствием функции печени и тяжелым ацидозом [29]. В работе на крысиных сердцах 30-минутной НОРЕ было достаточно для восстановления клеточных уровней АТФ, а также для уменьшения повреждения клеток и сердечной дисфункции во время нормотермической перфузии сердец после 20-минутной тепловой ишемии.

В нашем исследовании показано, что «Кустодиол», являющийся золотым стандартом хранения сердца в России, не проявляет синергических эффектов при сочетанном использовании с консервирующей газовой смесью. При этом показана

высокая сохранность сердца при консервации органа, не отмытого от крови. Данный факт может найти свое применение при длительной газовой гипотермической консервации с применением кровяной кардиоплегии или плегии с добавлением элементов крови к кристаллоидным растворам. Показано, что данные варианты плегии при малых временах хранения в условиях стандартной консервации обеспечивают более высокую защиту миокарда по сравнению с кристаллоидными растворами [30, 31]. Использование кровяной кардиоплегии и газовой смеси CO+O₂ может стать перспективным вариантом для улучшения выживаемости трансплантата и сохранения его функции при временах хранения от 6–24 ч. Другим возможным направлением применения газовой консервации с использованием крови может стать сохранение травматически ампутированных конечностей в результате раздалвления и отрыва [32]. При данном типе повреждения не всегда возможно оперативно обнаружить главную артерию для введения раствора с целью сохранения ткани. Дальнейшее исследование и адаптация данного подхода для травматически потерянных конечностей может дать дополнительное время, необходимое для транспортировки в медицинское учреждения с целью реплантации.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 20-34-90132\20.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты проводили в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите животных 2010/63/EU. Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. С. А. Альсов, А. Ф. Фомичев, Д. В. Доронин и др., Вестн. трансплантологии и искусственных органов, **20** (1), 110 (2018).
2. С. М. Минасян, М. М. Галагудза, Ю. В. Дмитриев и др., Регионарное кровообращение и микроциркуляция, **13** (3), 4 (2014).
3. О. Н. Резник, А. Е. Скворцов, Я. Г. Мойсюк, Альманах клинич. медицины, **48** (3), 193 (2020).
4. T. M. Suszynski, M. D. Rizzari, W. E. Scott, et al., J. Cardiothorac. Surg., **8**, 105 (2013).
5. Е. Г. Старикова, Дис. ... д-ра мед. наук (Сибирский государственный медицинский университет, 2014).
6. A. Nakao, J. S. Neto, S. Kanno, et al., Am. J. Transplant., **5** (2), 282 (2005).
7. N. Hatayama, M. Inubushi, M. Naito, et al., Sci. Rep., **6**, 32120 (2016).
8. Е. Е. Фесенко, Е. Л. Гагаринский, А. С. Аверин и др., Биофизика, **65** (4), 780 (2020).
9. С. М. Минасян, М. М. Галагудза, М. С. Васильева и др., Росс. физиол. журн. им. И. М. Сеченова, **9** (4), 353 (2010).
10. D. M. Rudd and G. P. Dobson, J. Thorac. Cardiovasc. Surg., **142** (6), 1552 (2011).
11. C. Suzuki, N. Hatayama, T. Ogawa et al., Int. J. Mol. Sci., **21** (22), 8858 (2020).
12. <https://www.rlsnet.ru/regdoc/kustodiol-p-n01465601-52408>.
13. A. Nakao and A. M. Choi, N. Murase, J. Cell. Mol. Med., **10** (3), 650 (2006).
14. W. Adach and B. Olas, Future Med. Chem., **11** (1), 61 (2019).
15. H. H. Kim and S. Choi, Int. J. Mol. Sci., **19** (8), 2381 (2018).
16. J. D. McCully, J. Thorac. Cardiovasc. Surg., **124** (2), 219 (2002).
17. T. Fannelop, G. O. Dahle, P. R. Salminen, et al., Ann. Thorac. Surg., **87** (4), 1205 (2009).
18. А. Е. Гурин, Е. Л. Гагаринский, Е. Е. Фесенко (мл.), Биофизика, **66** (5), 964, (2021).
19. K. S. Ozaki, S. Kimura, N. Murase, Transplantation Rev., **26** (2), 125 (2012).
20. D. Němeček, M. Dvořáková, and M. Sedmíková, Int. J. Biochem. Mol. Biol., **8** (1), 1 (2017).
21. C. S. Queiroga, A. S. Almeida, C. Martel, et al., J. Biol. Chem., **285** (22), 17077 (2010).
22. X. Wang, Y. Wang, H. P. Kim, et al., J. Biol. Chem., **282** (3), 1718 (2007).
23. M. Kondo-Nakamura, K. Shintani-Ishida, K. Uemura, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. **393** (3), 449 (2010).
24. H. B. Barner, Ann. Thorac. Surg., **52** (6), 1354 (1991).
25. T. Radovits, L. Lin, J. Zotkina, et al., J. Heart Lung Transplantation, **27** (2), 208 (2008).
26. U. Rauen, S. Klempt, and H. de Groot, Cell Mol. Life Sci., **64** (2), 192 (2007).
27. S. Loganathan, T. Radovits, K. Hirschberg, et al., J. Thorac. Cardiovasc. Surg., **139** (4), 1048 (2010).
28. P. Dutkowski, K. Furrer, Y. Tian, et al., Ann. Surg., **244** (6), 968 (2006).
29. O. de Rougemont, S. Breitenstein, B. Leskosek, et al., Ann. Surg., **250** (5), 674 (2009).
30. S. M. Minasian, M. M. Galagudza, Y. V. Dmitriev, et al., Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg., **20** (4), 510 (2015).
31. M. Sobieraj, M. Kilanowska, P. Ładziński, et al., Kardiochir. Torakochirurgia Pol., **15** (2), 86 (2018).
32. S. B. Wijayarathna, H. J. Suraweera, M. D. Lamawansa, et al., Injury, **39** (2), 203 (2008).

Influence of Custodiol on Preservation of the Isolated Rat Heart during Hypothermic Storage in a High-Pressure Gaseous Mixture of Carbon Monoxide and Oxygen

A.E. Gurin*, E.L. Gagarinsky*, and E.E. Fesenko (Jr.)*

**Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

The effects of Custodiol, a preservation solution, on heart rate and contractility in the isolated rat heart were evaluated following a prolonged hypothermic (+4°C) preservation in a 6.5 atm gas mixture of carbon monoxide and oxygen. The isolated rat hearts were preserved under 6.5 atm for 6, 12 and 24 hours. It has been shown that Custodiol, which in Russia is the gold standard for heart preservation, does not exert synergistic effects when used in combination with a protective gas mixture. In the rat hearts after being preserved with the use of Custodiol solution under high pressure of gas mixture for 12 hours, left ventricular contractility fell to $34 \pm 9\%$ of the intact control, taken as 100%. At the same time, in the hearts preserved without the use of Custodiol, this value was significantly higher, $61 \pm 9\%$. After 6 and 24 hours of preservation, there were no significant differences in pressure generated by the left ventricle between rat hearts preserved with and without the preservation solution: contractility reduced by about 75% (6 hours) and 30% (24 hours) as compared to control. It was shown that the heart was preserved better if the blood was not washed out. This fact can find its application in long-term gas hypothermic preservation with the use of blood cardioplegia or plegia with addition of blood elements to crystalloid solutions.

Keywords: carbon monoxide, Custodiol, preservation solution, gas, organ, preservation, heart, rat, conservation, hypothermia