

兔未熟心に対する Histidine-Triptophan-Ketoglutarate (HTK) 液による single dose 法を用いた心筋保護効果の検討

(平成 11 年 12 月 10 日受付)

(平成 12 年 10 月 11 日受理)

札幌医科大学外科学第二講座

(主任 安倍十三夫 教授)

高木 伸之 中島 慎治 光島 隆二 安倍十三夫

key words : HTK 液, 兔未熟心, 心筋内 pH, 高エネルギーリン酸化合物, 心機能

要 旨

Histidine-Triptophan-Ketoglutarate (HTK) 液は, Histidine の強力な緩衝作用に基づく心筋保護液である。今回, 我々は 2~4 生日の摘出兔未熟心を用い, 2 時間, 15 度の global ischemia を作成した。単純冷却, ST. Thomas 液を対照とし, 一定量の HTK 液を 2 分及び 7 分間で灌流する single dose 法を採用, 心筋内 pH, 高エネルギーリン酸化合物, 心機能を測定し, 心筋保護効果を検討した。HTK 液は 2, 7 分の両群とも重炭酸系と比較し, 虚血中, 良好に心筋内 pH を維持したが, 再灌流直前のリン酸化合物は全ての群で良好に維持され, pH との相関はなかった。再灌流後は, HTK 液の 7 分灌流群で心機能, リン酸化合物とも良好に温存されたが, 2 分灌流群で, エネルギー産生系の障害が示唆された。以上の結果から, 十分な HTK 液の心筋保護効果を得るには, 成熟心と同様に長時間の灌流が必要と考えられた。

1 緒 言

Histidine-Triptophan-Ketoglutarate (HTK) 液は, Histidine による強力な緩衝作用に基づく心筋保護液である¹⁾。成人の開心術では, 初回の導入のみで, 2~3 時間の良好な心筋保護効果が維持され臨床に使用される²⁾。しかし, 新生児期の開心術の使用に関しては実験報告もなく, 臨床応用の報告も少ない³⁾。本研究では, 新生仔家兔の未熟心筋を用いて, HTK 液の single dose 法による心筋保護効果について, 現在, 臨床応用されている St. Thomas 液との比較を行った。さらに, 投与時間による心筋保護効果の違いが, 未熟心筋においても認められるか否かを検討した。

2 実験方法

2・1 実験動物

実験動物として生後 2~4 生日の新生仔家兔 (New

別刷請求先: (〒060 8543) 札幌市中央区南 1 条西 16 丁目

札幌医科大学医学部外科学第二講座

高木 伸之

Zealand White Rabbit) を使用した。

2・2 実験群

対照として, St. Thomas 群 (ST 群) (Table 1) 及び, 単純冷却群 (C 群) を用いた。投与量は, 全ての群で同一量 (10 ml/100 g BW) の single dose 法とし, 投与時間は, HTK 液は 2 分 (HTK-2 群) 及び 7 分 (HTK-7 群), ST 群は 2 分とした。

2・3 プロトコール

エーテル麻酔にて開腹し, ヘパリン 10 mg/kg を投与後, 心拍動下に心臓を摘出。ただちに, 4 の生理食塩水に浸漬し心停止を得た。上行大動脈よりカニューラを挿入し, 95% O₂+5% CO₂ の混合ガスで酸素化した modified KHB 液 (Table 1) を灌流液とし, 38℃, 50 cm の静水圧で冠灌流 (Langendorff mode) を開始した。さらに, 左心耳より working mode 用のカニューラを挿入した。摘出心は 15 分間の Langendorff mode 後, 前負荷 12 cm, 後負荷 50 cm で 15 分間の working mode 灌流を行った。心筋保護液投与後, 15, 120 分間の global ischemia とした。再灌流後は 15 分間の

Table 1 Composition of HTK solution, ST. Thomas Hospital solution and KHB solution

HTK solution	
NaCl	15.0 mmol/l
KCl	9.0 mmol/l
α-ketoglutarate	1.0 mmol/l
MgCl ₂ · 6H ₂ O	4.0 mmol/l
Histidine-HCl · H ₂ O	18.0 mmol/l
Histidine	180.0 mmol/l
Tryptophan	2.0 mmol/l
Mannitol	30.0 mmol/l
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.015 mmol/l
St. Thomas Hospital solution	
NaCl	110.0 mmol/l
NaHCO ₃	10.0 mmol/l
KCl	16.0 mmol/l
MgSO ₄ · 6H ₂ O	16.0 mmol/l
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1.20 mmol/l
KHB solution	
NaCl	118.0 mmol/l
NaHCO ₃	25.0 mmol/l
KCl	4.6 mmol/l
KH ₂ PO ₄	1.2 mmol/l
MgSO ₄	1.4 mmol/l
CaCl ₂	2.8 mmol/l
EDTA-2Na	0.5 mmol/l
Glucose	11.1 mmol/l

Langendorff mode 灌流及び 15 分間の working mode 灌流を行った。

2・4 測定項目

2・4・1 HTK 液注入時の冠灌流液組成

HTK-2 群の 2 分後及び HTK-7 群の 2, 7 分後の冠灌流液を冠静脈洞にチューブを挿入して採取し, K⁺ イオン, CO₂ 分圧を測定し, HTK 液の組成と比較した。

2・4・2 心筋内 pH

心筋保護液注入直後から虚血中の心筋内 pH を測定した。測定装置は, Schott 社製 CG 836 型マイクロプロセッサ pH メーターを使用, pH 電極は左心室の冠動脈を避けた部位に挿入固定した。測定は心筋保護液注入直後, 10 分, 20 分, 30 分, 60 分, 90 分, 120 分で行った。

2・4・3 高エネルギーリン酸化合物

高エネルギーリン酸化合物として ATP, ADP, AMP 含量を測定した。また, これらの測定項目より心筋内エネルギー量の指標である Energy Charge⁴⁾ (EC) を次式にて算出した。

$$EC = (ATP + 0.5 ADP) / (ATP + ADP + AMP)$$

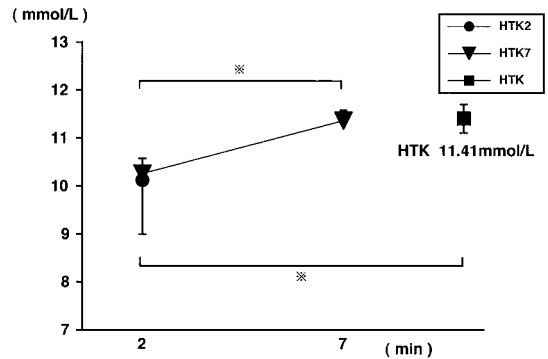


Fig. 1 Mean values (± SD) of potassium concentration in coronary return at 2 min in HTK-2 and 2, 7 min in HTK-7 in contrast to HTK solution during cardioplegic infusion . ; p<0.01.

試料の作成及び測定方法は, 川島ら⁵⁾の方法に準じて行い, 測定値は乾燥重量あたりの含量 (μmol/g dry weight) で示した。測定時点は control を虚血前値とし, 再灌流直前と再灌流後 working mode 終了時点の 3 回とした。

2・4・4 心機能

心機能の測定は, 虚血前後で 15 分間の working mode 灌流後に行った。心拍数 (beat/min), 収縮期血圧 (mmHg), 前方拍出量 (ml/min), 冠灌流量 (ml/min) を計測し, これらの測定項目より, 心機能の指標として分時心仕事量 (Joule/min) を次式にて算出した。

$$\text{分時心仕事量} = \text{収縮期圧} \times (\text{前方拍出量} + \text{冠還流量}) \times 1.33 \times 10^{-4}$$

さらに回路及び冠灌流液の酸素分圧より, 分時酸素消費量 (Joule/min) を次式にて算出した。

$$\text{分時酸素消費量} = 0.0031 \times (\text{PaO}_2 - \text{PcorO}_2) \times \text{冠還流量} \times 20$$

PaO₂: 灌流液酸素分圧 PcorO₂: 冠灌流液酸素分圧。また, 心機能と独立した冠灌流量及び冠血管抵抗の比較のために Langendorff mode 灌流での冠灌流量 (ml/min) を測定し, 冠血管抵抗 (mmHg/ml) を次式にて算出した。

$$\text{冠血管抵抗} = \text{Perfusion pressure} / \text{冠灌流量}$$

尚, 全ての数値は 100 g 体重に換算した。

2・5 統計処理法

測定値は, 平均値 ± 標準偏差で示した。統計学的比較は 1 元配置分散分析にて有意差検定を行い, 有意差がある場合には Fisher の PLSD 法を用いた。また, 連

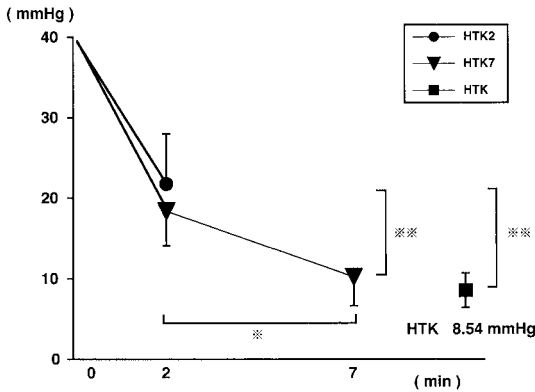


Fig. 2 Mean values (± SD) of CO₂ partial pressure in coronary return at 2 min in HTK-2 and 2, 7 min in HTK-7 in contrast to HTK solution during cardioplegic infusion. ; p<0.05, ; p<0.01.

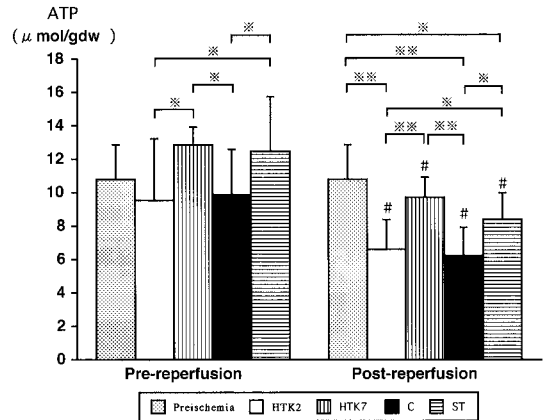


Fig. 4 Mean values (± SD) of ATP content at the end of the ischemia and 30 min after reperfusion, ; p<0.05, ; p<0.01, #; p<0.05 versus the value at the end of the ischemia in the same group.

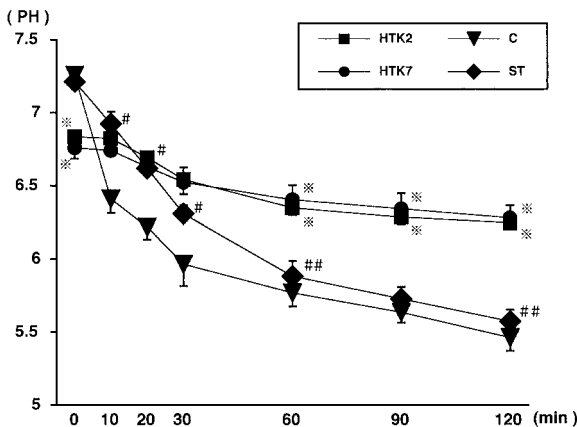


Fig. 3 The time course of intramyocardial pH during ischemic period. Results are expressed as mean ± SD. ; p<0.01 versus C and ST, #; p<0.01 versus C, ##; p<0.05 versus C.

続時系列測定値には、反復測定分散分析を用いた。有意水準はP<0.05とした。また、心機能は虚血前値に対する回復率(%)で示した。

3 実験成績

3・1 体重及び生後日数

各群間の体重及び生後日数に有意差はなかった。

3・2 HTK液の冠灌流液組成の比較

HTK群での冠灌流液の2分後のK⁺濃度(mmol/l)(Fig. 1)は、HTK-2群10.1±1.1, HTK-7群10.3±0.3と両群間に有意差はないが、HTK液のK⁺濃度(11.4

±0.3)と比較して有意に低値であった(HTK-2; p<0.01, HTK-7; p<0.01)。また、CO₂分圧(mmHg)(Fig. 2)も、HTK-2群21.8±6.2, HTK-7群18.4±4.3と2群間に有意差はなく、HTK液のCO₂分圧(8.5±2.1)と比較して有意に高値であった(HTK-2; p<0.01, HTK-7; p<0.01)。HTK-7群の7分後の組成は、K⁺濃度(Fig. 1), CO₂分圧(Fig. 2)ともにHTK液と比較して有意差はなかった。

3・3 虚血中の心筋内pHの変動

心筋保護液投与前の心筋内pHは、HTK-2群7.15±0.07, HTK-7群7.17±0.17, C群7.11±0.14, ST群7.16±0.11で各群で有意差はなかった。心筋保護液注入後の心筋内pH(Fig. 3)は、それぞれ6.84±0.15, 6.76±0.08, 7.26±0.05, 7.21±0.05とHTKの両群がC群及びST群と比較して有意に低値であった(HTK-2 vs C and ST; p<0.01, HTK-7 vs C and ST; p<0.01)。その後の経過では、HTKの両群がC群及びST群と比較し良好に心筋内pHを維持した。

3・4 高エネルギーリン酸化合物

3・4・1 ATP値の変動(Fig. 4)

再灌流前のATP値は、HTK-2群9.54±3.67, HTK-7群12.85±1.06, C群9.88±2.71, ST群12.47±3.27で、HTK-7群, ST群はHTK-2群, C群と比較して有意に温存された。しかし、虚血前値(10.79±2.07)との比較では、全ての群で有意差はなかった。再灌流30分後のATP値は、HTK-2群6.62±1.76, HTK-7群9.71±1.20, C群6.22±1.71, ST群8.39±1.59であり、HTK-7群は

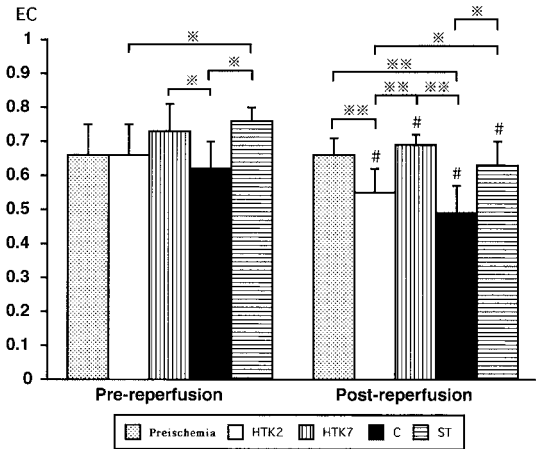


Fig. 5 Mean values (±SD) of Energy charge at the end of the ischemia and 30 min after reperfusion . ; p<0.05 , ; p<0.01 , # ; p<0.05 versus the value at the end of the ischemia in the same group.

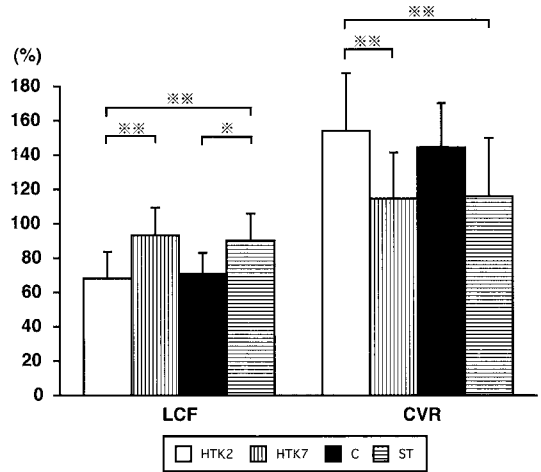


Fig. 7 Mean values (±SD) of percent recovery of coronary flow and coronary vascular resistance from baseline in Langendorff mode . ; p<0.05 . ; p<0.01.

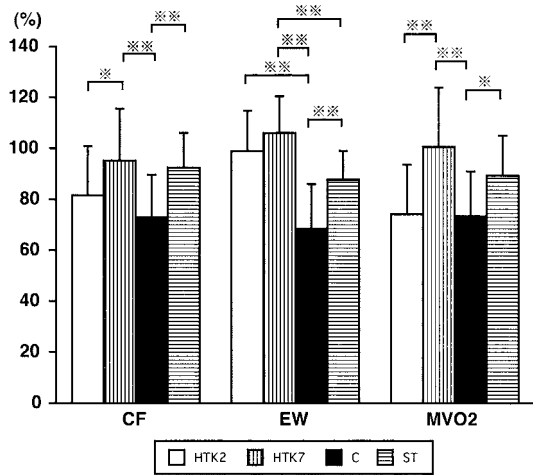


Fig. 6 Mean values (±SD) of percent recovery of coronary flow, external work and oxygen consumption from baseline . ; p<0.05 , ; p<0.01.

HTK-2 群 , C 群と比較して有意に高値であった (HTK-7 vs HTK-2 and C ; p<0.01) . ST 群 も HTK-2 群 , C 群と比較して有意に高値であった (ST vs HTK-2 and C ; p<0.05) . 再灌流前後の比較では , 全ての群で有意に低下した (p<0.05) が , 虚血前値 (10.79 ± 2.07) との比較では , HTK-7 群のみ有意差はなかった .

3・4・2 Energy charge 値の変動 (EC) Fig. 5

再灌流前の EC は , HTK-2 群 0.66 ± 0.09 , HTK-7 群

0.73 ± 0.08 , C 群 0.62 ± 0.08 , ST 群 0.76 ± 0.04 であり , ST 群が HTK-2 群 , C 群と比較し有意に高値を示した (p<0.05) . また , HTK-7 群も C 群と比較し有意に高値を示した (p<0.05) . 虚血前値 (0.66 ± 0.09) との比較では , 全ての群で有意差はなかった . 再灌流後の EC は , HTK-2 群 0.55 ± 0.07 , HTK-7 群 0.69 ± 0.03 , C 群 0.49 ± 0.08 , ST 群 0.63 ± 0.07 であり , HTK-7 群 , ST 群が HTK-2 群 , C 群と比較し有意に高値であった (HTK-7 ; p<0.01 , ST ; p<0.05) . 虚血前後での比較では , 全ての群で有意に低下したが (p<0.05) , 虚血前値 (0.66 ± 0.05) との比較では , HTK-2 - 群と C 群のみが有意に低下した (HTK-2 ; p<0.01 , C ; p<0.01) .

3・5 Working 時の心機能の回復率 (%) Fig. 6

3・5・1 心拍数の変動

HTK-2 群 97.2 ± 6.4 , HTK-7 群 93.7 ± 5.9 , C 群 99.8 ± 8.9 , ST 群 98.6 ± 9.1 であり , 各群間に有意差はなかった .

3・5・2 心仕事量の変動

HTK-2 群 98.9 ± 15.9 , HTK-7 群 106.1 ± 14.4 , C 群 68.4 ± 17.6 , ST 群 87.7 ± 11.3 であった . HTK-7 群は , C 群及び ST 群と比較し有意に回復した (HTK-7 vs KHB and ST ; p<0.01) . HTK-2 群および ST 群は , C 群と比較して有意に回復した (HTK-2 vs C ; p<0.01 , ST vs C ; p<0.01) .

3・5・3 冠灌流量の変動

HTK-2 群 81.6 ± 19.2 , HTK-7 群 95.2 ± 20.4 , C 群 72.9 ± 16.8 , ST 群 92.4 ± 13.7 であり, HTK-7 群は HTK-2 群及び C 群に対して有意に回復した (HTK-7 vs HTK-2; $p < 0.05$, HTK-7 vs C; $p < 0.01$). また, ST 群も C 群と比較して, 有意に回復した ($p < 0.01$).

3・5・4 分時酸素消費量の変動

HTK-2 群 74.2 ± 19.4 , HTK-7 群 100.6 ± 23.3 , C 群 73.4 ± 17.6 , ST 群 89.3 ± 15.7 であり, HTK-7 群は, HTK-2 群及び C 群に対して有意に回復し (HTK-7 vs HTK-2 and C; $p < 0.01$), ST 群も C 群との間に有意差を示した ($p < 0.05$).

3・6 Langendorff 時の冠灌流量と冠血管抵抗 (%) Fig. 7)

冠灌流量の回復率は, HTK-2 群 68.2 ± 15.6 , HTK-7 群 93.3 ± 16.2 , C 群 70.7 ± 12.4 , ST 群 90.2 ± 13.7 であり, HTK-2 群は HTK-7 群及び ST 群と比較して有意に低下した (HTK-2 vs HTK-7 and ST; $p < 0.01$). 冠血管抵抗の増加率は, HTK-2 群 154.1 ± 33.7 , HTK-7 群 114.6 ± 26.9 , C 群 144.5 ± 25.8 , ST 群 116.0 ± 33.9 であり, HTK-2 群は HTK-7 群及び ST 群と比較して有意に上昇した (HTK-2 vs HTK-7 and ST; $p < 0.01$).

4 考 察

4・1 実験動物の選択

今回の実験研究では, 新生児期の開心術を想定し, ヒトの未熟心筋の特性に類似した動物種の選択が重要である. 我々が使用した生後 2~4 日の NWR 兎の心臓は, 他の動物種と比べて比較的その特性が検討され, 未熟心としての心筋保護の実験においても頻用されている. 当教室でも, これまで未熟兎を使用した実験⁵⁾を行っており, 他の報告との比較も考慮し, 生後 2~4 日 NWR 兎心臓を未熟心として採用した.

4・2 HTK 液の投与法

HTK 液は, 心筋保護効果を最大限に発揮するために, 数分から 10 数分間の投与時間を必要とする. Preusse ら⁷⁾の報告によれば犬成熟心で $200 \text{ ml}/100 \text{ g wet weight}/\text{min}$ の 8 分間定流量注入により, 冠静脈灌流液の組成が常定になるまで, K^+ は 2 分以内, Na^+ は 5 分, CO_2 分圧は 7 分を要したと報告している. 一方, 未熟心に対するの詳細な検討は見られない. 今回の実験結果では, K^+ 及び CO_2 分圧は, 2 分では流量に関係なく十分な平衡には達せず, 7 分の灌流で初めて HTK 液と比較して有意差がなくなった. 以上の実験結果は, 未熟心においても短時間の灌流では HTK 液組成によ

る細胞外液の平衡を達成できないことを示すものである.

4・3 虚血中の心筋内 pH 及び高エネルギーリン酸化合物

成熟心での Histidine 含有液を使用した心筋内 pH の報告は散見されるが^{8,9)}, single dose 法による未熟心を使用した心筋内 pH の報告はない. 今回使用した心筋内 pH の測定は, 細胞外液 pH の測定であり, 細胞内 pH を直接示すものではない. しかし, 虚血中, 心筋内 pH の低下により細胞内外のプロトン勾配が減少し, pH が 6.8~7.0 以下では平衡に達すると報告される¹⁰⁾. 我々の実験では, 虚血中の心筋内 pH は, 全てこの範囲内にあり, 心筋内 pH は細胞内 pH を反映するものと考えた. 心筋保護液注入直後の pH は液自体の pH を反映し, HTK 液の両群は弱酸性であったが, その後は, ST 群, C 群と比較して高い pH を維持した. Preusse ら⁷⁾は成熟犬の実験で, 15 分, 単純冷却で心筋内 pH が 6.0 になるまでの時間は約 3 時間と報告している. 一方 Portman ら¹¹⁾の豚未熟心の 20 分, 60 分の虚血では, 単純冷却でも細胞内 pH は約 7.0 を維持し, Flaherty ら¹²⁾の兔成熟心での 24 分, 60 分の単純虚血での細胞内 pH は 6.1 まで低下したと述べている. 今回の実験で, 兎未熟心の単純冷却では, 15 分の低温にもかかわらず, 60 分ですでに 6.0 を下回り, 120 分では 5.46 まで低下した. 以上の結果は, 成熟度や種の違いによって虚血中の acidosis の程度が異なることを示すものであり, 兎未熟心では, 強い acidosis となることが判明した. このような特性を持つ兎未熟心において, ST 液の効果は, C 群と同様の低下傾向を示した. このことは, 兎未熟心の低温下 single dose 法による心筋保護法では, 重炭酸系は, 虚血中の acidosis を長時間抑制するには不十分な buffer 系であることを示す. 一方, HTK-2 及び HTK-7 群では, 120 分後でも 6.25, 6.28 であり, 良好な緩衝作用を発揮した. Histidine は, 重炭酸と比較し多くの有利な条件を備え, 低温下でも強力な buffer 作用を維持すると報告される¹³⁾. また, HTK 液には, Histidine が約 $200 \text{ mmo}/\text{l}$ 含まれ, 高濃度の Histidine が, single dose 法においても長時間の緩衝作用を示した一因と考えられる.

一方, 虚血中の高エネルギーリン酸化合物を検討すると, 4 群とも虚血前値と比較して有意な減少を認めず, 心筋内 pH の良否にかかわらず良好に温存された. 未熟心では十分な低温保護のみで, 虚血中 ATP は温存されるとの報告がある¹⁴⁾. しかし, 心筋内 pH と

ン酸化合物の関係からは、ATP含量が減少するほどpHも低下するとされ、原因として虚血中のプロトン発生源の主要なものはATPの加水分解によるとしている¹⁵⁾。しかし、今回の結果では心筋内pHとリン酸化合物の間に相関はなく、pHのcontrolが不良であったST群やC群でも、虚血中の細胞内エネルギーが維持されたことは、兎未熟心では、低いpHにおいても解糖系が完全に抑制されていないことを示唆する。成熟心ではpHが6.7ないし6.8で解糖系が抑制されるとする報告があるが¹⁶⁾、未熟心での報告はない。しかし、未熟心では、エネルギー産生系のうち解糖系の占める割合が高いこと。代謝中間体による抑制が成熟心と比較して弱いことを考慮すると¹⁷⁾、未熟心本来の特性による嫌気性代謝の持続と、低温による十分な代謝の抑制が、虚血中の良好なエネルギー温存の原因と考えられ、成熟心で認められるhistidineのpH維持による解糖系の亢進作用は、有意なものではないと思われた。

4・4 再灌流後の心機能及び高エネルギーリン酸化合物

再灌流後の心機能では、HTK-7群が最も良好に回復した。心機能に与える心筋保護液の影響には、1:虚血中の細胞内エネルギーの温存 2:虚血中の良好な細胞内イオン環境の維持 3:再灌流後の細胞内イオン環境の速やかな適正化とエネルギー代謝の回復、が考えられる。今回の実験では、全ての群で虚血中の細胞内エネルギーが温存されたことより、虚血中の細胞内エネルギー減少による心機能への影響は少ないと考えられる。一方、虚血中の細胞内イオン環境に関して、細胞内外のプロトン濃度の変化は、直接的、間接的にエネルギー代謝やイオン環境に影響を及ぼす。プロトンは、Ca依存性の代謝を抑制し、エネルギー代謝を低下させると報告される¹⁸⁾¹⁹⁾。一方、acidosisによって、虚血中の細胞内イオン、特にCaイオンの制御機構も障害される可能性がある²⁰⁾²¹⁾。この障害は、再灌流後もすぐには回復せず、その障害の程度は、虚血時間やacidosisの程度により異なると考えられる²²⁾²³⁾。以上のように、acidosisは、その程度や時間によって、心筋保護的に働く場合と心筋障害的に働く場合の両面性を有すると考えられ、虚血中のpHを適切に維持することの重要性を示唆する²⁴⁾。さらに、HTK液は、そのイオン組成によって、イオンの再分布を抑制し、虚血中の良好なイオン環境を維持すると報告される²⁵⁾。

再灌流時には、細胞外の急激なpHの上昇と細胞内acidosisが、細胞膜を介するプロトンの濃度勾配を増

加させ、Na/Hポンプ及びNa/Caポンプの活性化によるCaの過負荷(PH-paradox)を招くと報告される²⁶⁾²⁷⁾。未熟心では、Na/Hポンプ活性が高いとされ²⁸⁾、また、成熟心と比較して、兎未熟心の細胞内のCa制御には、Na/Caポンプが重要な役割を果たすと報告される²⁹⁾³⁰⁾。Histidineによって細胞内のpHが緩衝されるならば、C群やST群と比較して、再灌流直後のプロトン勾配が小さくなることが予想され、Ca負荷の軽減の可能性が期待される。

再灌流後のリン酸化合物に関しては、虚血中と同様に、需要供給のバランスを考慮する必要がある。再灌流後の心ポンプ機能ではHTK両群の回復が高く、特にHTK-7群は虚血前値を凌駕した。心ポンプ機能による消費量が全体の70~80%を占めることを考慮すると、HTK-7群では心ポンプ機能に費やされるエネルギー量が大きいことが予想される。しかし、HTK-7群のATP含量は、HTK-2群、C群と比較し高く、ST群と比較しても有意差はなかった。さらに虚血前値と比べてもHTK-7群のみが維持された。このことは、HTK-7群の良好なエネルギー代謝の回復を示唆する。一方、HTK-2群は、心機能は回復したが、エネルギー産生系の障害が示唆された。Langendorff modeでの検討でも、冠血管抵抗が上昇した。この冠血管抵抗の上昇が、心筋complianceの上昇によるか、冠血管自体の障害かは不明である。しかし、未熟心の冠血管および血管床が成熟心と比較し、虚血に対して感受性が高いとの報告もあり³¹⁾、不十分な心筋保護効果による血管内皮の障害が考慮される。

5 結 論

今回、我々は、生後2~4日の新生仔家兎(New Zealand White Rabbit)を用いて、single dose法による未熟心筋保護としてHistidine-Triptophan-Ketoglutarate(HTK)液の効果について比較検討した。HTK液による7分間の冠灌流は、心機能の回復と同時に虚血後のエネルギー代謝も良好に回復した。以上より、HTK液の投与方法として、7分間灌流は、未熟心のsingle dose法として有用であり、臨床応用が可能と考えられた。

謝 辞：稿を終えるに当たり、研究に際し御助言、御協力いただいた本学生理学第一講座當瀬教授に深謝致します。

文 献

- 1) Bretschneider HJ, Gebhard MM, Preusse CJ: Optimization of myocardial protection. *Advances in Clinical Cardiology*. Vol. I. New York, G. Witz-

- stock Publishing House Ins, 1980
- 2) Sakata J, Morishita K, Itho T, Koshino T, Kazui T, Abe T : Comparison of clinical outcome between Histidine-Triprophan-Ketoglutarate solution and cold blood cardioplegic solution in mitral valve replacement. *J Card Surg* 1998 ; 13 : 43 47
 - 3) Krian A, Kramer H, Ouaegebuer J, Ostermeyer J, Korbmacher B, Godenhardt E, Briks W : The arterial swith operation : early and midterm (6 years) results with particular reference to technical problems. *Thorac Cardiovasc Surgeon* 1991 ; 39 : 159 164
 - 4) Daniel E, Atkinson : The Energy charge of the Adenylate Pool as a Regulatory Parameter. Interaction with Feedback Modifiers. *Biochemistry* 1968 ; 7 : 4030 4034
 - 5) 川島敏也 : 未熟心筋に対する心筋保護 : 冷却血液と晶質液の比較検討 . 札幌医誌 1996 ; 65 : 169 177
 - 6) Neely JR, Leibermeister H, Battersby EF, Morgan HE : Effect of Pressure development on oxygen consumption by isolated rat hearts. *Am J Physiol* 1967 ; 212 : 804 814
 - 7) Preusse CJ, Gebhard MM, Bretschneider HJ : Myocardial¹⁴C Equilibration Processes ¹⁴C and Myocardial Energy Turnover during Initiation of Artificial Cardiac Arrest with Cardioplegic Solution Reasons for a Sufficiently Long Cardioplegic Perfusion. *Thorac Cardiovasc Surg* 1981 ; 29 : 71 76
 - 8) Gebhard MM, Bretschneider HJ, Gersing E, Schnabel PA : Bretschneider Histidine-Buffered Cardioplegic Solution : Concept, Application, and Efficiency.
 - 9) Iannettoni MD, Bove EL, Fox MH, Groh MA, Bolling SF, Gallagher KP : The effect of intramyocardial pH on functional recovery in neonatal hearts receiving St. Thomas Hospital cardioplegic solution during global ischemia. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1992 ; 104 : 333 343
 - 10) Walters FJ, Chir B, Wilson GJ, Steward DJ, Domech RJ, MacGregor DC : Intramyocardial pH as an index of myocardial metabolism during cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1979 ; 78 : 319 329
 - 11) Portman MA, Panos AL, Xiao Y, Anderson DL, Alfieri GM, Ning X, Lupinetti FM : Influence of the pH of cardioplegic solutions on cellular energy metabolism and hydrogen ion flux during neonatal hypothermic circulatory arrest and reperfusion : A dynamic ³¹P nuclear resonance study in a pig model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997 ; 114 : 601 608
 - 12) Flaherty JT, Weisfeldt ML, Bulkley BH, Gardner TJ, Gott VL, Jacobus WE : Mechanisms of Ischemic Myocardial Cell Damage Assessed by Phosphorus-31 Nuclear Magnetic Resonance. *Circulation* 1982 ; 65 : 561 571
 - 13) Vander Woude JC, Christlieb IY, Sicard GA, Clark RE : Imidazole-buffered cardioplegic solution. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1985 ; 90 : 225 234
 - 14) Magovern JA, Pae WE, Waldhausen JA : Protection of the immature myocardium. An experimental evaluation of topical cooling, single-dose, and multiple-dose administration of St. Thomas Hospital cardioplegic solution. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1988 ; 96 : 408 413
 - 15) Gevers W : Generation of protons by metabolic processes in heart cells. *J Mol Cell Cardiol* 1977 ; 9 : 867 874
 - 16) Rovetto MJ, Lambertson WF, Neely JR : Mechanisms of glycolytic inhibition in ischemic rat heart. *Circ Res* 1975 ; 37 : 742 751
 - 17) Jarmakani JM, Nagatomo T, Nakazawa M, Langer GA : Effect of hypoxia on myocardial high-energy phosphates in the neonatal mammalian heart. *Am J Physiol* 1978 ; 235 : 475 481
 - 18) Rousin W, Erickson JL, Solaro AR : Effects of oligomycin and acidosis on rates of ATP depletion in ischemic heart muscle. *Am J Physiol* 1992 ; 250 : H 503 H 508
 - 19) Pool-Wilson PA : Regulation of intracellular pH in the myocardium ; relevance to pathology. *Mol Cell Biochem* 1989 ; 89 : 151 155
 - 20) Krause S, Hess ML : Characterization of cardiac sarcoplasmic reticulum dysfunction during short-term, normothermic, global ischemia. *Circ Res* 1984 ; 55 : 176 184
 - 21) Hess ML, Warner MF, Robbins AD, Crute S, Greenfield LJ : Characterization of the excitation-contraction coupling system of the hypothermic myocardium following ischemia and reperfusion. *Cardiovasc Res* 1981 ; 15 : 390 397
 - 22) Fisher DJ. Acidemia depresses cardiac contractility and output in newborn lambs. *Circulation* 1983 ; 68 : Supp III, III 122
 - 23) Wildenthal D, Mierzwiak DS, Myers RW : Effects of acute lactic acidosis on left ventricular performance. *Am J Physiol* 1968 ; 214 : 1352 1359
 - 24) Baker JE, Boerboom LE, Olinger GN : Age and protection of ischemic myocardium : Is alkaline cardioplegia appropriate? *Ann Thorac Surg*

- 1993 ; 55 : 747 755
- 25) Stinner B, Krohn E, Gebhard MM, Bretschneider HJ : Intracellular sodium activity and Bretschneider cardioplegia : Continuous measurement by ionselective microelectrodes at initial equilibration. *Basic Res Cardiol* 1989 ; 84 : 197 207
- 26) Scholz W, Albus U : Na/H exchange and its inhibition in cardiac ischemia and reperfusion. *Basic Res Cardiol* 1993 ; 88 : 443 455
- 27) Karmazyn M, Moffat M : Role of Na/H exchange in cardiac physiology and pathophysiology : mediation of myocardial reperfusion injury by the PH paradox. *Cardiovasc Res* 1993 ; 27 : 915 924
- 28) Meno H, Jarmakani JM, Philipson KD : Developmental Changes of Sarcolemmal Na/H Exchange. *J Mol Cell Cardiol* 1989 ; 21 : 1179 1185
- 29) Mahony L : Regulation of intracellular calcium concentration in the developing heart. *Cardiovasc Res* 1996 ; 31 : 61 67
- 30) Baldwin SH, Artman M : Recent advances in cardiovascular development : promise for the future. *Cardiovasc Res* 1998 ; 40 : 456 468
- 31) Parving HH, Klebe JG, Ingomar CJ : Simultaneous determination of plasma volume and transcapillary escape rate with ¹³¹I-labelled albumin T-1824 in the newborn. *Acta Paediatr Scand* 1973 ; 62 : 248 252

Experimental Study of the Cardioprotective Effect using HTK Solution with Single Dose Method in the Immature Rabbit Heart

Nobuyuki Takagi, Sinji Nakajiima, Ryuji Kojima and Tomio Abe

Second Department of Surgery, Sapporo Medical University School of Medicine, Sapporo, Japan

The application of Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate (HTK) solution for congenital cardiac operation, especially for neonatal heart, is now under debate. Our experimental study was designed to evaluate two issues : Does HTK solution have an additive cardioprotective effect against the hypothermic global ischemia in immature heart? : How does the difference in the cardioplegic infusion time affect this cardioprotective effect ?

Isolated perfused working neonatal rabbit hearts (New Zealand White Rabbit) at 2 to 4 days from birth were subjected to hypothermic global ischemia for two hours at 15 °C following the infusion of HTK solution for 2 min (HTK-2) or for 7 min (HTK-7) St. Thomas hospital solution for 2 min (ST) under the constant volume of 10 ml/100 g BW in all groups. Intra-myocardial pH was measured continuously during ischemia and high energy phosphate contents were measured at the end of ischemia and 30 min after reperfusion. Cardiac function under working was compared with baseline values as percent recovery at 30 min after reperfusion. Coronary vascular resistance (CVR) was calculated from coronary flow and constant driving pressure of 50 cm in Langendorff mode.

The two groups with HTK solution showed significantly higher intra-myocardial pH values (HTK-2 ; 6.25, HTK-7 ; 6.28) as compared with ST (5.57) and KHB (5.46) at the end of ischemia ($p < 0.01$) At the end of ischemia, no significant change was obtained in high energy phosphate contents in any group as compared with preischemic values. Percent recovery of cardiac function at 30 min after the reperfusion was more enhanced in HTK-7 and HTK-2 than in KHB and ST ($p < 0.01$). But, HTK-2 showed increased CVR in Langendorff mode and decreased MVO₂ (vs HTK-7 $p < 0.01$ and vs ST $p < 0.01$) High energy phosphate contents after the reperfusion were maintained only in HTK-7 as compared with preischemic values.

HTK solution with single dose method is likely to have significant additive effects on cardioprotection in immature rabbit heart as compared with hypothermia only and to produce significantly superior protective effects as compared with ST solution. However, it is essential to allow adequate time for the establishment of complete equilibrium of the extracellular space with HTK solution, even in immature rabbit hearts.