

## УЧАСТИЕ МОНООКСИДА АЗОТА В МЕХАНИЗМАХ РЕАЛИЗАЦИИ ИНФАРКТ-ЛИМИТИРУЮЩЕГО ЭФФЕКТА ПОСТКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ С ПОМОЩЬЮ ЛАКТАТА ПРИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ МИОКАРДА У МОЛОДЫХ И СТАРЫХ КРЫС

Чепелев С.Н., Висмонт Ф.И.

*Белорусский государственный медицинский университет,  
кафедра патологической физиологии, г. Минск*

**Ключевые слова:** монооксид азота, лактат, посткондиционирование миокарда, инфаркт-лимитирующий эффект, пожилой возраст.

**Резюме:** результаты исследования дают основания полагать, что активность NO-синтазы и уровень NO имеют значимость в механизмах реализации инфаркт-лимитирующего эффекта посткондиционирования с помощью лактата у молодых, но не у старых крыс.

**Resume:** the results of the study suggest that the activity of NO-synthase and the level of NO are significant in the mechanisms of implementation of the infarct-limiting effect of postconditioning with lactate in young, but not in old rats.

**Актуальность.** Медицина стоит перед проблемой неуклонного роста сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ). В настоящее время ССЗ занимают первое место среди причин смертности населения в развитых странах мира. Самым распространенным ССЗ и основной причиной смертности является ишемическая болезнь сердца (ИБС). Одним из опаснейших осложнений данного заболевания является развитие инфаркта миокарда (ИМ). Учитывая большую частоту инвалидизации и сложность реабилитации пациентов с ИМ, ИБС представляет собой не только значимую медицинскую, но и важную государственную проблему. В связи с этим поиск новых эффективных методов предотвращения или ослабления ишемического и реперфузионного повреждения миокарда и выяснение механизмов их реализации остается актуальной задачей современной экспериментальной и клинической медицины.

Особое значение в процессах повреждения миокарда при его ишемии-реперфузии, а собственно, при ИБС, имеет реперфузия. Она может привести к парадоксальной дисфункции кардиомиоцитов, известной как ишемическое-реперфузионное повреждение. Для улучшения результатов ранней реперфузии разработаны два основных способа кардиопротекции: ишемическое посткондиционирование (ПостК) и фармакологическое ПостК [1].

В последние десятилетия объектом повышенного интереса ведущих мировых исследователей в области экспериментальной и клинической кардиологии являются кардиопротекторные эффекты дистантного ишемического пре- и ПостК, которые воспроизводятся кратковременной ишемией конечностей, осуществляемой до или после острой коронароокклюзии соответственно [1–3].

В исследовании M. Basalay с соавт. в 2012 г. продемонстрировали в экспериментах на крысах, что кратковременная (15-минутная) ишемия задних конечностей оказывает выраженное инфаркт-лимитирующее действие на миокард на 10-й мин после восстановления коронарного кровотока [4]. В последующие годы целым ря-

дом экспериментальных и клинических исследований было показано, что ДИПостК является эффективным методом снижения реперфузионного повреждения [1–3].

Необходимо констатировать, что эффективные методы профилактики реперфузионных повреждений миокарда пока не разработаны, а клинические исследования в этой сфере носят немногочисленный характер. Одним из наиболее перспективных направлений в профилактике вышеуказанных повреждений считается фармакологическая защита миокарда с использованием различных фармакологических агентов, в основе которых лежат феномены фармакологического пре- и ПостК сердца [5].

Принимая во внимание известные факты о том, что гипоперфузия, ишемия органов и тканей приводит к повышению уровня молочной кислоты (лактата) в крови, а лактат, в свою очередь, оказывает коронарное сосудорасширяющее действие за счет выделения эндотелием сосудов монооксида азота (NO) [6], а также способен ингибировать перекисное окисление липидов и свободнорадикальные процессы [7], выраженность которых при реперфузии возрастает, и что лактат может использоваться тканями и, особенно, миокардом, после гипоксии в большей степени, чем глюкоза [8], были основания полагать, что повышенный уровень лактата в крови (гиперлактатемия) сможет уменьшить реперфузионное повреждение миокарда.

Как известно, большинство заболеваний сердца связаны с ишемией миокарда. А одной из причин ишемии является дефицит монооксида азота (NO). В миокарде NO может регулировать функции органа как непосредственно, так и через влияние на сосуды. По современным представлениям, дефицит NO является ключевым звеном эндотелиальной дисфункции и развития сердечной недостаточности. Результаты ряда исследований свидетельствуют о значимости NO в механизмах реализации инфаркт-лимитирующего эффекта ишемического пре- и ПостК [9, 10]. Однако биохимические механизмы кардиопротекции, лежащие в основе инфаркт-лимитирующего эффекта кондиционирования при ишемии-реперфузии миокарда, несмотря на их интенсивное изучение, исследованы недостаточно и во многом не ясны.

Учитывая имеющиеся в научной литературе сведения о том, что с возрастом в организме происходят значительные морфофункциональные и биохимические изменения, а также о том, что уровень NO оказывает влияние на процессы эндотелиальной дисфункции и реперфузионного повреждения миокарда, были основания полагать, что активность NO-синтазы и уровень NO в органах и тканях будут иметь значение в реализации кардиопротекторных эффектов ПостК с помощью лактата, а их выраженность зависеть от возраста животных.

**Цель:** выяснить значимость NO в механизмах реализации инфаркт-лимитирующего эффекта ПостК с помощью лактата при ишемии-реперфузии миокарда у молодых и старых крыс.

**Материалы и методы.** Исследование проведено на 72 наркотизированных нелинейных белых крысах-самцах, которые были разделены на 2 возрастных группы: 36 молодых (молод) крысы, массой 200–250 г, возрастом  $4 \pm 1$  мес. и 36 старых (стар) крыс, массой 400–450 г, возрастом  $24 \pm 1$  мес. Все животные в начале эксперимента перед 30-минутной ишемией и последующей 120-минутной реперфузией

миокарда были разделены на 6 групп: 1-я – Контроль<sub>молод</sub> – группа молодых крыс, которым проводилась ишемия-реперфузия миокарда ( $n = 12$ ); 2-я – Контроль<sub>стар</sub> – группа старых крыс, которым проводилась ишемия-реперфузия миокарда ( $n = 12$ ); 3-я – Лактат<sub>молод</sub> – группа молодых крыс, которым через 25 мин от начала реперфузии вводили в левую общую яремную вену лактат (Sigma-Aldrich, США) в дозе 10 мг/кг ( $n = 12$ ); 4-я – Лактат<sub>стар</sub> – группа старых крыс, которым через 25 мин от начала реперфузии вводили в левую общую яремную вену лактат в дозе 10 мг/кг ( $n = 12$ ); 5-я – L-NAME + Лактат<sub>молод</sub> – группа молодых крыс, которым осуществлялось внутривенное введение ингибитора NO-синтазы метилового эфира N<sup>G</sup>-нитро-L-аргинина (L-NAME, Acros Organics, США) в дозе 25 мг/кг за 5 мин до начала реперфузии и за 30 мин до ПостК с помощью лактата ( $n = 12$ ); 6-я – L-NAME + Лактат<sub>стар</sub> – группа старых крыс, которым осуществлялось внутривенное введение L-NAME в дозе 25 мг/кг за 5 мин до начала реперфузии и за 30 мин до ПостК с помощью лактата ( $n = 12$ ).

Для наркотизации животных использовали тиопентал натрия в дозе 50 мг/кг внутривенно с последующей внутривенной инфузией в левую общую яремную вену поддерживающей дозы 10 мг/кг·ч. Крыс переводили на искусственное дыхание атмосферным воздухом через трахеостому при помощи аппарата ИВЛ. В ходе экспериментов непрерывно регистрировались ЭКГ во II стандартном отведении и системное АД, полученные при этом данные обрабатывались с помощью компьютерной программы Spike 4 (Великобритания). Для измерения АД прямым методом крысам канюлировали правую общую сонную артерию. Грудную клетку наркотизированного животного вскрывали в IV межреберном промежутке слева.

После периода 15-минутной стабилизации гемодинамики крысам выполняли 30-минутную окклюзию передней нисходящей ветви левой коронарной артерии путем механического ее пережатия при помощи лигатуры. Реперфузия (120 минут) миокарда достигалась снятием лигатуры.

Депрессия NO-синтазы проводилась у животных, которым за 5 мин до начала реперфузии и за 30 мин до воспроизведения ПостК с помощью лактата внутривенно вводили в левую общую яремную вену водный раствор метилового эфира N<sup>G</sup>-нитро-L-аргинина (L-NAME, Acros Organics, США) в дозе 25 мг/кг.

Зону риска определяли путем введения в левую общую яремную вену 0,5 мл 5% р-ра синьки Эванса в конце реперфузии. Сердце извлекали и отделяли левый желудочек, который замораживали и разрезали на 6 поперечных срезов. Срезы взвешивали и сканировали с обеих сторон. Для определения зоны некроза, срезы помещали в 1% р-р трифенилтетразолия хлорида на 15 мин (37°C), затем инкубировали 24 часа в 10% р-ре формалина, после чего повторно сканировали и определяли соотношения площадей зоны риска и зоны некроза.

Изучение инфаркт-лимитирующей эффективности лактата при ишемии-реперфузии миокарда проводилось у животных, которым через 25 мин от начала реперфузии вводили в левую общую яремную вену 0,5 мл 40 мМоль нейтрализованного раствора молочной кислоты (L-(+)-Lactic acid,  $\geq 98\%$ , (Sigma-Aldrich, США)), т.е. в дозе 10 мг/кг. Нейтрализованный лактат готовили растворением молочной кислоты в 0,9 % растворе NaCl для инъекций с последующим доведением pH до 7,4 с помо-

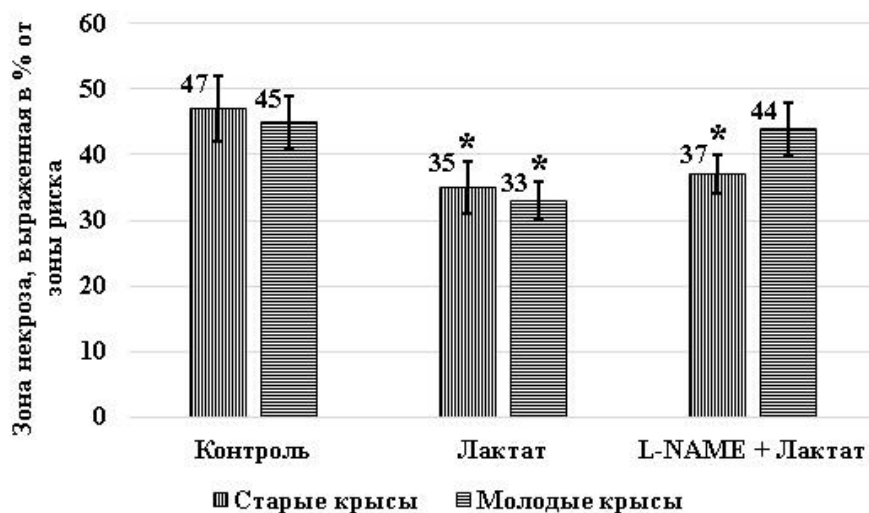
шью NaOH (10 N). Доза лактата (10 мг/кг) была выбрана нами с целью обеспечить уровень лактата в крови близкий к тому, что имел место во время ДИПостК после 15-минутного наложения микроартериальных зажимов на обеих бедренных артериях. Уровень лактата в цельной крови, взятой из левой общей яремной вены, определяли при помощи анализатора Lactate Pro 2 (Arkray, Япония) с использованием тест-полосок Lactate Pro 2 Test Strip для биохимических исследований.

Уровень  $p < 0,05$  рассматривался как статистически значимый.

**Результаты и их обсуждение.** При изучении инфаркт-лимитирующего эффекта ПостК с помощью лактата при ишемии-реперфузии миокарда у молодых и старых крыс статистически значимых различий между анализируемыми группами по показателю размера зоны риска в миокарде левого желудочка не выявлено ( $p > 0,05$ ). Так, зона ишемии в группе Контроль<sub>молод</sub> составила  $54 \pm 3 \%$ , в группе Контроль<sub>стар</sub> –  $55 \pm 3 \%$ , в группе Лактат<sub>молод</sub> –  $52 \pm 4 \%$ , в группе Лактат<sub>стар</sub> –  $53 \pm 3 \%$ , в группе L-NAME + Лактат<sub>молод</sub> –  $56 \pm 5 \%$  и в группе L-NAME + Лактат<sub>стар</sub> –  $55 \pm 5 \%$ .

Размер инфаркта является важным показателем повреждения миокарда из-за его влияния на сократимость сердца. Установлено, что размер зоны некроза в миокарде левого желудочка у животных в группе Контроль<sub>молод</sub> составил  $45 \pm 4 \%$ , а в группе Контроль<sub>стар</sub> –  $47 \pm 5 \%$ . После внутривенного введения животным лактата (10 мг/кг), которое осуществлялось через 25 мин после начала реперфузии, у крыс при ишемии и реперфузии миокарда в левом желудочке формировались следующие размеры зон некроза: в группе Лактат<sub>молод</sub> –  $33 \pm 3 \%$  ( $p < 0,05$  по сравнению с группами Контроль<sub>молод</sub>), а в группе Лактат<sub>стар</sub> –  $35 \pm 4 \%$  ( $p < 0,05$  по сравнению с группой Контроль<sub>стар</sub>). Полученные данные свидетельствуют о наличии инфаркт-лимитирующего эффекта ПостК с помощью лактата как у молодых, так и у старых крыс.

Размер зоны некроза в миокарде левого желудочка в группах молодых и старых животных, которым выполнялось внутривенное введение ингибитора НО-синтазы L-NAME в дозе 25 мг/кг за 5 мин до начала реперфузии, а затем через 25 мин от начала реперфузии внутривенно вводился лактат в дозе 10 мг/кг, был следующим: в группе L-NAME + Лактат<sub>молод</sub> –  $44 \pm 4 \%$  ( $p > 0,05$  по сравнению с группой Контроль<sub>молод</sub>), а в группе L-NAME + Лактат<sub>стар</sub> –  $37 \pm 3 \%$  ( $p < 0,05$  по сравнению с группой Контроль<sub>стар</sub>) (рис. 1).



**Рис. 1** – Размеры зоны некроза в миокарде левого желудочка в исследуемых группах.  
\* – статистически значимые отличия ( $p < 0,05$ ) размеров зоны некроза по сравнению с соответствующими возрастными группами контроля

Таким образом выявлено, что в условиях системного действия в организме молодых животных ингибитора NO-синтазы L-NAME (25 мг/кг), введение которого в кровоток осуществлялось за 5 мин до начала реперфузии и за 30 мин до выполнения ПостК с помощью лактата, ослабляется инфаркт-лимитирующий эффект ПостК с помощью лактата (10 мг/кг), так как в левом желудочке сердца имела место более обширная (на 33,3 %,  $p < 0,05$ ,  $n = 12$ ) зона некроза по сравнению с группой Лактат-молод. У старых крыс после воспроизведения ПостК с помощью лактата (10 мг/кг) в условиях угнетения активности NO-синтазы L-NAME (25 мг/кг) при ишемии-реперфузии миокарда инфаркт-лимитирующий эффект лактата сохранялся.

**Выводы:** опыты показали, что ПостК с помощью лактата при ишемии-реперфузии миокарда, которое осуществляется через 25 мин от начала реперфузии, путем его введения в кровоток в дозе 10 мг/кг приводит к уменьшению размеров зоны некроза в миокарде левого желудочка на 26,7 и 25,5 % у молодых и старых крыс соответственно. Индуцированная ПостК с помощью лактата защита миокарда ослаблялась у молодых крыс в условиях действия в организме ингибитора NO-синтазы L-NAME, который вводился в дозе 25 мг/кг за 5 мин до начала 120-минутной реперфузии. В аналогичных условиях у старых крыс инфаркт-лимитирующий эффект ПостК с помощью лактата не изменялся. Таким образом, результаты исследования дают основания полагать, что активность NO-синтазы и уровень NO имеют значимость в механизмах реализации инфаркт-лимитирующего эффекта ПостК с помощью лактата у молодых, но не у старых крыс.

### Литература

1. Кардиопротективные эффекты ишемического кондиционирования: современные представления о механизмах, экспериментальные подтверждения, клиническая реализация / А. Е. Батулин [и др.] // Трансляционная медицина. – 2016. – Т. 3, № 1. – С. 50–62.
2. Donato, M. Protecting the heart from ischemia/reperfusion injury: an update on remote ischemic preconditioning and postconditioning / M. Donato, P. Evelson, R. J. Gelpi // Curr Opin Cardiol. – 2017. – Vol. 32, N 6. – P. 784–790.

3. Маслов, Л. Н. Феномен ишемического посткондиционирования сердца. Анализ клинических данных / Л. Н. Маслов, А. Ю. Подоксёнов, И. Г. Халиулин // *Ангиология и сосудистая хирургия*. – 2017. – Т. 23, № 1. – С. 21–28.

4. Remote ischaemic pre- and delayed postconditioning – similar degree of cardioprotection but distinct mechanisms / M. Basalay [et al.] // *Experimental Physiology*. – 2012. – Vol. 97, N 8. – P. 908–917.

5. Pharmacological Conditioning of the Heart: An Update on Experimental Developments and Clinical Implications / S. Roth [et al.] // *Int J Mol Sci*. – 2021. – Vol. 22, N 5. – Article ID 2519. – P. 1–19.

6. Nitric oxide-mediated relaxation to lactate of coronary circulation in the isolated perfused rat heart / J. J. Montoya [et al.] // *J Cardiovasc Pharmacol*. – 2011. – Vol. 58, N 4. – P. 392–398.

7. Free radical scavenging and antioxidant effects of lactate ion: an in vitro study / C. Groussard [et al.] // *J. Appl Physiol* (1985). – 2000. – Vol. 89, N 1. – P. 169–175.

8. Клинические аспекты динамики лактата крови во время операции на сердце и аорте в условиях искусственного кровообращения / Н. А. Трекова [и др.] // *Анестезиология и реанимация*. – 2016. – Т. 61, № 5. – С. 324–329.

9. Чепелев, С. Н. О значимости монооксида азота в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта дистантного ишемического посткондиционирования при ишемии-реперфузии миокарда у молодых и старых крыс / С. Н. Чепелев, Ф. И. Висмонт // *Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук*. – 2020. – Т. 17, № 3. – С. 353–364.

10. NO в сигнальном каскаде фармакологического прекондиционирования при ишемии-реперфузии миокарда / Л. Н. Даниленко [и др.] // *Ведомости Науч. центра экспертизы средств мед. применения*. – 2015. – № 2. – С. 40–44.