

С.Н. Чепелев, Ф.И. Висмонт
**УЧАСТИЕ NO-ЗАВИСИМЫХ МЕХАНИЗМОВ В РЕАЛИЗАЦИИ
ИНФАРКТ-ЛИМИТИРУЮЩЕГО ЭФФЕКТА
ПОСТКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ С ПОМОЩЬЮ L-ЛАКТАТА
ПРИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ МИОКАРДА**

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

S.N. Chepelev, F.I. Vismont
**PARTICIPATION OF NO-DEPENDENT MECHANISMS IN THE
IMPLEMENTATION OF THE INFARCTION-LIMITING EFFECT
OF POSTCONDITIONING WITH L-LACTATE
IN MYOCARDIAL ISCHEMIA-REPERFUSION**

*Department of Pathological Physiology
Belarusian State Medical University, Minsk*

Резюме. Целью исследования явилось выяснение инфаркт-лимитирующего эффекта посткондиционирования с помощью L-лактата (ПостЛ) при ишемии-реперфузии миокарда у молодых крыс в условиях системного действия в организме животных ингибитора NO-синтазы L-NAME. Выявлено, что в условиях системного действия в организме молодых животных ингибитора NO-синтазы L-NAME в дозе 25 мг/кг устраняется инфаркт-лимитирующий эффект ПостЛ.

Ключевые слова: инфаркт-лимитирующий эффект, посткондиционирование, L-лактат, монооксид азота, синтаза монооксида азота.

Resume. The purpose of the study was to elucidate the infarct-limiting effect of postconditioning with L-lactate (PostL) during myocardial ischemia-reperfusion in young rats under conditions of systemic action in the animal body of the NO-synthase inhibitor L-NAME. It was revealed that under conditions of systemic action in the body of young animals of the NO-synthase inhibitor L-NAME at a dose of 25 mg/kg, the infarction-limiting effect of PostL is eliminated.

Keywords: infarction-limiting effect, postconditioning, L-lactate, nitrogen monoxide, nitric monoxide synthase.

Актуальность. В течение последних чуть более тридцати лет кондиционирование миокарда было предметом многочисленных исследований с целью выяснения механизмов кардиопротекции, а также возможностей его клинического применения.

В последнее время многими учеными было показано, что L-лактат играет важную роль в сердечном метаболизме, участвует в адаптационно-компенсаторных процессах в миокарде при ишемически-реперфузионном повреждении.

Как известно, во время ишемии развивается гипоксия, которая приводит к повышению уровня L-лактата в крови. Долгое время считалось, что лактат является метаболическим «отходом производства» и несет исключительно отрицательные последствия для организма [1]. Однако в эксперименте на изолированных сердцах, перфузированных раствором, содержащем 10 мМоль L-лактата и 11 мМоль глюкозы, до их острой ишемии, после периода ишемии G.W. Goodwin и H. Taegtmeier (1994 г.) отметили улучшение восстановления сердечной деятельности по сравнению с

сердцами, получавшими только глюкозу.

В настоящее время лактат признан связующим звеном между аэробным и гликолитическим путями, являясь продуктом одного метаболического пути (гликолиз) и субстратом для другого (окислительное фосфорилирование) [2]. Лактат не только играет роль основного источника энергии или предшественника глюконеогенеза, но также действует как сигнальная молекула [2]. Важно отметить, что лактат и индуцируемый гипоксией фактор-1 (HIF-1), который участвует в обеспечении кислородного гомеостаза, регулируются реципрокной активацией, т. е. повышенные уровни лактата способствуют стабилизации HIF-1 и экспрессии генов, индуцированных HIF-1, в то время как HIF-1 стимулирует поглощение глюкозы и гликолиз и, тем самым, обеспечивает выработку лактата [3]. Аналогичная взаимосвязь реципрокной активации существует между L-лактатом и коактиватором гамма-рецептора, активируемого пролифератором пероксисом 1-альфа (PGC-1 α), – главным регулятором митохондриального биогенеза [2].

В современной литературе имеются также немногочисленные данные экспериментальных исследований, посвященных выяснению механизмов влияния лактата на сердечную деятельность. Так, G. Zhang и соавт. (2015 г.) установили, что фармакологическое посткондиционирование с помощью молочной кислоты и богатого водородом физиологического раствора у крыс дает сопоставимую кардиопротекцию ишемическому посткондиционированию. J. Zhang и соавт. (2021 г.) в опытах на мышцах показали, что лактат ускоряет поляризацию макрофагов M2, продуцирующих противовоспалительные цитокины, через сигнальный путь STAT3, а также оказывает кардиозащитное действие после инфаркта миокарда за счет улучшения фракции выброса и фракционного укорочения, снижения апоптоза кардиомиоцитов и увеличения плотности микрососудов в зоне ишемии.

В настоящее время появляются сведения, полученные в клинических исследованиях, подчеркивающие значимость лактата в кардиопротекции. Так, в исследовании M. Nalos и соавт. (2014 г.) показано, что инфузия полумолярного лактата натрия может улучшить работу сердца у пациентов с острой сердечной недостаточностью без какого-либо пагубного воздействия на функцию органов. Кроме того, исследования T. Коуама и соавт. (2016, 2019, 2022 гг.) показали, что посткондиционирование с кровью, обогащенной лактатом, обеспечивает потенциальную кардиопротекцию у пациентов с инфарктом миокарда и подъемом сегмента ST на ЭКГ. Накапливающиеся данные свидетельствуют о том, что L-лактат может быть многообещающим средством лечения сердечно-сосудистых заболеваний.

Принимая во внимание известные факты о том, что гипоперфузия, ишемия органов и тканей приводит к повышению уровня L-молочной кислоты (L-лактата) в крови, а L-лактат, в свою очередь, оказывает коронарное сосудорасширяющее действие за счет выделения эндотелием сосудов монооксида азота (NO) [3], а также способен ингибировать перекисное окисление липидов и свободнорадикальные процессы [4], выраженность которых при реперфузии возрастает, были основания полагать, что повышенный уровень L-лактата в крови (гиперлактатемия) сможет уменьшить реперфузионное повреждение миокарда. Так, в ранее проведенном

исследовании было показано, что после 15-минутной ишемии обеих нижних конечной у крыс, что характерно для модели дистантного ишемического посткондиционирования (ДИПост), повышается уровень L-лактата в крови в 2,28 раза ($p < 0,001$) с 1,55 (1,47; 1,92) мМоль/л до 3,54 (3,35; 3,69) мМоль/л, а выполнение посткондиционирования с помощью L-лактата (ПостЛ) путем введения нейтрального экзогенного L-лактата на 25-й минуте реперфузии в дозе 10 мг/кг приводит к снижению размеров зоны некроза в миокарде левого желудочка на 28,2 % ($p < 0,01$), то есть ослабляет реперфузионное повреждение сердца [5]. А как известно, NO, в образовании которого участвуют ферменты NO-синтазы, играет важную роль в процессах регуляции сердечной деятельности и нарушение регуляции механизмов, участвующих в образовании NO, является важной причиной развития сердечно-сосудистых заболеваний.

Цель: выяснить инфаркт-лимитирующий эффект ПостЛ при ишемии-реперфузии миокарда у молодых крыс в условиях системного действия в организме животных ингибитора NO-синтазы метилового эфира N^G-L-нитроаргинина (L-NAME).

Материалы и методы. Выяснение инфаркт-лимитирующей эффективности ПостЛ при ишемии-реперфузии (И/Р) миокарда у молодых крыс в условиях системного действия в организме животных ингибитора NO-синтазы L-NAME проведено на 69 белых крысах-самцах массой 200–250 г и в возрасте 4 ± 1 месяцев. Все животные в начале эксперимента перед 30-минутной окклюзией передней нисходящей ветви левой коронарной артерии и последующей 120-минутной реперфузией были разделены на 5 групп (рисунок 1).

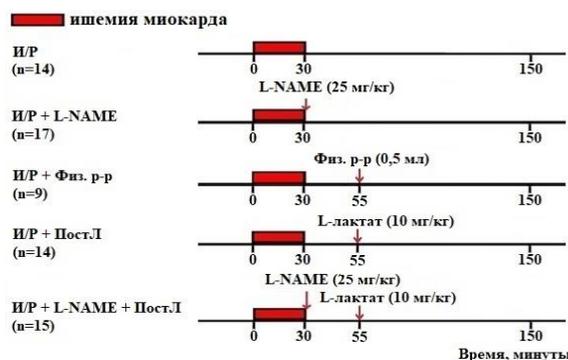


Рис. 1 – Схема протоколов эксперимента для изучения инфаркт-лимитирующей эффективности ПостЛ у молодых крыс в условиях системного действия в организме животных блокатора NO-синтазы L-NAME

Для наркотизации животных внутрибрюшинно вводили тиопентал натрия в дозе 50 мг/кг. Крыс переводили на искусственное дыхание атмосферным воздухом через трахеостому при помощи аппарата искусственной вентиляции легких model 683 (Harvard Apparatus, США). В ходе экспериментов постоянно регистрировалась электрокардиограмма (ЭКГ) во II стандартном отведении при помощи электрокардиографа (Harvard Apparatus, США) с использованием игольчатых электродов, помещаемых подкожно на конечности, и системное артериальное

давление (АД). Полученные при выполнении исследования данные обрабатывались с помощью компьютерной программы Spike 4 (Великобритания).

Изучение инфаркт-лимитирующей эффективности ПостЛ при ишемии-реперфузии миокарда у крыс проводилось у животных, которым через 25 минут от начала реперфузии вводили в левую внутреннюю яремную вену 0,5 мл 40 мМоль нейтрализованного раствора L-молочной кислоты (Sigma-Aldrich, США), т. е. в дозе 10 мг/кг. Для приготовления нейтрализованного L-лактата для инъекций L-молочную кислоту растворяли в 0,9 %-м растворе NaCl с последующим доведением pH до 7,4 с помощью NaOH. Крысам контрольной группы через 25 мин от начала реперфузии вводили в левую общую яремную вену физиологический раствор (физ. р-р) в объеме 0,5 мл.

Определение уровня L-лактата в плазме крови у животных проводилось спектрофотометрическим методом с использованием набора реагентов (BioSystems S. A., Испания) с помощью биохимического автоматического анализатора A25 Random Access Analyzer (BioSystems S. A., Испания) при длине волны 600 нм.

Изучение инфаркт-лимитирующей эффективности ПостЛ при ишемии-реперфузии миокарда у молодых крыс в условиях системного действия в организме животных ингибитора NO-синтазы L-NAME проводилось после введения в левую внутреннюю яремную вену водного раствора L-NAME (Acros Organics, США) в дозе 25 мг/кг сразу после острой ишемии миокарда.

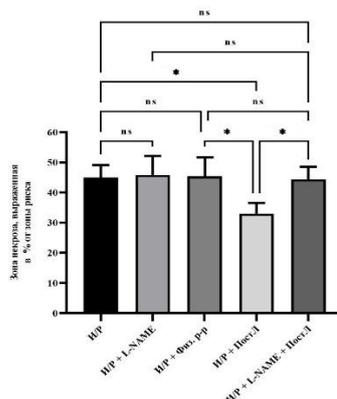
Выводили животных из эксперимента после реперфузии путем иссечения сердца из грудной полости для последующего окрашивания и определения зоны риска (зоны ишемии) и зоны некроза (зоны инфаркта). Размеры анализируемых зон риска и зон некроза определяли при помощи компьютерной планиметрии с использованием программы Adobe Photoshop CC 2013 и взвешивания срезов как соотношение массы зоны некроза к массе зоны риска, выраженное в % [5].

Полученные данные анализировались с использованием программы GraphPad Prism 9.3.1. Уровень $p < 0,05$ рассматривался как статистически значимый.

Результаты и их обсуждение. При изучении кардиопротекторной эффективности ПостЛ при ишемии-реперфузии миокарда у молодых крыс в условиях системного действия в организме животных ингибитора NO-синтазы L-NAME в дозе 25 мг/кг, который вводили сразу после острой ишемии миокарда, установлено, что показатель выживаемости в группе И/Р составил 85,7 %, в группе И/Р + L-NAME – 70,6 %, в группе И/Р + Физ. р-р – 88,8%, в группе И/Р + ПостЛ – 85,7 % и в группе И/Р + L-NAME + ПостЛ – 80,0 %. Общий показатель выживаемости в исследуемых группах составил 66,7 % (13 крыс из 69 погибло во время ишемии-реперфузии миокарда). В итоге из групп животных И/Р, И/Р + L-NAME, И/Р + ПостЛ и И/Р + L-NAME + ПостЛ для последующего анализа данных было отобрано по 12 крыс, а из группы И/Р + Физ. р-р – 8 крыс.

При изучении инфаркт-лимитирующего эффекта ПостЛ при ишемии-реперфузии миокарда у молодых крыс в условиях действия в организме L-NAME (25 мг/кг) статистически значимых различий между анализируемыми группами по размеру зоны риска в миокарде левого желудочка не выявлено. Установлено, что

размер зоны некроза в миокарде левого желудочка у животных в группе И/Р составил $45 \pm 4 \%$, в группе И/Р + L-NAME – $46 \pm 6 \%$, в группе И/Р + Физ. р-р – $45 \pm 6 \%$, в группе И/Р + ПостЛ – $33 \pm 3 \%$ ($p < 0,01$ в сравнении с группами И/Р, И/Р + L-NAME и И/Р + Физ. р-р) и в группе И/Р + L-NAME + ПостЛ – $44 \pm 4 \%$ ($p > 0,05$ в сравнении с группами И/Р, И/Р + L-NAME и И/Р + Физ. р-р; $p < 0,01$ в сравнении с группой И/Р + ПостЛ) (рисунок 2).



* – $p < 0,01$ – различия статистически значимы; ns – различия статистически не значимы

Рис. 2 – Влияние ПостЛ на размеры зоны некроза в миокарде левого желудочка у молодых крыс в условиях системного действия в организме животных L-NAME (25 мг/кг)

Таким образом выявлено, что в условиях системного действия в организме молодых животных ингибитора NO-синтазы L-NAME (25 мг/кг), введение которого в кровотоки осуществлялось сразу после острой ишемии миокарда и за 25 минут до выполнения ПостЛ, ослабляется инфаркт-лимитирующий эффект ПостЛ (10 мг/кг), так как в левом желудочке сердца имела место более обширная (на 33,3 %, $p < 0,01$, $n = 12$) зона некроза в сравнении с группой И/Р + ПостЛ.

Выводы: в условиях системного действия в организме молодых животных ингибитора NO-синтазы L-NAME в дозе 25 мг/кг (внутривенное введение сразу после острой ишемии миокарда) устраняет инфаркт-лимитирующий эффект ПостЛ. После внутривенного введения животным L-NAME ПостЛ у молодых крыс при ишемии-реперфузии миокарда сопровождается формированием в левом желудочке сопоставимых по размеру зон некроза с группами контроля.

Литература

1. Lactate metabolism: historical context, prior misinterpretations, and current understanding / B. S. Ferguson [et al.] // Eur J Appl Physiol. – 2018. – Vol. 118, № 4. – P. 691–728.
2. Brooks, G. A. The science and translation of lactate shuttle theory / G. A. Brooks // Cell Metabolism. – 2018. – Vol. 27, N 4. – P. 757–785.
3. 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.
4. Free radical scavenging and antioxidant effects of lactate ion: an in vitro study / C. Groussard [et al.] // J. Appl Physiol (1985). – 2000. – Vol. 89, № 1. – P. 169–175.
5. Чепелев, С. Н. Инфаркт-лимитирующая эффективность фармакологического посткондиционирования с помощью молочной кислоты при ишемии-реперфузии миокарда в эксперименте / С. Н. Чепелев, Ф. И. Висмонт // Мед. журн. – 2021. – № 1. – С. 104–109.