

С.Н. Чепелев, Ф.И. Висмонт, С.В. Губкин, П.Ф. Юшкевич, Е.Н. Чепелева
ОСОБЕННОСТИ ИНФАРКТ-ЛИМИТИРУЮЩЕГО ЭФФЕКТА
ПОСТКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ С ПОМОЩЬЮ L-ЛАКТАТА ПРИ
ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ МИОКАРДА У КРЫС В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИХ
ВОЗРАСТА В УСЛОВИЯХ ДЕЙСТВИЯ В ОРГАНИЗМЕ ЖИВОТНЫХ
БЛОКАТОРА МУСКАРИНОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ХОЛИНОРЕАКТИВНЫХ
СИСТЕМ АТРОПИНА

*Кафедра патологической физиологии,
 Научно-исследовательская часть
 Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск*

S.N. Chepelev, F.I. Vismont, S.V. Gubkin, P.F. Yushkevich, E.N. Chepeleva
FEATURES OF THE INFARCTION-LIMITING EFFECT OF
POSTCONDITIONING WITH L-LACTATE FOR MYOCARDIAL ISCHEMIA-
REPERFUSION IN RATS DEPENDING ON THEIR AGE UNDER CONDITIONS
OF ACTION IN THE ANIMALS OF A BLOCKER OF MUSCARINE-SENSITIVE
CHOLINOREACTIVE SYSTEMS ATROPINE

*Department of Pathological Physiology,
 Scientific Research Section
 Belarusian State Medical University, Minsk*

Резюме. По результатам проведенного исследования выявлено, что в условиях системного действия в организме животных блокатора мускариночувствительных холинореактивных систем (М-ХРС) атропина инфаркт-лимитирующий эффект посткондиционирования с помощью L-лактата (ПостЛ) сохраняется только у старых крыс. Таким образом, активность М-ХРС имеет значение в механизмах реализации инфаркт-лимитирующего эффекта ПостЛ у молодых, но не у старых крыс.

Ключевые слова: миокард, ишемия, реперфузия, инфаркт-лимитирующий эффект, посткондиционирование, L-лактат, атропин.

Resume. According to the results of the study, it was revealed that under conditions of systemic action in the body of animals of the blocker of muscarinic-sensitive cholinoreactive systems (M-CRS) atropine, the myocardial infarct size-limiting effect of postconditioning with L-lactate (PostL) is preserved only in old rats. Thus, the activity of M-CRS is important in the mechanisms of implementation of the infarct-limiting effect of PostL in young, but not in old rats.

Keywords: myocardium, ischemia, reperfusion, infarct-limiting effect, postconditioning, L-lactate, atropine.

Актуальность. Наиболее распространенной причиной смерти является ишемическая болезнь сердца, на которую по данным ВОЗ приходится 16 % от общего числа смертей в мире. В связи с этим поиск новых эффективных методов предотвращения или ослабления ишемического повреждения миокарда и выяснение механизмов его реализации остается актуальной задачей современной экспериментальной и клинической медицины.

За последнее десятилетие данные ряда фундаментальных научных и клинических исследований подтвердили, что дистантное ишемическое посткондиционирование (ДИПост) является эффективным методом снижения реперфузионного повреждения [1-4]. Так, в исследовании М. Basalay и соавт. (2012) на крысах продемонстрировано, что ДИПост путем 15-минутной ишемии задних

конечностей, осуществляемой с 10-й по 25-ю мин реперфузии, оказывает выраженное инфаркт-лимитирующее действие на миокард и приводит к уменьшению размера зоны некроза миокарда левого желудочка на 48 % ($p < 0,001$) [4].

Принимая во внимание известные факты о том, что ишемия органов и тканей, в том числе возникающая во время ДИПост, сопровождается повышением в крови уровня L-лактата, который в свою очередь вызывает расширение коронарных сосудов за счет выделения эндотелием NO [5, 6], а также способен ингибировать перекисное окисление липидов и свободнорадикальные процессы [7, 8], выраженность которых при реперфузии возрастает, и может использоваться тканями, особенно миокардом, после гипоксии в большей степени, чем глюкоза [8], были основания полагать, что повышенный уровень L-лактата в крови (гиперлактатемия) может уменьшить реперфузионное повреждение миокарда, а соответственно, иметь значение в реализации кардиопротекторных эффектов ДИПост. Так, в проведенном авторами в 2020 г. исследовании было установлено, что после воспроизведения ДИПост у экспериментальных животных в крови повышается уровень L-лактата, а посткондиционирования с помощью L-лактата (ПостЛ), путем введения нейтрализованного L-лактата на 25-й минуте реперфузии в дозе 10 мг/кг частично имитирует инфаркт-лимитирующий эффект ДИПост и приводит к снижению размеров зоны некроза в миокарде левого желудочка на 28,2 % ($p < 0,01$), т.е. ослабляет повреждение сердца, вызываемое ишемией и реперфузией [9].

Учитывая, что в организме старых животных происходят значительные морфофункциональные и биохимические изменения [10], были основания полагать, что возрастные изменения органов и тканей и, в частности, изменения в них активности мускариночувствительных холинореактивных систем (М-ХРС), могут оказывать существенное влияние на инфаркт-лимитирующую эффективность ПостЛ у крыс в зависимости от их возраста.

Цель: выяснить особенности инфаркт-лимитирующего эффекта ПостЛ при ишемии-реперфузии миокарда у крыс в зависимости от их возраста в условиях системного действия в организме животных блокатора М-ХРС атропина.

Материалы и методы. Исследование проведено на 141 наркотизированных нелинейных белых крысах-самцах, разделенных на две возрастные группы: 58 молодых крыс массой 200–250 г и в возрасте 3–5 месяцев и 73 старые крысы массой 400–450 г и в возрасте 23–25 месяцев. Все животные в начале эксперимента перед 30-минутной ишемией и последующей 120-минутной реперфузией миокарда были разделены на 8 групп (рис. 1).

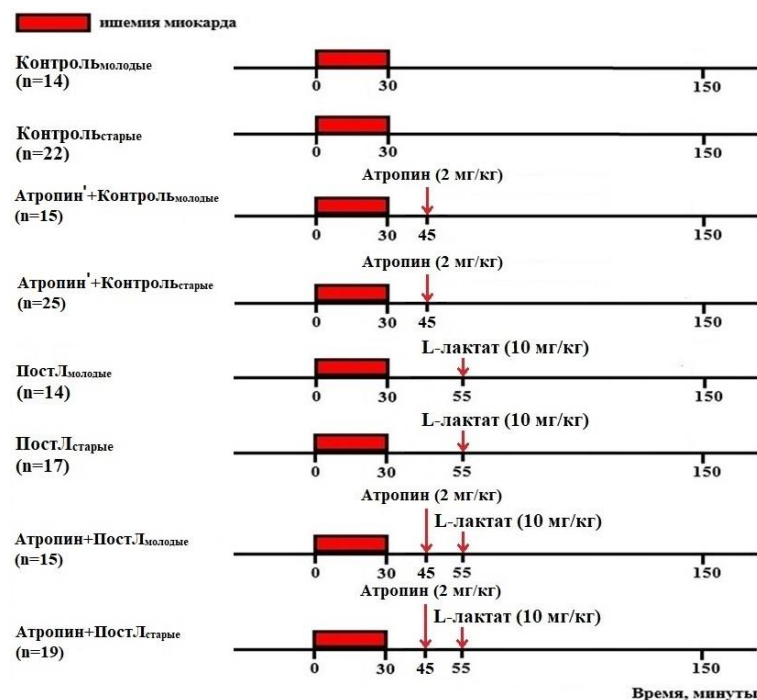


Рис. 1 – Схема эксперимента для изучения инфаркт-лимитирующего эффекта ПостЛ у крыс в условиях действия в организме животных блокатора М-ХРС атропина

Животных наркотизировали внутрибрюшинно вводя тиопентал натрия в дозе 50 мг/кг, после чего переводили на искусственное дыхание. Грудную клетку у крыс вскрывали в IV межреберном промежутке слева. После стабилизации гемодинамики крысам выполняли 30-мин. окклюзию левой коронарной артерии (ЛКА) путем пережатия фишкой. Реперфузия (120 мин) достигалась удалением фишки.

ПостЛ моделировали путем введения через 25 мин от начала реперфузии в левую внутреннюю яремную вену 0,5 мл 40 мМоль нейтрализованного раствора L-молочной кислоты (Sigma-Aldrich, США) до L-лактата, т. е. в дозе 10 мг/кг.

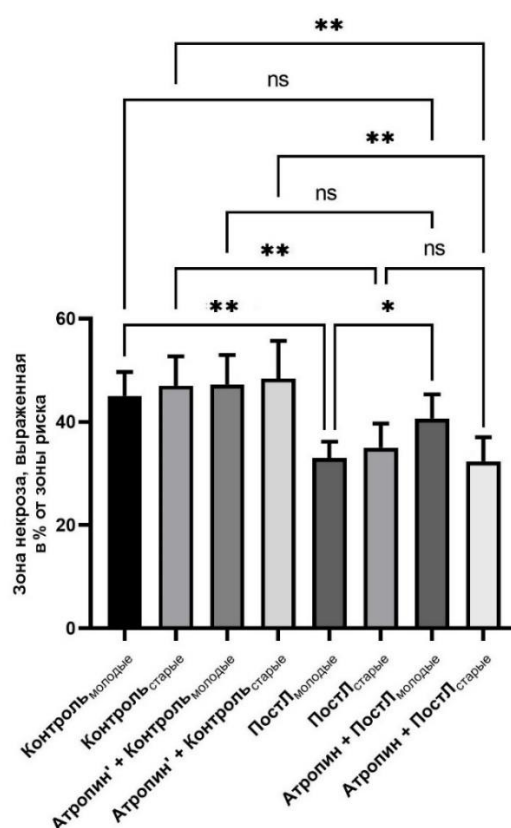
С целью выяснения значимости М-ХРС в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта ПостЛ при ишемии-реперфузии миокарда, крысам выполнялось однократное введение в левую внутреннюю яремную вену 0,2 %-го раствора М-холиноблокатора атропина (Sigma-Aldrich, США) в дозе 2 мг/кг, которое осуществлялось за 10 минут до воспроизведения у крыс ПостЛ.

Зону риска определяли путем введения в левую общую яремную вену 0,5 мл 5% р-ра синьки Эванса в конце реперфузии при кратковременной повторной окклюзии ЛКА. Зона риска определялась как зона не окрашенная в синий цвет. Затем сердце извлекали и отделяли левый желудочек. После замораживания (-20°C в течение 30 мин) из левого желудочка изготавливали 6 поперечных срезов. Срезы взвешивали и сканировали с обеих сторон. После этого, для идентификации зоны некроза (ЗН), срезы помещали в 1% р-р трифенилтетразолия хлорида на 15 мин при температуре 37°C . При этом жизнеспособный миокард окрашивался в кирпично-красный цвет, а некротизированная ткань была белесой. После 24-часовой инкубации срезов в 10% р-ре формалина срезы сканировали повторно с обеих сторон. При помощи программы Adobe Photoshop CC 2017 для каждого среза определяли ЗН.

Полученные данные анализировались с использованием программы GraphPad Prism 9.3.1. Размер ЗН оценивали с помощью ANOVA с использованием тестов

множественных сравнений Данна и Бонферрони, при этом результаты представлялись в виде: среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$). Уровень $p < 0,05$ рассматривался как статистически значимый.

Результаты и их обсуждение. Установлено, что размер ЗН в миокарде левого желудочка у животных в группе Контроль_{молодые} составил $45 \pm 4 \%$, а в группе Контроль_{старые} – $47 \pm 5 \%$. В контрольных группах крыс, которым осуществлялось введение на 15-й минуте реперфузии блокатора М-ХРС атропина в дозе 2 мг/кг, формировались следующие размеры ЗН: в группе Атропин' + Контроль_{молодые} – $47 \pm 5 \%$, а в группе Атропин' + Контроль_{старые} – $48 \pm 7 \%$. После внутривенного введения животным L-лактата (10 мг/кг), которое осуществлялось через 25 минут после начала реперфузии, у крыс при ишемии и реперфузии миокарда в левом желудочке формировались следующие размеры ЗН: в группе ПостЛ_{молодые} – $33 \pm 3 \%$ ($p < 0,01$ в сравнении с группами Контроль_{молодые} и Атропин' + Контроль_{молодые}), а в группе ПостЛ_{старые} – $35 \pm 4 \%$ ($p < 0,01$ в сравнении с группами Контроль_{старые} и Атропин' + Контроль_{старые}). Размер ЗН в группах молодых и старых животных, которым на 15-й минуте реперфузии вводили блокатор М-ХРС атропин (2 мг/кг), а затем внутривенно вводили L-лактат, был следующим: в группе Атропин + ПостЛ_{молодые} – $41 \pm 4 \%$, а в группе Атропин + ПостЛ_{старые} – $32 \pm 4 \%$ ($p < 0,01$ в сравнении с группами Контроль_{старые} и Атропин' + Контроль_{старые}) (рис. 2).



Примечание – * / ** – $p < 0,05$ / $p < 0,01$ – различия статистически значимы; ns – различия не достоверны

Рис. 2 – Влияние ПостЛ на размеры ЗН в миокарде левого желудочка во время ишемии-реперфузии миокарда у молодых и старых крыс в условиях системного действия в организме животных атропина (2 мг/кг)

Следовательно, полученные результаты свидетельствуют о наличии выраженного инфаркт-лимитирующего эффекта ПостЛ у молодых и старых крыс. Однако в условиях системного действия в организме животных блокатора М-ХРС атропина (2 мг/кг) у молодых крыс ПостЛ оказывало менее выраженный инфаркт-лимитирующий эффект. У старых животных в условиях системного действия в их организме атропина инфаркт-лимитирующий эффект ПостЛ сохранялся.

Выводы. В условиях системного действия в организме животных блокатора М-ХРС атропина (2 мг/кг), который вводился за 10 мин до воспроизведения ПостЛ, инфаркт-лимитирующий эффект ПостЛ сохранялся только у старых крыс. После введения в организм животных атропина ПостЛ у старых крыс приводил к уменьшению размеров зоны некроза в миокарде левого желудочка на 31,9 % ($p < 0,01$) в сравнении с контрольной группой старых животных. У молодых крыс в этих условиях ПостЛ при ишемии-реперфузии миокарда не оказывало своего кардиопротекторного эффекта и сопровождалось формированием в левом желудочке сопоставимых по размеру с группой контроль зон некроза.

Литература

1. Островский Ю.П., Гореликов А.В., Карпелёв Г.М. Ишемическое посткондиционирование миокарда. – Нац. акад. наук Беларуси, Отд-ние мед. наук. – Минск : Беларуская навука, 2021. – 171 с.
2. Кардиопротективные эффекты ишемического кондиционирования: современные представления о механизмах, экспериментальные подтверждения, клиническая реализация / А. Е. Баутин, Л. И. Карпова, А. О. Маричев [и др.] // Трансляционная медицина. – 2016. – Т. 3, № 1. – С. 50–62.
3. Кардиопротективный эффект дистантного посткондиционирования: механизмы и возможность клинического применения / Л. Н. Маслов, С. Ю. Цибульников, А. В. Цепкина [и др.] // Клин. медицина. – 2016. – Т. 94, № 9. – С. 650–656.
4. Remote ischaemic pre- and delayed postconditioning – similar degree of cardioprotection but distinct mechanisms / M. Basalay, V. Barsukevich, S. Mastitskaya [et al.] // Experimental Physiology. – 2012. – Vol. 97, № 8. – P. 908–917.
5. Totzeck, M. Nitrite-Nitric Oxide Signaling and Cardioprotection / M. Totzeck., U. B. Hendgen-Cotta, T. Rassaf // Advances in Experimental Medicine & Biology. – 2017. – Vol. 982. – P. 335–346.
6. Nitric oxide-mediated relaxation to lactate of coronary circulation in the isolated perfused rat heart / J. J. Montoya, N. Fernández, L. Monge [et al.] // J Cardiosvasc Pharmacol. – 2011. – Vol. 58, № 4. – P. 392–398.
7. Free radical scavenging and antioxidant effects of lactate ion: an in vitro study/ C. Groussard, I. Morel, M. Chevanne [et al.] // J. Appl Physiol (1985). – 2000. – Vol. 89, № 1. – P. 169–175.
8. Brooks, G. A. Role of the Heart in Lactate Shuttling / G. A. Brooks // Front Nutr. – 2021. – Vol. 8. – Art. ID 663560. – P. 1–10.
9. Чепелев, С. Н. О значимости гиперлактатемии в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта дистантного ишемического посткондиционирования при ишемии-реперфузии миокарда в эксперименте / С. Н. Чепелев, Ф. И. Висмонт, С. В. Губкин // Докл Нац Акад Наук Беларуси. – 2020. – Т. 64, № 3. – С. 332–340.
10. Freeling, J. L. Age-related attenuation of parasympathetic control of the heart in mice / J. L. Freeling, Y. Li // Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol. – 2015. – Vol. 7. – P. 126–135.