

The effect of lactate on the normoxic, ischemic and reperfused heart

Citation for published version (APA):

de Groot, M. J. M. (1992). *The effect of lactate on the normoxic, ischemic and reperfused heart*. Rijksuniversiteit Limburg. <https://doi.org/10.26481/dis.19920326mg>

Document status and date:

Published: 01/01/1992

DOI:

[10.26481/dis.19920326mg](https://doi.org/10.26481/dis.19920326mg)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

SUMMARY

In this thesis the influence of exogenous lactate (5 mM) on hemodynamic and metabolic properties of the heart under normoxic, ischemic and reperfused conditions was studied.

The isolated working rat heart was used as a standard model. To establish the effect of lactate and to elucidate mechanisms involved, hearts were perfused with either glucose (11 mM), glucose (11 mM) plus lactate (5 mM) or glucose (11 mM) plus pyruvate (5 mM).

During 120 min of perfusion exogenous lactate was well tolerated by the normoxic heart (chapter 2). Exogenous lactate reduced the decline in functional performance compared to glucose perfused hearts. Likewise, pyruvate improved cardiac stability in normoxic hearts during prolonged perfusion. Endogenous glycogen and triacylglycerol pools were preserved in both lactate and pyruvate hearts. In glucose hearts these endogenous substrate pools became depleted. Unlike pyruvate and glucose, lactate stimulated the turnover of triacylglycerols throughout the perfusion period. Increased availability of glycerol-3-phosphate may be involved in control of triacylglycerol turnover.

The cardiac tolerance for extracellular lactate under ischemic and reperfused conditions was dependent on ischemia time (chapter 3-6). After 15 min of ischemia, lactate did not influence hemodynamic recovery. However, cardiac function was severely impaired after 30 and 45 min of ischemia in lactate hearts compared to glucose hearts. Pyruvate perfused hearts demonstrated improved functional recovery after 30 min of ischemia, but inferior function after 45 min of ischemia compared to glucose hearts. The release of lactate dehydrogenase (chapter 3) implied marked cell damage in lactate hearts after 30 min of ischemia and in all groups of hearts after 45 min of ischemia.

The glycolysis process was evaluated as a possible determinant of hemodynamic recovery (chapter 3). No protective role of either high or low glycogen stores prior to ischemia could be observed. Accumulation of lactate, glycerol-3-phosphate and total NADH (parameters related to glycolysis) during ischemia did not seem to be responsible for the diversity of cardiac function either.

Deprivation of coronary flow as well as subsequent reperfusion caused characteristic changes in lipid metabolism (chapter 4). During the first fifteen minutes of ischemia, the turnover of triacylglycerols was increased in all groups of hearts as suggested by glycerol accumulation and concomitantly maintained levels of triacylglycerols. After 15 min of ischemia glucose and lactate hearts started to accumulate fatty acids. Fatty acid levels were more elevated in glucose hearts than in lactate hearts. In pyruvate hearts fatty acid accumulation was retarded. By reperfusion, fatty acid levels were further increased in lactate and pyruvate hearts, whereas in glucose hearts the fatty acid content returned to control values. Although no net changes were found for the phospholipid content, arachidonic acid accumulation during ischemia and reperfusion suggested degradation of phospholipids. Further, during reperfusion the content of triacylglycerols was maintained at a constant level, but the activity of the triacylglycerol cycle was increased in lactate hearts when the preceding time of ischemia was 30 min. The glucose and pyruvate reperfused hearts also demonstrated elevated rates of cycling of triacylglycerols after 45 min of

ischemia. No direct correlation between ischemic lipid changes and postischemic recovery was found. However, lipid disturbances during reperfusion occurred simultaneously with functional impairment of the postischemic hearts. The causal relationship remains to be established.

The content of high-energy phosphates was decreased after ischemia whereas the content of breakdown products was increased (chapter 5). Lactate did not stimulate the degradation of high-energy phosphates compared to glucose or pyruvate. During reperfusion degradation products were washed out. When preceded by 30 min of ischemia, the lactate hearts showed higher amounts of purine release and lower levels of high-energy phosphates at the end of reperfusion compared to pyruvate hearts. At this time point there was no difference of high-energy phosphate content or purine release between lactate and glucose hearts. Following 45 min of ischemia, ATP and GTP levels remained severely depressed in lactate hearts, but were partly restored in glucose and pyruvate hearts. Degradation products were incompletely washed out both in lactate and pyruvate hearts. Accumulation of purines in tissue at the end of reperfusion was most pronounced in lactate hearts. A relationship between the changes in energy metabolism and hemodynamic recovery could not be established.

Myocardial metabolism depends on the supply of substrates and oxygen which is available by coronary flow through the capillaries. Lactate did not influence the distribution of coronary flow over the inner and outer layers of the left ventricular tissue during the preischemic normoxic phase (chapter 6). Following 15 min of ischemia, all groups of hearts increased coronary flow (hyperemic response) in both the inner and outer layers of the myocardium at the onset of reperfusion. After 30 min of ischemia, there was no increase of flow through the inner layers in lactate and glucose hearts. Flow in the inner layers of lactate hearts was even transiently depressed. In contrast, pyruvate hearts were still able to raise flow above preischemic levels. After 45 min of ischemia, all substrate groups demonstrated lowered coronary flow in the inner layers of the myocardium at the onset of reperfusion. In lactate hearts flow through the inner layers remained depressed during continued reperfusion. Likewise, flow did not recover in pyruvate hearts but the disturbance was less severe than in lactate hearts. In contrast, in glucose hearts flow through the inner layers returned to preischemic levels. These findings indicate that lactate may aggravate an ischemic insult by causing (transient) underperfusion of the inner layers of the ischemic myocardium after reinstallation of flow.

Finally, special attention was paid to the validity of glycerol release as a measure of lipolysis. Chapter 7 shows that the heart contains glycerol-3-phosphate hydrolysing activity. In cardiac homogenates, the apparent V_{max} value of the hydrolysis of glycerol-3-P at pH 7.2 was $0.25 \pm 0.03 \mu\text{mol P/g wet weight}\cdot\text{min}$ while the K_m value was estimated to be $2.86 \pm 0.96 \text{ mM}$. The hydrolysing activity increased when the pH was decreased from 7.2 to 5.0 (this pH range covers the range of acidosis in ischemic hearts). At pH 5.0, the apparent V_{max} and K_m values were $0.94 \pm 0.11 \mu\text{mol P/g wet weight}\cdot\text{min}$ and $4.24 \pm 1.12 \text{ mM}$, respectively. Under normal normoxic circumstances, the content of glycerol-3-phosphate in cardiac tissue is far below the K_m value measured at pH 7.2. However, under ischemic circumstances the content of glycerol-3-P may amount to levels close to the K_m value measured at pH 5.0. Hence, glycerol-3-phosphate hydrolysis may contribute to glycerol production under ischemic circumstances.

In conclusion, lactate improves cardiac stability during prolonged normoxic perfusion, but impairs hemodynamic function after 30 min of ischemia. There is no correlation between postischemic hemodynamic recovery and glycolytic flux, lipid changes or degradation of high-energy phosphates during ischemia. During reperfusion, lipid disturbances occur simultaneously with functional impairment in the lactate hearts. In addition, lactate-induced underperfusion in the inner layers of the myocardium during reperfusion seems to be related to functional impairment. Future research should focus on the responsible mechanism for underperfusion of the left ventricular inner layers of the heart by lactate.

SAMENVATTING

De hartspier heeft zuurstof en substraten nodig om in zijn energiebehoefte te voorzien. Onder normale omstandigheden zijn vetzuren, glucose, lactaat en pyruvaat geschikte voedingsstoffen voor het hart. Lactaat blijkt kwantitatief een belangrijke bijdrage als energiebron te leveren wanneer de concentratie lactaat in het bloed stijgt. Een verhoogde lactaatconcentratie treedt o.a. op bij fysieke inspanning tijdens sport. Voor de verbranding van lactaat is zuurstof nodig. Het gezonde hart krijgt voldoende zuurstof aangeboden vanuit het bloed om lactaat te oxyderen. Deze situatie verandert echter wanneer de doorbloeding van het hart gestoord is (ischemie). Hierdoor ontstaat een zuurstof tekort in het hart en gaat het hart zelf lactaat produceren. Tijdige opheffing van ischemie maakt herstel van de hartspierfunctie mogelijk. Er zijn aanwijzingen dat de aanwezigheid van de circulerende substraten hierbij van invloed is. Het doel van dit onderzoek was om het effect van een verhoogde exogene lactaat concentratie op het postischemisch herstel van het hart te bestuderen. Tevens werd aandacht geschonken aan de functionele en metabole veranderingen in het hart tijdens langdurige normoxische perfusie.

Het onderzoek werd uitgevoerd met behulp van geïsoleerde ratteharten die volgens het werkende (=ejecterende) hartmodel geperfundeerd werden. Het perfusiemedium was een gemodificeerde Krebs-Henseleit buffer waarin standaard glucose (11 mM) als substraat aanwezig was. Lactaat of pyruvaat werd extra toegevoegd (concentratie 5 mM). Er werd een vergelijking gemaakt tussen glucose, glucose plus lactaat en glucose plus pyruvaat geperfundeerde harten om meer inzicht te verkrijgen in het werkingsmechanisme van lactaat. Glucose werd gekozen als controle t.o.v. lactaattoevoeging. Pyruvaat werd bestudeerd omdat lactaat en pyruvaat vrijwel identieke verbindingen zijn in de metabole route (pyruvaat is de geoxideerde vorm van lactaat).

Gedurende twee uren normoxische perfusie bleek de combinatie exogeen lactaat en glucose een beter behoud van de hemodynamische functie te waarborgen dan glucose alleen (hoofdstuk 2). Ook in pyruvaat harten bleef de stabiliteit beter gehandhaafd dan in glucose harten. Hiervoor werd geen aanspraak gemaakt op de endogene substraatbronnen in het hart. In de glucose harten daarentegen werd energie geput uit de endogene glycogeen en triacylglycerol voorraad. Opvallend was dat lactaat de omzetting van de triacylglycerol voorraad verhoogde. Dit betekent dat de synthese en afbraak van triacylglycerolen sneller verloopt. Een verhoogd glycerol-3-fosfaat aanbod zou hiervoor de aanleiding kunnen vormen. Glycerol-3-fosfaat is betrokken bij de synthese van triacylglycerolen.

De tolerantie van de hartspier voor exogeen lactaat na blootstelling aan ischemie bleek afhankelijk te zijn van de tijdsduur (hoofdstuk 3-6). Na een ischemische periode van 15 minuten werd het hemodynamisch herstel nauwelijks beïnvloed door exogeen lactaat. Echter na 30 minuten ischemie verslechterde de hemodynamische functie aanzienlijk in lactaat harten ten opzichte van glucose of pyruvaat harten. Na 45 minuten ischemie ging ook het hemodynamisch herstel in pyruvaat harten verloren terwijl glucose harten nog een matig herstel van functie vertoonden. Het verhoogde verlies aan lactaatdehydrogenase, een enzym dat zich in het cytoplasma bevindt, wijst op het lek raken van cellen in lactaat harten die blootgesteld waren aan 30 minuten ischemie (hoofdstuk 3). In de glucose en pyruvaat groep werd een aanzienlijk verlies

van lactaatdehydrogenase geconstateerd na 45 minuten ischemie.

De verminderde ischemie tolerantie van de hartspier in aanwezigheid van extracellulair lactaat bleek niet gerelateerd te zijn aan parameters uit de glycolyse (hoofdstuk 3). Noch een beschermende werking van glycogeen (de bron voor glycolyse) noch een schadelijk effect van de eindproducten van de glycolyse (melkzuur, glycerol-3-fosfaat of NADH) kon worden vastgesteld.

Tijdens ischemie en reperfusie traden veranderingen op in het vetmetabolisme (hoofdstuk 4). Reeds vroeg in de ischemische fase was de omzetting van de triacylglycerol voorraad verhoogd in de drie groepen maar deze verhoging bleef niet gehandhaafd. In de glucose en lactaat groep trad vervolgens vetzuur accumulatie op. Deze ophoping was iets hoger in de glucose harten dan in de lactaat harten. In de pyruvaat groep was de accumulatie van vetzuren enigszins vertraagd. Gedurende reperfusie zette de stapeling van vetzuren zich voort in lactaat en pyruvaat harten. Echter in glucose harten werd de endogene vetzuurinhoud hersteld tijdens reperfusie. De belangrijke bijdrage van arachidonzuur, een vetzuur dat voornamelijk is ingebouwd in fosfolipiden, impliceert dat membraanfosfolipiden werden afgebroken. Omdat de totale vetzuurstapeling slechts een gering percentage van de totale fosfolipide voorraad reflecteert, werden er geen veranderingen in de totale fosfolipide inhoud waargenomen. Ook de totale triacylglycerol voorraad bleef behouden gedurende ischemie en reperfusie. Tijdens reperfusie bleek de omzetting van de triacylglycerolen gestimuleerd te worden in lactaat harten blootgesteld aan 30 minuten ischemie. Na 45 minuten ischemie werd de omzetting van de triacylglycerol voorraad ook in glucose en pyruvaat harten verhoogd.

Stapeling van vetzuren tijdens ischemie bleek niet gerelateerd te zijn aan het postischemisch hemodynamische herstel. Lipidstoornissen tijdens reperfusie leken wel enigszins geassocieerd te zijn met de mate van herstel.

Tijdens ischemie kon de beperkte energieleverantie niet voldoen aan de energiebehoefte van de hartspier (hoofdstuk 5). Energierijke fosfaten (creatine fosfaat, ATP en GTP) werden afgebroken en afbraakproducten accumuleerden. De lactaat harten werden hierbij niet benadeeld ten opzichte van glucose of pyruvaat harten. Tijdens reperfusie werden afbraakproducten uitgewassen. Hierdoor is geen volledig herstel van de ATP en GTP inhoud mogelijk. In dit opzicht vertoonden de lactaat harten een hogere uitwas van afbraakproducten en een lagere inhoud aan ATP en GTP na 30 minuten ischemie en 35 minuten reperfusie vergeleken met pyruvaat harten. Op dit tijdstip was er geen verschil tussen lactaat en glucose harten. Na 45 ischemie waren de lactaat harten niet meer in staat het gehalte aan energierijke fosfaten te herstellen tijdens reperfusie. De glucose en pyruvaat harten daarentegen vertoonden een matig herstel van het gehalte aan energierijke fosfaten. De afbraakproducten bleven sterk verhoogd aanwezig in het weefsel van de lactaat harten na 45 minuten ischemie en 35 minuten reperfusie. Ook in pyruvaat harten was de uitwas van purines niet volledig. Veranderingen in het energie metabolisme vertoonden geen directe relatie met de mate van postischemisch herstel.

Voor aanvoer van zuurstof en substraat naar de hartcellen is coronaire doorbloeding noodzakelijk. Hoofdstuk 6 beschrijft de invloed van lactaat op de doorbloeding door de binnenste en buitenste lagen van het linker ventrikel. Onder normoxische omstandigheden werden de binnenste lagen van een hogere doorbloeding voorzien dan de buitenste lagen. Lactaat bracht hierin geen verandering teweeg. Echter na blootstelling aan ischemie versnelde lactaat het optreden van

onderperfusie in de binnenste lagen. Na 15 minuten ischemie waren de lactaat harten nog in staat de doorbloeding bij aanvang van reperfusie te verhogen in zowel de binnenste als buitenste lagen van het linker ventrikel (reactieve hyperemie). Deze respons verdween voor de binnenste lagen na 30 minuten ischemie. De binnenste lagen werden zelfs tijdelijk ondergeperfundeed. Na 45 minuten ischemie bleven de binnenste lagen verstoken van voldoende doorbloeding tijdens de gehele reperfusie fase. In glucose harten verdween ook na 30 minuten ischemie de verhoogde doorbloedingsrespons in de binnenste lagen bij aanvang van reperfusie. Echter hierbij trad geen onderperfusie op zoals in de lactaat harten. Na 45 minuten ischemie was de onderperfusie in de binnenste lagen slechts van tijdelijke aard. In tegenstelling tot de lactaat en glucose harten, waren de pyruvaat harten na 30 minuten ischemie nog in staat hun doorbloeding door de binnenste lagen te verhogen bij aanvang van reperfusie. Daarentegen trad in deze harten een permanente onderperfusie van de binnenste lagen op na 45 minuten ischemie. De doorbloeding bleek in mindere mate verlaagd te zijn dan in de lactaat harten. Onderperfusie in de binnenste lagen van het linkerventrikel hangt mogelijk samen met een slechter hemodynamisch herstel. Lactaat verkort hierbij het tijdsinterval waarin de veranderingen optreden.

Ter aanvulling op hoofdstuk 2 en hoofdstuk 4 werd in hoofdstuk 7 de uitwas van glycerol als maat voor lipolyse nader in het licht gesteld. In harthomogenaten werd aangetoond dat het hart hydrolytische activiteit vertoont ten aanzien van glycerol-3-fosfaat en dus dat een directe omzetting van glycerol-3-fosfaat naar glycerol mogelijk is. De hydrolytische activiteit bleek pH afhankelijk d.w.z. een hogere activiteit bij pH 5.0 dan bij pH 7.2. Het onderzochte pH gebied, pH 7.2 tot pH 5.0, reflecteert het interval waarover pH verlaging kan optreden tijdens ischemie. Onder ischemische omstandigheden stijgt de glycerol-3-fosfaat concentratie in het hart tot nabij de K_m waarde (pH 5.0). Het is daarom niet uitgesloten dat directe defosforylatie van glycerol-3-fosfaat bijdraagt aan glycerol productie in het hart tijdens ischemie.

Samenvattend kan gesteld worden dat lactaat de hemodynamische stabiliteit van het hart verbetert tijdens normoxie, maar dat lactaat het hemodynamisch herstel verslechtert na een ischemisch tijdsinterval van 30 minuten. Er is geen eenduidige relatie gevonden tussen de mate van herstel en verscheidene metabole veranderingen (glycogenolyse, glycolyse, lipid verstoringen, afbraak energie rijke fosfaten) tijdens ischemie. Daarentegen traden lipid veranderingen tijdens reperfusie gelijktijdig op met de afname van de hemodynamische functie. Verder lijkt onderperfusie van de binnenste lagen van het linker ventrikel tijdens reperfusie samen te hangen met een slechter hemodynamisch herstel in de lactaat harten. Het mechanisme dat verantwoordelijk is voor onderperfusie verdient nadere aandacht in de toekomst.