

На правах рукописи



Говорушкина Наталия Станиславовна

Эффекты модуляции рецепторов N-метил-D-аспартата в изолированном сердце крысы во время ишемии и реперфузии

3.3.3. Патологическая физиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2023

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор
доктор медицинских наук, профессор

Болевич Сергей Бранкович
Яковлевич Владимир

Официальные оппоненты:

Ломакин Никита Валерьевич - доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центральная клиническая больница с поликлиникой» Управления делами Президента Российской Федерации, отделение кардиологии №2, заведующий отделением

Осиков Михаил Владимирович - доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра патологической физиологии, заведующий кафедрой

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Защита диссертации состоится «21» марта 2023 г. в 14.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.25 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119992, г. Москва, ул. Трубецкая, д.8. строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1 и на сайте организации: www.sechenov.ru.

Автореферат разослан « _____ » _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор



Калюжин Олег Витальевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Рецепторы N-метил-D-аспартата (NMDA) относятся к группе ионотропных рецепторов глутамата, которые играют роль в синаптической передаче возбуждения, открывая лиганд-зависимые трансмембранные ионные каналы. Для адекватного функционирования NMDA-рецепторов необходимо, чтобы в их структуре содержались две глутаматных субъединицы N1 (GluN1) и две глутаматных субъединицы N2 (GluN2), или одна субъединица GluN2 и одна глутаматная субъединица N3 (GluN3). Поскольку субъединицы GluN1 и GluN3 связывают глицин, а GluN2 представляет собой глутамат, для активации рецептора NMDA требуется действие обоих коагонистов, глицина и глутамата [Traynelis S.F., 2010]. Нарушение активности рецептора NMDA связано с рядом неврологических заболеваний. Ключевым расстройством при болезни Альцгеймера является неадекватная регуляция индуцированной амилоидом бета(A β)-активности NMDA-рецептора [Переверзев А.П., 2019].

Несколько десятилетий назад результаты некоторых исследований показали возможность существования NMDA-рецепторов и вне нервных тканей [Collingridge G.L., 2009]. Существуют данные об их распространенности в большом количестве тканей и органов, в том числе и в сердце, где они впервые были обнаружены в кардиомиоцитах крысы [Vyklisky V., 2014]. Исследование временного и пространственного распределения в тканях радиоактивно меченных антагонистов NMDA-рецепторов ($[^3\text{H}]$ CGS и $[^3\text{H}]$ МК-801) выявило их широкое распространение в ряде органов, таких как сердце, легкие, почки и желудок [Lin, J.W., 1998]. Также имеются данные о NMDA-рецепторах в эндотелии кровеносных сосудов в разных частях тела. Введение глутамата и D-серина (которые связываются с глицином) вызывает активацию NMDA рецепторов, которые активируют эндотелиальную синтазу оксида азота (eNOS), что приводит к увеличению продукции оксида азота (NO) и вазодилатации в мозговых артериях. Этот каскад опосредуется астроцитами, которые накапливают глутамат и D-серин и выделяют их в зависимости от активности нервной системы [Sattler, R., 1999]. Изучение влияния гомоцистеина и механизмов, посредством которых он оказывает негативное влияние на сердечно-сосудистую систему (ССС), показало наличие GluN1 и GluN2A в сонных артериях крыс, а также экспрессию всех субъединиц рецептора NMDA в эндотелии аорты крысы. В том же исследовании также сообщалось об увеличении экспрессии GluN1 под

действием гомоцистеина и увеличении пролиферации клеток, а также об уменьшении пролиферации при предыдущем введении МК-801 [Chatterton, J.E., 2002].

Цель

Выявить особенности влияния введения агонистов и антагонистов NMDA-рецепторов во время прекондиционирования и посткондиционирования на кардиодинамические показатели миокарда, коронарный поток и оксидативный стресс изолированного сердца крыс при ишемии и реперфузии.

Задачи

1. Выявить особенности кардиодинамических показателей, коронарного потока и параметров оксидативного стресса изолированного сердца крыс при ишемии и реперфузии без кондиционирования.
2. Изучить влияние глутамата во время прекондиционирования и посткондиционирования на кардиодинамические показатели миокарда, коронарный поток и оксидативный стресс изолированного сердца крыс при ишемии и реперфузии.
3. Изучить влияние глицина во время прекондиционирования и посткондиционирования на кардиодинамические показатели миокарда, коронарный поток и оксидативный стресс изолированного сердца крыс при ишемии и реперфузии.
4. Изучить влияние МК-801 во время прекондиционирования и посткондиционирования на кардиодинамические показатели миокарда, коронарный поток и оксидативный стресс изолированного сердца крыс при ишемии и реперфузии.
5. Изучить влияние мемантина во время прекондиционирования и посткондиционирования на кардиодинамические показатели миокарда, коронарный поток и оксидативный стресс изолированного сердца крыс при ишемии и реперфузии.
6. Провести сравнительную характеристику влияния агонистов и антагонистов во время прекондиционирования и посткондиционирования на кардиодинамические показатели миокарда, коронарный поток и оксидативный стресс изолированного сердца крыс при ишемии и реперфузии.

Научная новизна результата исследования

- Выявлено, что кардиодинамические параметры сердца, которое подвергалось двадцатиминутной ишемии с кондиционированием агонистами NMDA-рецепторов (глутаматом и глицином) и последующей тридцатиминутной реперфузии, снижаются и не возвращаются к значениям, близким к начальным значениям, то есть не происходит

адекватного их восстановления. Одновременно в данной группе увеличиваются значения показателей оксидативного стресса как в первую минуту, так и на тридцатой минуте реперфузии после двадцатиминутной ишемии.

- Обнаружено, что кардиодинамические параметры сердца, которое подвергалось двадцатиминутной ишемии с кондиционированием антагонистами NMDA-рецепторов (МК-801 и мемантином) и последующей тридцатиминутной реперфузии, повышаются и возвращаются к значениям, близким к начальным значениям, то есть происходит их адекватное восстановление. Одновременно в данной группе снижаются значения показателей оксидативного стресса как в первую минуту, так и на тридцатой минуте реперфузии после двадцатиминутной ишемии.
- Зарегистрировано, что антагонисты NMDA-рецепторов, в отличие от их агонистов, вызывают повышение всех кардиодинамических показателей и снижение уровня оксидативного стресса.

Теоретическая и практическая значимость работы

По сравнению с контрольной группой, которая не подвергалась кондиционированию, наилучшие эффекты в сохранении сердечной функции после ишемии и во время реперфузии наблюдались при использовании блокаторов NMDA-рецепторов во время посткондиционирования, причем МК-801 имел более выраженный положительный эффект по сравнению с мемантином. Наиболее выраженным негативным влиянием на кардиодинамические показатели было использование глутамата во время посткондиционирования. Полученные результаты указывают на возможность существования и участия других глутаматных рецепторов, помимо рецепторов NMDA, в достижении этих результатов. Применение агонистов и антагонистов NMDA-рецепторов продемонстрировало практически полностью противоположное влияние на динамику продукции тестируемых АФК и азота. Учитывая важность кальция для сердечной функции, а также его влияние на выработку АФК и азота, предполагаемый механизм этих изменений, вероятно, подразумевает нарушение гомеостаза кальция, поскольку NMDA-рецепторы значительно более проницаемы для ионов кальция, чем других ионов.

Материалы диссертации по исследованию эффектов модуляции NMDA-рецепторов в изолированном сердце крысы во время ишемии и реперфузии рекомендуются для использования в практике научных исследований, посвященных изучению патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний, а также для разработки и апробации методов

патогенетической терапии и профилактики для обеспечения кардиопротективного эффекта при гипо- и реперфузии миокарда.

Теоретические представления об эффектах модуляции NMDA-рецепторов в изолированном сердце, сформулированные в работе, могут использоваться в образовательном процессе медицинских вузов.

Методология и методы исследования

Диссертация выполнена на кафедре патологии человека Института биодизайна и моделирования сложных систем ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет).

На исследование получено разрешение локального этического комитета ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (выписка из протокола № 31-20 от 11.11.2020 г.). Экспериментальная работа проведена на 90 крысах Wistar Albino на базе Лаборатории физиологии сердечно-сосудистой системы (зав. проф. В Яковлевич) факультета медицинских наук университета г. Крагуевац (Сербия). Выводы и практические рекомендации автора диссертации основаны на результате исследования достаточного количества крыс с прекондиционированием и посткондиционированием агонистами NMDA-рецепторов (глутаматом и глицином) и антагонистами NMDA-рецепторов (МК-801 и мемантином).

Для выполнения исследования использованы современные лабораторные и инструментальные методы, позволяющие с высокой степенью достоверности оценить влияние введения агонистов и антагонистов NMDA-рецепторов во время прекондиционирования и посткондиционирования на кардиодинамические показатели миокарда, коронарный поток и оксидативный стресс изолированного сердца крыс при ишемии и реперфузии.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Значения максимальной и минимальной скорости изменения давления в левом желудочке (дп/дт макс и дп/дт мин), систолического и диастолического давления в левом желудочке (СЛВП и ДЛВП), частоты сердечных сокращений (ЧСС) и коронарного потока перфузирующего раствора (КППР) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии без кондиционирования были ниже на тридцатой минуте реперфузии по сравнению с контрольными значениями. Таким образом, можно сделать

вывод о том, что кардиодинамические параметры сердца, которые подвергались двадцатиминутной ишемии без кондиционирования, не возвращаются к значениям, близким к начальным во время тридцатиминутной реперфузии, то есть не происходит их адекватного восстановления. Одновременно в группе без кондиционирования показатели индекса перекисного окисления липидов (ИПОЛ), супероксид-анион-радикала (O_2^-) и пероксида водорода (H_2O_2) были значительно выше в последнюю минуту реперфузии по сравнению с базовыми (контрольными). Таким образом, реперфузия вызывает активизацию свободнорадикальных процессов.

2. Уровни dp/dt макс и dp/dt мин, СЛВП и ДЛВП, ЧСС и КППР изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии с прекондиционированием глутаматом были ниже на тридцатой минуте реперфузии, по сравнению с контрольными значениями и значениями в последнюю минуту введения глутамата. После посткондиционирования глутаматом все кардиодинамические параметры и ЧСС были значительно ниже в последнюю минуту реперфузии по сравнению с контрольными значениями. В тоже время, при прекондиционировании глутаматом значения O_2^- и H_2O_2 были значительно выше в последнюю минуту реперфузии по сравнению с контрольными значениями, а при посткондиционировании этим же веществом значения ИПОЛ и O_2^- были значительно выше в последнюю минуту реперфузии по сравнению с контрольными значениями.

3. Глицин в качестве прекондиционирования приводил к значительному снижению значения dp/dt макс и dp/dt мин, СЛВП и ДЛВП, ЧСС и КППР изолированного сердца крыс в последнюю минуту реперфузии по сравнению с контрольным значением. При посткондиционировании глицином значения вышеуказанных параметров были значительно ниже в последнюю минуту реперфузии по сравнению с контрольными значениями. Введение глицина в качестве агониста рецептора NMDA вызывало значительное увеличение ИПОЛ, O_2^- и H_2O_2 в последнюю минуту реперфузии при относительно нормальных контрольных значений. В этой группе посткондиционирование глицином приводило к повышению значения O_2^- на тридцатой минуте реперфузии по сравнению с исходным уровнем.

4. МК-801 вызывал статистически значимое снижение всех кардиодинамических параметров через полчаса после начала реперфузии миокарда, после периода его 20-минутной ишемии, после их кратковременного увеличения через минуту от начала реперфузии миокарда, так что они не были статистически значимо отличными от

контрольных значений. У животных с посткондиционированием МК-801 через минуту от начала реперфузии миокарда увеличивались показатели СЛВП, ДЛВП, КППР, которые снижались через полчаса после начала реперфузии и достигали контрольных значений. У животных с посткондиционированием МК-801 через минуту от начала реперфузии миокарда снижались показатели дп/дт макс, дп/дт мин, ЧСС, которые увеличивались через полчаса после начала реперфузии и достигали контрольных значений. МК-801, как антагонист рецептора NMDA, при прекондиционировании вызывал значительное снижение всех измеряемых биомаркеров окислительного стресса. При посткондиционировании МК-801 значения H_2O_2 были значимо ниже в последнюю минуту реперфузии по сравнению с базовыми значениями, в то время как значения других биомаркеров существенно не изменились.

5. Кардиодинамические параметры сердца, как после прекондиционирования, так и при посткондиционировании мемантином и подвергающиеся двадцатиминутной ишемии, после тридцатиминутной реперфузии возвращаются к значениям, близким к начальным, то есть происходит их адекватное восстановление. Прекондиционирование мемантином вызвало значительное снижение продукции NO_2^- и O_2^- по сравнению с контрольными значениями, в то время как значения ИПОЛ, NO_2^- и H_2O_2 были значительно ниже в последнюю минуту реперфузии по сравнению с контрольными значениями. Использование мемантина в посткондиционировании привело к значительному снижению значений NO_2^- и H_2O_2 , которые были значимо ниже по сравнению с базовыми значениями. Значения ИПОЛ и O_2^- существенно не изменились.

Степень достоверности результатов

Достоверность полученных результатов определяется достаточным количеством животных (90 крыс, разделенных на 9 групп по 10 в каждой группе), применением современных методов лабораторной диагностики.

Апробация результатов

Первичная документация диссертации проверена комиссией, созданной распоряжением проректора по научно-исследовательской работе ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) доцента Д.В.Бутнару, распоряжение от 17 ноября 2020 г. № 270.

Для оценки достоверности полученных данных использовались надлежащие методы статистического анализа.

Данные исследования используются при проведении практических занятий и лекций у обучающихся (студенты, ординаторы, аспиранты и врачи повышения квалификации) на кафедре патологии человека Института биодизайна и моделирования сложных систем ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский Университет), а также на кафедре физиологии медицинского факультета университета г. Крагуевац (Сербия).

Основные положения работы доложены и обсуждены на: 4-м конгрессе физиологических наук Сербии с международным участием «Current trends in physiological sciences: from cell signals to the biology of aging» (Сербия, г. Ниш, 19-23 сентября 2018); 45-м конгрессе Октябрьские дни здоровья Крагуевацкого районного филиала сербского медицинского общества («Октобарски здравствени дани, српског лекарског друштва окружна подружница Крагујевац») (Сербия, г. Крагуевац, 29-30 октября 2020); симпозиуме лаборатории сердечно-сосудистой физиологии «Ефекти модулације N-метил-D-аспартатних рецептора у изолованом срцу пацова током исхемије и реперфузије» (Сербия, г. Крагуевац, 28 августа 2020).

Апробация результатов диссертации проведена на совместной научно-методической конференции сотрудников кафедры патологии человека, кафедры патофизиологии Института биодизайна и моделирования сложных систем ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) и кафедры физиологии факультета медицинских наук университета г. Крагуевац (Сербия) 26 ноября 2020 г.

Личный вклад автора

Вкладом автора в данную работу является определение цели и задачи исследования, проведение экспериментальных исследований, обработке и анализе полученных данных, а также обобщении полученных результатов. Экспериментальные исследования проведены совместно с сотрудниками лаборатории сердечно-сосудистых заболеваний Факультета медицинских наук Университета г. Крагуевац V. Jakovljevic, V. Zivkovic, I. Milosavljevic, J. Jeremic, J. Bradic, D. Djuric, K. Radonjic, M. Andjic, N. Draginic, A. Stojanovic, I. Srejovic. Обобщение полученных результатов проведено совместно с сотрудниками кафедр патологии человека и патофизиологии Института биодизайна и моделирования сложных систем С.Б. Болевичем, В. Яковлевичем, Б.И. Тачиевой, С.С.

Болевич, А.С. Орловой, М.А. Фокиной, А.Б. Салтыковым, Е.М. Морозовой, Н.В. Самбуровой, М.Н. Вуколовой, Е.Б. Тезиковым.

Связь диссертации с основными научными темами

Диссертационная работа Говорушкиной Н.С. выполнена в соответствии с тематикой и планом научной работы ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М.Сеченова (Сеченовский Университет) Минздрава России и является фрагментом научно-исследовательской работы «Разработка современных технологий подготовки специалистов с высшим медицинским и фармацевтическим образованием на основе достижений медико-биологических исследований», проводимой кафедрой патологии человека Института биодизайна и моделирования сложных систем, номер гос. регистрации 01.2.006.06352.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследований используются в работе кафедры физиологии факультета медицинских наук университета г. Крагуевац (Сербия), а также в учебном процессе на кафедрах патофизиологии и патологии человека Института биодизайна и моделирования сложных систем ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М.Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Соответствие диссертации паспорту заявленной научной специальности

Представленная диссертация соответствует паспорту специальности 3.3.3. Патологическая физиология. Результаты исследования соответствуют области исследования специальности, а именно пунктам №3, №8 и №1 паспорта специальности Патологическая физиология (Область науки: 3. Медицинские науки).

Публикации

Основное содержание диссертационного исследования отражено в 3 печатных работах соискателя, из них в изданиях из Перечня Университета/Перечня ВАК при Минобрнауки – 1 статья, в журналах, включенных в международные базы Scopus - 2 статьи.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 169 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения. Список литературы

содержит 199 источников, из них 18 отечественных и 183 зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 94 рисунками и содержит 20 таблиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены на базе Лаборатории физиологии сердечно-сосудистой системы (зав. профессор В. Яковлевич) Факультета медицинских наук Университета города Крагуевац (Сербия).

В исследовании использовано 90 белых крыс линии Wistar albino обоего пола массой тела 250 ± 30 грамм. Животных содержали в стандартных лабораторных условиях (температура воздуха $23 \pm 1^\circ\text{C}$, относительная влажность воздуха 50%, циклы освещенности помещения свет/темнота: 12/12 с началом периода освещения в 9:00 час, со свободным доступом к воде и пище (*ad libitum*). Животные были разделены на 9 групп (по 10 крыс в каждой).

Протокол эксперимента одобрен локальными Комитетами по этике в интересах экспериментальных животных Факультета медицинских наук Университета г. Крагуевац и локального этического комитета Сеченовского университета.

Подготовка изолированного сердца крысы по Лангердорфу и ретроградная перфузия его коронарных сосудов раствором Кребса-Хензеляйта при постоянном давлении проводилась по описанной ранее методике [Jakovljevic V., 2017, 2018].

Экспериментальные исследования проводились с использованием прибора Лангендорфа марки LF-01 F-P (ExperimetriaLtd, Будапешт, Венгрия) для перфузии изолированного сердца крыс.

Ретроградная перфузия изолированного сердца крысы раствором Кребса-Хензеляйта при постоянном перфузионном давлении проводилась по описанной ранее методике [Smigic J., 2019].

Использована методика и параметры перфузии коронарных сосудов изолированного сердца крысы раствором Кребса-Хензеляйта описанные нами ранее [Jakovljevic V., 2017, 2018]. Биохимические анализы проводили, используя перфузат из коронарных сосудов изолированных сердец крыс собранном в конце контрольного периода, в последнюю минуту применения испытуемого вещества, в первую, третью, пятую, десятую, пятнадцать, двадцать и тридцать минут реперфузии в экспериментах с прекондиционированием. В экспериментах с посткондиционированием пробы с

перфузатом из коронарных сосудов изолированных сердец крыс отбирались практически на одинаковых временных отрезках, исключая последнюю минуту применения вещества в прекондиционировании. Все реактивные молекулы, представляющие интерес для нашего исследования, были измерены спектрофотометрическим методом на спектрофотометре *Shimadzu UV-1800*, Северная Америка.

Определяли уровень нитрита (NO_2^-), супероксидного анион радикала, перекиси водорода, индекса перекисного окисления липидов по описанным ранее методикам [Prokic V., 2019; Jakovljevic V., 2017, 2018]

Для описания отдельных показателей использовались их абсолютные величины, процентные значения; средняя величина выборки, ее медиана и стандартное отклонение, ранжирование и доверительные интервалы, равные 95%. Для выявления различий между показателями использованы t критерий Стьюдента, парный t-критерий, критерий Манна-Уитни, точный тест Фишера. Кроме того, проводили однофакторный и двухфакторный дисперсионный анализ. Для определения разницы между параметрами в различных группах животных использовали поправку Бонферрони для множественных сравнений. Критическое значение уровня статистической значимости при проверке нулевых гипотез принималось равным 0,05. Статистическая обработка данных осуществлялась в пакете SPSS 20.0 (SPSS, Чикаго, Иллинойс).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Значения кардиодинамических параметров изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии без кондиционирования

Значения максимальной и минимальной скорости изменения давления в левом желудочке (дп/дт макс и дп/дт мин, в мм рт.ст./сек), систолического и диастолического давления в левом желудочке (СЛВП и ДЛВП, в мм рт.ст.), частоты сердечных сокращений (ЧСС, в уд/мин) и коронарного потока перфузирующего раствора (КППР (мл/мин)) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии без кондиционирования представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Показатели функции левого желудочка сердца при ишемии и последующей реперфузии изолированного сердца крыс раствором Кребса-Хензелята ex vivo (контроль)

Контрольная группа без кондиционирования						
Минуты	дп/дт макс (мм рт.ст./сек)	дп/дт мин (мм рт.ст./сек)	СЛВП (мм рт.ст)	ДЛВП (мм рт.ст.)	ЧСС (уд./мин)	КППР (мл/мин)
Контроль	2003,8 ± 235,2	-1401,9 ± 99,3	53,4 ± 8,8	5,5 ± 0,6	290,5 ± 8,9	8,5 ± 0,5
Ишемия						
1	2115,8 ± 123,5	-1445,3 ± 73,3	58,1 ± 7,7	5,3 ± 0,4	250,5 ± 25,8*	7,2 ± 0,4*
30	1805,6 ± 78,5	-1140,3 ± 96,5*	40,3 ± 6,3*	4,7 ± 0,2*	225,6 ± 15,4	6,0 ± 0,5

Примечание. * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Кардиодинамические параметры сердца, которые подвергались двадцатиминутной ишемии без кондиционирования, не возвращаются к значениям, близким к начальным значениям во время тридцатиминутной реперфузии, то есть не происходит адекватного их восстановления.

Влияние применения глутамата при прекондиционировании на кардиодинамические параметры изолированного сердца крыс

Значения максимальной и минимальной скорости изменения давления в левом желудочке (дп/дт макс и дп/дт мин, в мм рт.ст./сек), систолического и диастолического давления в левом желудочке (СЛВП и ДЛВП, в мм рт.ст.), частоты сердечных сокращений (ЧСС, в уд/мин) и коронарного потока перфузирующего раствора (КППР (мл/мин)) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при прекондиционировании глутаматом представлены в таблице 2.

Кардиодинамические параметры сердца, после прекондиционирования глутаматом и подвергающиеся двадцатиминутной ишемии, не возвращаются к значениям, близким к

начальным значениям после тридцатиминутной реперфузии, то есть не происходит адекватного их восстановления.

Таблица 2 - Показатели функции левого желудочка сердца при ишемии и последующей реперфузии изолированного сердца крыс раствором Кребса-Хензелята *ex vivo* после прекондиционирования глутаматом

Преко́ндиционирование глутаматом						
Минуты	дп/дт макс (мм рт.ст./сек)	дп/дт мин (мм рт.ст./сек)	СЛВП (мм рт.ст)	ДЛВП (мм рт.ст.)	ЧСС (уд./мин)	КППР (мл/мин)
Контроль	2243,9 ± 48,5	-1967,5 ± 137,4	83,1 ± 1,8	3,0 ± 1,0	325,0 ± 9,6	10,2 ± 0,4
Глутамат	2394,1 ± 43,5	-2097,6 ± 32,1	85,2 ± 0,8	3,2 ± 1,0	318,1 ± 11,0	10,0 ± 0,4
Ишемия						
1	2364,2 ± 111,8	-1827,9 ± 82,9	132,6 ± 0,6	5,3 ± 0,3	148,1 ± 4,9*	10,1 ± 0,3
30	1903,0 ± 43,6*	-1536,7 ± 122,0*	79,4 ± 5,9	2,9 ± 0,2	269,2 ± 6,1*	8,8 ± 0,5*

Примечание. * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Аналогичные результаты были зарегистрированы и при применении глутамата в посткондиционировании.

Влияние применения глицина при преко́ндиционировании на кардиодинамические параметры изолированного сердца крыс

Значения максимальной и минимальной скорости изменения давления в левом желудочке (дп/дт макс и дп/дт мин, в мм рт.ст./сек), систолического и диастолического давления в левом желудочке (СЛВП и ДЛВП, в мм рт.ст.), частоты сердечных сокращений (ЧСС, в уд/ мин) и коронарного протока перфузирующего раствора (КППР (мл/мин)) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при преко́ндиционировании глицином представлены в таблице 3.

Кардиодинамические параметры сердца, после прекондиционирования глицином и подвергающиеся двадцатиминутной ишемии, не возвращаются к значениям, близким к начальным значениям после тридцатиминутной реперфузии, то есть не происходит адекватного их восстановления.

Таблица 3 - Показатели функции левого желудочка сердца при ишемии и последующей реперфузии изолированного сердца крыс раствором Кребса-Хензелята *ex vivo* после прекондиционирования глицином

Преко́ндиционирование глицином						
Минуты	дп/дт макс (мм рт.ст./сек)	дп/дт мин (мм рт.ст./сек)	СЛВП (мм рт.ст)	ДЛВП (мм рт.ст.)	ЧСС (уд./мин)	КППР (мл/мин)
Контроль	1872,7 ± 100,4	-1551,9 ± 83,5	54,5 ± 2,4	2,4 ± 0,3	308,7± 12,2	9,1 ± 0,6
Глицин	1484,0 ± 158,6	-1297,4 ± 116,4	61,1 ± 3,8	2,7 ± 0,2	256,6± 14,9	8,2 ± 0,8
Ишемия						
1	1789,8 ± 136,5	-1521,6 ± 96,4	71,2 ± 2,8	3,4 ± 0,4	233,8± 30,3*	8,5 ± 0,7
30	1695,4 ± 135,8*	-1482,6 ± 76,1	54,8 ± 2,9	2,3 ± 0,3	258,4 ± 3,4*	7,7 ± 0,8*

Примечание. * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Аналогичные результаты были зарегистрированы и при применении глицина в посткондиционировании.

Влияние применения МК-801 при прекондиционировании на кардиодинамические параметры изолированного сердца крыс

Значения максимальной и минимальной скорости изменения давления в левом желудочке (дп/дт макс и дп/дт мин, в мм рт.ст./сек), систолического и диастолического давления в левом желудочке (СЛВП и ДЛВП, в мм рт.ст.), частоты сердечных

сокращений (ЧСС, в уд/мин) и коронарного протока перфузирующего раствора (КППР (мл/мин)) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при прекондиционировании МК-801 представлены в таблице 4.

Кардиодинамические параметры сердца, после прекондиционирования МК-801 и подвергающиеся двадцатиминутной ишемии, после тридцатиминутной реперфузии возвращаются к значениям, близким к начальным значениям, то есть происходит адекватное их восстановление.

Аналогичные результаты были зарегистрированы и при применении МК-801 в посткондиционировании.

Таблица 4 - Показатели функции левого желудочка сердца при ишемии и последующей реперфузии изолированного сердца крыс раствором Кребса-Хензелята *ex vivo* после прекондиционирования МК-801

Прекондиционирование МК-801						
Минуты	дп/дт макс (мм рт.ст/сек)	дп/дт мин (мм рт.ст./сек)	СЛВП (мм рт.ст)	ДЛВП (мм рт.ст.)	ЧСС (уд./мин)	КППР (мл/мин)
Контроль	2035,0 ± 104,5	-1393,6 ± 41,6	59,6 ± 2,4	5,3 ± 0,1	311,7 ± 7,0	10,2 ± 0,8
МК-801	1537,8 ± 77,6	-948,7 ± 57,5	42,2 ± 2,5	3,9 ± 0,1	254,9± 15,3	7,3 ± 0,4
Ишемия						
1	2363,6 ± 182,1*	-1573,7 ± 63,1*	84,1 ± 3,4*	8,2 ± 0,6*	256,7± 18,6	10,7 ± 0,3
30	2021,0 ± 110,9**	-1317,5 ± 40,0**	59,1 ± 2,0**	5,2 ± 0,2**	302,4 ± 8,4	9,4 ± 0,7

Примечание. * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ** - $p < 0,05$ по сравнению с 1-й минутой реперфузии

Влияние применения мемантина при прекондиционировании на кардиодинамические параметры изолированного сердца крыс

Значения дп/дт макс и дп/дт мин (мм рт.ст./сек), СЛВП и ДЛВП (мм рт.ст.), частоты сердечных сокращений (ЧСС, в уд/мин) и коронарного протока перфузирующего раствора (КППР (мл/мин)) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при прекондиционировании мемантином представлены в таблице 5.

Кардиодинамические параметры сердца, после прекондиционирования мемантином и подвергающиеся двадцатиминутной ишемии, после тридцатиминутной реперфузии возвращаются к значениям, близким к начальным значениям, то есть происходит адекватное их восстановление.

Аналогичные результаты были зарегистрированы и при применении мемантина в посткондиционировании.

Таблица 5 - Показатели функции левого желудочка сердца при ишемии и последующей реперфузии изолированного сердца крыс раствором Кребса-Хензелята *ex vivo* после прекондиционирования мемантином

Прекондиционирование мемантином						
Минуты	дп/дт макс (мм рт.ст./сек)	дп/дт мин (мм рт.ст./сек)	СЛВП (мм рт.ст)	ДЛВП (мм рт.ст.)	ЧСС (уд./мин)	КППР (мл/мин)
Контроль	2021,9 ± 138,7	-1476,6 ± 126,2	62,7 ± 5,4	4,5 ± 0,6	303,8 ± 9,6	12,7 ± 0,6
мемантин	1661,9 ± 96,8	-1088,9 ± 131,2	49,6 ± 7,4	3,7 ± 0,2	263,2± 11,0	10,8 ± 0,8
Ишемия						
1	2021,7 ± 102,6	-1460,6 ± 103,0	79,3 ± 3,0*	6,1 ± 0,9*	271,8 ± 4,9*	11,5 ± 0,4*
30	1782,6 ± 100,6	-1302,6 ± 90,6	61,8 ± 5,2**	4,3 ± 0,6**	261,5 ± 6,1	9,4 ± 0,3

Примечание. * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ** - $p < 0,05$ по сравнению с 1-й минутой реперфузии

Значения параметров оксидативного стресса изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии без кондиционирования

Значения показателя ИПОЛ, NO₂⁻, O₂⁻ и H₂O₂ изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии без кондиционирования представлены в таблице 6.

Таблица 6 - Показатели оксидативного стресса при ишемии и последующей реперфузии изолированного сердца крыс раствором Кребса-Хензеляйта ex vivo (контроль)

Контрольная группа без кондиционирования				
Минуты	ИПОЛ	NO ₂ ⁻	O ₂ ⁻	H ₂ O ₂
Контроль	22,3 ± 2,4	97,7 ± 4,9	52,2 ± 1,3	56,5 ± 4,2
Ишемия				
1	28,5 ± 1,8*	104,5 ± 6,7	67,0 ± 1,0*	59,2 ± 6,2
30	27,0 ± 1,8*	96,2 ± 5,6	65,3 ± 5,0*	64,5 ± 2,3*

Примечание. * - p<0,05 по сравнению с контролем; ** - p<0,05 по сравнению с 1-й минутой реперфузии

Параметры оксидативного стресса, после двадцатиминутной ишемии без кондиционирования возрастают, не возвращаются к значениям, близким к начальным значениям во время тридцатиминутной реперфузии, то есть не происходит адекватного их восстановления.

Влияние применения глутамата при прекондиционировании на параметры оксидативного стресса изолированного сердца крыс

Значения показателя ИПОЛ, NO₂⁻, O₂⁻ и H₂O₂ изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при прекондиционировании глутаматом представлены в таблице 7.

Таблица 7 - Показатели оксидативного стресса при ишемии и последующей реперфузии изолированного сердца крыс раствором Кребса-Хензелайта ex vivo после прекондиционирования глутаматом

Прекондиционирование глутаматом				
Минуты	ИПОЛ	NO ₂ ⁻	O ₂ ⁻	H ₂ O ₂
Контроль	30,1 ± 2,4	103,1 ± 4,2	51,4 ± 1,5	38,3 ± 2,5
Глутамат	29,2 ± 2,6	102,2 ± 4,1	49,8 ± 4,2	40,0 ± 3,3
Ишемия				
1	28,1 ± 1,8	99,9 ± 1,8	49,8 ± 4,2	40,9 ± 2,4
30	30,6 ± 2,7	94,9 ± 1,6*	68,2 ± 3,2*	43,4 ± 2,5*

Примечание. * - p<0,05 по сравнению с контролем; ** - p<0,05 по сравнению с 1-й минутой реперфузии

Параметры оксидативного стресса, после двадцатиминутной ишемии после прекондиционирования глутаматом и последующей тридцатиминутной реперфузии возрастают и остаются значительно выше контрольных значений, то есть не происходит адекватного их восстановления.

Аналогичные результаты были зарегистрированы и при применении глутамата в посткондиционировании.

Влияние применения глицина при прекондиционировании на параметры оксидативного стресса изолированного сердца крыс

Значения показателя ИПОЛ, NO₂⁻, O₂⁻ и H₂O₂ изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при прекондиционировании глицином представлены в таблице 8.

Таблица 8 - Показатели оксидативного стресса при ишемии и последующей реперфузии изолированного сердца крыс раствором Кребса-Хензелята ex vivo после прекондиционирования глицином

Прекондиционирование глицином				
Минуты	ИПОЛ	NO ₂ ⁻	O ₂ ⁻	H ₂ O ₂
Контроль	25,8 ± 1,7	103,7 ± 7,3	50,7 ± 2,1	49,7 ± 2,3
Глицин	25,9 ± 3,2	100,2 ± 5,7	64,7 ± 4,6	50,6 ± 2,9
Ишемия				
1	27,0 ± 2,2	99,5 ± 7,9	60,4 ± 5,5*	51,4 ± 2,4
30	28,5 ± 2,3	99,2 ± 8,5	66,2 ± 3,8	51,9 ± 2,2

Примечание. * - p<0,05 по сравнению с контролем; ** - p<0,05 по сравнению с 1-й минутой реперфузии

Параметры оксидативного стресса после двадцатиминутной ишемии после прекондиционирования глицином и последующей тридцатиминутной реперфузии возрастают и остаются значительно выше контрольных значений, то есть не происходит адекватного их восстановления.

Аналогичные результаты были зарегистрированы и при применении глицина в посткондиционировании.

Влияние применения МК-801 при прекондиционировании на параметры оксидативного стресса изолированного сердца крыс

Значения показателя ИПОЛ, NO₂⁻, O₂⁻ и H₂O₂ изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при прекондиционировании МК-801 представлены в таблице 9.

Параметры оксидативного стресса, после двадцатиминутной ишемии после прекондиционирования МК-801 снижаются и после последующей тридцатиминутной реперфузии также остаются значительно ниже контрольных значений.

Аналогичные результаты были зарегистрированы и при применении МК-801 в посткондиционировании.

Таблица 9 - Показатели оксидативного стресса при ишемии и последующей реперфузии изолированного сердца крыс раствором Кребса-Хензelayта ex vivo после прекондиционирования МК-801

Преко̀ндиционирование МК-801				
Минуты	ИПОЛ	NO ₂ ⁻	O ₂ ⁻	H ₂ O ₂
Контроль	23,1 ± 1,6	105,3 ± 9,0	52,9 ± 5,4	49,6 ± 3,7
МК-801	15,4 ± 2,0	67,3 ± 6,6	35,1 ± 2,4	27,1 ± 5,6
Ишемия				
1	20,6 ± 2,6	90,8 ± 6,1	47,0 ± 4,7	44,4 ± 5,6
30	15,8 ± 2,4*	95,9 ± 4,6	49,5 ± 4,6	36,2 ± 4,0*

Примечание. * - p<0,05 по сравнению с контролем; ** - p<0,05 по сравнению с 1-й минутой реперфузии

Влияние применения мемантина при преко̀ндиционировании на параметры оксидативного стресса изолированного сердца крыс

Значения показателя ИПОЛ, NO₂⁻, O₂⁻ и H₂O₂ изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при преко̀ндиционировании мемантина представлены в таблице 10.

Таблица 10 - Показатели оксидативного стресса при ишемии и последующей реперфузии изолированного сердца крыс раствором Кребса-Хензelayта ex vivo после преко̀ндиционирования мемантином

Преко̀ндиционирование мемантином				
Минуты	ИПОЛ	NO ₂ ⁻	O ₂ ⁻	H ₂ O ₂
Контроль	34,5 ± 2,6	141,6 ± 4,5	49,3 ± 3,1	40,8 ± 2,5
Мемантин	32,1 ± 2,4	125,0 ± 7,0	34,4 ± 4,1	41,5 ± 3,3
Ишемия				
1	30,2 ± 2,3	120,8 ± 8,3*	41,8 ± 4,5*	40,9 ± 2,4
30	22,2 ± 1,5* **	93,3 ± 7,1* **	41,0 ± 2,3*	29,9 ± 2,5* **

Примечание. * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ** - $p < 0,05$ по сравнению с 1-й минутой реперфузии

Параметры оксидативного стресса, после двадцатиминутной ишемии после прекондиционирования мемантином снижаются и после последующей тридцатиминутной реперфузии остаются значительно ниже контрольных значений.

Аналогичные результаты были зарегистрированы и при применении мемантина в посткондиционировании.

ВЫВОДЫ

1. Уровень кардиодинамических параметров и коронарного потока изолированного сердца крыс после ишемии и тридцатиминутной реперфузии значительно снижаются относительно контрольных значений. Об этом свидетельствуют снижение максимальной и минимальной скорости изменения давления в левом желудочке, систолического давления в левом желудочке, частоты сердечных сокращений и коронарного потока перфузирующего раствора. Кардиодинамические параметры сердца, которые подвергались двадцатиминутной ишемии без кондиционирования, не возвращаются к близким к начальным значениям во время тридцатиминутной реперфузии, то есть не происходит их адекватного восстановления. Одновременно в группе без кондиционирования значения ИПОЛ, супероксид-анион-радикала (O_2^-) и пероксида водорода (H_2O_2) значительно выше в последнюю минуту реперфузии по сравнению с базовыми (контрольными) значениями. Таким образом, реперфузия вызывает активизацию свободнорадикальных процессов.

2. Прекондиционирование и посткондиционирование глутаматом приводит к снижению уровня параметров, которые отражают сократимость миокарда, а также частоты сердечных сокращений и коронарного потока в последнюю минуту реперфузии по сравнению с контрольными значениями. В тоже время, при прекондиционировании глутаматом значения O_2^- и H_2O_2 значимо выше в последнюю минуту реперфузии по сравнению с контрольными значениями, а при посткондиционировании этим же веществом значения ИПОЛ и O_2^- значительно выше в последнюю минуту реперфузии по сравнению с контрольными значениями. Таким образом, глутамат приводит к интенсификации свободнорадикальных процессов.

3. Введение глицина как в качестве прекондиционирования, так и в качестве посткондиционирования приводит к значительному снижению параметров сократимости

миокарда, частоты сердечных сокращений и коронарного кровотока, значения которых статистически значимо ниже в последнюю минуту реперфузии по сравнению с контрольным значением. Введение глицина в качестве прекондиционирования вызывает значительное увеличение ИПОЛ, O_2^- и H_2O_2 , а при посткондиционировании – увеличение O_2^- в последнюю минуту реперфузии по отношению к контрольным значениям. Таким образом, глицин вызывает активацию свободнорадикальных процессов.

4. Прекондиционирование и посткондиционирование МК-801 приводит к увеличению уровня показателей сократимости миокарда, а также коронарного потока в первую минуту реперфузии по сравнению с контрольными значениями и их снижению в последнюю минуту реперфузии, достигая контрольных значений. МК-801, как при прекондиционировании, так и при посткондиционировании вызывает значительное снижение всех измеряемых биомаркеров окислительного стресса (ИПОЛ, NO_2^- , O_2^- , H_2O_2) как в первую минуту, так и в последнюю минуту реперфузии. Таким образом, МК-801 обладает антиоксидантными свойствами.

5. Применение мемантина в качестве прекондиционирования и посткондиционирования вызывает значительное увеличение систолического и диастолического давления в левом желудочке в первую минуту реперфузии и их снижение в последнюю минуту реперфузии, достигая контрольных значений. Прекондиционирование и посткондиционирование мемантином вызывает значительное снижение продукции ИПОЛ, NO_2^- , O_2^- , H_2O_2 NO_2^- и O_2^- по сравнению с контрольными значениями, как в первую минуту, так и в последнюю минуту реперфузии. Таким образом, мемантин обладает антиоксидантными свойствами.

6. Антагонисты NMDA-рецепторов, в отличие от их агонистов вызывают увеличение всех кардиодинамических показателей и снижение показателей окислительного стресса, т.е. обладают кардиопротекторным действием.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Govoruskina N.** The effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade on oxidative status in heart during conditioning maneuvers/ **N. Govoruskina, I. Srejavic, S. Bolevich// Serbian Journal of Experimental and Clinical Research.** -2019. – №20 (4). – P.343-349. [Scopus]
2. **Govoruskina N.** The Role of Cardiac N-Methyl-D-Aspartate Receptors in Heart Conditioning-Effects on Heart Function and Oxidative Stress/ **N. Govoruskina, V. Jakovljevic, V. Zivkovic // Biomolecules.** – 2020. - №10(7). – P.1065. [Scopus]
3. **Говорушкина Н.С.** Влияние соединения МК-801, глутамата и глицина через модуляцию N-метил-D-аспартатных рецепторов на изолированное сердце крысы/ **Н.С. Говорушкина, С.Б. Болевич, В. Яковлевич// Сеченовский вестник.** – 2020. - Т. 11, № 1. – С. 37-47.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК - активные формы кислорода

ИПОЛ - индекс перекисного окисления липидов

И/Р повреждение – ишемическо-реперфузионное повреждение

КППР - коронарный поток перфузирующего раствора

МК-801 - (+)-5-methyl-10,11-dihydro-5Hdibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine hydrogen maleate

ЧСС – частота сердечных сокращений

АМРА - α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионатом

ДЛВП - диастолическое давление в левом желудочке

дп/дт макс - максимальная скорость развития давления в левом желудочке

дп/дт мин - минимальная скорость развития давления в левом желудочке

NMDA - N-метил-D-аспартат

СЛВП - систолическое давление в левом желудочке