

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.М. СЕЧЕНОВА
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи

Говорушкина Наталия Станиславовна

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

14.03.03 - Патологическая физиология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:
доктор медицинских наук, профессор
Болевич Сергей.Бранкович
доктор медицинских наук, профессор
Яковлевич Владимир

Москва - 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	16
1.1 Глутаматные рецепторы и их роль в организме.....	16
1.1.1 Виды и особенности ионотропных глутаматных рецепторов.....	16
1.1.2 Структура NMDA-рецепторов.....	18
1.1.3. Контроль открытия рецепторов.....	21
1.1.4. Аллостерическая регуляция	23
1.1.5. Агонисты и антагонисты рецептора.....	25
1.1.6. Роль магния в регулировании функции рецептора NMDA	30
1.1.7. NMDA рецепторы и центральная нервная система.....	30
1.1.8. NMDA-рецепторы и сердечно-сосудистая система	34
1.2 Свободные радикалы и окислительно-восстановительное равновесие	37
1.2.1. Свободные радикалы	37
1.2.2. Свободные радикалы и сердечно-сосудистая система	40
1.3. Ишемическо-реперфузионное повреждение	42
1.3.1. Патопфизиология ишемически-реперфузионного повреждения.....	43
1.3.2. Роль АФК в возникновении ишемически-реперфузионного повреждения	45
1.3.3. Накопление ионов Ca^{2+}	45
1.3.4. Открытие митохондриальных переходных пор	46
1.3.5. Факторы риска и клинические проявления ишемическо-реперфузионного повреждения.....	46
1.4. Феномен preconditionирования	47
1.4.1. Preconditionирование миокарда ишемией.....	48
1.4.2. Механизм ишемического preconditionирования.....	50
1.4.3. Фармакологическая подготовка.....	52
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	55

2.1 Экспериментальная модель исследования.....	55
2.1.1 Модели ретроградной перфузии: перфузия с постоянным давлением и перфузия с постоянным потоком.....	55
2.1.2 Langendorff аппарат LF-01 F-P.....	56
2.2 Экспериментальный протокол.....	59
2.3 Биохимический анализ.....	62
2.3.1. Определение индекса перекисного окисления липидов (ИПОЛ-TBARS).....	63
2.3.2. Определение содержания оксида азота	64
2.3.3. Определение содержания супероксидного анион радикала (O_2^-).....	66
2.3.4. Определение перекиси водорода (H_2O_2).....	67
2.4 Статистическая обработка данных	68
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	70
3.1. Значения кардиодинамических параметров изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии без кондиционирования.....	70
3.2. Влияние применения глутамата при preconditionировании на кардиодинамические параметры изолированного сердца крыс.....	74
3.3. Влияние применения глутамата при postconditionировании на кардиодинамические параметры изолированного сердца крыс.....	78
3.4. Влияние применения глицина при preconditionировании на кардиодинамические параметры изолированного сердца крыс.....	83
3.5. Влияние применения глицина при postconditionировании на кардиодинамические параметры изолированного сердца крыс.....	87
3.6. Влияние применения МК-801 при preconditionировании на кардиодинамические параметры изолированного сердца крыс.....	91
3.7. Влияние применения МК-801 при postconditionировании на кардиодинамические параметры изолированного сердца крыс.....	95
3.8. Влияние применения мемантина при preconditionировании на кардиодинамические параметры изолированного сердца крыс.....	100
3.9. Влияние применения мемантина при postconditionировании на кардиодинамические параметры изолированного сердца крыс.....	104

3.10. Значения параметров оксидационного стресса изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии без кондиционирования	109
3.11. Влияние применения глутамата при preconditionировании на параметры оксидационного стресса изолированного сердца крыс	111
3.12. Влияние применения глутамата при postconditionировании на параметры оксидационного стресса изолированного сердца крыс	115
3.13. Влияние применения (RS)-(tetrazol-5-YL) глицина при preconditionировании на параметры оксидационного стресса изолированного сердца крыс	118
3.14. Влияние применения (RS)-(tetrazol-5-YL) глицина при postconditionировании на параметры оксидационного стресса изолированного сердца крыс	121
3.15. Влияние применения МК-801 при preconditionировании на параметры оксидационного стресса изолированного сердца крыс.....	124
3.16. Влияние применения МК-801 при postconditionировании на параметры оксидационного стресса изолированного сердца крыс	127
3.17. Влияние применения мемантина при preconditionировании на параметры оксидационного стресса изолированного сердца крыс	130
3.18. Влияние применения мемантина при postconditionировании на параметры оксидационного стресса изолированного сердца крыс	133
ОБСУЖДЕНИЕ	136
ВЫВОДЫ	147
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	149
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	171

ВВЕДЕНИЕ

АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ. 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 [175]. Физиологическая роль NMDA-рецептора в первую очередь связана с функцией центральной нервной системы (ЦНС). NMDA-рецепторы, в дополнение к другим ионотропным глутаматным рецепторам (AMPA-рецептор (рецептор α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты) и каинат), играют ключевую роль в быстрой регуляции синаптической пластичности, включая долгосрочное потенцирование и длительную депрессию, которые являются клеточной основой памяти и процессов обучения [163]. 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 [11]. С одной стороны, A β индуцирует эндоцитоз и интернализацию синаптических NMDA-рецепторов, а с другой - индуцирует гиперактивность extrasинаптических NMDA-рецепторов, предотвращая переход глутамата из внеклеточного пространства, вызывая тем самым нейротоксичность [191].

Несколько десятилетий назад результаты некоторых исследований показали возможность существования NMDA-рецепторов и вне нервных тканей [41]. 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 [181]. 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 [104]. Исследование отдельных субъединиц рецептора NMDA выявило высокую представленность GluN1 в сердце крысы, тогда как те же авторы не обнаружили GluN2, и их заключение было сведено к возможному существованию гомоолигомерных рецепторов NMDA, состоящих из GluN1 [144]. Изучая распространенность отдельных субъединиц рецепторов NMDA в сердце крысы, зарегистрировано наличие GluN2B, обнаруживаемой в сердечной ткани от ранних стадий развития до десятой недели постнатальной жизни [126]. Однако в этом исследовании GluN1 не была выявлена ни на одной стадии развития. Однако результаты данных исследований противоречивы. 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 азот-оксид синтазу (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 [154]. 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 [38].

Степень разработанности проблемы

Появляется все больше доказательств важности NMDA-рецепторов в регуляции электрической активности сердца [115]. Кроме того, все больше исследований посвящено изучению влияния чрезмерной стимуляции этих

рецепторов на сердце и ССС, в результате чего хроническая активация этих рецепторов со стороны определенных агонистов вызывает значительные электрофизиологические нарушения и повышает вероятность желудочковых аритмий [148]. Механизм патофизиологических нарушений, вызванных высокими концентрациями гомоцистеина, связан с активацией NMDA-рецепторов [19].

Активация NMDA-рецептора позволяет значительному количеству ионов Ca^{2+} проникать в клетку (в отличие от других йонотропных глутаматных рецепторов, которые являются преимущественно Na^+ -каналами), что вызывает чрезмерное накопление Ca^{2+} в клетках, дисбаланс в выработке и устранении активных форм кислорода (АФК) и, следовательно, окислительный стресс и нарушение митохондриальной функции. Конечным результатом данного процесса является апоптоз. Исследования кардиомиоцитов показали, что введение блокатора рецепторов NMDA, МК-801 ((+)-5-methyl-10,11-dihydro-5Hdibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine hydrogen maleate), предотвращает ранее описанный каскад и последующий апоптоз [156].

Предыдущие исследования воздействия МК-801 и глутамата на нейроны гиппокампа крыс показали, что совместное применение этих двух веществ вызывает кратковременное открытие каналов под действием глутамата с последующей блокировкой каналов, вызванной МК-801 [168].

Эти факты указывают на важность NMDA рецепторов в регуляции физиологической активности и патологических процессов в ССС, а также на роль окислительного стресса как одного из посредников данных реакций.

С учетом приведенных выше данных в настоящем исследовании была поставлена 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.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие 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 ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Впервые 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.

2. Впервые 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.

3. Впервые зарегистрировано, что антагонисты NMDA-рецепторов, в отличие от их агонистов, вызывают повышение всех кардиодинамических показателей и снижение уровня оксидативного стресса.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ 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.

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ:

1. Значения максимальной и минимальной скорости изменения давления в левом желудочке ($dp/dt \max$ и $dp/dt \min$), систолического и диастолического давления в левом желудочке (SLVP и DLVP), частоты сердечных сокращений (ЧСС) и коронарного потока (КП) перфузирующего раствора 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 $dp/dt \max$ и $dp/dt \min$, SLVP и DLVP, ЧСС и КП перфузирующего раствора изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии с preconditionированием глутаматом были ниже на тридцатой минуты реперфузии, по сравнению с контрольными значениями и значениями в последнюю минуту введения глутамата. После postconditionирования глутаматом все кардиодинамические параметры и ЧСС были значительно ниже в последнюю минуту реперфузии по сравнению с контрольными значениями. В тоже время, при preconditionировании глутаматом значения O_2^- и H_2O_2 были значительно выше в последнюю минуту реперфузии по сравнению с контрольными значениями, а при postconditionировании этим же веществом значения ИПОЛ и O_2^- были значительно выше в последнюю минуту реперфузии по сравнению с контрольными значениями.

3. Глицин в качестве preconditionирования приводил к значительному снижению значения $dp/dt \max$ и $dp/dt \min$, SLVP и DLVP, ЧСС и КП перфузирующего раствора изолированного сердца крыс в последнюю минуту реперфузии по сравнению с контрольным значением. При postconditionировании 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 postconditionирование 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 30 минут от 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 postconditionированием

МК-801 через минуту от начала реперфузии миокарда после периода его 20-минутной ишемии увеличивались показатели SLVP, DLVP, КП перфузирующей жидкости, которые снижались через 30 минут от начала реперфузии и достигали контрольных значений. У животных с посткондиционированием МК-801 через минуту от начала реперфузии миокарда после периода его 20-минутной ишемии снижались показатели $dp/dt \max$, $dp/dt \min$, ЧСС, которые увеличивались через 30 минут от начала реперфузии и достигали контрольных значений. МК-801, как антагонист рецептора NMDA, при прекодиционировании 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 прекодиционирования так и при посткондиционировании мемантином и подвергающиеся двадцатиминутной ишемии, после тридцатиминутной реперфузии возвращаются к значениям, близким к начальным, то есть происходит их адекватное восстановление. Прекодиционирование 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.

ЛИЧНЫЙ ВКЛАД АВТОРА ДИССЕРТАЦИИ

Автору принадлежит ведущая роль в выборе направления исследования, формулировки ее цели и задач, анализе и обобщении полученных фактических результатов; в подготовке обзора отечественных и зарубежных публикаций по теме исследования.

Автором диссертации проведены лабораторные исследования; анализ и статистическая обработка фактических данных; обобщение, формулировка и научное обоснование результатов и выводов, теоретической, практической значимости и рекомендаций, основанных на результатах работы; подготовка научных публикаций и докладов; работа по их внедрению в практику.

ВНЕДРЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИИ В ПРАКТИКУ

Фактические данные диссертационного исследования и теоретические заключения, сделанные на их основе, включены в материалы для преподавания (лекции, занятия и др.) и используются при обучении студентов, подготовке ординаторов, аспирантов и слушателей на кафедрах патологии человека Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченоский Университет), а также на кафедре физиологии медицинского факультета университета г. Крагуевац (Сербия).

СТЕПЕНЬ ДОСТОВЕРНОСТИ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИИ.

Достоверность результатов диссертационного исследования базируется на презентативном количестве животных (90 крыс, разделенных на 9 групп по 10 в каждой группе).

Статистическая обработка и сравнительный анализ полученных фактических данных осуществлялась следующим образом: 1) для описания отдельных показателей использовались абсолютные показатели, их процентное значение; средняя величина выборки, ее медиана и стандартное отклонение, ранжирование и доверительные интервалы, равные 95%; 2) для оценки нормальности распределения показателей применяли тесты Колмогорова, Смирнова и Шапиро Вилька; 3) для выявления различий между показателями были использованы t-критерий Стьюдента, t-критерий парного типа, критерий Манна-Уитни, критерий абсолютной вероятности Фишера, однофакторный или двухфакторный дисперсионный анализ. При тестировании достоверности разницы между параметрами, в случае нескольких подгрупп, использовался тест Бонферрони.

Статистическая обработка данных выполнялась в статистическом пакете SPSS 20.0 для Windows.

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

Материалы диссертации используются в работе сотрудников института и кафедры физиологии факультета медицинских наук университета г. Крагуевац (Сербия), кафедры патологии человека ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), а также используются на занятиях, лекциях и в учебных материалах кафедры патологии человека и кафедры патофизиологии Сеченовского Университета.

АПРОБАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИИ

Апробация результатов диссертации проведена на совместной научно-методической конференции сотрудников кафедры патологии человека, кафедры патофизиологии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) и кафедры физиологии факультета медицинских наук университета г.Крагуевац (Сербия) 26 ноября 2020 г.

МАТЕРИАЛЫ ДИССЕРТАЦИИ ДОЛОЖЕНЫ НА:

1) 4th CONGRESS OF PHYSIOLOGICAL SCIENCES OF SERBIA WITH INTERNATIONAL PARTICIPATION:” CURRENT TRENDS IN PHYSIOLOGICAL SCIENCES: FROM CELL SIGNALS TO THE BIOLOGY OF AGING”, September 19-23, 2018, Faculty of Medicine, University of Nis, Nis, Republic of Serbia.

2) 45. ОКТОБАРСКИ ЗДРАВСТВЕНИ ДАНИ, СРПСКОГ ЛЕКАРСКОГ ДРУШТВА ОКРУЖНА ПОДРУЖНИЦА КРАГУЈЕВАЦ, Крагујевац, 29-30.10.2020. године.

3) СИМПОЗИЈУМ ЛАБОРАТОРИЈЕ ЗА КАРДИОВАСКУЛАРНУ ФИЗИОЛОГИЈУ ПОД НАЗИВОМ: „ЕФЕКТИ МОДУЛАЦИЈЕ N-МЕТИЛ-D-

АСПАРТАТНИХ РЕЦЕПТОРА У ИЗОЛОВАНОМ СРЦУ ПАЦОВА ТОКОМ ИСХЕМИЈЕ И РЕПЕРФУЗИЈЕ“. Факултет медицинских наука Университета Крагујевац (Србија) 28.08.2020. године.

ПУБЛИКАЦИИ

Основное содержание диссертационного исследования отражено в 3 научных работах соискателя, из которых 2 в зарубежных изданиях базы данных Scopus.

ОБЪЕМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ

Диссертация изложена на 172 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения. Список литературы содержит 197 источников, из них 15 отечественных и 182 зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 94 рисунками и содержит 20 таблиц.

СООТВЕТСТВИЕ ДИССЕРТАЦИИ ПАСПОРТУ НАУЧНОЙ СПЕЦИАЛЬНОСТИ

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 14.03.03 – патологическая физиология. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 1 и 4 паспорта специальности.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Глутаматные рецепторы и их роль в организме

1.1.1 Виды и особенности ионотропных глутаматных рецепторов

NMDA-рецепторы, вместе с AMPA-рецепторами, каинатными рецепторами и δ -рецепторами относятся к группе ионотропных рецепторов глутамата. Ионотропные глутаматные рецепторы опосредуют синаптическую передачу возбуждения, открывая лиганд-зависимые трансмембранные ионные каналы, которые сортируются по их фармакологическим свойствам. Кроме того, все ионотропные глутаматные рецепторы являются структурными мембранными белками, которые состоят из четырех больших субъединиц, которые образуют центральный канал [4]. Каждая из субъединиц рецептора глутамата содержит четыре домена: большой внеклеточный аминокислотный терминальный домен (ATD), который играет ключевую роль в организации рецептора (специфичной для подтипа), транспорта и модуляции; внеклеточный лиганд-связывающий домен (LBD), который связывает специфические агонисты и антагонисты; трансмембранный домен (TMD), который образует канал, проходящий через мембрану; и внутриклеточный карбокси-терминальный домен (CTD), который участвует в транспорте, подвижности и регуляции рецептора [175, 163]. При соединении четырех субъединиц TMD образуется один ионный канал, причем поверхности контакта между TMD значительно больше, чем у других доменов, что указывает на сильное влияние ионного канала на стабильность тетрамерной структуры распределенных субъединиц [163].

Все рецепторы глутамата кодируются в общей сложности 18 генами, которые могут быть дополнительно подразделены на семь подгрупп на основе профилей связывания лиганда и последовательностей нуклеиновых кислот. AMPA- и каинатные рецепторы, а также субъединицы NMDA-рецептора GluN2 связывают глутамат, тогда как субъединицы NMDA-рецептора GluN1 и GluN3 и δ -рецепторы связывают глицин и D-серин [191].

Таблица 1 - Названия некоторых субъединиц ионотропных глутаматных каналов по номенклатуре NC-IUPHAR [175, 41]

Группа рецепторов	NC-IUPHAR субъединицы	Название хуманог гена	Локализация на хуманим хромозомима
NMDA	GluN1	<i>GRIN1</i>	9q34.3
	GluN2A	<i>GRIN2A</i>	16p13.2
	GluN2B	<i>GRIN2B</i>	12p12
	GluN2C	<i>GRIN2C</i>	17q25
	GluN2D	<i>GRIN2D</i>	19q13.1
	GluN3A	<i>GRIN3A</i>	9q31.1
	GluN3B	<i>GRIN3B</i>	19p13.3
AMPA	GluA1	<i>GRIA1</i>	5q31.1
	GluA2	<i>GRIA2</i>	4q32–q33
	GluA3	<i>GRIA3</i>	Xq25–q26
	GluA4	<i>GRIA4</i>	11q22
Каинатные	GluK1	<i>GRIK1</i>	21q22.11
	GluK2	<i>GRIK2</i>	6q16.3–q21
	GluK3	<i>GRIK3</i>	1p34–p33
	GluK4	<i>GRIK4</i>	11q22.3
	GluK5	<i>GRIK5</i>	19q13.2
δ рецепторы	GluD1	<i>GRID1</i>	10q22
	GluD2	<i>GRID2</i>	4q22

Обозначения: NC-IUPHAR - International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification - Комитет по номенклатуре рецепторов и классификации лекарств

Все четыре субъединицы рецептора AMPA могут связываться с образованием гомомеров или гетеромеров. Субъединицы рецептора каината также могут образовывать гомомеры или гетеромеры, причем субъединицы GluK4 и GluK5 образуют функциональные каналы только в сочетании с субъединицами GluK1, GluK2 или GluK3. Субъединицы δ-рецептора (GluD1 и GluD2) могут образовывать гомомерные рецепторы [6].

Для того чтобы NMDA-рецепторы функционировали необходимо, чтобы они содержали две субъединицы GluN1 и две субъединицы GluN2 или одну субъединицу GluN2 и одну субъединицу GluN3. Поскольку GluN1 и GluN3

связывают глицин, а GluN2 - глутамат, для активации рецептора NMDA требуется действие обоих ко-агонистов [175].

Регуляция проницаемости ионных каналов включает ряд конформационных изменений, которые происходят после связывания или высвобождения соответствующего лиганда. За счет регистрации ионных токов в клетке после связывания глутамата в качестве агониста были определены три отдельных процесса регулирования проницаемости ионных каналов: активация, десенсibilизация и дезактивация [163].

1.1.2 Структура NMDA-рецепторов

Как отмечено выше, NMDA-рецепторы состоят из трех различных типов субъединиц, называемых GluN1, GluN2 и GluN3. Посттрансляционный процессинг РНК для GluN1 приводит к восьми различным вариантам «сплайсинга», причем GluN2 (A - D) кодирует четыре, а GluN3 (A и B) два разных гена. Функциональные NMDA-рецепторы представляют собой гетеротетрамеры, содержащие две облигатные субъединицы GluN1 и еще две субъединицы GluN2 и/или GluN3 [181].

Сочетание различных GluN1 и GluN2 приводит к формированию функционально различных типов NMDA-рецепторов. Различные «сплайсинги» варианта GluN1 определяют свойства рецептора, такие как модуляция цинком, полиаминами и протеинкиназой C (PKC), так и связывание с внутриклеточными белками (кальмодулин, кальмодулин-зависимая протеинкиназа II, α -актинин-2) [104, 144]. Тип субъединицы GluN2 определяет биофизические характеристики каналов, такие как проводимость канала, среднее время открытия, чувствительность к вольтаж-зависимой блокаде магнием (Mg^{2+}) [144, 126]. Комбинация GluN1 и GluN2 характеризуется большей проницаемостью для Ca^{2+} , что определяет специфическую роль NMDA-рецепторов, прежде всего в ЦНС, такую как синаптическая пластичность и нейротоксичность [154].

Субъединицы GluN3 связывают глицин и не способны самостоятельно образовывать функциональные ионные каналы. Комбинация субъединиц GluN1 и

GluN3 приводит к образованию возбуждающих рецепторов, активируемых глицином, но такие рецепторы на сегодняшний день не обнаружены в нейронах, содержащих субъединицу GluN3 [154, 38]. Если NMDA-рецептор, в дополнение к GluN1 и GluN2, также содержит субъединицу GluN3A, это вызывает уменьшение проводимости канала и проницаемости для Ca^{2+} , о чем свидетельствует регистрация ионных токов, генерируемых при активации NMDA-рецепторов в нейронах, где эти рецепторы не содержат субъединицу GluN3A [115].

До настоящего времени были предложены три модели для сборки рецептора NMDA. Согласно первой модели, создаются стабильные гомодимеры GluN1-GluN1 и GluN2-GluN2, которые затем связываются и образуют тетрамерный рецептор [148]. На основе второй модели сначала образуется стабильный гомодимер GluN1-GluN1, а затем добавляются два мономера GluN2, образуя таким образом тетрамерную структуру [19]. Согласно третьей модели, образуются гетеродимеры GluN1-GluN2, которые затем тетрамеризуются [156]. В настоящее время недостаточно данных в пользу ни одной из предложенных моделей.

Как и другие рецепторы в этой группе, субъединицы рецептора NMDA состоят из четырех доменов: ATD, LBD, TMD и CTD.

Внеклеточный LBD образован двумя внеклеточными массивами аминокислот, которые упоминаются как S1 и S2 [168]. Все LBD имеют форму «раковины», причем полипептидный сегмент S1 связан со спиралью TMD M1, и образует большую часть одной стороны «раковины» (D1), а полипептидный сегмент S2 расположен между спиралями TMD M3 и M4 и образует большую часть другой стороны «раковины» (D2). Таким образом, трещина или «карман» образуются там, где расположена точка связывания агониста. Соответствующие агонисты глутамат и глицин, в случае с NMDA-рецепторами, содержат группы, которые связываются с α -амино- и α -карбоксильными группами в LBD. LBD-фрагменты, которые образуют атомные связи с лигандом, в целом сходны по всем глутаматным рецепторам и построены в основном из аминокислотных остатков, принадлежащих к D1-фрагменту LBD. Связывание агонистов LBD вызывает конформационные изменения. При изучении структурных изменений LBD

субъединиц глутаматных рецепторов которые связывали агониста и тех, которые его не связывали, было обнаружено, что в свободной форме D1 и D2 разделены и принимают более открытую конформацию, тогда как в связанной форме D1 и D2 принимают более замкнутую конформационную форму [175].

Внеклеточный ATD играет роль в регуляции функции рецептора и не является существенным для связывания субъединицы и конструирования рецептора. Было показано, что ATD GluN2 субъединица NMDA рецептора контролирует фармакологические и кинетические свойства рецепторов, такие как сродство связывания агониста, время дезактивации, вероятность открытия, среднее время открытия и закрытия [194]. ATD также содержит точки связывания для двухвалентных катионов (Zn^{2+}) и отрицательных аллостерических модуляторов (ифенпродил), а также внеклеточных белков (внеклеточный домен рецепторов эфрина) [144]. Внешний вид субъединицы ATD GluN2B, аналогичный LBD, описывается как имеющий форму «раковины» и состоит из двух частей, R1 и R2. Эти две части образуют трещину, содержащую несколько точек: 1) гидрофильную точку связывания снаружи трещины, построенную из полярных аминокислотных остатков, которые образуют точку связывания для Zn^{2+} , 2) гидрофобную точку связывания, созданную из гидрофобных аминокислотных остатков, расположенных глубоко внутри трещины, и связывающих ифенпродил, и 3) точка, которая связывает ионы Na^+ и Cl^- , роль которых полностью не выяснена [86]. N-конец расположен на вершине фрагмента R1, тогда как фрагмент R2 связан с LBD.

Трансмембранный домен (TMD) всех рецепторов глутамата связан с LBD тремя короткими связями. TMD содержит три трансмембранные спирали, обозначенные M1, M3 и M4, и петлю, которая входит в мембрану и обозначается M2. Трансмембранные спирали M1, M3 и M4, каждая из четырех рецепторных субъединиц образуют трансмембранный канал, петли M2 ограничивают внутренний край поры канала, в то время как части спирали M3 ограничивают внешний край поры канала. Части спиралей M3 простираются навстречу друг другу, вероятно, образуя ворота, которые предотвращают поток ионов, когда

рецептор неактивен. Спираль M1 и M3 образуют ядро канала, а спираль M4 одной субъединицы соединяется со спиралью M1 и M3 другой субъединицы. Соединительная область, называемая pre-M1, образует короткую спираль, параллельную плоскости мембраны и соединенную с карбокси- и аминокс-терминальными концами трансмембранных спиралей M3 и M4. Спираль pre-M1 всех четырех субъединиц, которые являются частью рецептора, образуют «манжету» вокруг внешнего отверстия пор канала, что может оказать существенное влияние на регуляцию канала [175].

Карбокси-терминальный домен (CTD) наиболее сильно различается по аминокислотному составу между субъединицами, которые строят разные рецепторы глутамата. Считается, что CTD влияет на стабилизацию рецептора, посттрансляционную модификацию и маркировку рецептора деградации. Если CTD удаляется в субъединицах GluN1 и GluN2A, функция рецептора NMDA не нарушается, но регулирование изменяется, поскольку CTD содержит точки фосфорилирования и точки связывания для внутриклеточных белков, участвующих в регуляции функции [179]. Почти все субъединицы рецептора глутамата связывают некоторые внутриклеточные белки (цитоскелетные, связывающие, структурные, сигнальные и другие) с несколькими субъединицами рецептора NMDA, связывающимися через CTD с Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой протеинкиназой II, обеспечивая дальнейшее локальное распространение сигнала, что позволяет создать пространственную и временную специфичность рецепторной регуляции. Более поздние исследования предполагают возможность передачи сигнала через рецептор NMDA без утечки Ca^{2+} через связь между CTD и соответствующими протеинкиназами [18].

1.1.3. Контроль открытия рецепторов

Многие исследователи изучали механизм, с помощью которого связывание лиганда вызывает открытие пор рецепторов глутамата. Современное понимание того как работает этот механизм, основано на структурных (кристаллографических и ЯМР) и функциональных (УФ и ИК-

спектрометрических) исследованиях растворимых в воде LBD и функциональных исследований целых рецепторов. На основании исследований, преимущественно проводимых на AMPA и каинатных рецепторах, были сделаны выводы, что механизм связывания агонистов и контроля рецепторов одинаков для всех подтипов рецепторов глутамата и включает, по меньшей мере, три следующих стадии: 1) начальное связывание агонистов с соответствующей точкой связывания; 2) конформационные изменения в структуре в виде «ракушки» LBD, предотвращающие тем самым высвобождение агониста, и 3) конформационные изменения и открытие ионного канала, вызванные распространением изменений LBD [181, 62, 116, 117, 195].

Как отмечалось ранее, LBD состоит из двух доменов: S1 и S2. Верхняя область одной субъединицы домена S1 тесно связана с другой областью субъединицы S1, образуя димер LBD, что делает область S1 очень устойчивой. В отличие от вышесказанного, нижние S2 домены не участвуют в образовании димеров и поэтому остаются относительно мобильными [164]. Сдвиг нижних доменов S2 вследствие связывания лиганда одновременно влияет на области связывания LBD и TMD. Структурные свойства областей связывания очень важны для формирования механизма управления рецепторами и их специфичность особенно отражается в изменении двойной симметрии доменов LBD в четырехкратную симметрию ионного канала.

Несмотря на многочисленные исследования, связанные с кристаллографическим изучением трансмембранных белков, механизм контроля и открытия ионного канала рецептора NMDA, в настоящее время, не может быть полностью объяснен. Однако структурные сходства между глутаматными рецепторами и калиевыми каналами и имеющиеся данные о структуре калиевых каналов в закрытом и открытом состояниях позволяют предположить, что ионный канал открывается вращением и смещением к части спирали M3, которая практически расположена на центральной оси каналов, которые образуют M2 петли. Роль спиралей до- M1, M1 и M4 также до сих пор не совсем ясна [164].

В процессе управления открытием канала изменения в спирали M3 учитывают проходимость центральной полости канала. Полость центрального канала ограничивает пору, которая является ионоселективной, и определяет основные свойства канала - проницаемость для ионов и общую проводимость канала. В верхней части петли M2 находится точка QRN, который играет ключевую роль в регуляции проницаемости Ca^{2+} . AMPA- и каинатные рецепторы, которые содержат глутамин в этом месте, проницаемы для Ca^{2+} , но во время посттрансляционной обработки мРНК для GluA2 и GluK1/2 глутамин меняется аргинином, что делает эти каналы непроницаемыми для Ca^{2+} [110]. В отличие от вышеупомянутых рецепторов, NMDA-рецепторы на этом месте содержат аспарагин, который является причиной высокой проницаемости для Ca^{2+} в NMDA-рецепторах. В частности, замена аспарагина глутамином в субъединице GluN1 рецептора NMDA значительно снижает проницаемость для Ca^{2+} и слегка уменьшает блокаду магния (Mg^{2+}), тогда как такое же замещение в субъединице GluN2 значительно уменьшает блокаду и увеличивает проницаемость для Mg^{2+} , и оказывает очень незначительное влияние на проницаемость для Ca^{2+} [34].

Кроме того, проницаемость для Ca^{2+} в NMDA-рецепторах зависит от типа субъединиц, которые участвуют в конструировании рецептора. Таким образом, рецепторы, содержащие субъединицы GluN2A/GluN2B, наиболее проницаемы для Ca^{2+} , рецепторы, содержащие субъединицы GluN2C, имеют меньшую проницаемость, а рецепторы, содержащие GluN3, наименее проницаемы для Ca^{2+} [175].

1.1.4. Аллостерическая регуляция

Аллостерические модуляторы глутаматных рецепторов в последнее время привлекают большое внимание из-за возможности тонкого воздействия на физиологическое функционирование рецептора, а также из-за возможности его использования в терапевтических целях. Положительные и отрицательные аллостерические модуляторы обладают рядом терапевтических преимуществ по сравнению с агонистами и антагонистами глутаматных рецепторов, включая

большую селективность в отношении отдельных субъединиц, которые образуют часть рецептора. Считается, что лучшая переносимость аллостерических модуляторов в клинической практике является следствием их действия на существующем уровне, в отличие от антагонистов и агонистов, которые вызывают либо полную блокаду, либо чрезмерную стимуляцию.

Внеклеточные домены субъединиц рецептора NMDA, ATD и LBD, в значительной степени гомологичны бактериальным периплазматическим белкам. ATD, который состоит из первых 380 аминокислот, аналогичен так называемому лейцин-изолейцин-валин-связывающему белку (leucine/isoleucine/valine-binding protein - LIVBP), который в дополнение к своей значительной роли во взаимосвязи и организации субъединиц, также образует регуляторный домен, который связывает аллостерические ингибиторы [125].

Многие двухвалентные катионы влияют на инактивацию глутаматного рецептора, вольтаж-зависимый блок ионных каналов и на скорость диссоциации агониста, тем самым усиливая или ингибируя ответ рецептора.

Цинк (Zn^{2+}) является одним из внеклеточных двухвалентных катионов, который обладает наибольшим потенциалом для инактивации NMDA-рецепторов [187, 174]. В нервных окончаниях гиппокампа, миндалины, стриатума, неокортекса и коры Zn^{2+} упаковывается в синаптические везикулы и высвобождается во время нервной деятельности в синаптическую щель вместе с глутаматом [143].

Ионы водорода (протоны, H^+) из внеклеточного пространства ингибируют все типы ионотропных рецепторов глутамата по механизму, который не подразумевает конкурентное ингибирование и ионизацию агониста, предполагая, что они не действуют как блокаторы каналов [125, 176]. Чувствительность рецепторов NMDA к внеклеточным протонам зависит от типов субъединиц, составляющих рецептор, причем H^+ действует как на субъединицы GluN1, так и на GluN2.

1.1.5. Агонисты и антагонисты рецептора

NMDA-рецепторы являются уникальными в группе глутаматных рецепторов, поскольку для их активации требуется одновременное связывание глицина с субъединицами GluN1 и глутамата с GluN2 [93].

1.1.5.1. Агонисты NMDA-рецепторов

В некоторых литературных источниках глицин называют модулятором рецептора NMDA, чтобы отличать его от L-глутамата, который является специфическим агонистом всей группы рецепторов. Однако, поскольку их места связывания структурно сходны, они, вероятно, играют похожие роли в активации рецепторов. Однако в физиологических условиях глицин и глутамат по-прежнему играют разные роли в активации рецептора NMDA. В то время как L-глутамат высвобождается из нервных окончаний в синаптическую щель и является «активным» нейротрансмиттером, считается, что и небольшое количество глицина, которое уже находится в синаптической щели, достаточно для активации рецептора [23]. Было показано, что в определенных частях мозга астроциты выделяют D-серин, который связывается с точкой связывания глицина и участвует в активации рецепторов [141].

Как отмечалось выше, кристаллографические исследования субъединицы LBD GluN1 показали, что глицин и соответствующие аналоги связываются внутри трещины, образованной доменами D1 и D2 области связывания (LBD). В пределах области связывания α -карбоксильная группа глицина образует водородные связи с аминокислотами аргинином в положении 522 (Arg522), треонином в положении 518 (Thr518) и серином в положении 688 (Ser688). Аминогруппа глицина реагирует с карбонильной группой пролина в положении 516 (Pro516), гидроксильной группой треонина в положении 518 (Thr518) и кислородом карбоновой группы аспарагиновой кислоты в положении 732 (Asp732) [61, 175].

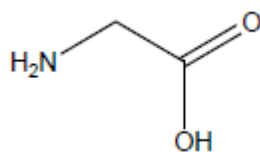


Рисунок 1 - Химическая структура глицина

В дополнение к глицину D- и L-изомеры серина и аланина могут связываться с его точкой связывания и действовать как агонисты субъединицы GluN1 рецептора NMDA [96]. D-серин значительно более эффективен, чем L-серин, и, вероятно, представляет собой основной лиганд для субъединиц GluN1 в определенных частях мозга, таких как супраоптические ядра [142].

Глутамат связывается с субъединицами GluN2. α -карбоксилатная группа глутамата реагирует с аргинином в положении 518 (Arg518), а γ -карбоксильная группа связывается с тирозином в положении 730 (Tyr730) с образованием водородных связей между доменами, образующимися между тирозином в положении 730 (Tyr730) и глутаминовой кислотой в положении 413 (Glu413) [62].

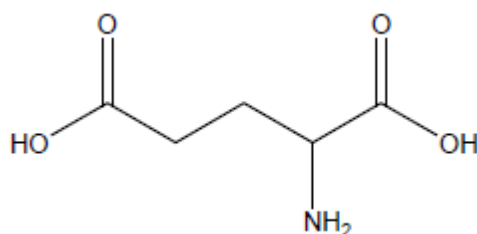


Рисунок 2 - Химическая структура глутамата

Помимо глутамата, эндогенные субъединицы агониста GluN2 включают D- и L-аспартат, гомоцистеин и сульфат цистеина [1, 133, 196]. Пока не обнаружено агонистов, которые связываются с конкретными подтипами субъединицы GluN2.

Субъединицы GluN3, такие как субъединицы GluN1, связывают глицин, но между ними есть некоторые различия. α -карбоксильная группа глицина в точке связывания субъединицы GluN3 связывается с аргинином в положении 638 (Arg638), серином в положении 633 (Ser633) и серином в положении 801 (Ser801), в то время как α -амино группа глицина ассоциируется с аспарагиновой кислотой в

положении 845 (Asp845), серином в положении 631 (Ser631) и серином в положении 633 (Ser633) [192]. Хотя обе эти субъединицы связывают глицин, сходство между ними составляет только 30%, и сродство к изолированному глицину GluN3 примерно в 600 раз больше, чем сродство к субъединице GluN1 [175].

1.1.5.2. Конкурентные антагонисты рецептора NMDA

Существует ряд конкурентных антагонистов NMDA-рецепторов, специфичных для субъединицы GluN1, таких как 7-хлорхинуриновая кислота и ее аналог 5,7-дихлорхинуриновая кислота (5,7-DCKA) [93]. 5,7-DCKA связывается с субъединицей GluN1, в результате чего связи, которые он устанавливает с аминокислотными остатками в расщелине точки связывания LBD, образуются в основном с доменом D1 [61].

Анестезирующее действие ксенона не обусловлено влиянием на ГАМК-ергическую нервную передачу, но зависит от ингибирования NMDA-рецепторов [47]. В исследовании, изучающем эффекты ксенона, было показано, что ингибирование рецептора NMDA ксеноном увеличивается с уменьшением концентрации глицина, что указывает на то, что ксенон связывается с точкой связывания глицина. Изучение мутантных рецепторов с более высоким сродством к глицину показало снижение ингибирующего эффекта ксенона, который снова увеличивается при уменьшении концентрации глицина [49].

Конкурентные антагонисты субъединиц GluN2, такие как (R)-2-амино-5-фосфопентанат, использовались для отделения эффектов NMDA-рецепторов от других ионотропных глутаматных рецепторов (прежде всего AMPA-рецепторов) [102]. Однако трудно синтезировать соединения, которые бы селективно ингибировали отдельные подтипы субъединиц GluN2, что является следствием высокой степени гомологичности между LBD-субъединицами GluN2. Из 39 аминокислот, окружающих точку связывания, только восемь отличаются по

подтипам субъединиц GluN2 (от GluN2A до GluN2D), тогда как 10 аминокислот в самом месте связывания, которые имеют глутаматные связи, полностью идентичны [62].

1.1.5.3. Неконкурентные антагонисты рецепторов NMDA

В группе неконкурентных антагонистов различают антагонисты, которые блокируют рецепторы, когда они закрыты, и антагонисты, чье действие требует, чтобы канал был открыт, чтобы они могли достичь своего места связывания и заблокировать канал.

Считается, что ифенпродил является примером для первой группы, хотя его чаще называют аллостерическим модулятором, и поэтому в данном случае его называют аллостерическим модулятором активности рецептора NMDA. Этанол и динорфины также входят в эту группу антагонистов. Действие этанола зависит от подтипа субъединицы GluN2, поэтому этанол ингибирует рецепторы, содержащие субъединицу GluN2B [87]. Действие динорфинов также зависит от подтипа субъединицы GluN2 (так они в значительной степени ингибируют рецепторы, содержащие субъединицу GluN2A), а также от длины пептидной цепи динорфина (чем длиннее пептидная цепь динорфина, тем он является более сильным ингибитором рецептора NMDA) [32].

Неконкурентные антагонисты рецептора NMDA, которые действуют, когда канал открыт, могут оставаться внутри канала, когда канал закрыт («захвачены» в канале), например, дисоцилпина малеат (МК-801), а также, когда блокаторы частично «захвачены», например, мемантин. Когда канал блокируется антагонистами, которые остаются в канале, агонисты должны связываться с рецептором, чтобы освободить антагонист из канала и реактивировать канал [175, 25].

Предыдущие исследования влияния дизоцилпина (МК-801) и глутамата на нейроны гиппокампа крыс показали, что совместная имплантация этих двух веществ вызывает кратковременное открытие каналов под действием глутамата с последующей блокировкой каналов, вызванной МК-801 [56].

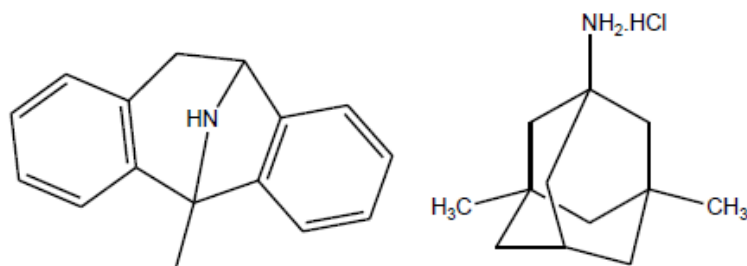


Рисунок 3 - Химическая структура дизоцилпина (МК-801) и мемантина

Блокаторы, которые частично «захвачены», такие как мемантин, также связываются после открытия канала, но быстро высвобождаются рецепторами [120]. Существует несколько потенциальных мест связывания мемантина, один из которых расположен рядом с внеклеточным отверстием пор рецептора GluN1/GluN2A [27]. Связывание мемантина демонстрирует большую зависимость от изменения напряжения на мембране, в результате чего мемантин связывается намного быстрее, высвобождается медленнее и, таким образом, обеспечивает более эффективную блокировку, если мембрана гиперполяризована. Место связывания для мемантина перекрывается с местом связывания для иона магния (Mg^{2+}), в следствии чего мемантин и Mg^{2+} являются подходящими для связывания в поре рецептора NMDA [83].

Мемантин - это вещество, которое было зарегистрировано в качестве лекарственного средства в Европе, Соединенных Штатах и РФ и используется для лечения болезни Альцгеймера. Бета-амилоид, считающийся основной причиной синаптической дисфункции при болезни Альцгеймера [12], нарушает гомеостаз глутамата, а также существуют доказательства того, что бета-амилоид непосредственно активирует NMDA-рецепторы, содержащие субъединицу GluN2A [172, 52]. Клиническая польза от использования мемантина в лечении болезни Альцгеймера умеренная [9, 10], но она охватывает последствия многочисленных расстройств, возникающих во время болезни [83].

Большинство блокаторов NMDA-рецепторов неселективны или слабо селективны в зависимости от подтипа субъединицы GluN2, поэтому МК-801 ингибирует рецепторы, содержащие субъединицу GluN2A или GluN2B, примерно

в 10 раз сильнее, чем рецепторы, содержащие субъединицу GluN2C или GluN2D. Также важно, что потенциал для блокады антагониста рецептора NMDA зависит от значения pH и парадоксальным является тот факт, что кислотные значения pH увеличивают степень связывания МК-801, который связывается внутри самого канала, поскольку кислотные значения pH уменьшают вероятность открытия ионного канала рецептора NMDA. Эта информация указывает на то, что МК-801 связывается со структурными элементами, которые участвуют в создании поры канала [172].

1.1.6. Роль магния в регулировании функции рецептора NMDA

Уникальной особенностью NMDA-рецепторов по сравнению с другими лиганд-зависимыми ионными каналами является двойная регуляция их функции, связывание двух агонистов и изменение мембранного потенциала. Зависимость функции рецептора NMDA от изменения напряжения клеточной мембраны является прямым следствием блокады поры ионного канала рецептора NMDA ионом магния (Mg^{2+}). В частности, во время мембранного потенциала покоя большинство подтипов NMDA-рецепторов блокируется Mg^{2+} из внеклеточного пространства, что в значительной степени препятствует потоку ионов через канал. Вследствие деполяризации клетки устраняется зависящая от напряжения блокада NMDA-рецептора магнием (Mg^{2+}), позволяя потоку ионов проходить через NMDA-рецептор. Последующее поступление Ca^{2+} запускает серию внутриклеточных сигнальных каскадов, которые изменяют функцию клеток, активируя различные киназы и фосфатазы [52].

1.1.7. NMDA рецепторы и центральная нервная система

Физиологическая роль NMDA-рецепторов в первую очередь связана с функцией ЦНС. NMDA-рецепторы, в дополнение к другим ионотропным глутаматным рецепторам (AMPA-рецепторы и каинат), играют ключевую роль в быстрой регуляции синаптической пластичности, включая долгосрочное потенцирование и длительную депрессию, которые являются клеточной основой

памяти и процессов обучения [129, 114]. Одной из наиболее изученных форм синаптической пластичности является длительная потенция в гиппокампе, где активация NMDA-рецептора в синапсе индуцирует включение AMPA-рецепторов в синаптическую мембрану с помощью таких механизмов как: поступление Ca^{2+} , Ca^{2+} /кальмодулин-зависимая протеинкиназа II (CaMKII) и внеклеточный сигнал регулируемой киназы (Ras-ERK). Поступление Ca^{2+} через NMDA-рецепторы также активирует сигнальный каскад, опосредуемый митоген-активируемой протеинкиназой (ERK (extracellular signal-regulated kinase - внеклеточная регулируемая киназа) – MAPK (mitogen-activated protein kinase - митоген-активируемая протеинкиназа)). Активация этого сигнального пути вызывает фосфорилирование cAMP-зависимо-связывающего белка (cAMP-responsive element-binding protein - CREB), который вызывает транскрипцию нескольких «синапс-связанных генов», которые необходимы для консолидации памяти [29, 71].

NMDA-рецепторы, состоящие из разных субъединиц, неравномерно распределены в различных частях мозга, кроме того, их экспрессия меняется с возрастом. Рецепторы субъединиц GluN2B более распространены в головном мозге на ранних стадиях развития, и их количество начинает уменьшаться с подросткового возраста, в то время как количество NMDA-рецепторов, содержащих субъединицу GluN2A, увеличивается в процессе старения [107]. Механизм, с помощью которого состав субъединиц рецептора NMDA меняется во время старения еще не установлен, также как и влияние этих изменений на когнитивные функции [98]. Одним из объяснений является изменение экспрессии отдельных субъединиц NMDA-рецептора, в результате чего экспрессия субъединиц GluN1, GluN2B и GluN3A уменьшается, а экспрессия субъединиц GluN2A и GluN3B увеличивается. Различные авторы приводят доводы в пользу этой точки зрения, основываясь на зарегистрированном снижении мРНК GluN1 в определенных частях мозга, таких как базальный гипоталамус, префронтальная кора, а также в островковой, орбитальной и соматосенсорной коре [45, 68, 112]. Изменения в экспрессии различных субъединиц GluN2 также наблюдались

главным образом в гиппокампе, причем изменения в составе GluN2 имеют большое физиологическое значение, поскольку они сильно влияют на свойства рецептора, такие как среднее время открытия рецептора и проводимость рецептора [165, 197].

Альтернативой этому является способность изменять локализацию рецептора с точки зрения включения рецептора в мембрану или перемещения рецептора из внесинаптических частей мембраны в сам синапс. Исследования на мышцах показали, что экспрессия субъединицы GluN2B в синаптической мембране, но не в гомогенате мозговой ткани, нарушается в лобной коре, что позволяет предположить, что уменьшение содержания субъединиц GluN2B может быть связано с секвестрацией NMDA-рецепторов, содержащих эту субъединицу, во внешней мембране [97]. Механизмы, которые также связаны с изменением состава субъединиц рецептора NMDA, также включают трансляционные модификации, окислительный стресс и влияние микроглии [98]. Эти изменения связаны с нарушениями памяти (прежде всего пространственной), которые происходят в процессе старения [59, 145].

Синаптическая пластичность в зрительной коре взрослых обусловлена NMDA-рецепторами [2], а именно NMDA-рецепторами, содержащими субъединицу GluN2A. Подтверждением этой точки зрения является тот факт, что ни селективные блокаторы NMDA-рецепторов, содержащие субъединицу GluN2B, ни стимуляция этих рецепторов, не влияют на длительное потенцирование в зрительной коре [107, 182]. Более быстрая кинетика NMDA-рецепторов, содержащих субъединицу GluN2A, имеет решающее значение для быстрой обработки визуальной информации и адекватного ответа нейронов на сенсорную стимуляцию, что, вероятно, является причиной доминирования этого типа рецепторов в зрительной коре [60].

Как отмечалось выше, NMDA-рецепторы играют ключевую роль в формировании памяти, в первую очередь - кратковременной или рабочей памяти, для которой также важна функция дорсолатеральной префронтальной коры (dlPFC). В отличие от сенсорной коры, dlPFC обеспечивает умственную

деятельность независимо от сенсорных раздражителей и является основой для рабочей памяти - памяти, которая активна в течение очень короткого времени, всего несколько секунд, и является основой для более сложных форм памяти [5]. Регистрация нервной активности dlPFC у обезьян показала непрерывную активность нейронов, которая обеспечивает процесс запоминания, и запускается повторной активацией пирамидных нейронов [67, 183]. Эта продолжающаяся нейрональная активность облегчается действием NMDA-рецепторов, прежде всего рецепторов NMDA, содержащих субъединицу GluN2B, поскольку они имеют медленную кинетику и наиболее подходят для функции нейронной сети в dlPFC без сенсорных стимулов [190]. Блок NMDA-рецепторов, в первую очередь содержащий субъединицу GluN2B, значительно снижает активность нейронов в dlPFC, в то время как блокирование активности AMPA-рецепторов не влияет на нервную деятельность в этой части мозга. Однако в этом случае вопрос состоит в том, как преодолеть блокаду NMDA-рецепторов магнием, и ответом на него, вероятно, является другой тип рецептора, такой как никотиновый $\alpha 7$ -рецептор. Никотиновые $\alpha 7$ -рецепторы локализуются в постсинаптическом утолщении глутаматных синапсов, и блокирование активности этих рецепторов ингибирует возбуждение NMDA-рецепторов. Поскольку ацетилхолин высвобождается во время бодрствования (но не во время глубокого сна), стимуляция никотиновых $\alpha 7$ -рецепторов позволяет осознанно мыслить [60, 184].

Нарушение активности рецептора NMDA связано с рядом неврологических заболеваний. Ключевым расстройством при болезни Альцгеймера является неадекватная регуляция индуцированной амилоидом бета ($A\beta$) активности NMDA-рецептора. С одной стороны, $A\beta$ индуцирует эндоцитоз и интернализацию синаптических NMDA-рецепторов, а с другой стороны индуцирует гиперактивность extrasинаптических NMDA-рецепторов, препятствуя переходу глутамата из внеклеточного пространства, вызывая тем самым нейротоксичность [177]. Синаптическая дисфункция, вызванная $A\beta$, зависит от чрезмерной стимуляции NMDA-рецептора, что приводит к увеличению концентрации Ca^{2+} в цитоплазме нейронов, что дополнительно запускает активацию множественных

сигнальных механизмов, конечным результатом которых является нарушение функции митохондрий, дисфункция и потеря синапсов, нарушение долгосрочной потенциации, ухудшение когнитивных функций [162]. Эндоцитоз NMDA-рецептора, индуцированный A β , включает никотиновые $\alpha 7$ -рецепторы, а также другие факторы (протеинфосфатазу 2B и тирозин фосфатазу STEP), а использование мемантина в качестве некомпетентного антагониста NMDA-рецептора оказывает нейропротективный эффект благодаря множеству механизмов [136, 140].

1.1.8. NMDA-рецепторы и сердечно-сосудистая система

Как отмечалось выше, NMDA-рецепторы играют ключевую роль в функционировании ЦНС, однако несколько десятилетий назад некоторые авторы указали на возможность их существования вне нервных тканей [127, 128]. Имеются данные об их распространенности в большом количестве тканей и органов, а в сердце они впервые были обнаружены в кардиомиоцитах крыс [105].

В экспериментах, основанных на клонировании комплементарной ДНК (кДНК) человеческого GluN2C, было обнаружено 88% сходство с крысиным GluN2C, а также высокая распространенность этой субъединицы как в определенных частях нервной ткани, так и в других тканях, и прежде всего в сердце [134]. 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 распределение в ряде органов, таких как сердце, легкие, почки и желудок [103]. Исследование отдельных субъединиц рецептора NMDA выявило высокую представленность субъединицы GluN1 в сердце крыс, тогда как те же авторы не обнаружили субъединиц GluN2, и их заключение было сведено к возможному существованию гомоолигомерных рецепторов NMDA, состоящих из субъединиц GluN1 [157]. Изучая распространенность отдельных субъединиц NMDA-рецепторов в сердце крыс, регистрировали наличие субъединицы GluN2B, обнаруженной в сердечной ткани от ранних стадий развития до десятой недели постнатальной жизни [100]. Однако,

в этом исследовании, не наблюдалось наличия субъединицы GluN1 ни на одной стадии развития. Таким образом, результаты этих исследований противоречивы.

Также имеются данные о NMDA-рецепторах в эндотелии кровеносных сосудов в разных частях тела. Введение глутамата и D-серина (который связывается с точкой связывания глицина) вызывает активацию рецепторов NMDA, которые активируют эндотелиальную синтазу оксида азота (eNOS), что приводит к увеличению продукции NO и вазодилатации в мозговых артериях. Этот каскад опосредуется астроцитами, которые накапливают глутамат и D-серин и выделяют их в зависимости от нервной активности [39, 131]. Изучение влияния гомоцистеина и механизмов, посредством которых он оказывает негативное влияние на CCC, показало наличие субъединиц 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 субъединицы GluN1 под действием гомоцистеина и увеличении пролиферации клеток, а также об уменьшении пролиферации при предыдущем введении МК-801 [17].

Концентрация глутамата в спинномозговой жидкости крыс составляет 11,4 мкмоль/л, тогда как концентрации в плазме значительно выше [101, 118]. На основании этого факта можно сделать вывод, что периферические NMDA-рецепторы находятся под постоянной тонической активацией. Однако действие активаторов на данные рецепторы в периферических тканях повышает их активность [30, 58, 108]. Одним из возможных объяснений является то, что интерстициальные концентрации глутамата не совпадают с концентрациями в плазме. В ЦНС концентрации глутамата в интерстиции поддерживаются в очень узком диапазоне благодаря действию возбуждающих переносчиков аминокислот EAAT (excitatory amino acid transporters), которые удаляют глутамат из синаптической щели, предотвращая чрезмерную стимуляцию нейронов и, как следствие, нейротоксичность [111]. Поскольку различные изоформы этих переносчиков были обнаружены в периферических тканях, в том числе в CCC, возможно, что концентрация глутамата во внеклеточном пространстве этих

тканей регулируется EAAT [99, 149]. Возможно это связано с меньшей чувствительностью рецепторов NMDA на периферии, то есть меньшим сродством к глутамату и глицину, по сравнению с рецепторами NMDA в ЦНС. Это открытие подтверждается данными исследований, указывающих, что константа диссоциации (K_d) глутамата, который связывается с рецепторами остеобластов NMDA, во много раз выше, чем у рецепторов NMDA в нервной ткани [31].

Появляется все больше доказательств важности NMDA-рецепторов в регуляции электрической активности сердца [158]. Кроме того, все больше исследований посвящено изучению влияния чрезмерной стимуляции этих рецепторов на сердце и CCC, в результате чего хроническая активация этих рецепторов заставляет некоторых агонистов вызывать значительные электрофизиологические расстройства и увеличивать вероятность желудочковых аритмий [113]. Механизм патофизиологических нарушений, вызванных высокими концентрациями гомоцистеина, связан с активацией рецептора NMDA [44].

Ингибирование NMDA-рецепторов снижает вероятность возникновения аритмий во время реперфузии, а также накопления Ca^{2+} в митохондриях [64, 170]. Увеличение концентрации Ca^{2+} из-за активации рецептора NMDA вызывает увеличение окислительного стресса, и эти цитотоксические эффекты можно предотвратить с помощью блокатора этих рецепторов [178]. В исследованиях, где наблюдалась делеция субъединицы GluN1 в кардиомиоцитах, отмечалось снижение продукции АФК под действием гомоцистеина, а также снижение концентрации NO и матричной металлопротеиназы 9 (MMP-9) в митохондриях сердца [121, 130]. Дополнительные исследования указывают на защитную роль блокады NMDA-рецепторов в сердце. Блокада NMDA-рецепторов мемантином снижает уменьшение количества ядер в кардиомиоцитах левого желудочка животных, подвергшихся воздействию холодового стресса [53].

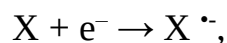
Вышеуказанные факты указывают на важность NMDA-рецепторов в регуляции физиологической активности, а также в механизмах патологических процессов в CCC.

1.2 Свободные радикалы и окислительно-восстановительное равновесие

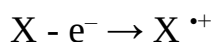
Процессы окисления и восстановления происходят непрерывно во всех живых биологических системах [15]. В процессе окисления образуются свободные радикалы, то есть молекулы, атомы или ионы, которые имеют в своей структуре один или несколько неспаренных электронов, так что они находятся между окисленным и восстановленным состоянием. В физиологических условиях выработка свободных радикалов и их устранение находятся в равновесии друг с другом, обеспечивая тем самым оптимальную среду для метаболических процессов. Свободные радикалы в низких физиологических концентрациях играют важную роль в организме, но их производство в больших количествах может превышать способность антиоксидантной системы организма устранять их, что приводит к повреждению макромолекул и нарушению функции клеток [72]. Нарушение баланса прооксидантов и антиоксидантов в пользу прооксидантов вызывает окислительный стресс [7].

1.2.1. Свободные радикалы

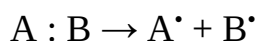
Свободные радикалы - это молекулы, атомы или ионы, которые имеют один или несколько не спаренных электронов на последней орбите, что делает их, как правило, очень реакционно-способными, хотя их реакционная способность значительно варьируется [75]. Самой простой формой свободных радикалов является атом водорода, потому что он имеет только один электрон. В живых системах существует ряд свободных радикалов, некоторые из которых играют положительную роль и участвуют в процессах передачи сигнала, тогда как другие вызывают повреждение макромолекул и разрушение биологических систем, хотя их влияние зависит от их концентрации. Свободные радикалы могут образовываться путем присоединения электронов к нерадикальным формам с образованием анион-радикалов, радикалов, которые заряжены отрицательно (электроны являются носителями отрицательного заряда):



или потерю одного электрона с образованием радикальных катионов, которые имеют избыток положительного заряда:

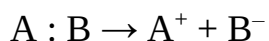


Одним из способов образования свободных радикалов является разрыв ковалентной связи, когда каждый из атомов сохраняет один электрон из общей пары электронов, так называемое гомолитическое деление.



Примером гомолитического деления является разрыв связи между двумя молекулами кислорода в перекиси водорода (H_2O_2) ультрафиолетовым (УФ) излучением с образованием гидроксильных радикалов ($OH^{\bullet}$) или расщепление молекул воды с образованием водородного радикала ($H^{\bullet}$) и гидроксила радикала ($OH^{\bullet}$) [55, 171].

В отличие от гомолитического деления, во время гетеролитического деления один из атомов сохраняет оба электрона и становится отрицательно заряженным, а другой становится положительно заряженным:



В результате гидролитического деления воды образуются ионы водорода (ион водорода, H^+) и гидроксид (или, как его часто называют, гидроксил) ион (OH^-).

Эволюция свободных радикалов может быть разделена практически на три фазы: фаза инициации, фаза распространения и фаза терминации.

- фаза инициации включает добавление или вычитание электрона к нерадикальным формам, в результате чего их физические и химические характеристики изменяются и становятся значительно более реактивными;
- фаза распространения включает период, в течение которого полученный свободный радикал реагирует с окружающими молекулами (молекулой-мишенью) и принимает один электрон, в результате чего он достигает стабильного состояния, но молекула-мишень становится свободным радикалом. Получающиеся в результате свободные радикалы далее взаимодействуют с

окружающими молекулами, вызывая образование новых свободных радикалов, тем самым увеличивая количество свободных радикалов за короткий период;

- во время фазы терминации свободные радикалы нейтрализуются действием ферментативных и неферментативных компонентов антиоксидантной системы, тем самым предотвращая их дальнейшее распространение.

В биологических системах имеется много свободных радикалов, но, безусловно, наиболее значительными являются свободные радикалы кислорода или АФК (*Reactive Oxygen Species* - ROS), а также свободные радикалы азота (виды активного азота - *Reactive Nitrogen Species* - RNS) и активные формы углерода (*Reactive Carbon Species* - RCS) и активные формы серы (*Reactive Sulfur Species* - RSS) (таблица 2) [160].

Таблица 2 - Виды свободных радикалов

Активные формы кислорода (АФК)	
Радикалы	Нерадикалы
Супероксидный анион радикал - $O_2^{\bullet-}$	Перекись водорода - H_2O_2
Гидроксильный радикал - $OH^{\bullet}$	Гипохлорная кислота - $HOCl$
Пероксидный радикал - $ROO^{\bullet}$	Озон - O_3
Алкоксильный радикал - $RO^{\bullet}$	Синглетный кислород - 1O_2
Гидропероксильный радикал - $HOO^{\bullet}$	
Реактивные виды азота - RNS	
Радикалы	Нерадикалы
Азот-моноксидный радикал - $NO^{\bullet}$	Азот-диоксидный анион - NO_2^-
Азот-диоксидный радикал - $NO_2^{\bullet}$	Азот-триоксид - N_2O_3
	Ион нитрония - NO_2^+
	Пероксинитрит - $OONO^-$
	Алкил пероксинитрита - $ROONO$
	Анион нитроксила - NO^-
	Катион нитрозила - NO^+

Реактивные врсте угљеника - RCSАлкильный радикал - $\text{R}^\bullet$ Алкоксильный радикал - $\text{RO}^\bullet$ Пероксильный радикал - $\text{ROO}^\bullet$ **Реактивные врсте сумпора - RSS**Тиол радикал - $\text{RS}^\bullet$ Глутатион радикал - $\text{GS}^\bullet$ Диглутатион-дисульфид анион радикал - $\text{GSSG}^{\bullet-}$ *1.2.2. Свободные радикалы и сердечно-сосудистая система*

Производство и устранение АФК/RNS в сердце зависит от ферментов, участвующих в их синтезе и соответствующих антиоксидантных систем, и происходит главным образом в митохондриях, саркоплазматической сети в сарколемме [185]. Во всех клетках, включая кардиомиоциты, продуцирование свободных радикалов в физиологических условиях происходит преимущественно в митохондриях в процессе окислительного фосфорилирования, то есть во время синтеза АТФ. В миоцитах митохондрии занимают от 30% до 40% объема и синтезируют более 90% АТФ. Из-за большого количества антиоксидантных ферментов в митохондриях (таких как супероксиддисмутаза - СОД) наибольшее количество свободных радикалов превращается в пероксид водорода (H_2O_2), который впоследствии восстанавливается под действием различных пероксидаз до воды [57, 89]. H_2O_2 может диффундировать из митохондрий в цитоплазму, где она участвует в редокс-зависимой сигнальной трансдукции. В условиях повышенной выработки АФК в митохондриях фрагмент H_2O_2 превращается в высокореактивный гидроксильный радикал ($\text{OH}^\bullet$) в реакции Фентона.

В дополнение к митохондриям в саркоплазматической сети и сарколемме также образуются свободные радикалы. В саркоплазматической сети, помимо АФК, таких как супероксидный анионный радикал ($\text{O}_2^{\bullet-}$) и H_2O_2 , есть также оксид азота (NO), который принадлежит к RNS. Ферменты, участвующие в синтезе этих

молекул, взаимосвязаны, и, таким образом, активность фермента нейрональной синтазы оксида азота (nNOS или NOS1), который катализирует синтез NO, в физиологических условиях снижает активность фермента ксантиноксидоредуктазы (XOR), который катализирует синтез $O_2^{\cdot-}$, сохраняя концентрацию $O_2^{\cdot-}$ на низком уровне [82, 91]. Основным источником $O_2^{\cdot-}$ в сарколемме является фермент NADPH оксидаза 2 (NOX2), который восстанавливает O_2 до $O_2^{\cdot-}$, который выводится из клетки, где он быстро подвергается дисмутации ферментом СОД, продуцируя H_2O_2 [92, 161, 188].

$O_2^{\cdot-}$ образующийся в сарколемме и саркоплазматической сети может вступать в реакцию с NO с образованием чуть менее реактивного радикала пероксинитрита ($ONOO^{\cdot-}$) или путем дисмутации под действием цитоплазматической формы СОД (Cu/ZnСОД, СОД1) с образованием H_2O_2 . $ONOO^{\cdot-}$ дополнительно нейтрализуется реакциями с NO, CO_2 , мочевой кислотой или восстановленным глутатионом, в то время как полученный H_2O_2 восстанавливается под действием пероксиредоксина (тиоредоксин пероксидаза, Prx) или пероксидазы, которая участвует в метаболизме глутатиона [95, 185].

В дополнение к nNOS в миокарде есть эндотелиальная синтаза оксида азота (eNOS, NOS3), и оба этих фермента представлены в сердце. Эти ферменты в основном локализуются в сарколемме и мембране саркоплазматического ретикулума, хотя их локализация может меняться при воздействии различных стимулов [147].

В физиологических условиях АФК/RNS участвуют в регуляции сердечной функции. Тип окислительно-восстановительных биомолекул, участвующих в индивидуальных регуляторных процессах, зависит от нескольких факторов, таких как окислительно-восстановительный потенциал биомолекул (имеет один или два неспаренных электрона), период полураспада окислительно-восстановительных биомолекул и окислительно-восстановительный потенциал окружающей среды. Эти факторы влияют на количество молекул-мишеней, на которые могут воздействовать окислительно-восстановительные биомолекулы, расстояние, на

котором они могут оказывать свое влияние, и тип модификации, которую может оказывать конкретная биомолекула АФК/RNS [185].

Окисляющие агенты оказывают свое биологическое действие путем обратимой модификации белка, особенно аминокислот, содержащих серу (цистеин или метионин). Обратные модификации цистеина включают в себя β -нитрозилирование, реакции β -сульфенилирования и образование дисульфидных связей, либо между двумя молекулами цистеина, либо между цистеином и глутатионом (S-глутатионилирование). Эти модификации изменяют функцию пораженного белка, независимо от того, становится ли этот белок функциональным или его функциональность уменьшается или нарушается, а также могут служить для защиты белка от стойкого окислительного повреждения [147, 185]. Окислительно-восстановительные биомолекулы могут участвовать в передаче сигнала от одной части клеток к другой несколькими способами: воздействуя на редокс-чувствительные факторы транскрипции, транснаитрозиацией белков или воздействуя на другие сигнальные молекулы, такие как фосфатазы или киназы [105].

В дополнение к вышеупомянутой физиологической роли биомолекул АФК/RNS, их повышенная продукция, то есть окислительный стресс, связана с рядом расстройств, среди которых значительную долю составляют нарушения ССС. Атеросклероз, как одно из наиболее важных патологических явлений современности, со многими осложнениями, которые он вызывает, напрямую связан с окислительным стрессом [1, 8], то есть с метаболизмом окисленных ЛПНП [54]. Нарушения сердечного ритма, такие как мерцательная аритмия, также связаны с окислительным стрессом [13, 92, 137].

1.3. Ишемическо-реперфузионное повреждение

Термин ишемия впервые был использован в начале девятнадцатого века для описания недостаточного поступления крови в ткань из-за обструкции артериального протока. Таким образом, в течение почти двух столетий интенсивных исследований врачи стремились лучше понять механизмы

повреждения тканей во время ишемии, надеясь, что разработать терапевтические методы для улучшения кровотока через ткани и, таким образом, уменьшить ущерб, вызванный ишемией. Опубликованные результаты были впечатляющими и внесли значительный вклад в лучшее понимание молекулярных, клеточных, тканеспецифических и системных процессов, возникающих во время ишемии [189]. Раннее установление кровотока через ишемические зоны с помощью тромболитической терапии или первичной чрескожной ангиопластики коронарной артерии является немедленной терапевтической стратегией, которая имеет большое значение для уменьшения размера инфаркта миокарда [40]. Тем не менее, хотя создание повторного кровотока (реперфузии) в ткани, пораженной ишемией, необходимо для предотвращения необратимого повреждения клеток, сама реперфузия может парадоксальным образом усугубить повреждение ткани, вызванное гипоксическим стрессом [153]. Это явление, известное как ишемически-реперфузионное повреждение (И/Р повреждение), является обычной клинической проблемой и находится в центре внимания исследований более четырех десятилетий.

1.3.1. Патопфизиология ишемически-реперфузионного повреждения

Длительная ишемия вызывает множество метаболических и структурных изменений. Во время ишемии преобладает анаэробный метаболизм, который вызывает снижение рН внутри клетки. Чтобы смягчить эффекты чрезмерного накопления ионов водорода, насос Na^+/H^+ имеет тенденцию выбрасывать как можно больше ионов H^+ , что приводит к увеличению количества ионов Na^+ , попадающих в клетку [48]. Из-за сниженного клеточного окислительного фосфорилирования, возникающего в период ишемии, ингибируется активность Na^+/K^+ -АТФ-азы, тем самым блокируя синтез богатых энергией фосфатов, аденозин-5'-трифосфата (АТФ) и фосфокреатина. Кроме того, катаболизм аденина во время ишемии приводит к внутриклеточному накоплению гипоксантинов, которые затем превращаются в токсичные АФК [153]. В дополнение к влиянию на активность Na^+/K^+ АТФ-азы, ишемия уменьшает выход Ca^{2+} из клетки,

ингибирует его обратный захват эндоплазматическим ретикулумом, что приводит к чрезмерному накоплению Ca^{2+} в клетке. В сердце эти клеточные изменения сопровождаются активацией внутриклеточных протеаз, которые повреждают миофибриллы. Эти изменения и, следовательно, степень повреждения тканей варьируются в зависимости от степени снижения кровотока и продолжительности ишемического периода. Таким образом, снижение выработки и усиление деградации АТФ, нарушение ионного гомеостаза, образование АФК и высвобождение проапоптотических белков являются ключевыми факторами формирования необратимого повреждения при ишемии [36, 48].

Внутри эндотелия ишемия вызывает повышенную экспрессию провоспалительных генных (молекулы адгезии лейкоцитов и цитокинов) и биоактивных (эндотелин и тромбоксан A_2) медиаторов. С другой стороны, снижается производство «защитных» генных медиаторов, таких как тромбомодулин, простациклины и оксид азота. Соответственно, ишемия вызывает провоспалительное состояние, которое повышает чувствительность тканей во время реперфузии, вызывая еще большее повреждение, чем то, которое было до нее [84, 153].

Хотя экстренная реперфузия, с одной стороны, восстанавливает снабжение кислородом и субстратами, необходимыми для синтеза АТФ, и нормализует внеклеточный pH путем выброса накопленных ионов H^+ , реперфузия, с другой стороны, оказывает вредное воздействие на ткани. Однако установление реперфузии уменьшает размер инфаркта на 50%, и считается, что неблагоприятные последствия этого явления можно объяснить ее стадиями [193]. Механизмы, объясняющие реперфузионное повреждение тканей, являются сложными и многофакторными и включают в себя:

1. генерацию АФК;
2. накопление ионов Ca^{2+} ;
3. открытие митохондриальных переходных пор;
4. эндотелиальную дисфункцию;
5. образование протромбогенного фенотипа;

6. выраженный воспалительный ответ [193].

1.3.2. Роль АФК в возникновении ишемически-реперфузионного повреждения

Реперфузия ишемической ткани приводит к образованию токсичных видов кислорода, которые включают супероксидный анионный радикал ($O_2^{\cdot-}$), гидроксильный радикал ($OH^{\cdot}$), гипохлорную кислоту ($HOCl$), перекись водорода (H_2O_2) и пероксинитрит из оксида азота.

Во время ишемии клеточный АТФ разлагается до гипоксантина, который окисляется до ксантина под действием ксантидегидрогеназы. Однако во время ишемии ксантидегидрогеназа превращается в ксантиноксидазу, под действием которой невозможно превращение гипоксантина в ксантин, что приводит к накоплению гипоксантина в тканях. Когда кровоток через ткани и, следовательно, нормальный уровень кислорода восстанавливаются во время реперфузии, происходит чрезмерное производство гипоксантина под действием ксантинового окислителя, что приводит к образованию АФК. Получающиеся радикалы являются сильными окислителями, которые вызывают повреждение клеточной мембраны в процессе перекисного окисления липидов [173]. Кроме того, АФК стимулирует активацию лейкоцитов и хемотаксис, активируя образование фосфолипазы арахидоновой кислоты A_2 , важного предшественника для синтеза эйкозаноидов (тромбоксан A_2 и лейкотриен B_4), что приводит к воспалению. Воспалительному процессу также способствует экспрессия генов цитокинов путем активации фактора транскрипции, такого как ядерный фактор kB . Считается, что первая фаза восстановления кровотока через предшествующую ишемическую область играет важную роль в генерации АФК и последующем развитии И/Р повреждения [42, 85].

1.3.3. Накопление ионов Ca^{2+}

Массовое накопление ионов Ca^{2+} во время ишемии определяет гибель клеток многих органов. Одним из способов объяснения гибели клеток вследствие летального повышения уровня этого иона является его поглощение в клетке

митохондриальным носителем, белковой структурой, которая благодаря положительному заряду Ca^{2+} переносит эти ионы в клеточном матриксе. Кроме того, И/Р повреждение способствует повышению уровня цитоплазматического Ca^{2+} , что вызывает патологическую активацию Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой протеинкиназы, что также способствует гибели клеток и последующей дисфункции органов [84]. Повышенные уровни Ca^{2+} также активируют семейство цистеиновых протеаз, известных как кальпаины, которые, в свою очередь, уменьшают объем внутриклеточных белков, включая цитоскелетные, эндоплазматические и митохондриальные белки. Фармакологические ингибиторы кальпаина, известные как кальпаистатин, играют защитную роль в мозге, сердце и почках. Разрушение кальпаистатина происходит во время И/Р повреждения, в результате чего активируются кальпаины и происходит гибель клеток [21].

1.3.4. Открытие митохондриальных переходных пор

Открытие пор митохондрий во внутренней мембране митохондрий является критическим событием в развитии сердечной смерти в ответ на И/Р повреждение. Вследствие ингибирования, при низких значениях pH, митохондриальные поры остаются в покое во время ишемии. Однако после реперфузии внезапно повышается уровень Ca^{2+} в митохондриях вместе с АФК и происходит открытие пор. При пропускании ионов H^+ внутрь клеточного матрикса происходит ингибирование синтеза АТФ, в то время как вода через осмотический градиент проходит через митохондрии, заставляя их набухать и взрываться [22, 77].

1.3.5. Факторы риска и клинические проявления ишемическо-реперфузионного повреждения

Большинство ишемических эпизодов, наблюдаемых в клинической практике, связаны с тромбоэмболической или артериотромботической окклюзионной болезнью. К некоторым из факторов риска относятся мужской возраст и наследственные факторы. Тем не менее, другие важные факторы риска могут быть изменены или контролироваться, включая курение, гиперлипидемию,

гипертонию, отсутствие физической активности, ожирение, метаболический синдром и сахарный диабет. Считается также, что потребление алкоголя увеличивает риск инфаркта миокарда [84]. Клинические проявления И/Р повреждения различны и варьируют от преходящей реперфузионной аритмии до развития мультисистемной дисфункции органов с летальным исходом. Хотя реакция на И/Р повреждение значительно различается у разных людей, присутствие таких факторов риска, как гиперхолестеринемия, гипертония или диабет, еще больше повышает уязвимость микроциркуляторного русла к неблагоприятным воздействиям И/Р повреждения [193].

Хотя многие терапевтические стратегии, применяемые в клинических, экспериментальных моделях, успешно уменьшают или ограничивают повреждение тканей во время И/Р повреждения, неоднозначные результаты были получены в клинических испытаниях на людях. Своевременная реперфузия ишемической области все еще считается краеугольным камнем в предотвращении повреждения тканей из-за этого явления. Поскольку ранняя фаза реперфузии представляет собой критический период, в течение которого происходит повреждение сердечной мышцы, основной целью стратегий лечения является именно этот период во время И/Р повреждения. Адаптация и реализация этих стратегий в клинической практике станет важным достижением в области кардиологии с целью снижения частоты возникновения острого инфаркта миокарда и предотвращения его возникновения во время операции на сердце.

1.4. Феномен прекондиционирования

За последние два десятилетия были предприняты значительные усилия для разработки стратегий по уменьшению масштабов инфаркта миокарда и других клинических проявлений в результате И/Р повреждения. Как отмечалось выше, своевременное назначение фармакологических и хирургических вмешательств в период реперфузии имеет большое значение. Хотя терапевтический прогресс достигнут с использованием новых антитромбоцитарных и антиагрегационных препаратов, адекватной терапевтической стратегии по предотвращению

реперфузионного повреждения миокарда до сих пор не существует. С целью сведения к минимуму вредного воздействия на сократимость и метаболизм миокарда, были использованы различные подходы, некоторые из которых включают введение β -адренергических рецепторов, ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента и использование антиоксидантов. Фибринолитическая терапия или чрескожная транслюминальная коронарная ангиопластика путем разрушения тромба приводит к реперфузии в ишемических сегментах при быстром введении, что может привести к некрозу миокарда [79]. Одним из немногих вмешательств, которое является общепринятым и по-прежнему привлекает большое внимание ученых, является феномен preconditionирования сердца ишемией, который все чаще применяется для решения этой серьезной клинической проблемы.

Хотя точный механизм, ответственный за preconditionирование, полностью не выяснен, появляется все больше свидетельств того, что эндогенные защитные вещества миокарда, такие как аденозин [150], брадикинин, простагландин и NO, могут играть центральную роль [109]. Тем не менее, как и где запоминается preconditionирование остается загадкой сегодня.

Учитывая, что данное исследование относится к эффектам preconditionирования на модели изолированного сердца крысы, особое внимание уделяется именно типам и эффектам его preconditionирования.

1.4.1. Preconditionирование миокарда ишемией

Ишемическое preconditionирование относится к явлению, при котором воздействие на ткани коротких периодов ишемии, за которыми следует период реперфузии, уменьшает вредный эффект следующего, длительного периода ишемии, т.е. размер инфаркта [132]. Экспериментальные исследования показали, что preconditionирование улучшает сократительную способность миокарда, а также уменьшает накопление и адгезию нейтрофилов, предотвращая апоптоз миоцитов И/Р повреждения [3].

Термин ишемическое прекондиционирование впервые был введен Mungu и Jennings в 1986 году, когда во время эксперимента короткие периоды окклюзии коронарной артерии применялись к одной группе собак, 4 раза в течение 5 минут с последующей реперфузией по 5 минут каждая. В конце теста они полностью закрывали ту же коронарную артерию в течение 40 минут, вызывая тем самым инфаркт миокарда. Во второй группе собак окклюзии коронарной артерии не предшествовала кратковременная ишемия. Величина инфаркта, вызванного окклюзией коронарной артерии, была на 75% меньше в первой группе животных, где инфаркту предшествовала ишемия миокарда [63].

Защита при прекондиционировании имеет два этапа:

- раннее прекондиционирование, которое происходит сразу после ишемии, приводящей к прекондиционированию, продолжительностью около 1-2 часов, и
- позднее прекондиционирование, которое происходит через 24 часа после эпизода ишемии, длится около 4 дней и защищает миокард от инфаркта, сердечной недостаточности и желудочковых аритмий, вызванных ишемией и реперфузией.

Для того чтобы ишемия вызывала прекондиционирование, она должна длиться достаточно долго, у животных - около 2-5 минут, а у людей - около 90 секунд. Одного эпизода ишемии достаточно для защиты миокарда, в то время как, с другой стороны, множественные эпизоды ишемии не имеют большего эффекта, т.е. явление такого типа прекондиционирования описывается как механизм «все или ничего» [193].

Кроме того, обнаружение ишемического прекондиционирования указывает на то, что ответ на ишемию является бимодальным, т.е. более длительные периоды ишемии вызывают клеточную дисфункцию и/или гибель, которая усугубляется реперфузией, в то время как короткие ишемические циклы являются защитными, то есть ткани становятся устойчивыми к вредным эффектам длительной ишемии с последующей реперфузией посредством активации программ выживания клеток [193].

1.4.2. Механизм ишемического preconditionирования

Различные механизмы лежат в основе объяснения того, как ишемическое preconditionирование уменьшает размер инфаркта, улучшает функцию эндотелия сосудов, снижает уровни полиморфноядерных нейтрофилов и предотвращает апоптоз миоцитов. Механизм, с помощью которого ишемическое preconditionирование достигает терапевтического эффекта, является сложным и включает влияние многочисленных молекул в качестве «мишеней», которые, как считается, высвобождаются в ткани во время ишемии, включая аденозин, брадикинин, эндогенные опиаты и АФК [79].

Существует достаточно доказательств того, что аденозин является основным медиатором в достижении терапевтического эффекта этой стратегии. Аденозин посредством стимуляции аденозина A_2 рецептора приводит к высвобождению NO, что вызывает активацию РКС и p38MAPK. Также считается, что агонисты аденозиновых или α_1 -адренергических рецепторов активируют белок G, который, как считается, играет важную роль во время ишемического preconditionирования, учитывая, что он стимулирует РКС путем стимуляции фосфолипазы C и D. Нет сомнений в том, что РКС занимает очень важное место в реализации кардиопротекции путем ишемического preconditionирования [51]. По различным сигнальным путям рецепторы аденозиновых, брадикининовых и опиоидных рецепторов приводят к высвобождению РКС. Таким образом, аденозиновые рецепторы могут активировать РКС также через фосфолипазы, полученные из диацилглицерина из мембранных фосфолипидов, тогда как эта активация через опиоидные рецепторы опосредуется трансактивацией металлопротеиназ из эпидермального фактора роста. В случае активации через рецепторы брадикинина каскадный путь аналогичен пути активации опиоидных рецепторов, за исключением посредничества эпидермального фактора роста [78]. Результатом активации этих рецепторов является повышенное образование эндотелиальной NO-синтазы, под действием которой высвобождается NO, с последующей активацией гуанилизациклазы, которая продуцирует циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ) и затем реактивирует образование РКС [191].

Независимо от задействованных сигнальных путей общепризнанно, что внутриклеточные сигналы приводят к транслокации и активации РКС. Биохимические и иммунологические исследования прямо, а экспериментальные исследования косвенно продемонстрировали роль РКС в этом явлении, так как ингибирование этой киназы привело к подавлению эффектов предварительного кондиционирования [33].

Путем высвобождения аденозина, брадикинина, эндогенных опиатов и АФК в течение периода ишемического preconditionирования активируются многочисленные сигнальные пути на митохондриальной мембране, что приводит к активации митохондриальных АТФ-чувствительных K^+ -каналов (mitoK_{АТР}), что является важным шагом для достижения терапевтического эффекта. В модели на животных наблюдалось, что диазоксид имитирует открытие mitoK_{АТР}, в то время, как блокада этих каналов достигается глибенкламидом. В связи с этим можно сделать вывод, что введение этого гипогликемического антагониста приводит к терапевтическому благоприятному эффекту ишемического preconditionирования [186].

В дополнение к АФК, существует ряд токсичных продуктов, которые способствуют возникновению И/Р повреждения. Известно, что ишемия приводит к повреждению и деградации большого количества внутриклеточных белков. В то же время, протеасомная система убиквитина становится дисфункциональной, что может привести к избирательной дисрегуляции сигнальных путей и накоплению токсичных метаболитов. Ишемическое preconditionирование предотвращает дисфункцию этого белка, что благоприятно влияет на концентрации защитных сигнальных молекул, таких как эпсилон и дельта-изоформы РКС [33].

На ранней стадии реперфузии происходит увеличение образования NO, а также ускоренное высвобождение АФК. Полученный NO быстро взаимодействует со свободными радикалами с образованием пероксинитрита, который, как известно, обладает сильными окислительными свойствами [88]. По этой причине preconditionирование ингибиторов NO дает сильный кардиозащитный эффект.

1.4.3. Фармакологическая подготовка

Ишемическое preconditioning - это хорошо описанный адаптивный ответ ткани, при котором кратковременное воздействие ишемии значительно улучшает способность сердца противостоять последующему ишемическому повреждению. Проливая свет на механизмы, с помощью которых миокард защищается от И/Р повреждения при данном типе preconditioning, была разработана фармакологическая альтернатива для достижения того же эффекта. Многочисленные фармакологические агенты запускают внутренние защитные механизмы против И/Р повреждения сердца. Кардиозащита, достигаемая с помощью этих агентов, основана на активации протеинкиназ, включая Akt и Erk1/2, активация которых во время фазы preconditioning или реперфузии вызывает сильный кардиопротективный эффект [76]. При использовании высокоселективного агониста α_2 -адренергических рецепторов, дексметомидина, во время глобальной ишемии сердца достигается кардиозащита, которая снижает повреждение миокарда. Preconditioning этим фармакологическим агентом активирует протеинкиназы Akt и Erk1/2, а также eNOS, тем самым уменьшая размер инфаркта после И/Р повреждения. Ингибирование PI3K и последующее фосфорилирование eNOS отменяет кардиопротекторный эффект дексметомидина. Это объясняет, что кардиозащита, достигаемая путем preconditioning этим агентом, зависит от активности пути PI3K/Akt, а не от стимуляции вегетативной нервной системы [81].

Кроме агониста α_2 -адренергического рецептора, синтеза NO и последующей активации cGMP в качестве вторичного мессенджера в активации протеинкиназы участвуют ингибитор фосфодиэстеразы 5 (PDE5), силденафил. Вазодилатация, достигнутая с помощью силденафила, обеспечивает сильную кардиозащиту против И/Р повреждения у кролика. С другой стороны, при использовании вальденафила, как другого ингибитора PDE5, достигается более мощный защитный эффект благодаря открытию *mitoK_{ATP}* [151].

Также с целью фармакологического предварительного кондиционирования вследствие И/Р повреждения может использоваться антиоксидантная терапия. Использование СОД, каталазы, маннита, N-ацетилцистеина, аллопуринола, витамина Е, а также хелатообразующих веществ в качестве preconditionирующих веществ обеспечивает кардиопротекцию при И/Р повреждении [75]. Блокаторы β -адренергических рецепторов, карведилол и метопролол, снижают ИПОЛ, одновременно повышая уровень антиоксидантного маркера глутатиона, действуя в качестве «мусорщика» свободных радикалов и, таким образом, предотвращая окислительный стресс. Антиоксидантную защиту также обеспечивают амиодарон и пробукол, при использовании которых в одном экспериментальном исследовании на крысах было отмечено предотвращение инфаркта миокарда за счет снижения уровня окислительного стресса и провоспалительных цитокинов [159].

Использование рапамицина, циклоспорина А и динитрофенола связано с многочисленными токсическими побочными эффектами. Тем не менее, исследования показали, что preconditionирование этими фармакологическими агентами может уменьшить размер инфаркта и, таким образом, оказать кардиозащитное действие. Рапамицин, как сильнодействующее иммуносупрессивное лекарственное средство, снижает частоту коронарного ретромбоза, и кардиозащита, достигаемая при введении этого препарата, связана с ингибированием киназы *mTOR*, после которого следует компенсаторная регуляция и остальных киназ (*Akt* и *PI3K*), и как следствие - уменьшение инфаркта миокарда и апоптоза миоцитов [90]. Свойства циклоспорина как кардиопротекторного агента связаны с процессом ингибирования мембранных митохондриальных пор и кальциневринов вследствие блокады фосфатазы PP2B. Аналогичным является механизм, с помощью которого динитрофенол оказывает кардиопротективный эффект и связан с модуляцией гомеостаза мембраны митохондрий, который участвует в процессе preconditionирования миокарда и защиты от инфаркта при ишемии [123].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Экспериментальная модель исследования

В экспериментах, выполненных в этом исследовании, была использована модель ретроградной перфузии изолированного сердца млекопитающего по Лангендорфу при постоянном перфузионном давлении, созданная немецким физиологом Оскаром Лангендорфом (*Oskar Langendorff*, 1853-1908).

2.1.1 Модели ретроградной перфузии: перфузия с постоянным давлением и перфузия с постоянным потоком

Существует две модели ретроградной перфузии сердца: перфузия с постоянным давлением и перфузия с постоянным потоком. В обоих случаях второе значение является переменным, то есть при постоянном давлении отслеживается изменение потока, а при постоянном потоке контролируется изменение давления. Изменение потока при данном постоянном перфузионном давлении регистрируется либо с помощью флоуметра (датчики которого расположены на коронарных артериях), либо путем сбора жидкости из венозных сосудов сердца через определенные промежутки времени, в то время как изменения давления при данном постоянном перфузионном давлении регистрируются на принтере с помощью соответствующих преобразователей. В обеих экспериментальных моделях перфузии сердца оцениваются средние уровни переменной величины.

В ходе экспериментов в данном исследовании использовался метод изолированного сердца по Лангендорфу при постоянном давлении (70 см H₂O). Постоянное перфузионное давление достигается путем поддержания гидростатического давления, при котором перфузионный раствор поступает в коронарные кровеносные сосуды на соответствующем уровне. Более новые методы включают использование перфузионных насосов, которые обеспечивают переход от одной модели перфузии к другой.

Все контролируемые параметры принимаются как среднее значение, учитывая, что абсолютные значения нельзя считать полностью надежными так как они постоянно меняются в небольшом диапазоне. Причина такой изменчивости заключается в самой природе работы сердца (различная продолжительность систолы и диастолы и постоянная вариабельность сердечного ритма), а также в условиях окружающей среды (минимальные изменения температуры перфузионного раствора).

Отношение давления и потока в экспериментальной модели, использованной в данном исследовании, определялась как:

$$p = \text{const}/\text{поток} = l/\text{radius}$$

Преимущества перфузионной модели постоянного давления, использованной в данном исследовании, по сравнению с моделью постоянного потока, прежде всего, заключаются в простоте используемой модели, а также в более физиологичном подходе, при котором перфузионная жидкость поступает в коронарные артерии при постоянном давлении. Также этот метод позволяет исследовать сосудистую ауторегуляцию тонуса коронарных сосудов и патогенез изменений, возникающих в результате индукции глобальной или региональной ишемии и реперфузии [23, 50].

2.1.2 *Langendorff annapam LF-01 F-P*

Эксперименты в этом исследовании проводились на аппарате Лангендорфа марки LF-01 F-P производства Experimetria Ltd, Будапешт, Венгрия.

Указанный аппарат состоит из следующих компонентов:

1. Две вертикальные стеклянные трубки одинаковой высоты и разного диаметра, при этом труба меньшего диаметра находится в трубе большего диаметра. Между этими трубками течет вода, которая нагревается до нужной температуры в водяной бане. В просвете трубки меньшего размера методом отрицательного давления впрыска находится сложный солевой раствор (раствор Крепса-Хенселейта). Вода, циркулирующая между двумя трубами, нагревает раствор в просвете трубки меньшего размера, так что температура раствора на выходе из

системы труб составляет 37°C , то есть до оптимальной температуры тела. Внутри трубки меньшего диаметра находится тонкая стеклянная трубка, вертикальное смещение которой регулирует гидростатическое давление, при котором раствор попадает в коронарные сосуды. Эта тонкая стеклянная трубка соединена с резервуаром, в который через нее возвращается избыток перфузионного раствора. Трубка меньшего диаметра заканчивается выходом, в который помещается препарат изолированного сердца;

2. резервуара, содержащего сложный раствор Крепса-Хенселейта (КХ) и соединенного с насосом, который непрерывно переносит раствор в трубку меньшего радиуса и в небольшую стеклянную трубку, через которую избыточный раствор из трубки меньшего диаметра возвращается в резервуар. Резервуар также соединен с бутылкой, содержащей смесь O_2 и CO_2 .

3. бутылки, содержащие смесь O_2 и CO_2 в отношении 95%: 5%, и соединенные с резервуаром, содержащим раствор КХ. Газификация раствора КХ обеспечивает парциальное давление O_2 и CO_2 в растворе, которое эквивалентно парциальному давлению O_2 и CO_2 в артериальной крови;

4. канюли, через которую соединяется выходящая трубка с восходящей аортой изолированного сердца крысы;

5. водяной бани, которая нагревает воду, протекающую между трубой большего и меньшего диаметра, что позволяет постоянно поддерживать температуру раствора КХ на оптимальном уровне (37°C ; изотермическое);

6. инфузионных насосов, в которых исследуемое вещество наносится на стык канюли и восходящей аорты с соответствующей скоростью (зависит от базального КП);

7. датчика-преобразователя, подключенного с одной стороны к разным структурам изолированного сердца, а с другой - к компьютеру. Роль сенсора заключается в непрерывной регистрации функции миокарда левого желудочка. На модели аппарата Лангендорфа установлены три датчика:

- датчик (преобразователь BS4 73-0184), соединенный с арочной металлической трубкой, заполненной дистиллированной водой, в верхней части которой

находится баллон (диаметр 5 мм, латексная/нейлоновая фольга), также заполненный дистиллированной водой. После разрушения митральных клапанов этот баллон вставляется в левый желудочек, что позволяет датчику напрямую регистрировать давление и ЧСС в этой полости сердца.

- датчик, который непрерывно регистрирует давление, при котором перфузионный раствор поступает в аорту (датчик перфузионного давления). В исследовании с помощью этого датчика контролировали среднее перфузионное давление в аорте - МВР (мм рт. ст.).

- датчик, который регистрирует температуру раствора, поступающего в аорту (датчик температуры).

Последние два датчика имеют фиксированную локализацию и не меняют положение во время экспериментов;

8. компьютера с соответствующим программным обеспечением (*Spel Advanced HaemoSys v3.24*)), с помощью которого постоянно отслеживались и записывались кардиодинамические параметры сердечного выброса. Компьютер подключен к датчикам, через которые он получал данные о ЧСС.

Такая экспериментальная модель с использованием датчика, размещенного в левом желудочке, позволяет регистрировать и анализировать следующие кардиодинамические параметры:

1. $dp/dt \max$, выраженная в мм рт.ст./сек, параметр, отражающий инотропную емкость миокарда;
2. $dp/dt \min$, выраженная в мм рт.ст./сек, параметр, отражающий изотоническую способность миокарда;
3. SLVP, выраженное в мм рт.ст.
4. DLVP, выраженное в мм рт.ст.
5. ЧСС, выраженная как ЧСС в минуту (уд / мин).

Коронарный поток перфузирующего раствора измеряли флоуметрическим методом и выражали в мл «венозного» оттока в минуту.

2.2 Экспериментальный протокол

Все экспериментальные исследования в рамках разработанного протокола были выполнены в Лаборатории сердечно-сосудистой физиологии (зав. В.Яковлевич) Медицинского факультета Университета г. Крагуевац (Сербия). В экспериментах использовался метод изолированного сердца крысы линии *Wistar albino*, которые по своим характеристикам наиболее подходят для задач, предложенных для решения поставленной в данном исследовании цели. В исследование включено 90 самцов крыс в возрасте восьми недель и весом 250 ± 30 г. Животных содержали в стандартных лабораторных условиях (температура воздуха $23,1^{\circ}\text{C}$, относительная влажность 50%, цикличность свет:темнота 12:12 часа (начиная со светлого периода в 9:00 часов), со свободным доступом к воде и пище (*ad libitum*). Животные были разделены на 9 экспериментальных групп (по 10 животных на группу).

Экспериментальная работа учитывала положения утвержденных правил по защите позвоночных животных (*EU Directive for the Protection of the Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes 86/609/EEC*) и принципы этики. Протокол эксперимента был одобрен Комитетом по этике по вопросам охраны экспериментальных животных Факультета медицинских наук Университета Крагуевац (Сербия).

Животных после кратковременного наркоза, вызванного внутривенным применением кетамина (10 мг/кг) и ксилазина (5 мг/кг), декапитировали и закрепляли на операционном столе (*Schedule 1 of the Animals/Scientific Procedures, Act 1986, UK*). За этим проводили хирургическое вскрытие брюшной полости, диафрагму разрезали дугообразно слева направо, а затем быстро вскрывали грудную клетку латерально вдоль линии молочных желез. Для поддержания относительного гомеостаза сердце сразу после вскрытия грудной клетки омывали физиологическим раствором ($+4^{\circ}\text{C}$). После вскрытия грудной клетки в верхней части сердца разрезали перикард, что делало его готовым к изолированию. У основания сердца зажимали кровеносные сосуды, орган извлекали из грудной

клетки и немедленно помещали в охлажденный физиологический раствор со льдом при температуре ((-4) - (-10)°C), при которой метаболические процессы в миокарде сводятся к минимуму («физиологические щипцы»), чтобы обеспечить достаточное время для подготовки сердца и к канюляции аорты без повреждения миокарда.

После погружения сердца в ледяной раствор проводили обработку его основания для устранения всех тканей кроме восходящей аорты, необходимой для проведения ретроградной перфузии сердца. Подготовленную аорту прикрепляли и фиксировали лигатурой к канюле прибора Лангендорфа. Общая процедура, от умерщвления животного до подключения аорты к канюле аппарата Лангендорфа, не занимала более 2 минут, чтобы сохранить жизнеспособность препарата и обеспечить достоверность полученных результатов.

После фиксации изолированного сердца к устройству Лангендорфа в проекции митрального клапана рассекали стенку левого предсердия и, получая доступ к митральному клапану, пинцетом разрушали его.

В нашей экспериментальной модели такая методика имела двоякое значение:

1) давление перфузирующей жидкости (КХ) в левом предсердии надежно снижалось до нуля. Это исключало влияние функции левого желудочка на коронарный ток КХ и позволяло достичь оптимальных условий для ретроградной перфузии сердца.

2) разрушение митрального клапана обеспечивало вход и установку в левом желудочке датчика-преобразователя BS4 73-0184. С его помощью проводили мониторинг показателей сократительной функции миокарда.

Как было упомянуто выше, датчик, который контролировал параметры кардиодинамики, подключался к программному обеспечению, позволяя осуществлять их непрерывное наблюдение и мониторинг, а также отмечать пересечение значений параметров кардиодинамики в конкретное время или записывать определенные сегменты в течение всего эксперимента. Кровоток через коронарные кровеносные сосуды (CF) выражался в мл/мин и измерялся

путем сбора содержимого из коронарных вен, выходящих из коронарных кровеносных сосудов сердца, флуорометрическим методом.

После установления стабильной работы сердца, которая подразумевает неизменные значения КП после трех последовательных измерений, и значений кардиодинамических параметров, поддерживаемых примерно на одном уровне, в течение 25 минут, создавались условия для проверки функции изолированного сердца. Через инфузионный насос вводилось вещество, которое было растворено в КХ, эффект которого на сердце изучается.

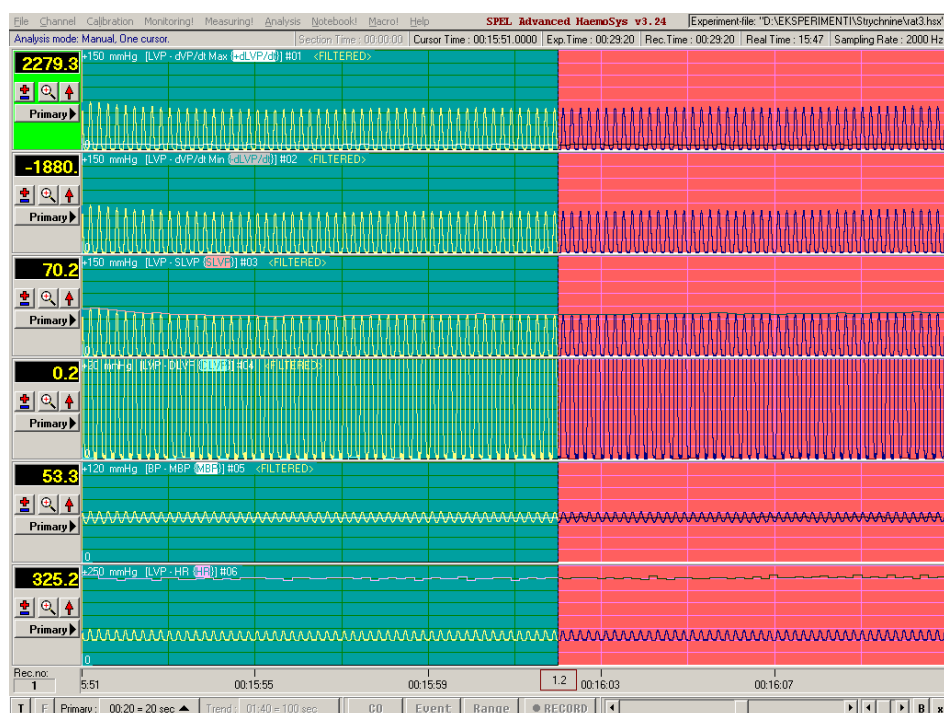


Рисунок 4 - Схема записи программного обеспечения кардиодинамического параметра

После периода стабилизации была индуцирована глобальная ишемия сердца в течение 20 минут с последующей реперфузией в течение 30 минут. В экспериментах с прекондиционированием упомянутые параметры сердечной функции измерялись в определенных интервалах времени: в последнюю минуту стабилизации, в последнюю минуту введения испытуемого вещества, в первую, третью, пятую, десятую, пятнадцатую, двадцатую и тридцатую минуту реперфузии. В экспериментах с посткондиционированием, представляющие интерес временные отрезки были почти идентичны, при этом отсутствовала только последняя минута введения вещества в прекондиционировании. Образцы

перфузата из коронарных сосудов отбирались в одно и то же время для анализа биомаркеров окислительного стресса. Как в экспериментах с preconditionированием, так и в экспериментах с postconditionированием экспериментальные вещества, эффекты которых были испытаны, вводили в течение 5 минут.

В исследовании было 9 экспериментальных групп:

1. тестирование эффектов ишемии и реперфузии - контрольная группа;
2. исследование эффектов введения глутамата в preconditionировании в дозе 100 мкмоль/л;
3. исследование эффектов введения глутамата в postconditionировании в дозе 100 мкмоль/л;
4. исследование эффектов введения (RS)-(Tetrazol-5-yl)глицина (активатора NMDA рецепторов) в preconditionировании в дозе 5 мкмоль/л;
5. исследование эффектов введения (RS)-(Tetrazol-5-yl)глицина (активатора NMDA рецепторов) в postconditionировании в дозе 5 мкмоль/л;
6. исследование эффектов введения МК-801 (блокатора NMDA рецепторов) в preconditionировании в дозе 20 мкмоль/л;
7. исследование эффектов введения МК-801 (блокатора NMDA рецепторов) в postconditionировании в дозе 20 мкмоль/л;
8. исследование эффектов введения мемантина (блокатора NMDA рецепторов) в preconditionировании в дозе 100 мкмоль/л;
9. исследование эффектов введения мемантина (блокатора NMDA рецепторов) в postconditionировании в дозе 100 мкмоль/л;

2.3 Биохимический анализ

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, пятнадцатую, двадцатую и тридцатую минуты реперфузии в экспериментах с preconditionированием. 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.

2.3.1. Определение индекса перекисного окисления липидов (ИПОЛ-TBARS)

Индекс перекисного окисления липидов, как один из существенных показателей окислительного стресса, рассчитывали по уровню реакции продуктов ПОЛ с тиобарбитуровой кислотой и сокращенно обозначали как TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances). Во всех группах животных концентрацию TBARS определяли спектрофотометрически в венозном перфузате [139]. Метод основан на определении содержания перекиси липидов на основе реакции одного из них: малонового диальдегида с тиобарбитуровой кислотой (ТБК).

В пробирку (объем 12 мл) добавляли 800 мкл коронарного венозного перфузата или плазмы (в зависимости от образца) и 200 мкл 1% ТБК в 0,05 М NaOH. В качестве контроля вместо коронарного венозного перфузата или плазмы использовали эквивалентное количество раствора КХ (в случае перфузата) или дистиллированной воды (в случае плазмы). После этого образцы инкубировали в водяной бане в течение 15 минут при 100°C. По завершении инкубации образцы доводили до комнатной температуры, и определяли в них концентрацию TBARS спектрофотометрическим методом при длине волны $\lambda = 530$ нм.

Концентрация TBARS рассчитывали на основе следующего уравнения:

$$nmol\ TBARS/ml\ образца = \Delta A (Au-Asp) / 1.56 \times 1.25,$$

где Au - абсорбент образца, Asp - абсорбент контроля, 1,56 и 1,25 - поправочные коэффициенты.

Количество TBARS определяется на грамм ткани сердца следующим образом:

$$nmol\ TBARS/минуту/g\ wt = \Delta A / 1.56 \times 1.25 \times CF / m$$

где m-масса сердца; wt-вес крыс; CF-коронарный поток.

Важно отметить, что, в отличие от всех других биохимических параметров, отслеживаемых в данном исследовании, уровень TBARS выражался в мкМ, тогда как количество других молекул - в нМ. Причина этого в количестве TBARS, которое на порядок больше, чем у всех остальных параметров. Это является следствием неспецифичности TBARS в качестве теста, поскольку он представляет собой сумму всех взаимодействий АФК и азота, в то время как все другие параметры, относящиеся к отдельным молекулам кислорода и азота, имеют разные механизмы действия как отдельные формы кислорода и азота.

2.3.2. Определение содержания оксида азота

Определение уровня оксида азота в коронарном венозном перфузате, проводилось косвенным методом по тестированию эндотелиальной системы: L-аргинин: NO в коронарной циркуляции. Так как методы прямого определения NO отсутствуют, спектрофотометрический метод определения количества нитрита [70] считается доступным и достаточно надежным.

Поскольку в реакции с молекулярным кислородом образуется эквимольное количество нитрита:



с большой уверенностью можно утверждать, что количество нитрита, выделяющегося в венозном потоке, представляет собой количество высвобожденного NO.

Биохимический метод основан на использовании реактива Грисса, который создает диазо-комплекс с нитритами, имеющий фиолетовый цвет. Грисс реагент готовится непосредственно до аналитических определений путем смешивания равного объема (V/V) 1% сульфаниловой кислоты, растворенной в 5% орто-фосфорной кислоты (хранится при комнатной температуре) и 0,1% водного

раствора N-(1-нафтил)-этилендиамин дигидрохлорида (NEDA), который хранится в темноте при 4°C, из-за своей высокой фотохимической реактивности.

В пробирку (объем 12 мл) добавляли 1 мл коронарного венозного перфузата или плазме, 250 мкл свежеприготовленного реагента Грисса и 125 мкл аммиачного буфера (pH= 9,0), который состоит из хлорида аммония (NH₄Cl) и тетрабората натрия (Na₂B₄O₇). Аммиачный буфер, который в процессе приготовления должен нагреваться, из-за чрезвычайно низкой растворимости тетрабората натрия, необходим для стабилизации диазо-комплекса. В качестве контроля вместо коронарного венозного перфузата использовали эквивалентное количество раствора КХ.

Концентрацию высвобожденного нитрита в образцах определяли на основе калибровочной кривой. Кривая строилась на основе исчезновения содержимого образцов, которые сами по себе содержали известную концентрацию нитрита при взаимодействии с Гриссовым реагентом в присутствии буфера. Смесь получали смешиванием различных количеств водного раствора 1 мМ NaNO₂ в 1 мл растворе КХ в 4 пробирки: 3, 6, 12, 24 мкл, в результате чего достигали следующие концентрации нитрита: 2,18, 4,37, 8,73 и 17,34 нмоль NO₂-/мл. После стабилизации цвета при комнатной температуре в течение 5-10 минут определяли концентрацию высвобождаемого нитрита спектрофотометрическим методом при длине волны $\lambda=550$ нм. Концентрацию, а затем количество высвобожденного нитрита рассчитывали на основе:

1) определения стандартного фактора (F), полученного из следующего уравнения:

$$F = \frac{\text{Исчезновение стандарта} - \text{исчезновение контроля}}{\text{Концентрация NaNO}_2 \text{ в стандарте}}$$

для каждого отдельного стандарта (F1-F4), а затем получали их среднее арифметическое значение;

2) затем рассчитывали разницу между исчезновением содержания образца и исчезновением содержанием контроля и полученный результат делили со стандартом F:

$$\text{нмоль NO}_2/\text{мл образца} = \Delta E (E_u - E_{sp})/F.$$

где E_u – исчезновение образца; E_{sp} – исчезновение контроля.

Количество нитрита определяли на грамм ткани сердца следующим образом:

$$\text{nmol NO}_2/\text{минуту/g wt} = \Delta E/F \times CF/mc$$

где m-масса сердца; wt-вес крыс; CF-коронарный поток.

2.3.3. Определение содержания супероксидного анион радикала (O_2^-)

Определение количества супероксидного анион-радикала в коронарном венозном перфузате основано на реакции O_2^- с нитросиним тетразолием (НСТ) с образованием нитросинего формазана [20]. Измерение проводили на длине волны максимального поглощения $\lambda_{\text{max}} = 550$ нм. Анализируемая смесь (“assay mixture”) содержит: 50 mM TRIS-HClбуфер (pH 8,6), 0,1 mM ЭДТА, 0,1 мг/мл желатина и 0,1 mM НСТ. Перед использованием раствор газировали азотом под давлением в течение одного часа.

В пробирку (объем 12 мл) добавляли 50 мкл коронарной венозной крови и 950 мкл анализируемой смеси, в результате чего начинается реакция. В качестве контроля вместо коронарного венозного перфузата использовали эквивалентное количество раствора КХ.

В самом начале реакции измеряли исчезновение содержания смеси и помечали как исчезновение содержания E_1 . Каждые 60 секунд перемешивали пластиковой палочкой и отмечали исчезновение содержания после перемешивания до его стабилизации. Это подразумевает два последовательных приблизительно одинаковых значения исчезновения содержания. Последнее исчезновение содержания обозначали как E_2 . Ту же процедуру применяли в контроле. Концентрация высвобожденного O_2^- получали используя следующие уравнения:

$$\Delta E_u = E_{2u} - E_{1u} \text{ (для образца)}$$

$$E_{sp} = E_{2sp} - E_{1sp} \text{ (для контроля)}$$

$$\Delta E = \Delta E_u - \Delta E_{sp}$$

$$\text{нмоль } O_2^-/\text{мл образца} = \Delta E / 0.015 \times 1/0.05$$

где E_u – исчезновение образца; E_{sp} – исчезновение контроля.

Количество O_2^- определяли на грамм ткани сердца следующим образом:

$$\text{нмоль } O_2^-/\text{минуту/g} = \Delta E / 0.015 \times CF/mc$$

где m-масса сердца; CF-коронарный поток.

2.3.4. Определение перекиси водорода (H_2O_2)

Определение количества перекиси водорода (H_2O_2) в коронарном венозном перфузате основано на окислении фенолового красного в реакции с перекисью водорода, которая катализируется пероксидазой (Horser Radish Per Oxidase—HRPO). Эта реакция приводит к образованию соединения, максимальное поглощение которого составляет $\lambda_{max}=610\text{nm}$ [146].

Линейная зависимость оптической плотности 610 нм от концентрации H_2O_2 является величиной постоянной для диапазона концентраций 1-60 мкМ (1-60 нмоль/мл). Этот метод позволяет определить образование и высвобождение H_2O_2 в течении 5-60 минут. В пробирку (объем 12 мл) добавляли 200 мкл коронарного венозного перфузата и 800 мкл свежеприготовленного раствора фенолового красного (PhenolRedSolution-PRS), содержащего 140 мМ NaCl, 10 мМ калий фосфатного буфера (pH = 7), 5,5 мМ D (+) - глюкозы и 0,28 мМ фенолового красного. Затем в образцы добавляли 10 мкл (1:20) HRPO, приготовленного extempore. Образцы оставляли стоять при комнатной температуре в течение 10 минут, затем корректировали pH ≈ 12 , используя 1 М NaOH. В качестве контроля вместо коронарного венозного перфузата использовали эквивалентное количество раствора КХ. Концентрация H_2O_2 , выделяющегося в коронарной венозной крови, рассчитывалась на основе калибровочной диаграммы (стандартные кривые), определенной для каждого анализа. Для построения стандартной кривой используется стандартный (исходный) раствор H_2O_2 с предварительной проверкой концентрации (A_{230} для 10 мМ H_2O_2 составляет 0,810). В 3 пробирки добавляли

(вместо коронарного венозного перфузата или плазмы), 5, 10 и 20 мкл, 1 мМ раствора H_2O_2 , 200 мкл дистиллированной воды, 800 мкл раствора фенолового красного и 10 мкл (1:20) HRPO. После инкубации в течение 10 минут при комнатной температуре доводили pH ≈ 12 используя 1 М NaOH (10 мкл). Таким образом, конечная концентрация H_2O_2 в 3 образцах стандарта составила: 2,75; 5,49; и 10,99 нмоль/ H_2O_2 /мл. Измерения оптической плотности (A) проводили при длине волны максимального поглощения $\lambda_{max}=610$ нм в стеклянных кюветах объемом 1 мл на спектрофотометре LKB Biochrome, модель: Ulltросрес 4050. От полученных значений оптической плотности вычитали величину оптической плотности контроля (B), что давало показатель конечной оптической плотности (ΔA). Концентрация, а затем и количество H_2O_2 в коронарном венозном перфузате или в плазме, рассчитывали следующим образом:

- 1) определяли фактор поглощения (F) на один нмоль перекиси водорода:

$$F = \Delta A / \text{нмоль } H_2O_2$$

- 2) с учетом оптической плотности образца при $\lambda_{max}=610$ нм (A_u) и его сравнения с контролем (A_{sp}) рассчитывается конечная оптическая плотность (ΔA) ($A = A_u - A_{sp}$). Используя полученную таким образом оптическую плотность, фактор F и количество образцов (коронарного венозного перфузата или плазмы), использованного в анализе (200 мл), получали концентрацию и количество H_2O_2 в коронарной венозной крови в соответствии с формулой:

$$\text{нмоль } H_2O_2 / \text{мл образца} = \Delta A / F$$

Количество H_2O_2 определяется на грамм ткани сердца следующим образом:

$$\text{нмоль } H_2O_2 / \text{мл/минуту/g wt} = \Delta A / F \times CF / mc$$

где m-масса сердца; wt-вес крыс; CF-коронарный поток.

2.4 Статистическая обработка данных

Статистическая обработка полученных фактических данных, осуществлялась следующим образом:

1) с целью описания параметров использовали частоту, проценты, среднее значение выборки, медиану выборки, стандартное отклонение выборки, ранжирование и доверительные интервалы, равные 95%;

2) для оценки нормальности распределения использовали тесты Колмогорова, Смирнова и Шапиро Вилька;

3) выявление различий между параметрами проводили с помощью t-критерия Стьюдента, парного t-критерия, критерия Манна-Уитни, точного теста Фишера, однофакторного или двухфакторного дисперсионного анализа. При тестировании достоверности разницы между параметрами, в случае нескольких подгрупп, использовали поправку Бонферрони;

4) статистическую обработку данных выполняли в статистическом пакете SPSS 20.0 для Windows.

При представлении результатов и статистической значимости показана не вся статистическая значимость, но только для определенных сечений, представляющих интерес. Графическое представление результатов экспериментов по прекондиционированию показывает статистическую значимость сравнения значений тестируемых параметров в последнюю минуту стабилизации, в последнюю минуту применения тестируемого вещества и через тридцать минут реперфузии. Графики экспериментов посткондиционирования показывают статистическую значимость сравнения значений тестируемых параметров в последнюю минуту стабилизации, в третью минуту реперфузии (которая также является последней минутой применения тестируемого вещества) и в тридцать минут реперфузии.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

Значения $dp/dt \max$ и $dp/dt \min$ (мм рт.ст./сек), SLVP и DLVP (мм рт.ст.), ЧСС (в уд/мин) и КП перфузирующего раствора (мл/мин) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии без кондиционирования представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Показатели функции левого желудочка сердца при ишемии и последующей реперфузии изолированного сердца крыс раствором Кребса-Хензелята *ex vivo* (контроль)

Контрольная группа без кондиционирования						
Минуты	$dp/dt \max$ (мм рт.ст./сек)	$dp/dt \min$ (мм рт.ст./сек)	SLVP (мм рт.ст.)	DLVP (мм рт.ст.)	ЧСС (уд./мин)	КП (мл/мин)
Контроль	$2003,8 \pm 235,2$	$-1401,9 \pm 99,3$	$53,4 \pm 8,8$	$5,5 \pm 0,6$	$290,5 \pm 8,9$	$8,5 \pm 0,5$
Ишемия						
1	$2115,8 \pm 123,5$	$-1445,3 \pm 73,3$	$58,1 \pm 7,7$	$5,3 \pm 0,4$	$250,5 \pm 25,8^*$	$7,2 \pm 0,4^*$
30	$1805,6 \pm 78,5$	$-1140,3 \pm 96,5^*$	$40,3 \pm 6,3^*$	$4,7 \pm 0,2^*$	$225,6 \pm 15,4$	$6,0 \pm 0,5$

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

У животных контрольной группы через минуту от начала реперфузии миокарда после периода его 20-минутной ишемии снижались: DLVP, однако $p > 0,05$, ЧСС в 1,2 раза ($p < 0,05$; рисунок 8), КП перфузирующей жидкости (КП) в 1,2 раза ($p < 0,05$; рисунок 10).

Через 30 минут от начала реперфузии миокарда после периода его 20-минутной ишемии снижались: $dp/dt \max$, однако $p > 0,05$ (рисунок 5), $dp/dt \min$ в 1,2 раза ($p < 0,05$; рисунок 6), SLVP в 1,3 раза ($p < 0,05$; рисунок 7), DLVP в 1,2 раза

($p < 0,05$; рисунок 8), ЧСС в 1,3 раза ($p < 0,05$; рисунок 9) и КП перфузирующей жидкости (КП) в 1,4 раза ($p < 0,05$; рисунок 10).

Таким образом можно сделать вывод о том, что 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.

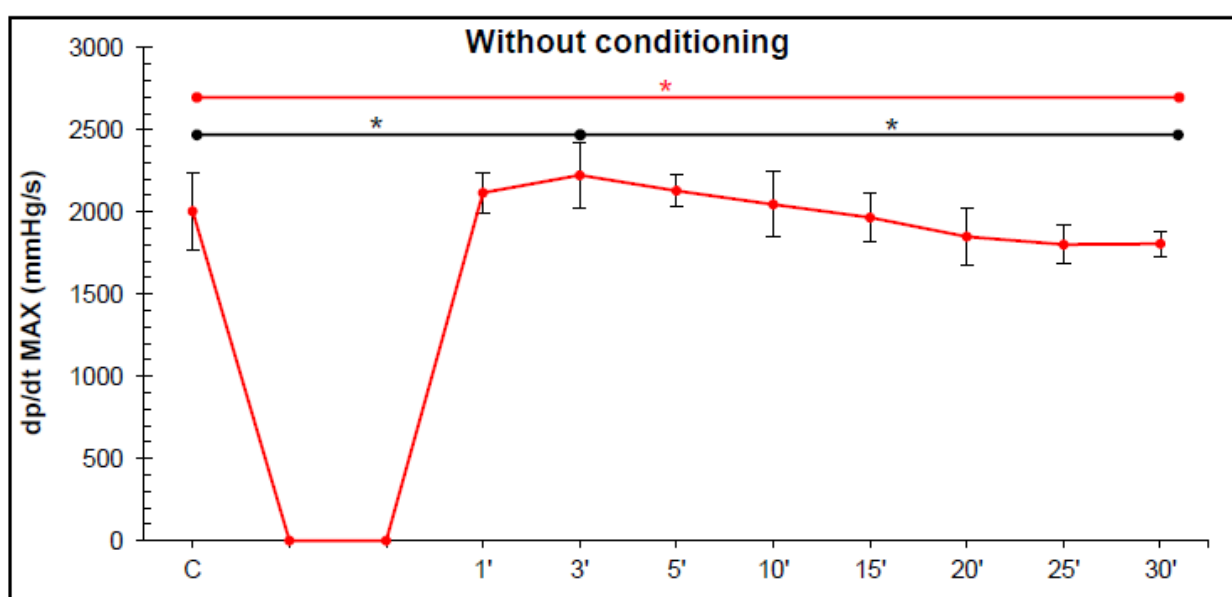


Рисунок 5 - Показатели максимальной скорости изменения давления в левом желудочке ($dp/dt \max$, в мм рт.ст./сек) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии без кондиционирования

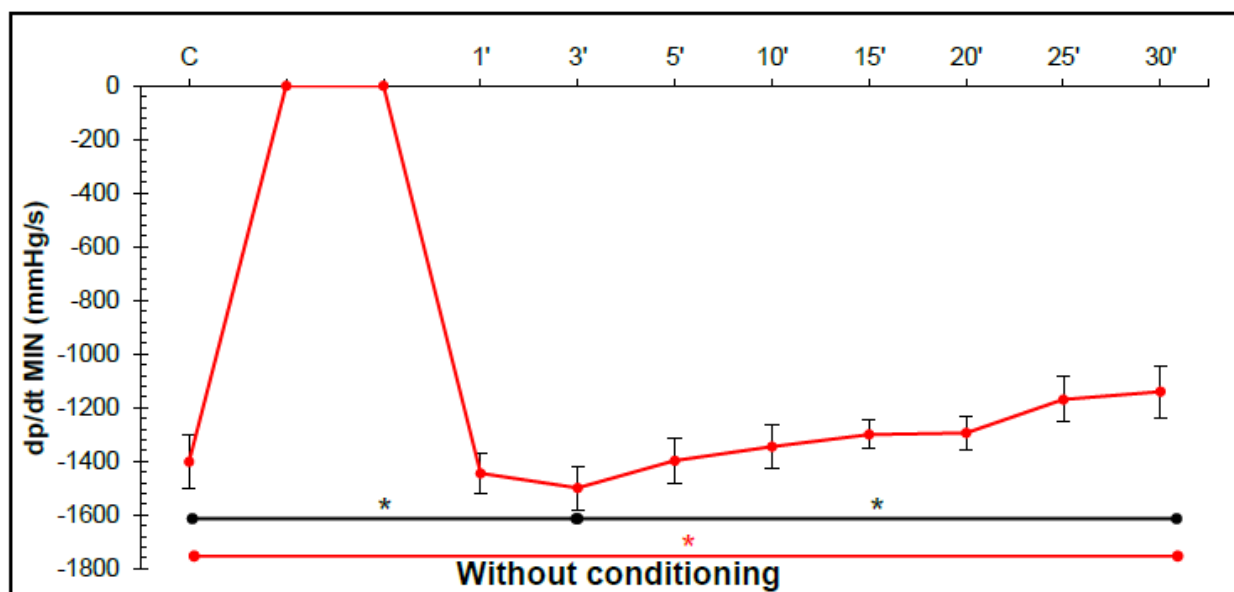


Рисунок 6 - Показатели минимальной скорости изменения давления в левом желудочке ($dp/dt \min$, в рт.ст./сек) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии без кондиционирования

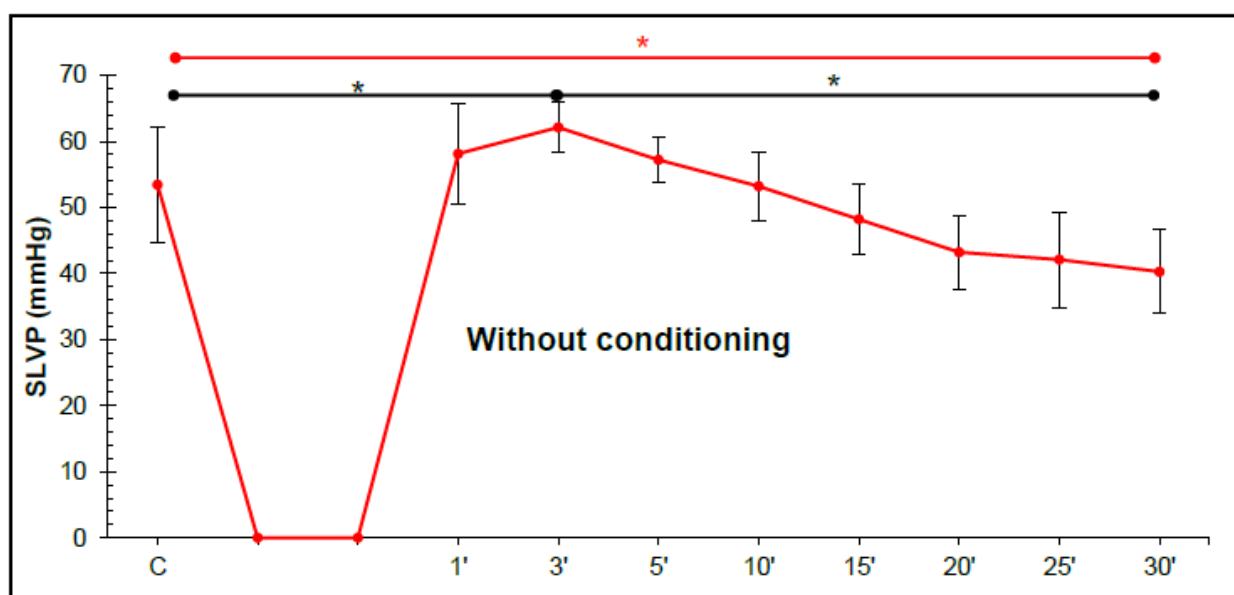


Рисунок 7 - Показатели систолического давления в левом желудочке (SLVP, в мм рт.ст.) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии без кондиционирования

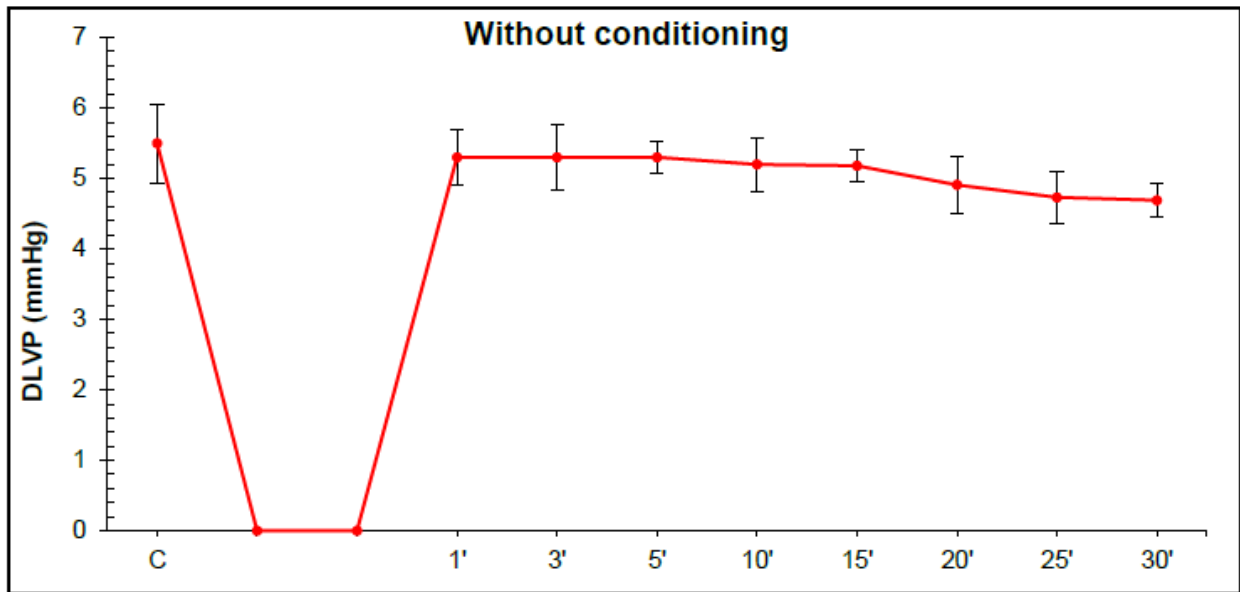


Рисунок 8 - Показатели диастолического давления в левом желудочке (DLVP, в мм рт.ст.) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии без кондиционирования

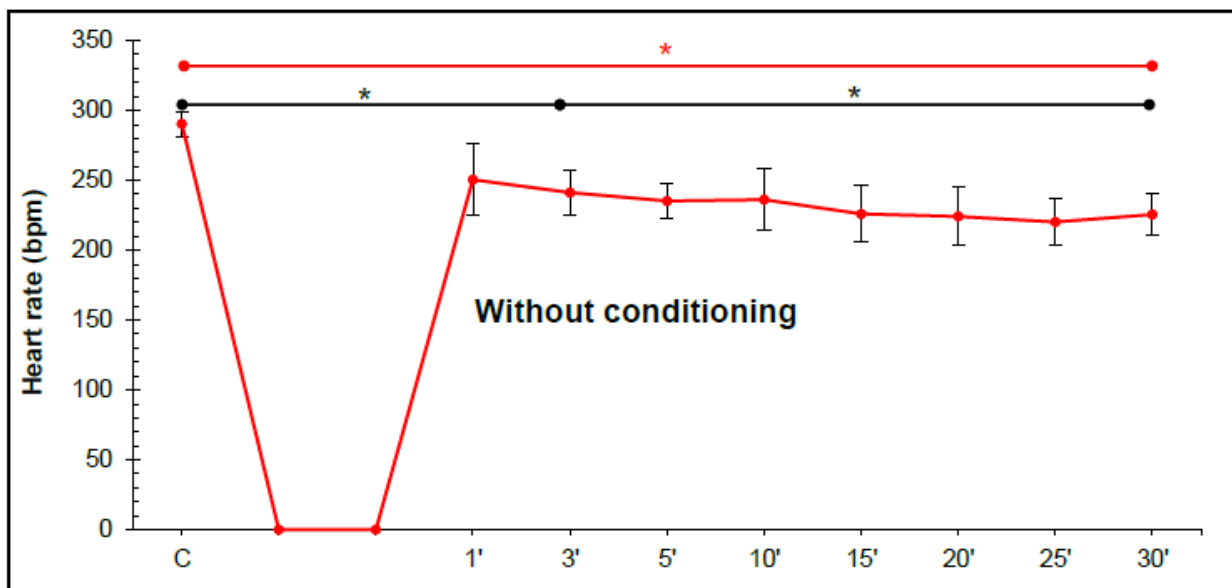


Рисунок 9 - Частота сердечных сокращений (ЧСС, в уд/мин) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии без кондиционирования

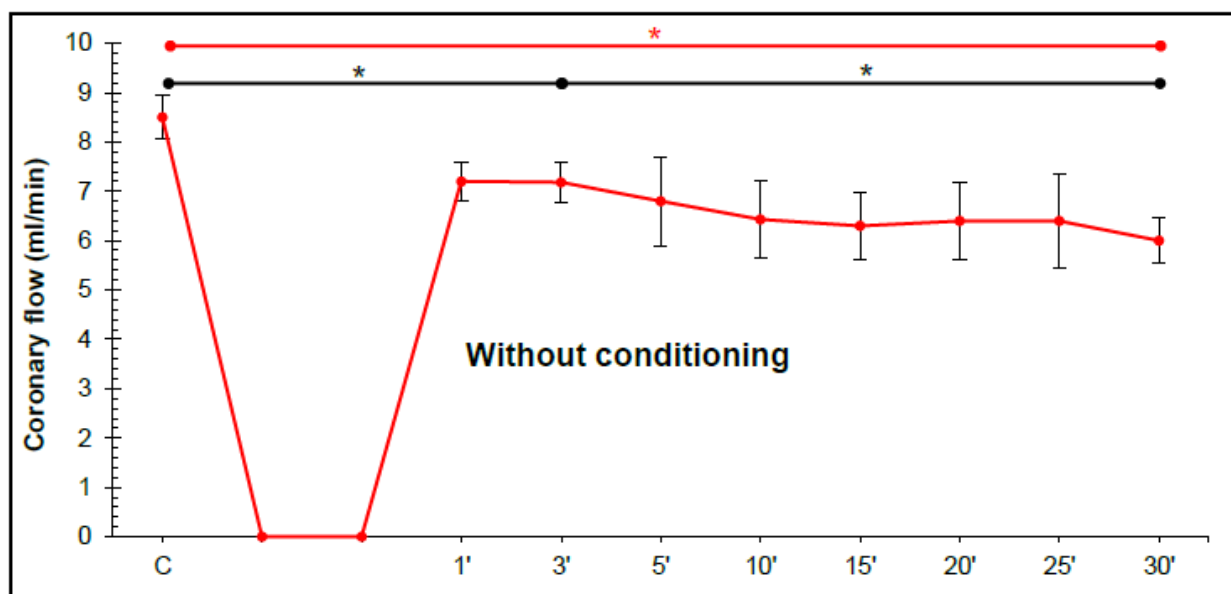


Рисунок 10 - Показатели коронарного потока перфузирующего раствора (КП, в мл/мин) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии без кондиционирования

3.2. Влияние применения глутамата при preconditionировании на кардиодинамические параметры изолированного сердца крыс

Значения $dp/dt \max$ и $dp/dt \min$ (мм рт.ст./сек), SLVP и DLVP (мм рт.ст.), ЧСС (уд/мин) и КП перфузирующего раствора (мл/мин) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании глутаматом представлены в таблице 4.

У животных с preconditionированием глутаматом через минуту от начала реперфузии миокарда после периода его 20-минутной ишемии снижались: $dp/dt \min$, однако $p > 0,05$; рисунок 12) и ЧСС в 2,2 раза ($p < 0,05$; рисунок 15).

Через 30 минут от начала реперфузии миокарда после периода его 20-минутной ишемии снижались: $dp/dt \max$ в 1,2 раза ($p < 0,05$; рисунок 11), $dp/dt \min$ в 1,3 раза ($p < 0,05$; рисунок 12), SLVP, однако $p > 0,05$; рисунок 13), DLVP, однако $p > 0,05$; рисунок 14), ЧСС в 1,2 раза ($p < 0,05$; рисунок 15) и КП перфузирующей жидкости в 1,2 раза ($p < 0,05$; рисунок 16).

Таблица 4 - Показатели функции левого желудочка сердца при ишемии и последующей реперфузии изолированного сердца крыс раствором Кребса-Хензelayта *ex vivo* после preconditionирования глутаматом

Преко́ндициони́рование глутаматом						
Минуты	dp/dt max (мм рт.ст./сек)	dp/dt min (мм рт.ст./сек)	SLVP (мм рт.ст.)	DLVP (мм рт.ст.)	ЧСС (уд./мин)	КП (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 ± 4,6	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

Таким образом, можно сделать вывод о том, что кардиодинамические параметры сердца, после preconditionирования глутаматом и подвергающиеся двадцатиминутной ишемии, не возвращаются к значениям, близким к начальным значениям после тридцатиминутной реперфузии, то есть не происходит адекватного их восстановления.

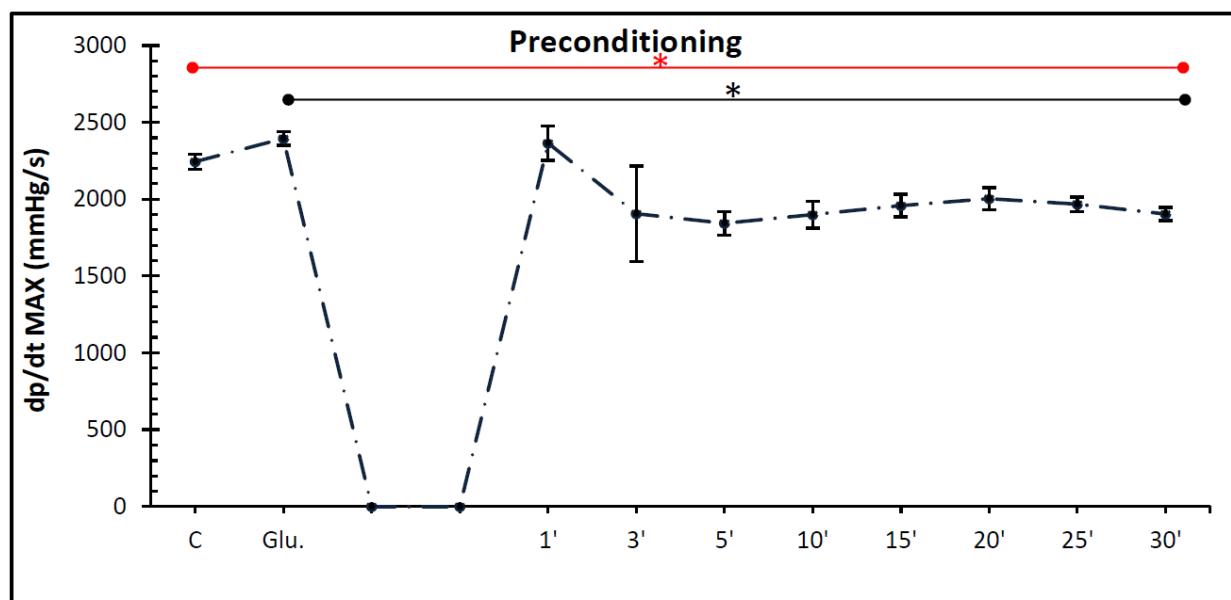


Рисунок 11 - Показатели максимальной скорости изменения давления в левом желудочке (dp/dt max, в мм рт.ст./сек) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании глутаматом

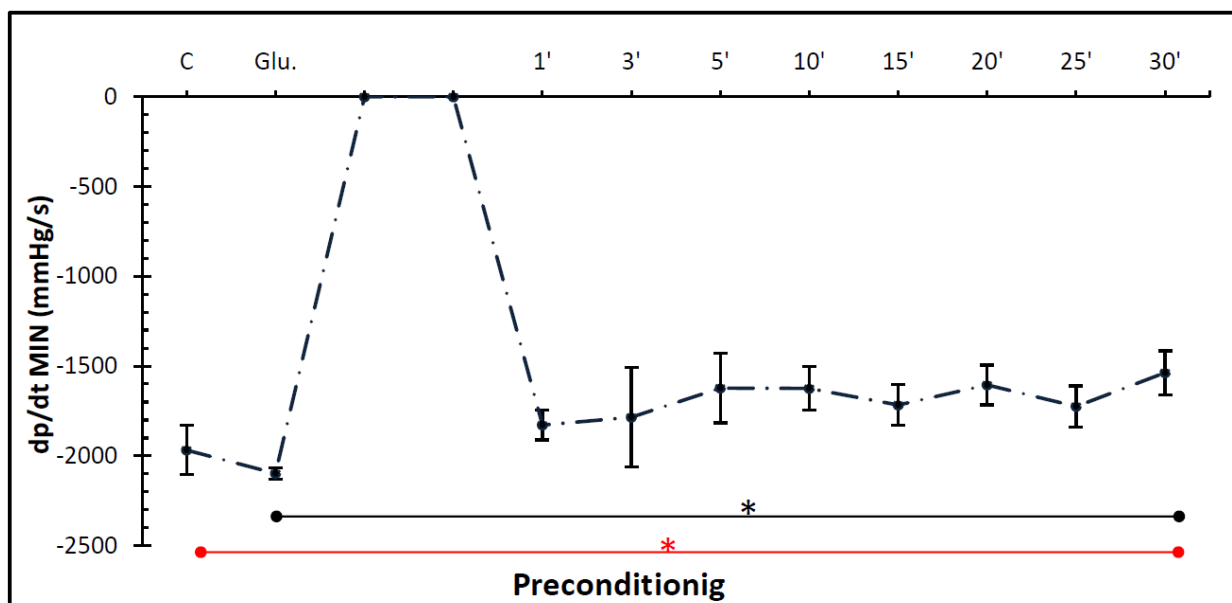


Рисунок 12 - Показатели минимальной скорости изменения давления в левом желудочке ($dp/dt \text{ min}$, в рт.ст./сек) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании глутаматом

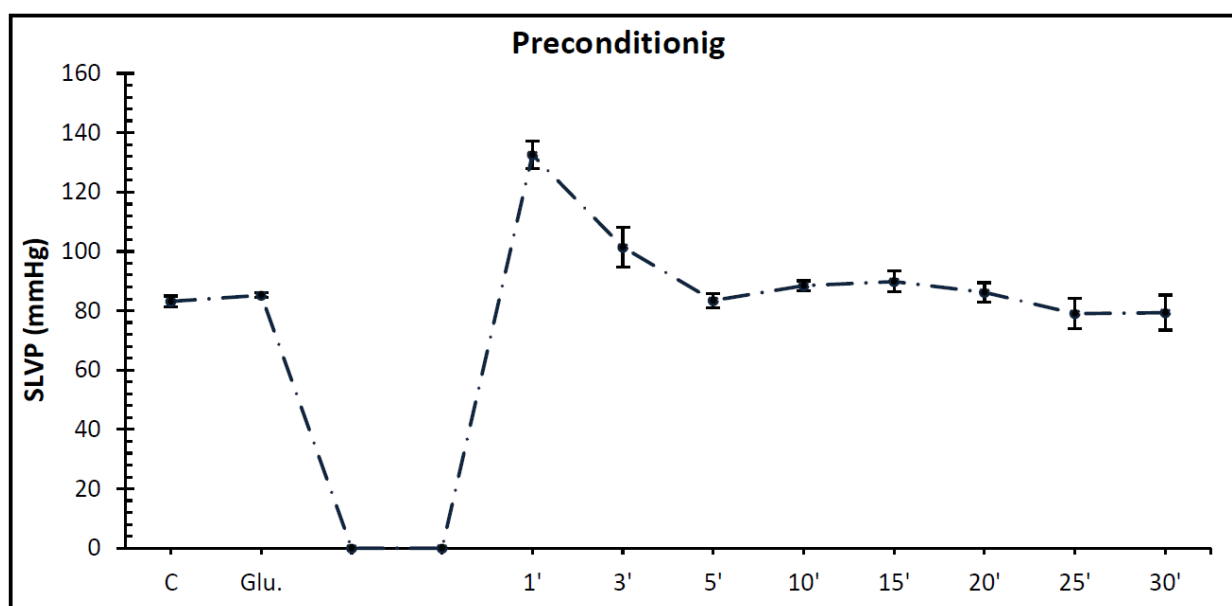


Рисунок 13 - Показатели систолического давления в левом желудочке (SLVP, в мм рт.ст.) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании глутаматом

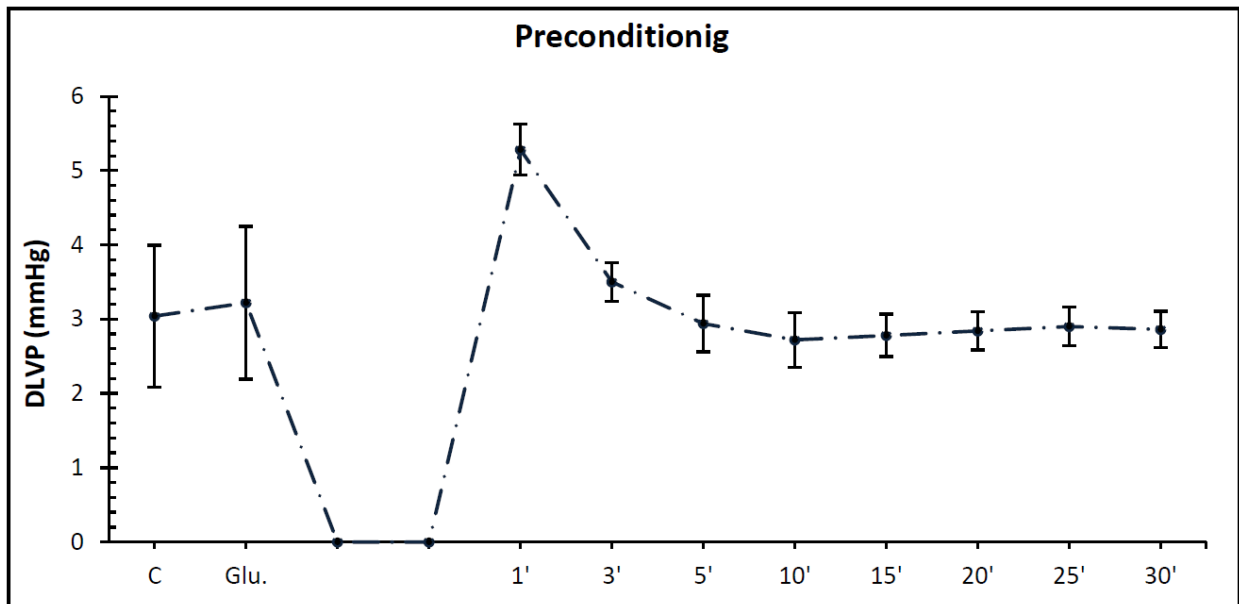


Рисунок 14 - Показатели диастолического давления в левом желудочке (DLVP, в мм рт.ст.) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании глутаматом

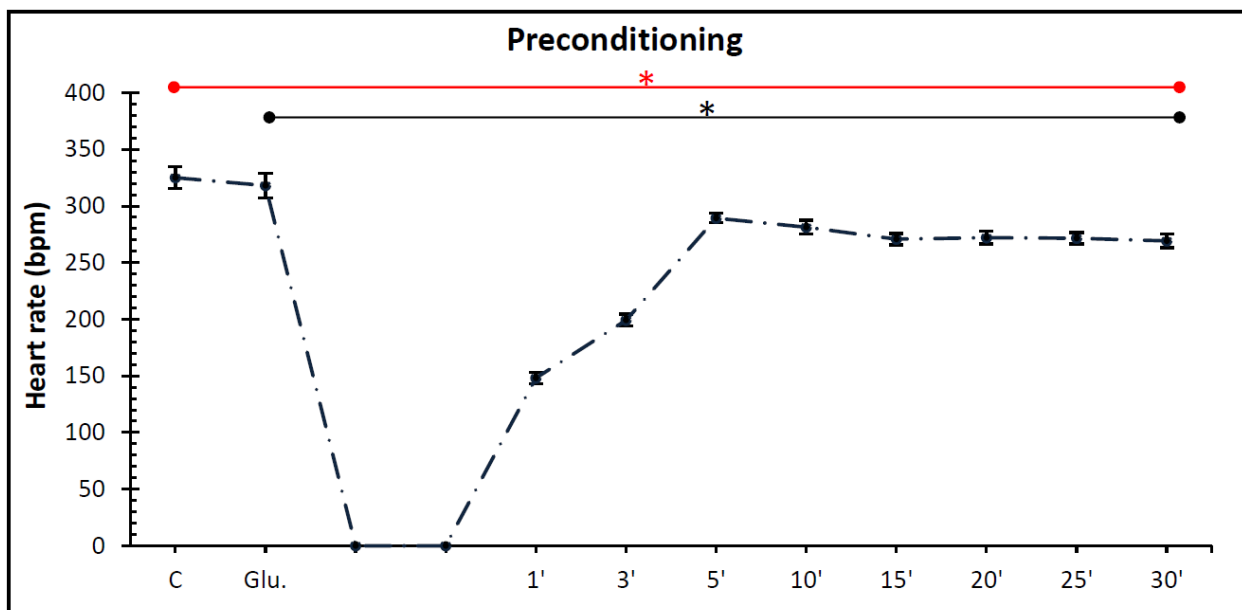


Рисунок 15 - Частота сердечных сокращений (ЧСС, в уд/мин) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании глутаматом

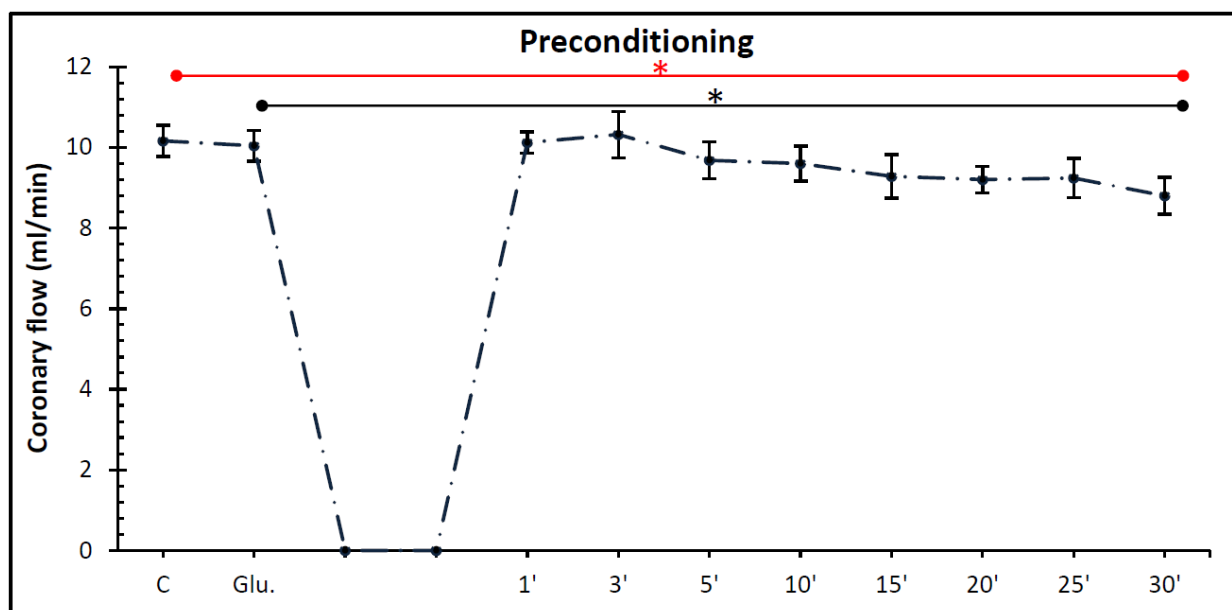


Рисунок 16 - Показатели коронарного потока перфузирующего раствора (КП, в мл/мин) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании глутаматом

3.3. Влияние применения глутамата при посткондиционировании на кардиодинамические параметры изолированного сердца крыс

Значения $dp/dt \max$ и $dp/dt \min$ (мм рт.ст./сек), SLVP и DLVP (мм рт.ст.), ЧСС (в уд/мин) и КП перфузирующего раствора (КП, в мл/мин) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при посткондиционировании глутаматом представлены в таблице 5.

У животных с посткондиционированием глутаматом через минуту от начала реперфузии миокарда после периода его 20-минутной ишемии снижались: максимальная скорость изменения давления в левом желудочке ($dp/dt \max$), однако $p > 0,05$ (рисунок 17), $dp/dt \min$, однако $p > 0,05$ (рисунок 18), ЧСС в 1,3 раза ($p < 0,05$; рисунок 21) и КП перфузирующей жидкости, однако $p > 0,05$ (рисунок 22).

Через 30 минут от начала реперфузии миокарда после периода его 20-минутной ишемии снижались: максимальная скорость изменения давления в левом желудочке ($dp/dt \max$) в 1,2 раза ($p < 0,05$; рисунок 17), $dp/dt \min$, однако

$p > 0,05$ (рисунок 18), SLVP в 1,1 раз ($p < 0,05$; рисунок 19), DLVP в 1,2 раза ($p < 0,05$; рисунок 20), ЧСС в 1,2 раза ($p < 0,05$; рисунок 21) и КП перфузирующей жидкости в 1,3 раза ($p < 0,05$; рисунок 22).

Таблица 5 - Показатели функции левого желудочка сердца при ишемии и последующей реперфузии изолированного сердца крыс раствором Кребса-Хензelayта *ex vivo* после посткондиционирования глутаматом

Посткондиционирование глутаматом						
Минуты	dp/dt max (мм рт.ст./сек)	dp/dt min (мм рт.ст./сек)	SLVP (мм рт.ст.)	DLVP (мм рт.ст.)	ЧСС (уд./мин)	КП (мл/мин)
Контроль	2905,5 ± 179,1	-2226,3 ± 159,4	100,7 ± 4,9	2,3 ± 0,1	280,0 ± 16,1	11,5 ± 0,4
Ишемия						
1	2704,4 ± 43,7	-2117,1 ± 35,7	108,8 ± 7,1	2,5 ± 0,3	215,1 ± 30,9*	10,8 ± 0,4
30	2425,3 ± 159,4*	-1923,4 ± 228,3	89,1 ± 3,6*	1,9 ± 0,3*	244,8 ± 8,0*	8,8 ± 0,3*

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

Таким образом, можно сделать вывод о том, что кардиодинамические параметры сердца, после посткондиционирования глутаматом и подвергающиеся двадцатиминутной ишемии, не возвращаются к значениям, близким к начальным значениям после тридцатиминутной реперфузии, то есть не происходит адекватного их восстановления.

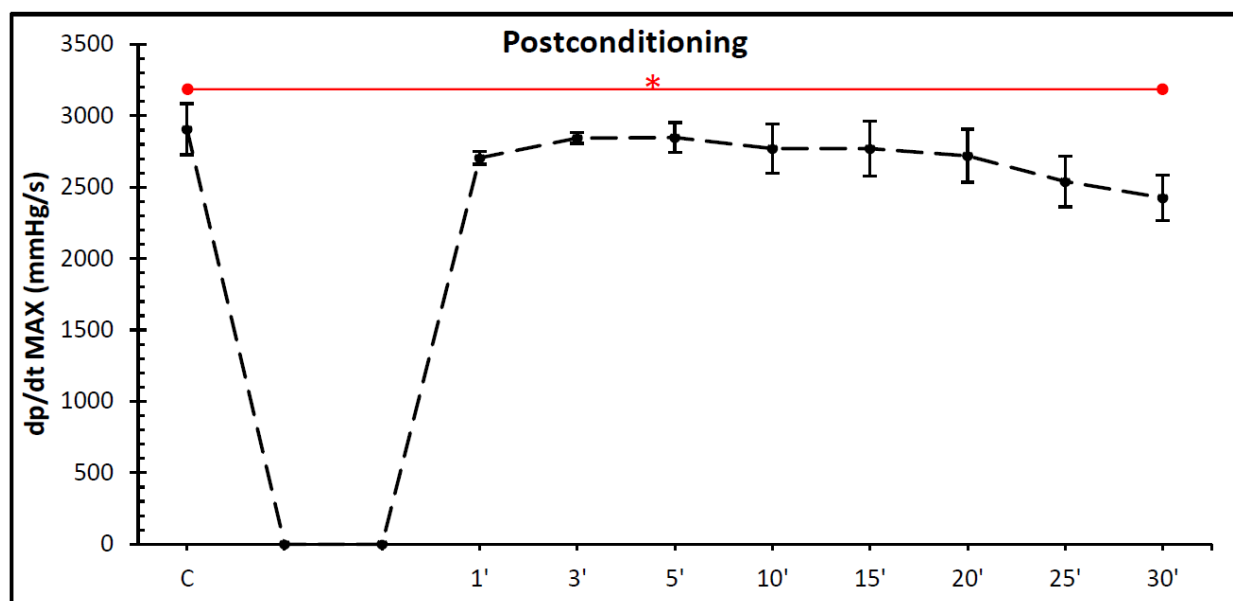


Рисунок 17 - Показатели максимальной скорости изменения давления в левом

желудочке ($dp/dt \max$, в мм рт.ст./сек) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при посткондиционировании глутаматом

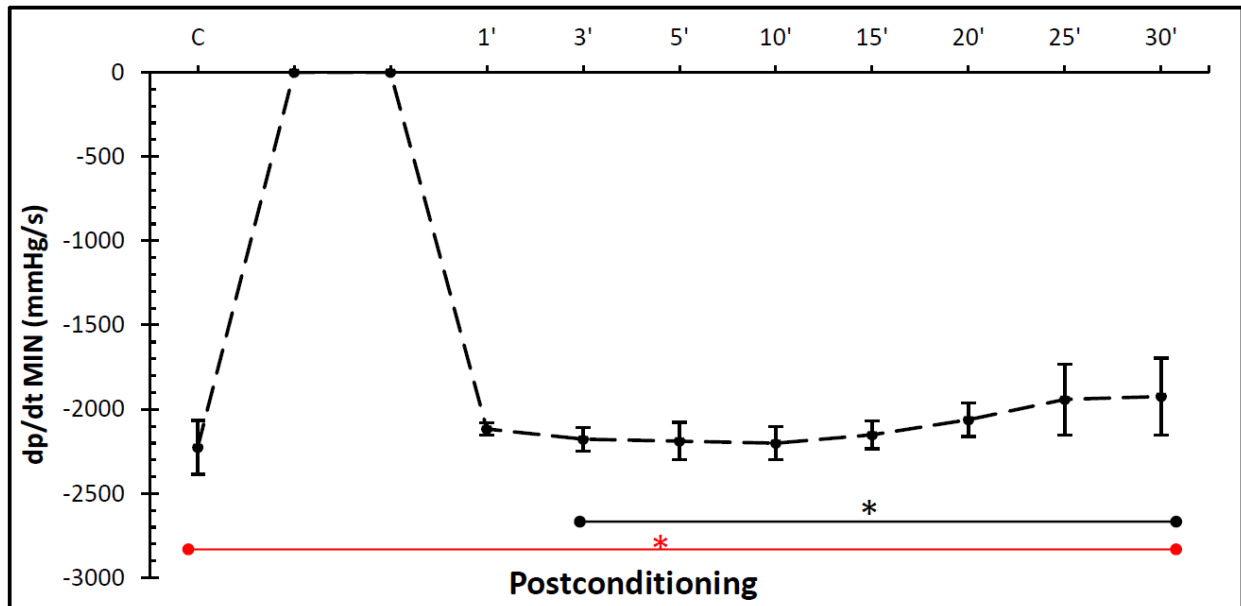


Рисунок 18 - Показатели минимальной скорости изменения давления в левом желудочке ($dp/dt \min$, в мм рт.ст./сек) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при посткондиционировании глутаматом

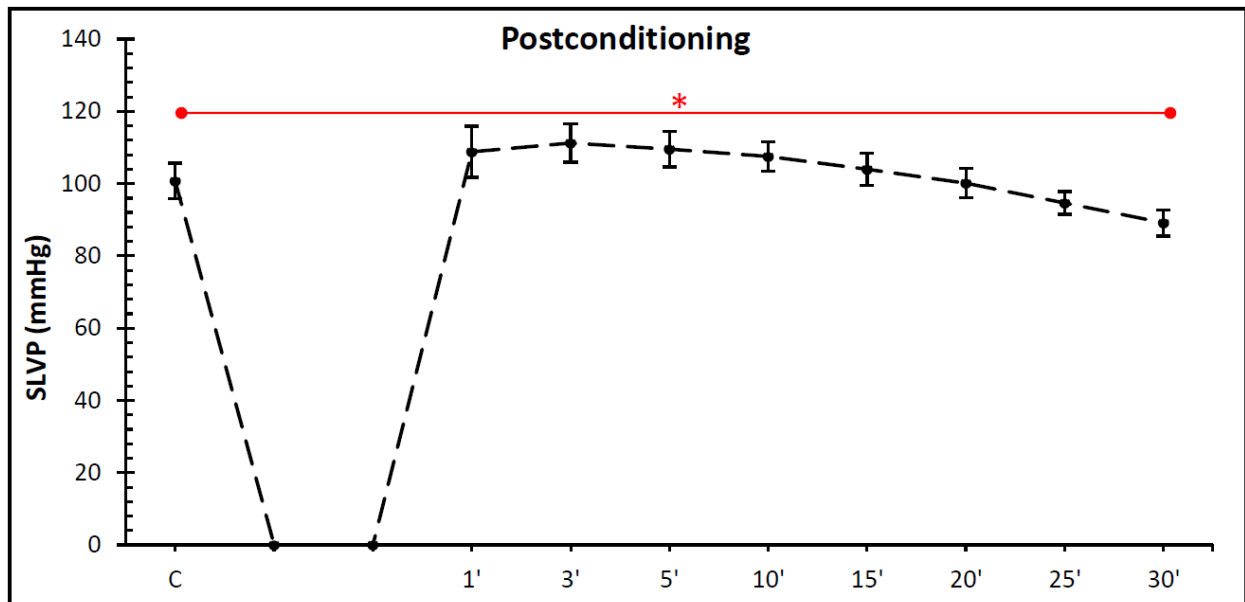


Рисунок 19 - Показатели систолического давления в левом желудочке (SLVP, в мм рт.ст.) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при посткондиционировании глутаматом

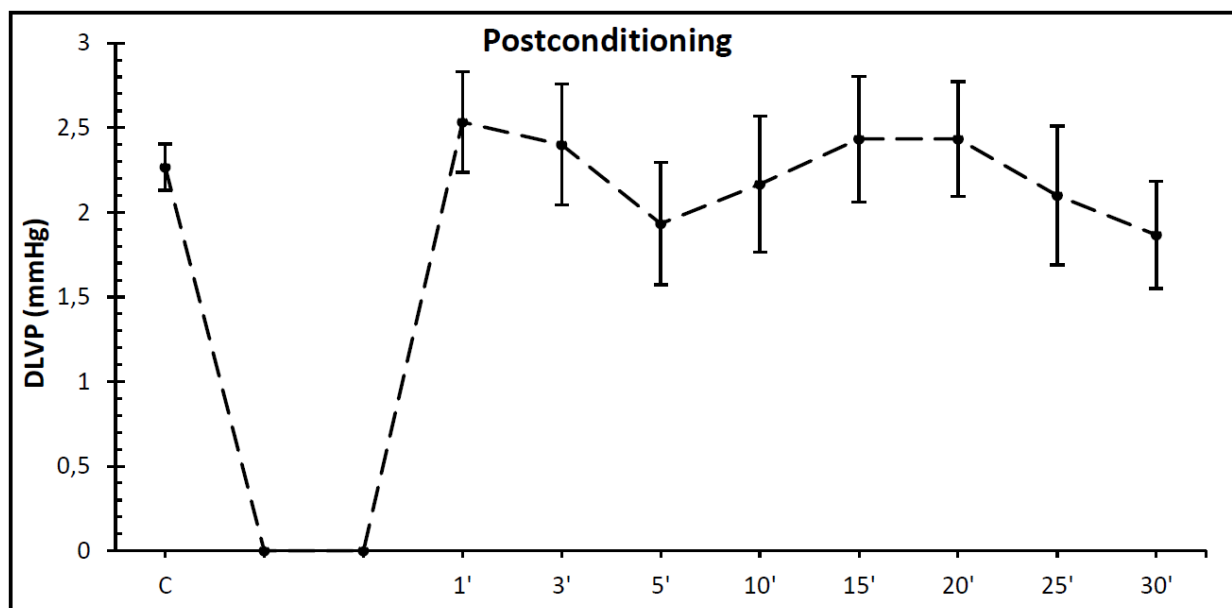


Рисунок 20 - Показатели диастолического давления в левом желудочке (DLVP, в мм рт.ст.) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при посткондиционировании глутаматом

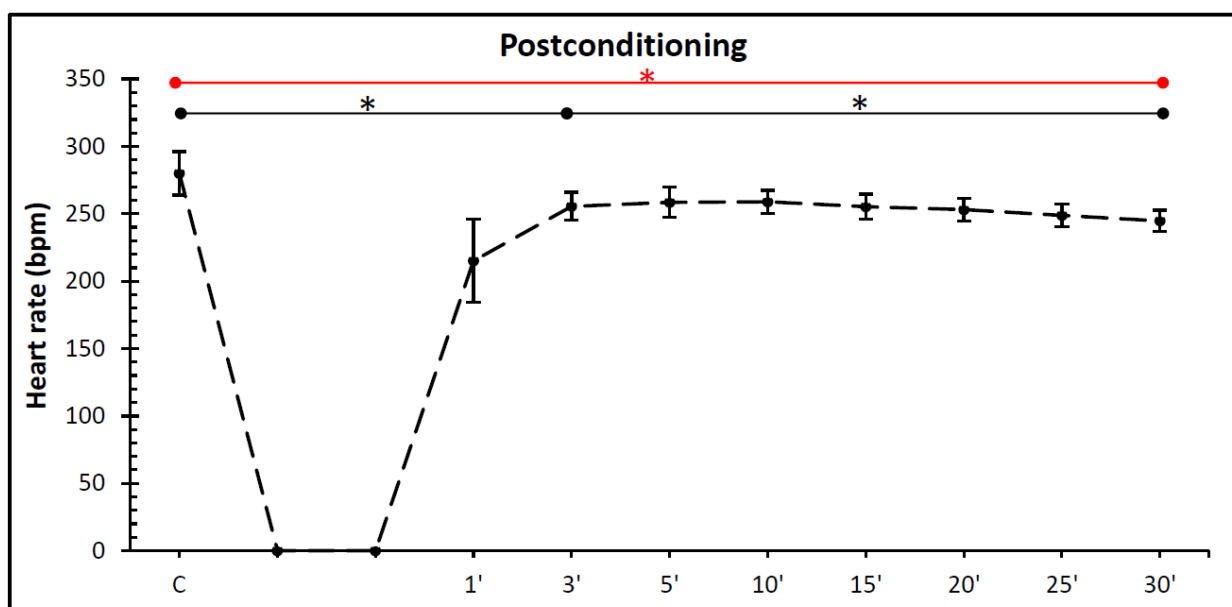


Рисунок 21 - Частота сердечных сокращений (ЧСС, в уд /мин) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при посткондиционировании глутаматом

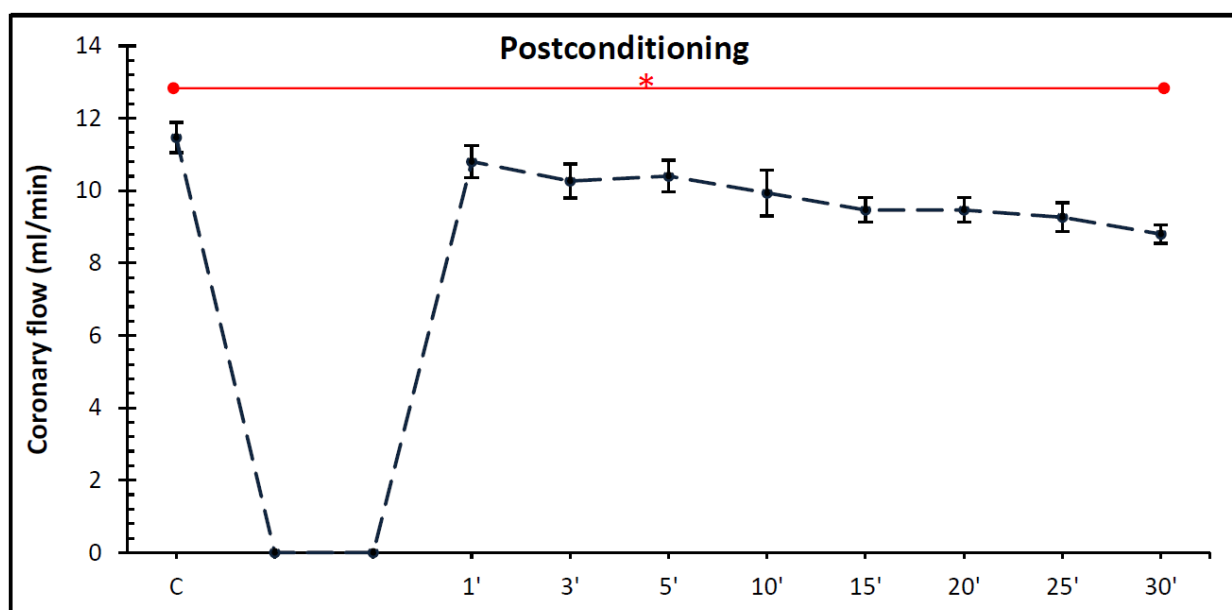


Рисунок 22 - Показатели коронарного потока перфузирующего раствора (КП, в мл/мин) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при посткондиционировании глутаматом

3.4. Влияние применения глицина при preconditionировании на кардиодинамические параметры изолированного сердца крыс

Значения $dp/dt \max$ и $dp/dt \min$ (мм рт.ст./сек), SLVP и DLVP (мм рт.ст.), ЧСС (в уд/мин) и КП перфузирующего раствора (КП, в мл/мин) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании глицином представлены в таблице 6.

Таблица 6 - Показатели функции левого желудочка сердца при ишемии и последующей реперфузии изолированного сердца крыс раствором Кребса-Хензelayта *ex vivo* после preconditionирования глицином

Preconditionирование глицином						
Минуты	$dp/dt \max$ (мм рт.ст./сек)	$dp/dt \min$ (мм рт.ст./сек)	SLVP (мм рт.ст.)	DLVP (мм рт.ст.)	ЧСС (уд./мин)	КП (мл/мин)
Контроль	$1872,7 \pm 100,4$	$-1551,9 \pm 83,5$	$54,5 \pm 2,4$	$2,4 \pm 0,3$	$308,7 \pm 12,2$	$9,1 \pm 0,6$
Глицин	$1484,0 \pm 158,6$	$-1297,4 \pm 116,4$	$61,1 \pm 3,8$	$2,7 \pm 0,2$	$256,6 \pm 14,9$	$8,2 \pm 0,8$
Ишемия						
1	$1789,8 \pm 136,5$	$-1521,6 \pm 96,4$	$71,2 \pm 2,8$	$3,4 \pm 0,4$	$233,8 \pm 30,3^*$	$8,5 \pm 0,7$
30	$1695,4 \pm 135,8^*$	$-1482,6 \pm 76,1$	$54,8 \pm 2,9$	$2,3 \pm 0,3$	$258,4 \pm 3,4^*$	$7,7 \pm 0,8^*$

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

У животных с preconditionированием глицином через минуту от начала реперфузии миокарда после периода его 20-минутной ишемии снижались: ЧСС в 1,3 раза ($p < 0,05$; рисунок 27) и КП перфузирующей жидкости, однако $p > 0,05$ (рисунок 28).

Через 30 минут от начала реперфузии миокарда после периода его 20-минутной ишемии снижались: максимальная скорость изменения давления в левом желудочке ($dp/dt \max$) в 1,1 раз ($p < 0,05$; рисунок 23), $dp/dt \min$, однако $p > 0,05$ (рисунок 24), DLVP, однако $p > 0,05$ (рисунок 26), ЧСС в 1,2 раза ($p < 0,05$; рисунок 27), КП перфузирующей жидкости в 1,2 раза ($p < 0,05$; рисунок 28).

Таким образом, можно сделать вывод о том, что кардиодинамические параметры сердца, после preconditionирования глицином и подвергающиеся

двадцатиминутной ишемии, не возвращаются к значениям, близким к начальным значениям после тридцатиминутной реперфузии, то есть не происходит адекватного их восстановления.

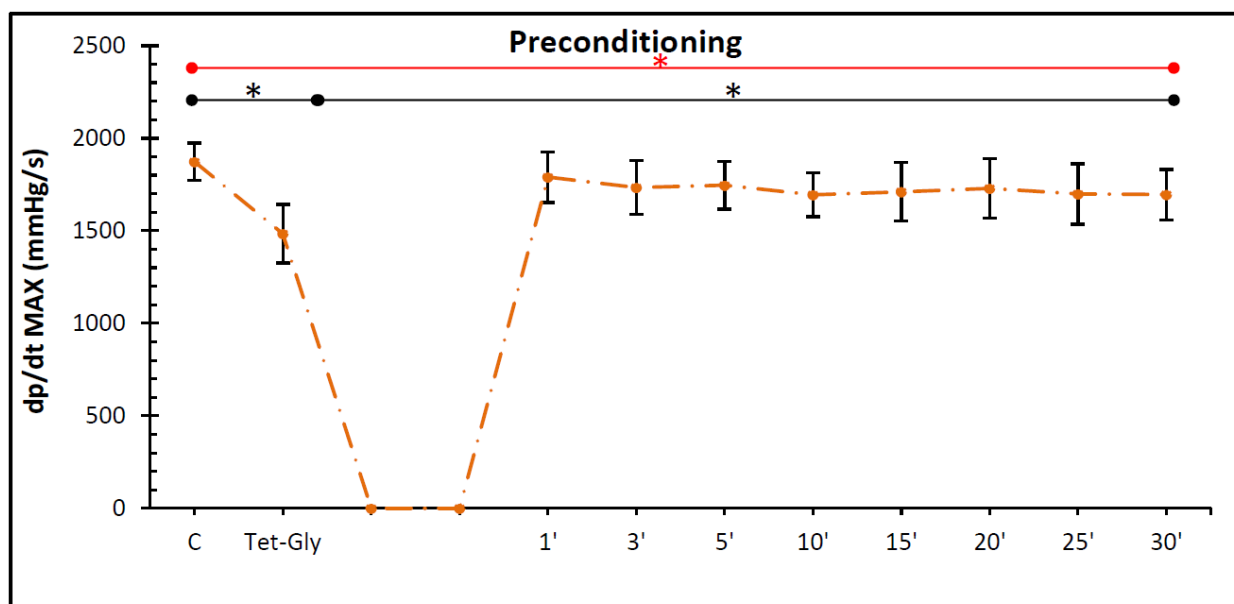


Рисунок 23 - Показатели максимальной скорости изменения давления в левом желудочке ($dp/dt \max$, в мм рт.ст./сек) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании глицином

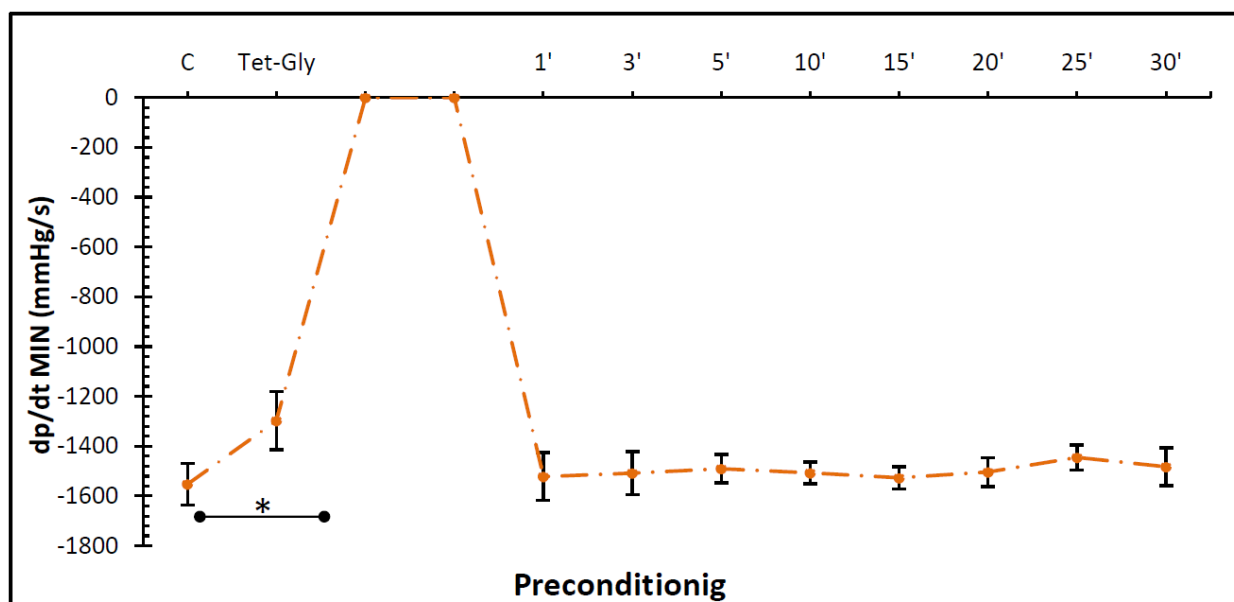


Рисунок 24 - Показатели минимальной скорости изменения давления в левом желудочке ($dp/dt \min$, в мм рт.ст./сек) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании глицином

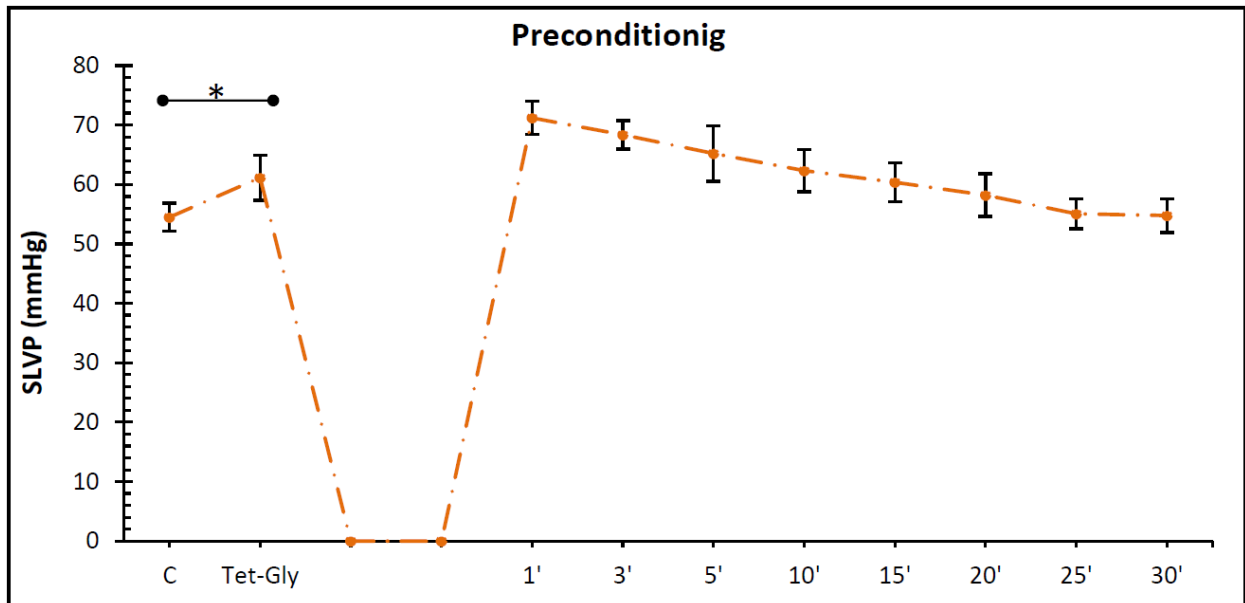


Рисунок 25 - Показатели систолического давления в левом желудочке (SLVP, в мм рт.ст.) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании глицином

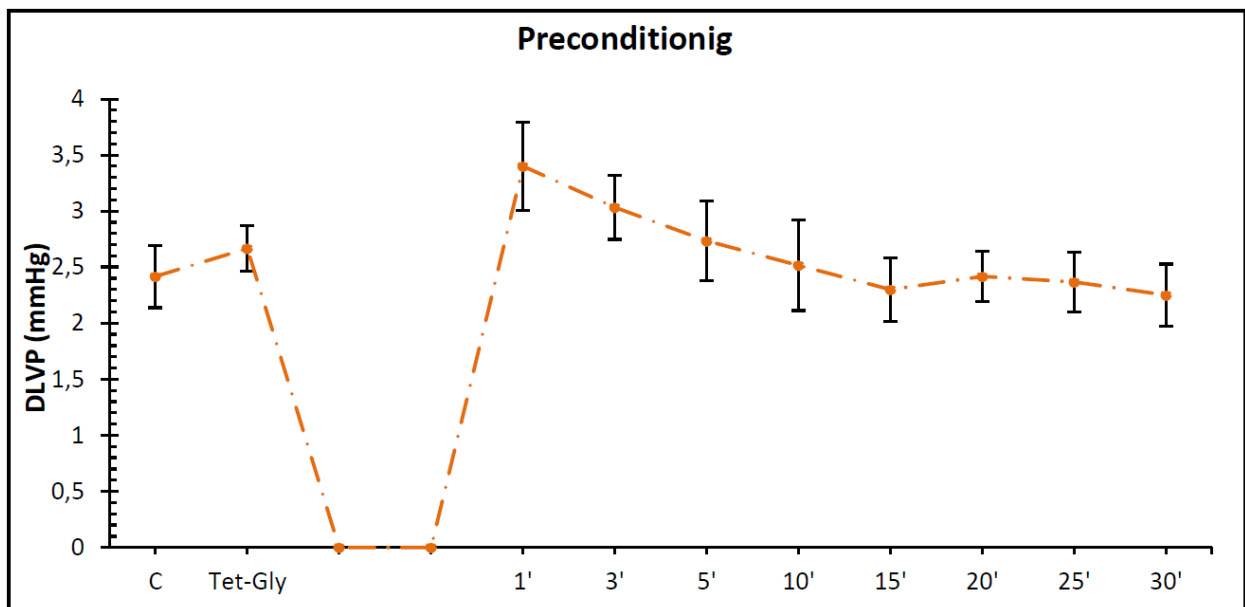


Рисунок 26 - Показатели диастолического давления в левом желудочке (DLVP, в мм рт.ст.) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании глицином

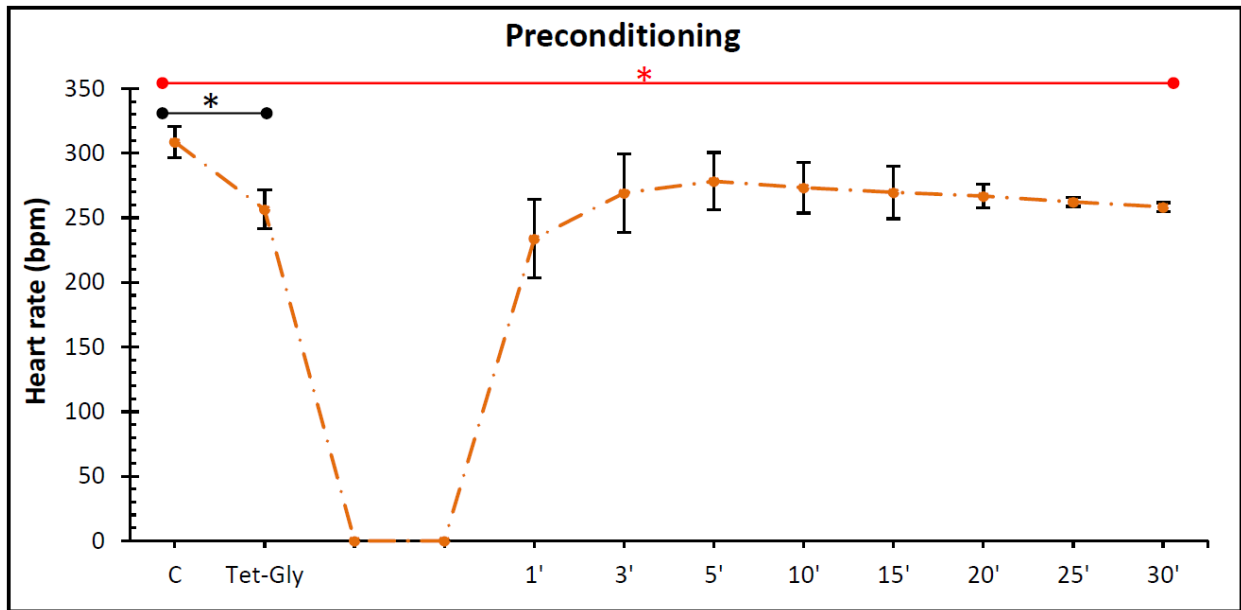


Рисунок 27 - Частота сердечных сокращений (ЧСС, в уд /мин) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании глицином

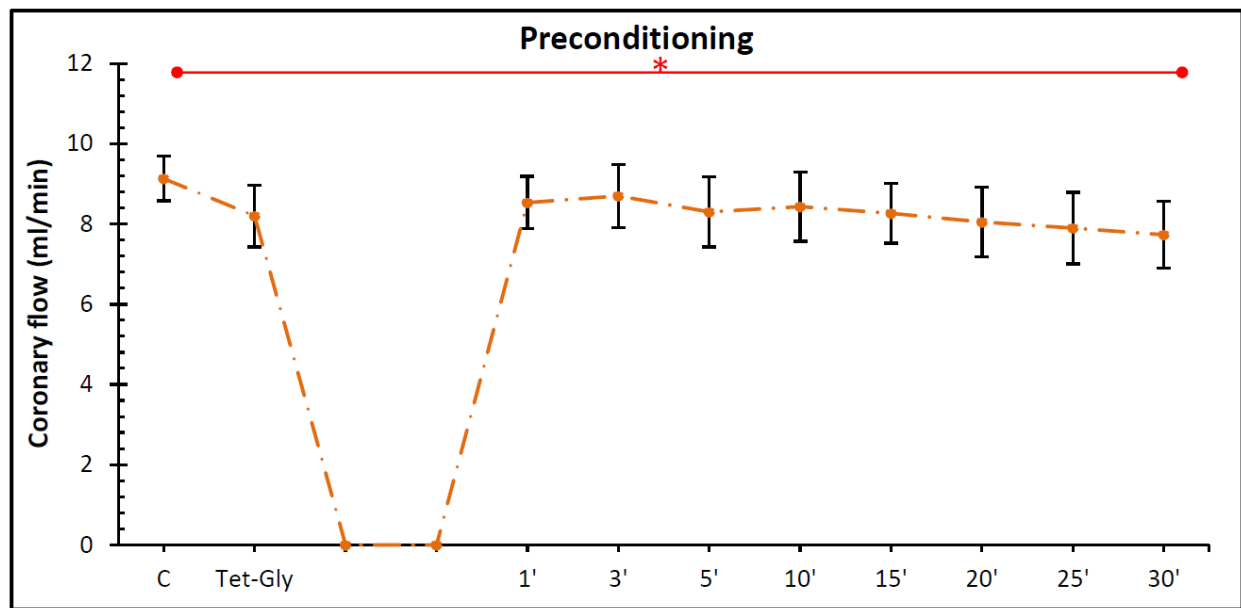


Рисунок 28 - Показатели коронарного потока перфузирующего раствора (КП, в мл/мин) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании глицином

3.5. Влияние применения глицина при посткондиционировании на кардиодинамические параметры изолированного сердца крыс

Значения $dp/dt \max$ и $dp/dt \min$ (мм рт.ст./сек), SLVP и DLVP (мм рт.ст.), ЧСС (в уд/мин) и КП перфузирующего раствора (КП, в мл/мин) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при посткондиционировании глицином представлены в таблице 7.

Таблица 7 - Показатели функции левого желудочка сердца при ишемии и последующей реперфузии изолированного сердца крыс раствором Кребса-Хензелята *ex vivo* после посткондиционирования глицином

Посткондиционирование глицином						
Минуты	$dp/dt \max$ (мм рт.ст./сек)	$dp/dt \min$ (мм рт.ст./сек)	SLVP (мм рт.ст.)	DLVP (мм рт.ст.)	ЧСС (уд./мин)	КП (мл/мин)
Контроль	$2089,7 \pm 86,7$	$-1538,9 \pm 110,6$	$57,7 \pm 3,3$	$1,4 \pm 0,5$	$320,0 \pm 13,1$	$10,4 \pm 0,6$
Ишемия						
1	$2410,8 \pm 126,2$	$-1763,4 \pm 85,4$	$91,2 \pm 4,2$	$2,6 \pm 0,4$	$183,8 \pm 14,9^*$	$9,8 \pm 0,3$
30	$1666,7 \pm 155,6^*$	$-1340,0 \pm 189,4$	$55,3 \pm 5,0$	$2,3 \pm 0,5$	$262,1 \pm 20,7$	$8,3 \pm 0,4$

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

У животных с посткондиционированием глицином через минуту от начала реперфузии миокарда после периода его 20-минутной ишемии снижались: ЧСС в 1,7 раза ($p < 0,05$; рисунок 33) и КП перфузирующей жидкости, однако $p > 0,05$ (рисунок 34).

Через 30 минут от начала реперфузии миокарда после периода его 20-минутной ишемии снижались: максимальная скорость изменения давления в левом желудочке ($dp/dt \max$) в 1,3 раза ($p < 0,05$; рисунок 29), $dp/dt \min$, однако $p > 0,05$ (рисунок 30), систолическое давление в левом желудочке, однако $p > 0,05$ (рисунок 31), ЧСС в 1,2 раза ($p < 0,05$; рисунок 33) и КП перфузирующей жидкости в 1,3 раза ($p < 0,05$; рисунок 34).

Таким образом, можно сделать вывод о том, что кардиодинамические параметры сердца, после посткондиционирования глицином и подвергающиеся

двадцатиминутной ишемии, не возвращаются к значениям, близким к начальным значениям после тридцатиминутной реперфузии, то есть не происходит адекватного их восстановления.

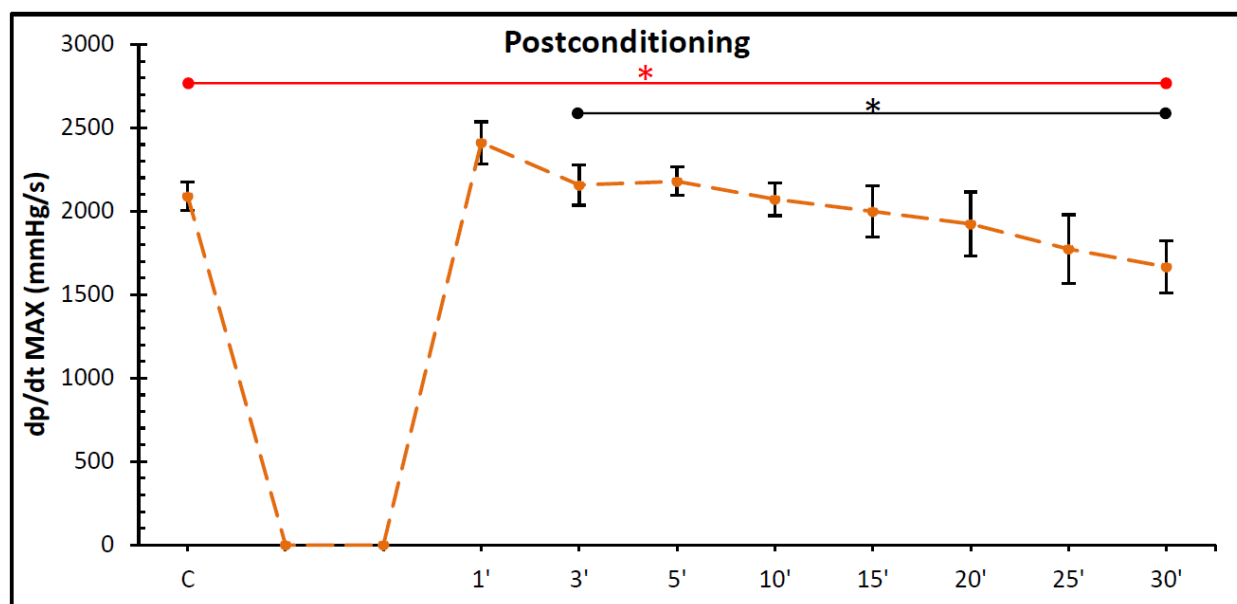


Рисунок 29 - Показатели максимальной скорости изменения давления в левом желудочке ($dp/dt \max$, в мм рт.ст./сек) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при посткондиционировании глицином

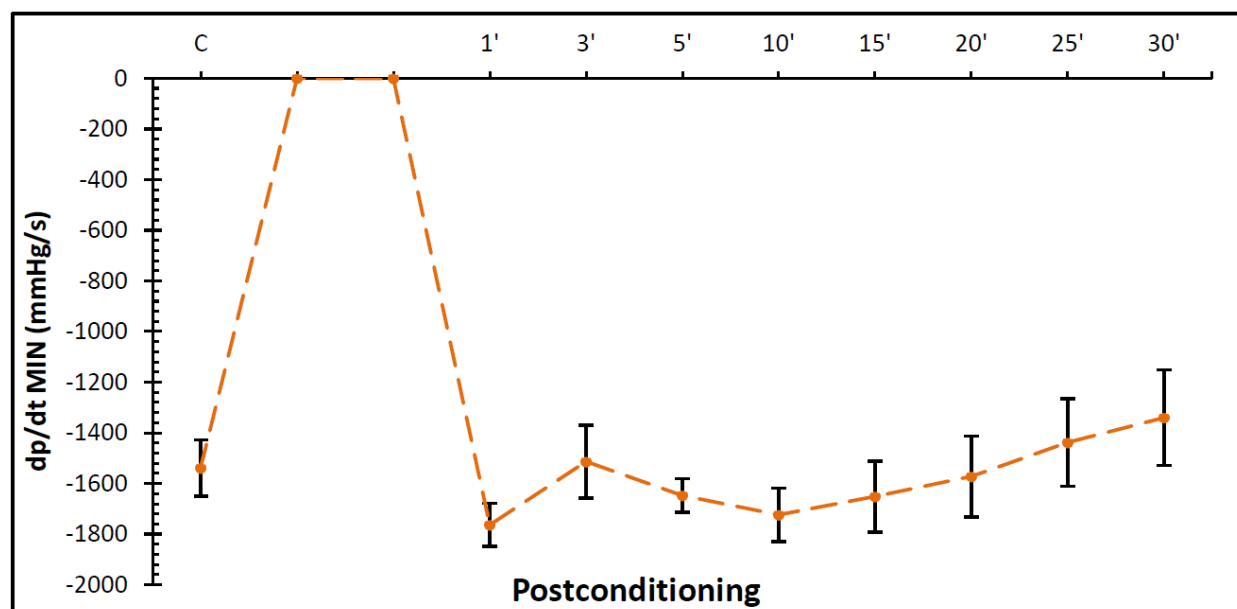


Рисунок 30 - Показатели минимальной скорости изменения давления в левом желудочке ($dp/dt \min$, в рт.ст./сек) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при посткондиционировании глицином

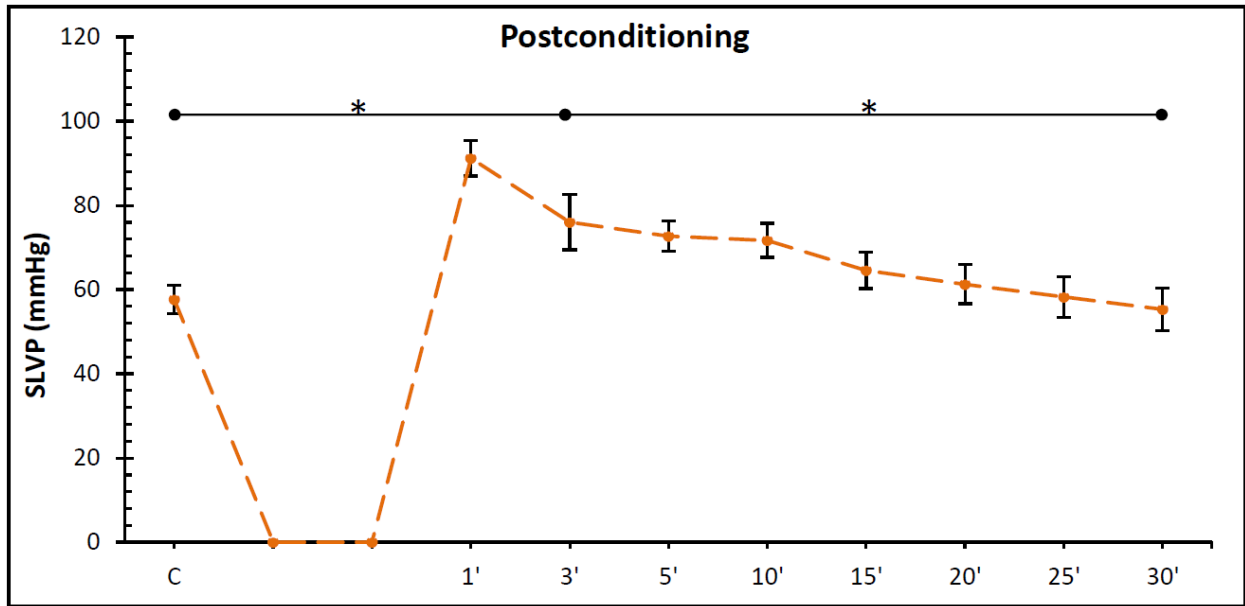


Рисунок 31 - Показатели систолического давления в левом желудочке (SLVP, в мм рт.ст.) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при посткондиционировании глицином

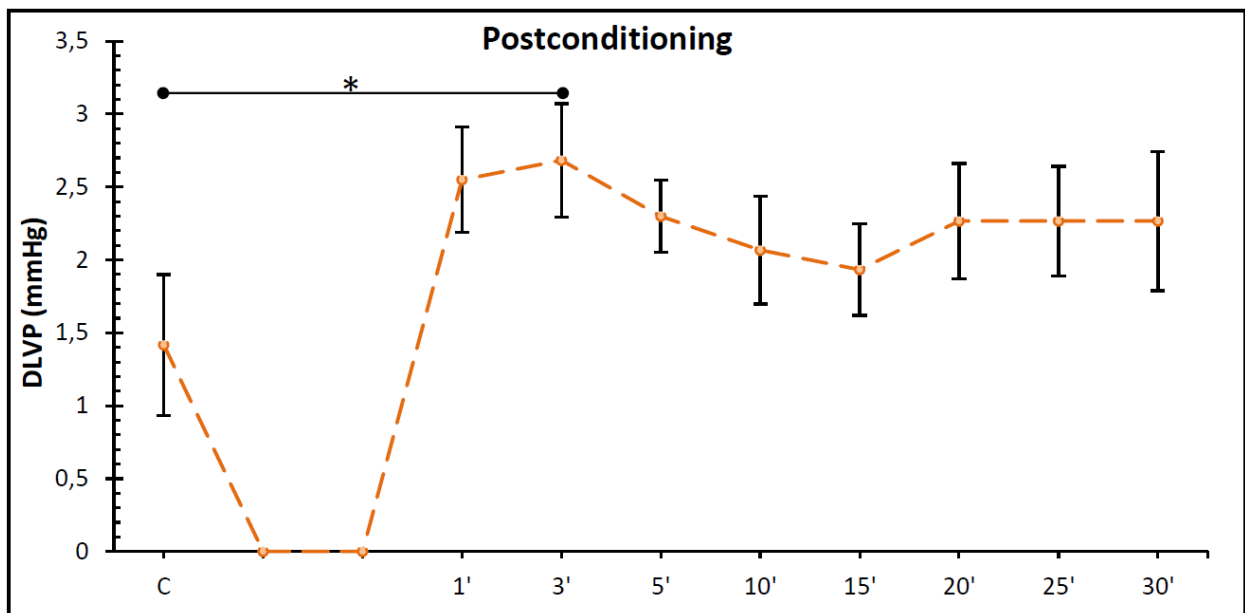


Рисунок 32 - Показатели диастолического давления в левом желудочке (DLVP, в мм рт.ст.) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при посткондиционировании глицином

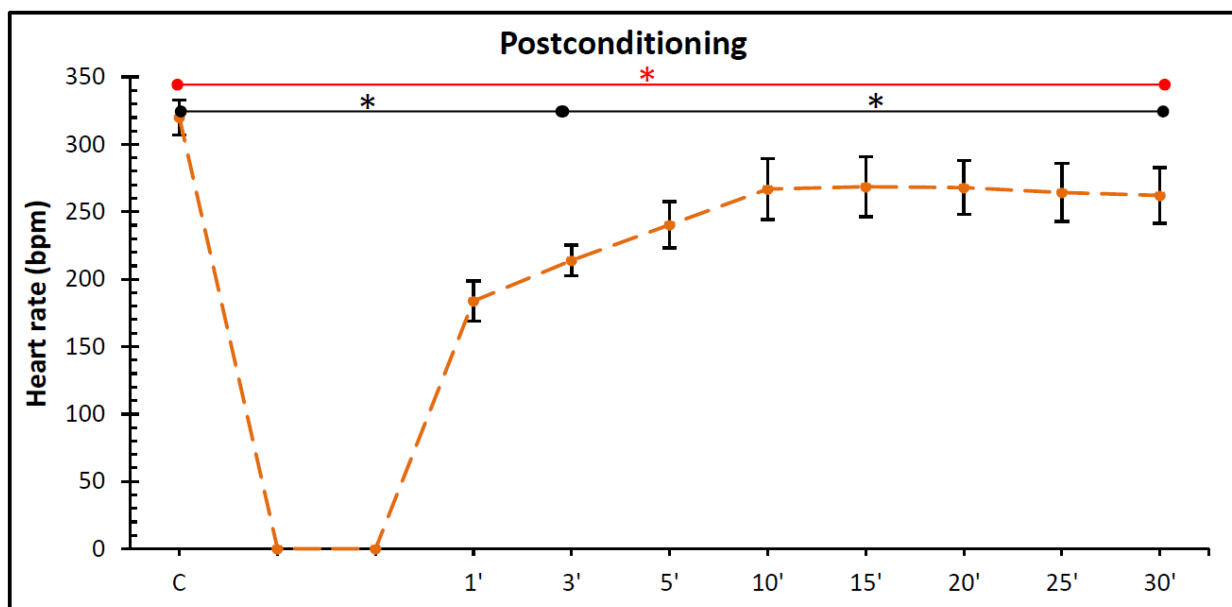


Рисунок 33 - Частота сердечных сокращений (ЧСС, в уд /мин) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при посткондиционировании глицином

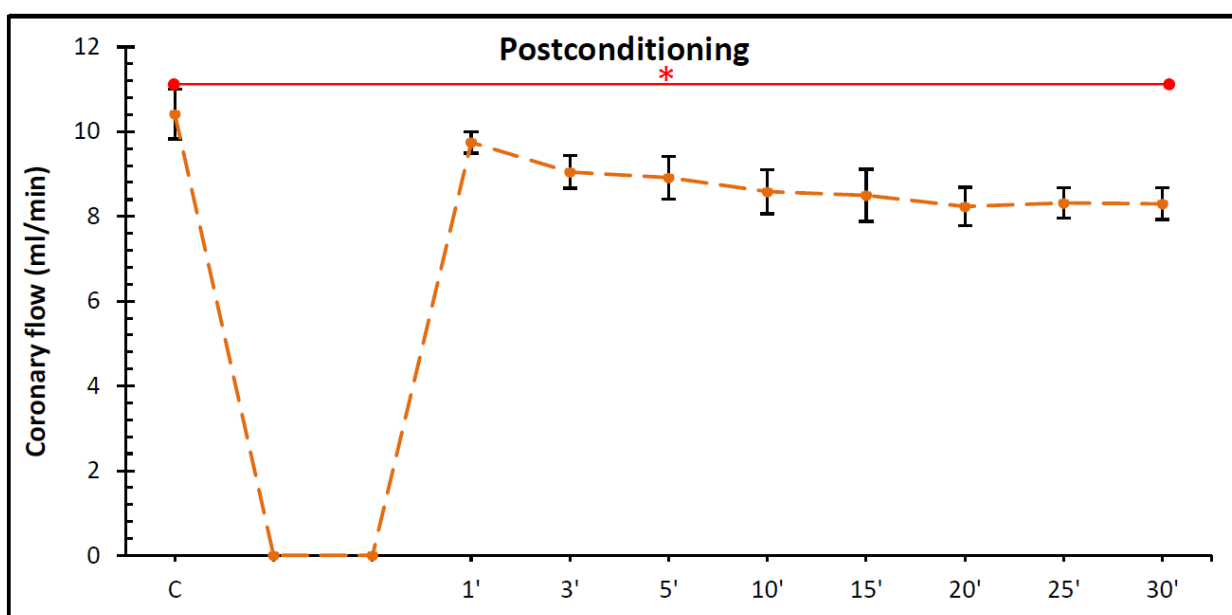


Рисунок 34 - Показатели коронарного потока перфузирующего раствора (КП, в мл/мин) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при посткондиционировании глицином

3.6. Влияние применения МК-801 при preconditionировании на кардиодинамические параметры изолированного сердца крыс

Значения $dp/dt \max$ и $dp/dt \min$ (мм рт.ст./сек), SLVP и DLVP (мм рт.ст.), ЧСС (в уд/мин) и КП перфузирующего раствора (КП, в мл/мин) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании МК-801 представлены в таблице 8.

Таблица 8 - Показатели функции левого желудочка сердца при ишемии и последующей реперфузии изолированного сердца крыс раствором Кребса-Хензелята ex vivo после preconditionирования МК-801

Preconditionирование МК-801						
Минуты	$dp/dt \max$ (мм рт.ст./сек)	$dp/dt \min$ (мм рт.ст./сек)	SLVP (мм рт.ст.)	DLVP (мм рт.ст.)	ЧСС (уд./мин)	КП (мл/мин)
Контроль	$2035,0 \pm 104,5$	$-1393,6 \pm 41,6$	$59,6 \pm 2,4$	$5,3 \pm 0,1$	$311,7 \pm 7,0$	$10,2 \pm 0,8$
МК-801	$1537,8 \pm 77,6$	$-948,7 \pm 57,5$	$42,2 \pm 2,5$	$3,9 \pm 0,1$	$254,9 \pm 15,3$	$7,3 \pm 0,4$
Ишемия						
1	$2363,6 \pm 182,1^*$	$-1573,7 \pm 63,1^*$	$84,1 \pm 3,4^*$	$8,2 \pm 0,6^*$	$256,7 \pm 18,6$	$10,7 \pm 0,3$
30	$2021,0 \pm 110,9^{**}$	$-1317,5 \pm 40,0^{**}$	$59,1 \pm 2,0^{**}$	$5,2 \pm 0,2^{**}$	$302,4 \pm 8,4$	$9,4 \pm 0,7$

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

У животных с preconditionированием МК-801 через минуту от начала реперфузии миокарда после периода его 20-минутной ишемии увеличивались: максимальная скорость изменения давления в левом желудочке ($dp/dt \max$) в 1,2 раза ($p < 0,05$; рисунок 35), $dp/dt \min$ в 1,1 раза ($p < 0,05$; рисунок 36), SLVP в 1,4 раза ($p < 0,05$; рисунок 37), DLVP в 1,6 раза ($p < 0,05$; рисунок 38) и КП перфузирующей жидкости, однако $p > 0,05$ (рисунок 40).

Через 30 минут от начала реперфузии миокарда после периода его 20-минутной ишемии снижались и достигали контрольных значений:

- максимальная скорость изменения давления в левом желудочке ($dp/dt \max$) в 1,1 раза ($p < 0,05$; рисунок 35), $dp/dt \min$ в 1,1 раза ($p < 0,05$; рисунок 36), SLVP в 1,4 раза ($p < 0,05$; рисунок 37), DLVP в 1,6 раза ($p < 0,05$; рисунок 38) и КП перфузирующей жидкости, однако $p > 0,05$ (рисунок 40).

Таким образом, можно сделать вывод о том, что кардиодинамические параметры сердца, после preconditionирования МК-801 и подвергающиеся двадцатиминутной ишемии, после тридцатиминутной реперфузии возвращаются к значениям, близким к начальным значениям то есть происходит адекватное их восстановление.

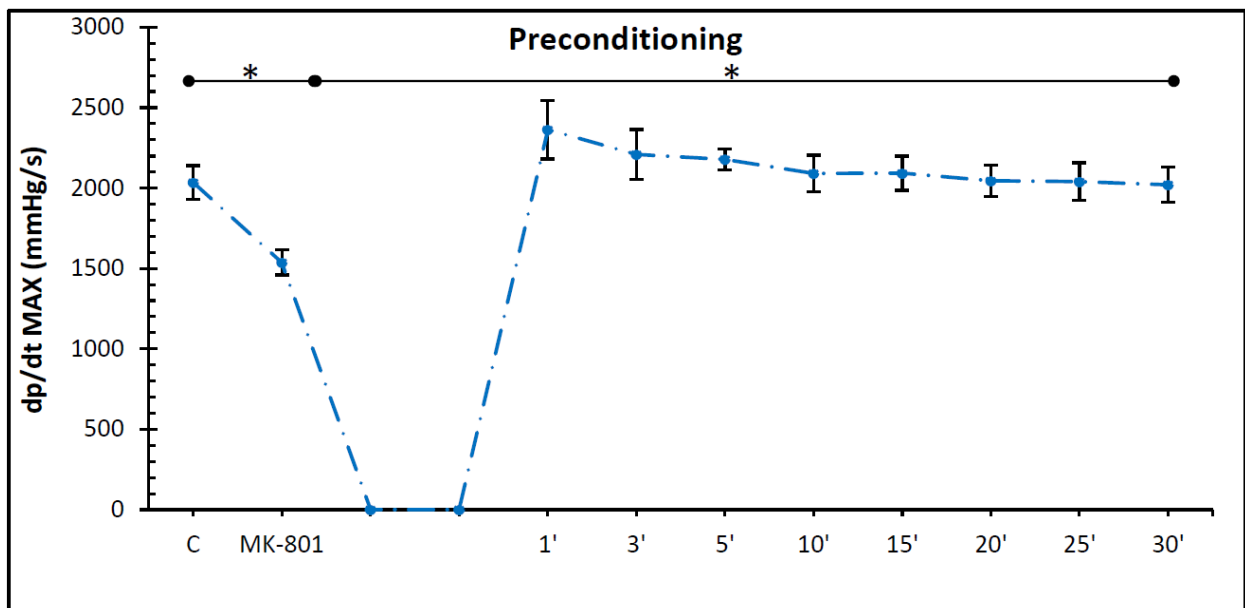


Рисунок 35 - Показатели максимальной скорости изменения давления в левом желудочке ($dp/dt \max$, в мм рт.ст./сек) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании МК-801

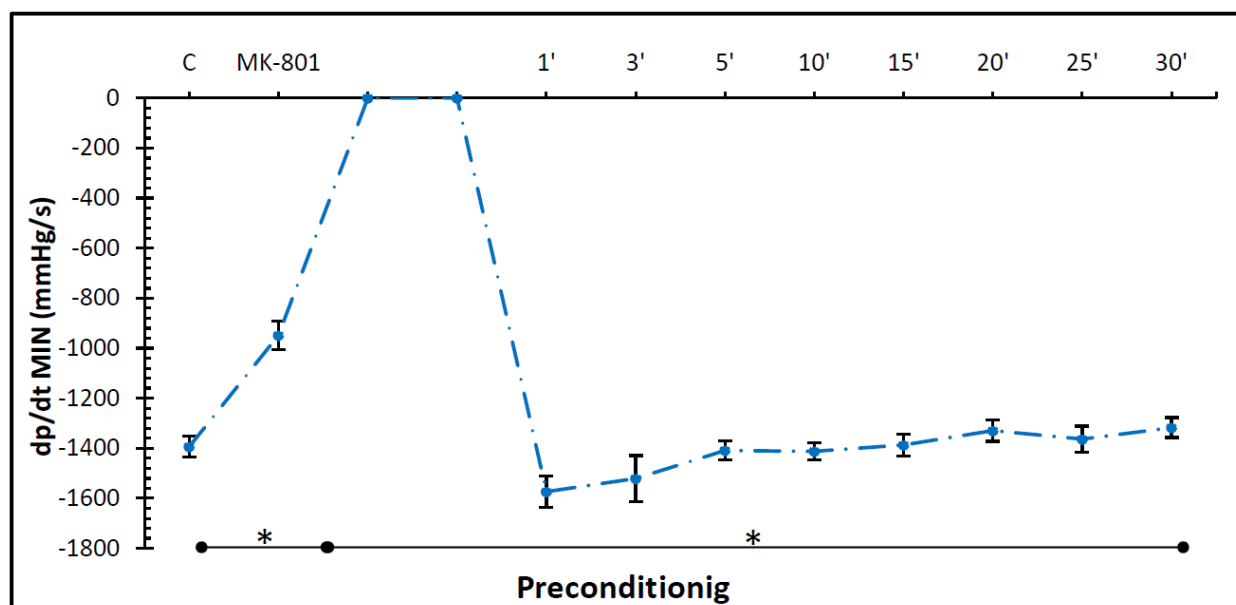


Рисунок 36 - Показатели минимальной скорости изменения давления в левом желудочке ($dp/dt \min$, в рт.ст./сек) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании MK-801

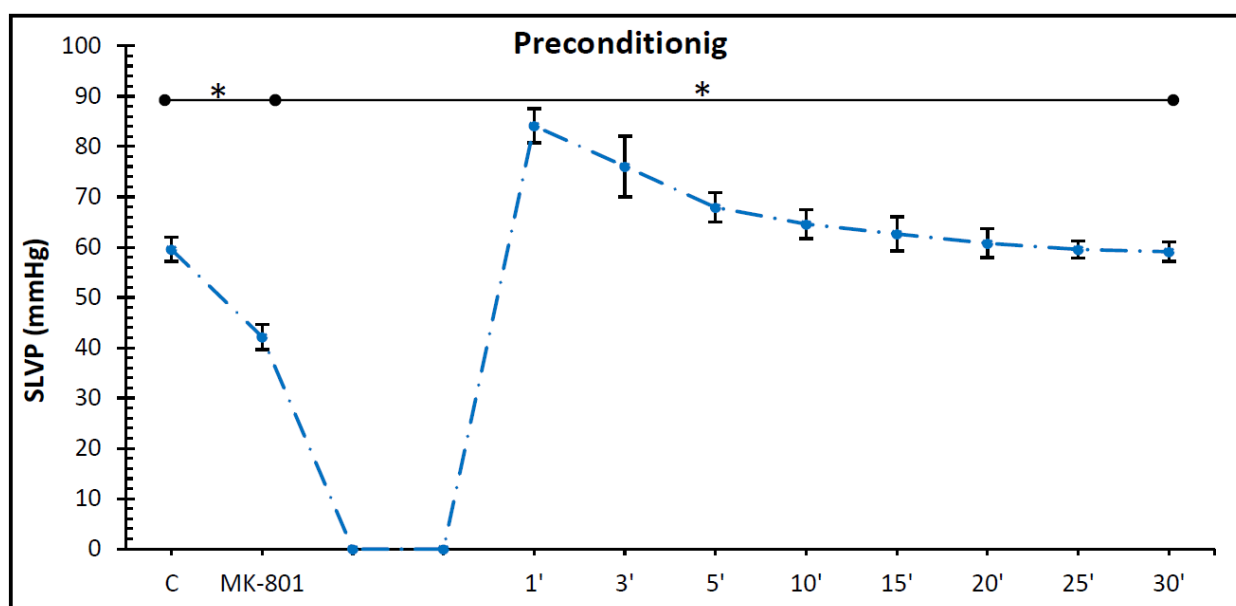


Рисунок 37 - Показатели систолического давления в левом желудочке (SLVP, в мм рт.ст.) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании MK-801

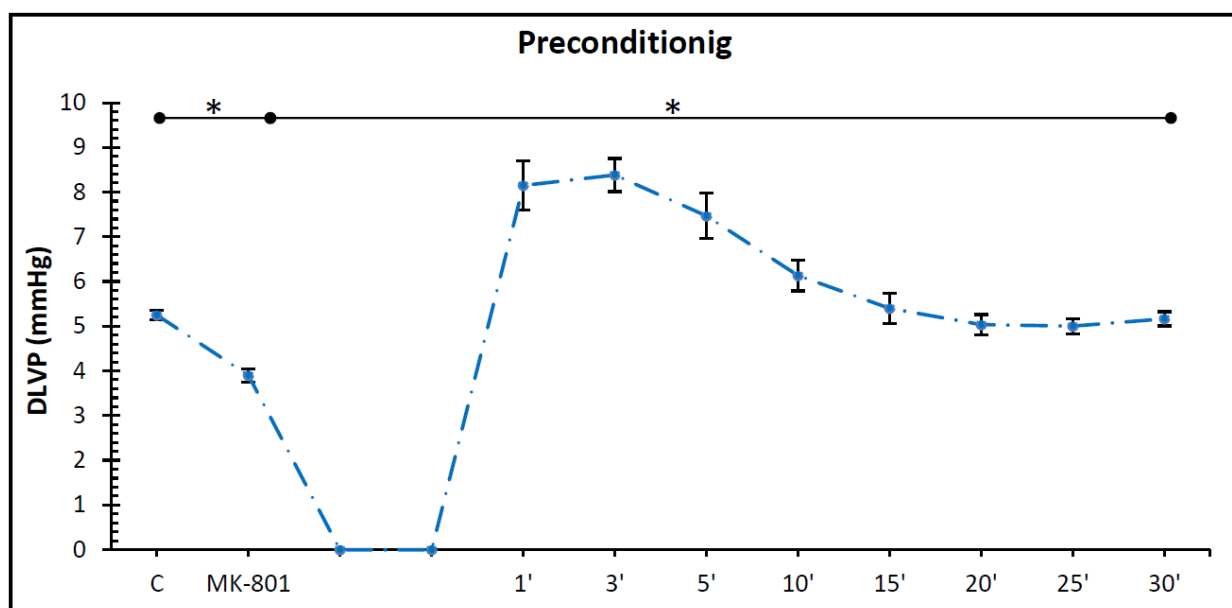


Рисунок 38 - Показатели диастолического давления в левом желудочке (DLVP, в мм рт.ст.) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании МК-801

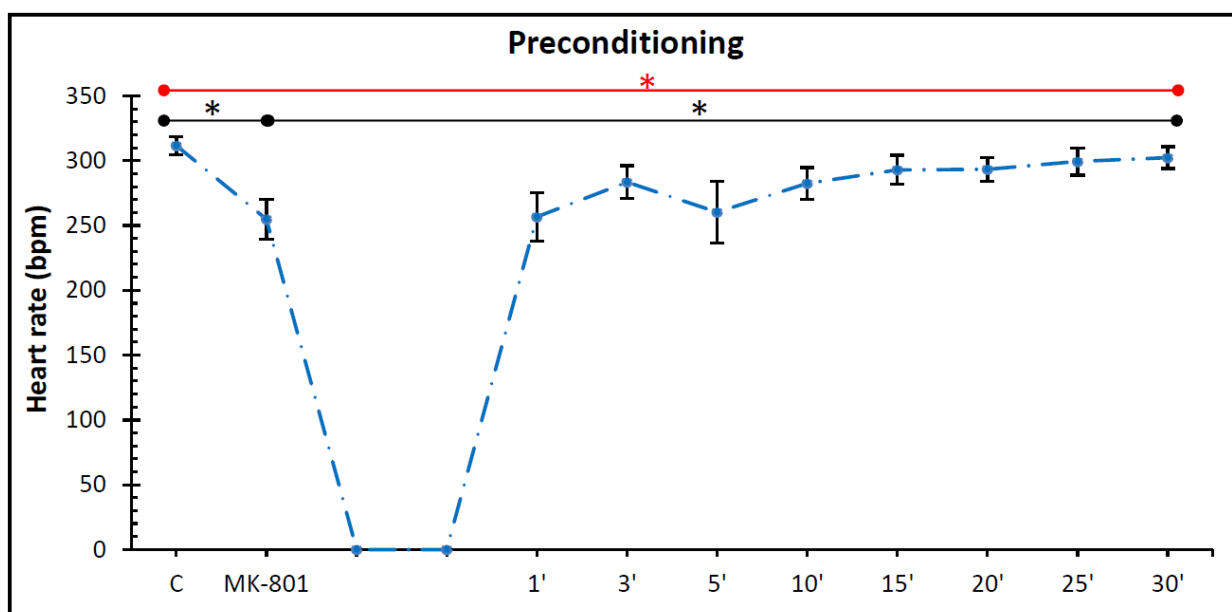


Рисунок 39 - Частота сердечных сокращений (ЧСС, в уд/мин) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании МК-801

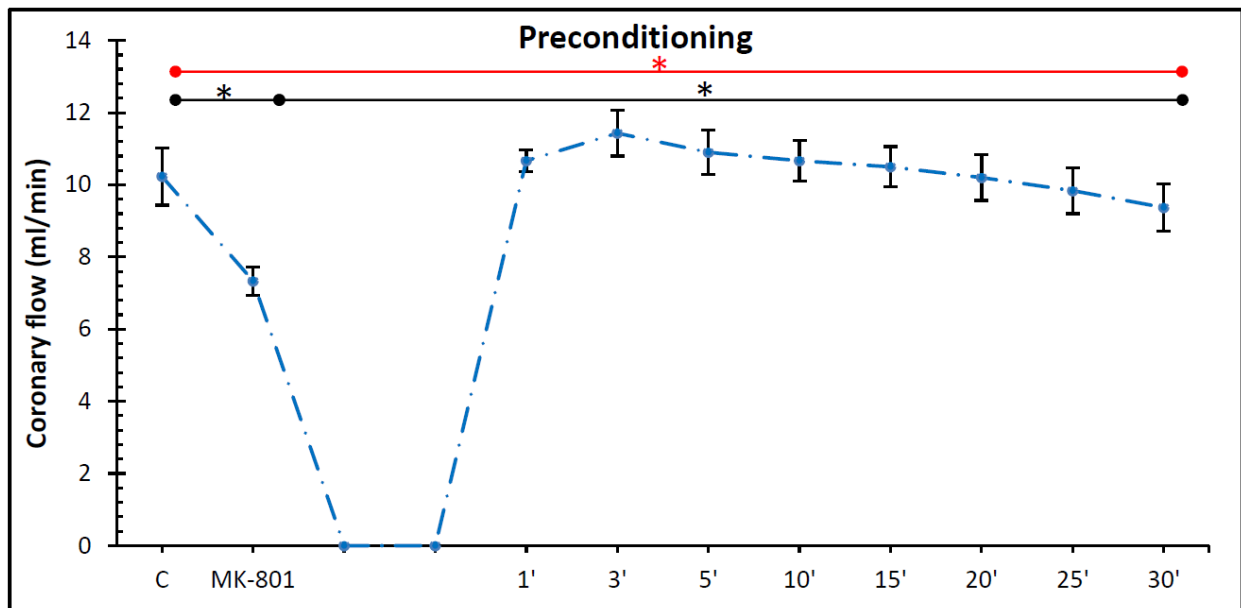


Рисунок 40 - Показатели коронарного потока перфузирующего раствора (КП, в мл/мин) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании МК-801

3.7. Влияние применения МК-801 при посткондиционировании на кардиодинамические параметры изолированного сердца крыс

Значения $dp/dt \max$ и $dp/dt \min$ (мм рт.ст./сек), SLVP и DLVP (мм рт.ст.), ЧСС (в уд/мин) и КП перфузирующего раствора (КП, в мл/мин) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при посткондиционировании МК-801 представлены в таблице 9.

У животных с посткондиционированием МК-801 через минуту от начала реперфузии миокарда после периода его 20-минутной ишемии увеличивались: SLVP в 1,2 раза ($p < 0,05$; рисунок 43), DLVP, однако $p > 0,05$ (рисунок 44), КП перфузирующей жидкости, однако $p > 0,05$ (рисунок 46).

У животных с посткондиционированием МК-801 через минуту от начала реперфузии миокарда после периода его 20-минутной ишемии снижались: максимальная скорость изменения давления в левом желудочке ($dp/dt \max$), однако $p > 0,05$ (рисунок 41), $dp/dt \min$ в 1,4 раза ($p < 0,05$; рисунок 42) и ЧСС в 1,2 раза ($p < 0,05$; рисунок 45).

Таблица 9 - Показатели функции левого желудочка сердца при ишемии и последующей реперфузии изолированного сердца крыс раствором Кребса-Хензelayта *ex vivo* после посткондиционирования МК-801

Посткондиционирование МК-801						
Минуты	dp/dt max (мм рт.ст./сек)	dp/dt min (мм рт.ст./сек)	SLVP (мм рт.ст.)	DLVP (мм рт.ст.)	ЧСС (уд./мин)	КП (мл/мин)
Контроль	1956,9 ± 81,1	-1226,2 ± 65,4	48,1 ± 2,1	5,1 ± 0,1	306,9 ± 4,7	10,5 ± 0,3
Ишемия						
1	1898,8 ± 82,4	-888,4 ± 36,1*	56,5 ± 1,4*	5,3 ± 0,2	265,5 ± 8,3*	10,7 ± 0,4
30	2001,4 ± 95,4	-1262,4 ± 61,7**	47,4 ± 2,1**	4,9 ± 0,1**	301,1 ± 2,8**	10,3 ± 0,3

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

Через 30 минут от начала реперфузии миокарда после периода его 20-минутной ишемии снижались и достигали контрольных значений: SLVP в 1,2 раза ($p < 0,05$; рисунок 43), DLVP в 1,1 раза ($p < 0,05$; рисунок 44) и КП перфузирующей жидкости, однако $p > 0,05$ (рисунок 46).

Через 30 минут от начала реперфузии миокарда после периода его 20-минутной ишемии увеличивались и достигали контрольных значений: максимальная скорость изменения давления в левом желудочке (dp/dt max), однако $p > 0,05$ (рисунок 41), dp/dt min в 1,4 раза ($p < 0,05$; рисунок 42) и ЧСС в 1,2 раза ($p < 0,05$; рисунок 45).

Таким образом, можно сделать вывод о том, что кардиодинамические параметры сердца, после посткондиционирования МК-801 и подвергающиеся двадцатиминутной ишемии, после тридцатиминутной реперфузии возвращаются к значениям, близким к начальным значениям то есть происходит адекватное их восстановление.

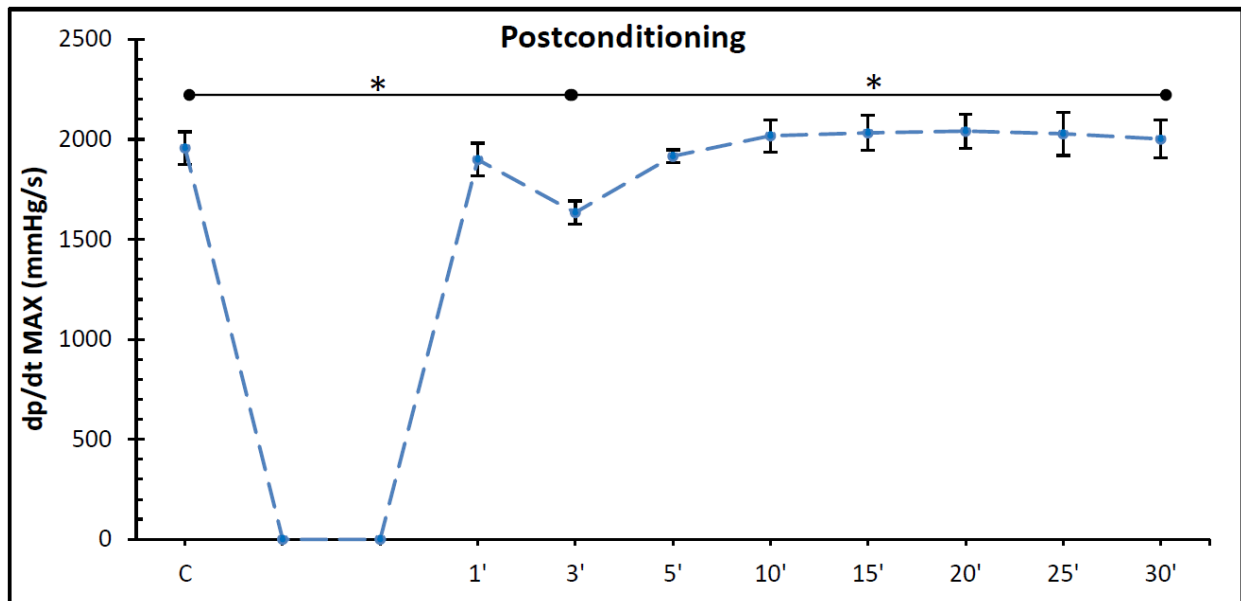


Рисунок 41. Показатели максимальной скорости изменения давления в левом желудочке ($dp/dt \max$, в мм рт.ст./сек) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при посткондиционировании МК-801

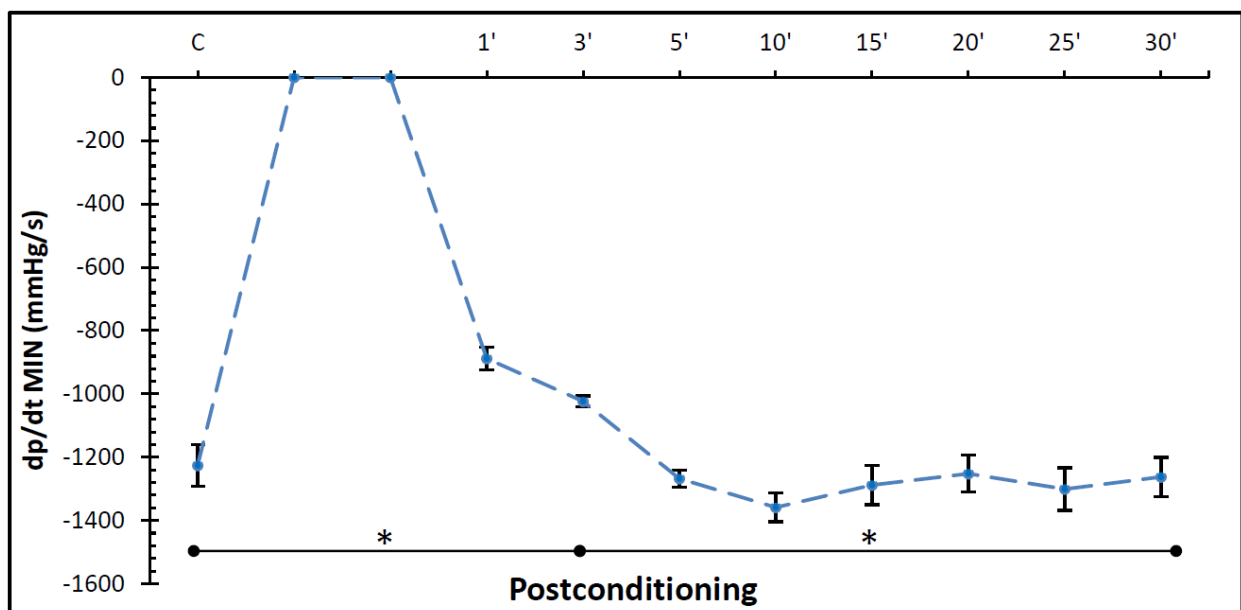


Рисунок 42. Показатели минимальной скорости изменения давления в левом желудочке ($dp/dt \min$, в мм рт.ст./сек) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при посткондиционировании МК-801

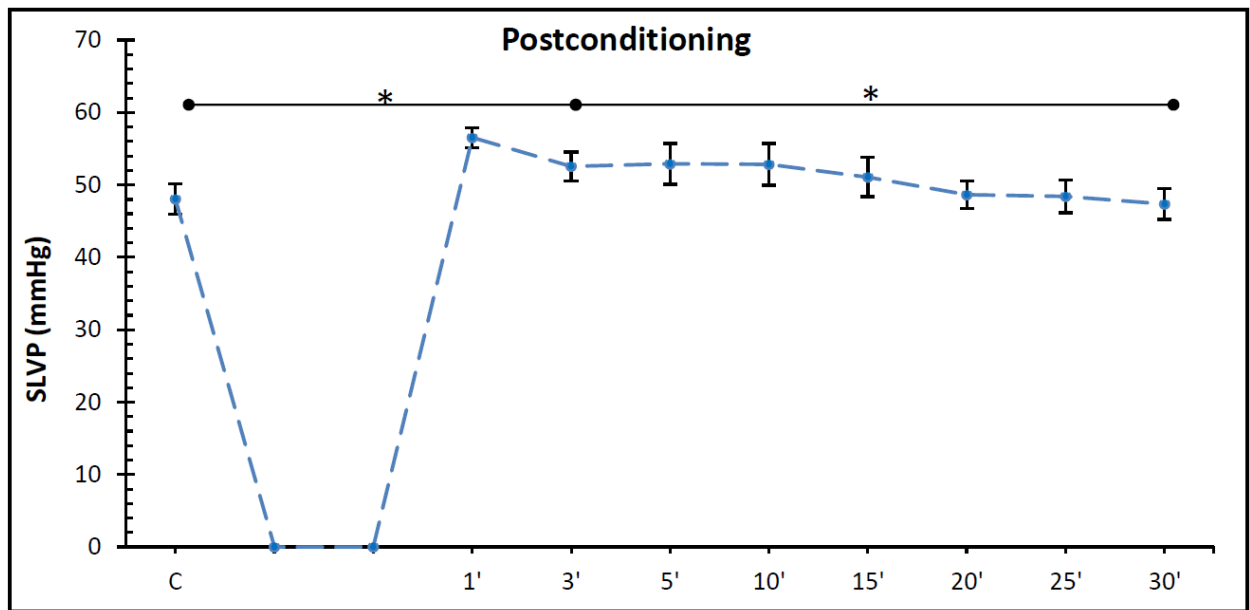


Рисунок 43 - Показатели систолического давления в левом желудочке (SLVP, в мм рт.ст.) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при посткондиционировании МК-801

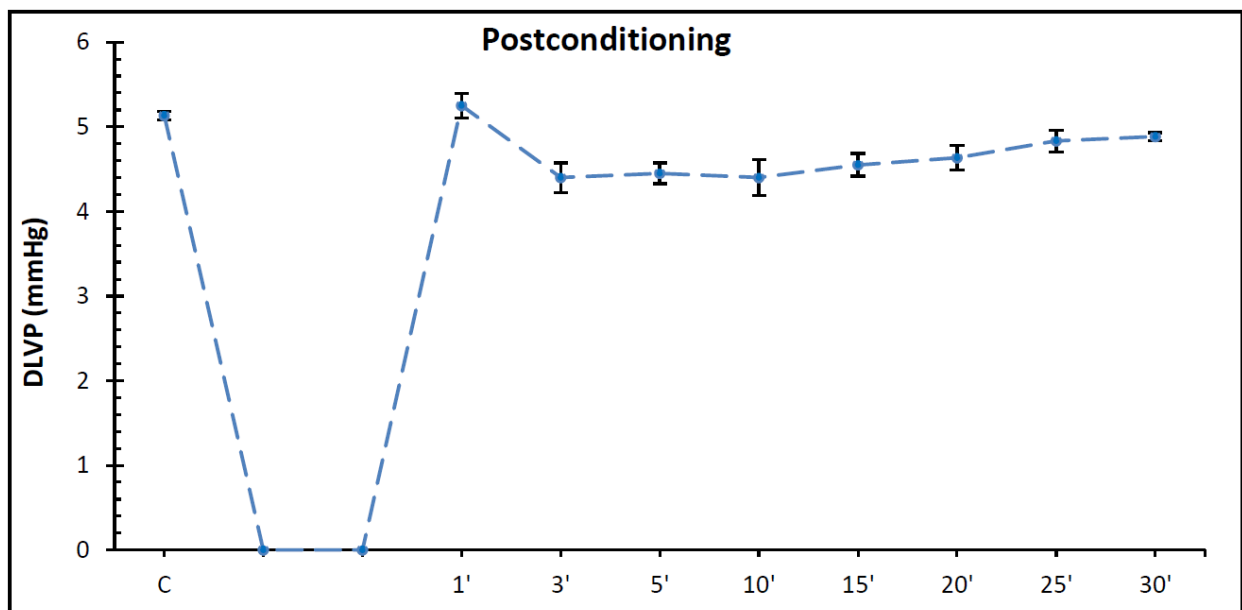


Рисунок 44 - Показатели диастолического давления в левом желудочке (DLVP, в мм рт.ст.) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при посткондиционировании МК-801

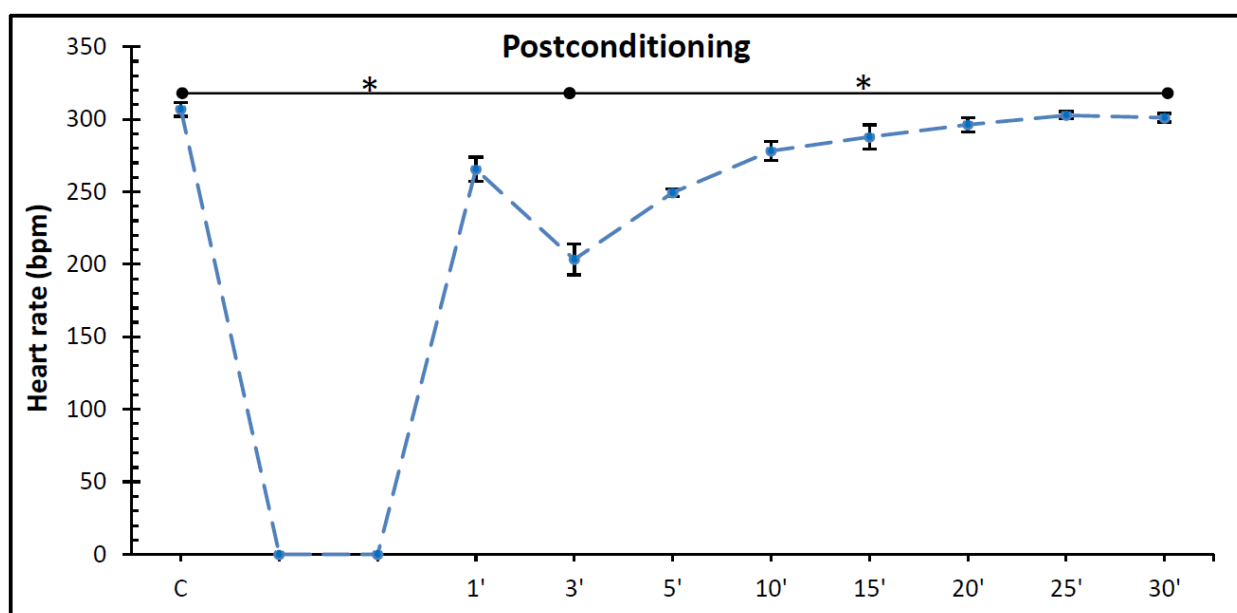


Рисунок 45 - Частота сердечных сокращений (ЧСС, в уд /мин) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при посткондиционировании МК-801

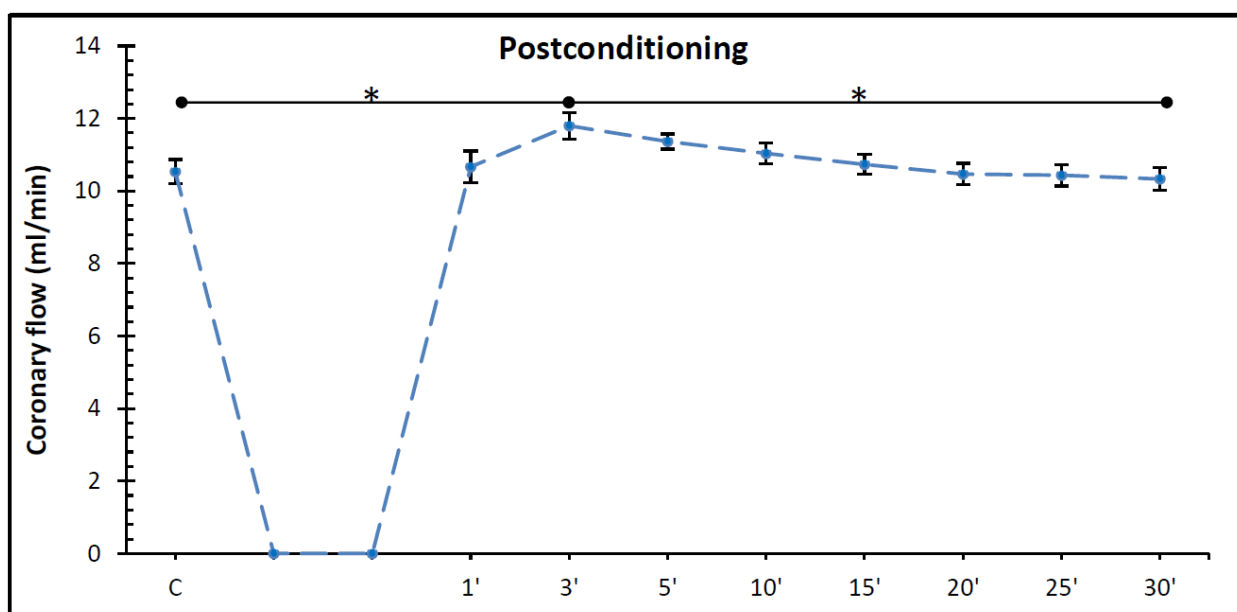


Рисунок 46 - Показатели коронарного потока перфузирующего раствора (КП, в мл/мин) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при посткондиционировании МК-801

3.8. Влияние применения мемантина при preconditionировании на кардиодинамические параметры изолированного сердца крыс

Значения $dp/dt \max$ и $dp/dt \min$ (мм рт.ст./сек), SLVP и DLVP (мм рт.ст.), ЧСС (уд/мин) и КП перфузирующего раствора (КП, в мл/мин) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании мемантином представлены в таблице 10.

Таблица 10 - Показатели функции левого желудочка сердца при ишемии и последующей реперфузии изолированного сердца крыс раствором Кребса-Хензелята *ex vivo* после preconditionирования мемантином

Preconditionирование мемантином						
Минуты	$dp/dt \max$ (мм рт.ст./сек)	$dp/dt \min$ (мм рт.ст./сек)	SLVP (мм рт.ст.)	DLVP (мм рт.ст.)	ЧСС (уд./мин)	КП (мл/мин)
Контроль	$2021,9 \pm 138,7$	$-1476,6 \pm 126,2$	$62,7 \pm 5,4$	$4,5 \pm 0,6$	$303,8 \pm 9,6$	$12,7 \pm 0,6$
мемантин	$1661,9 \pm 96,8$	$-1088,9 \pm 131,2$	$49,6 \pm 7,4$	$3,7 \pm 0,2$	$263,2 \pm 11,0$	$10,8 \pm 0,8$
Ишемия						
1	$2021,7 \pm 102,6$	$-1460,6 \pm 103,0$	$79,3 \pm 3,0^*$	$6,1 \pm 0,9^*$	$271,8 \pm 4,9^*$	$11,5 \pm 0,4^*$
30	$1782,6 \pm 100,6$	$-1302,6 \pm 90,6$	$61,8 \pm 5,2^{**}$	$4,3 \pm 0,6^{**}$	$261,5 \pm 6,1$	$9,4 \pm 0,3$

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

У животных с preconditionированием мемантином через минуту от начала реперфузии миокарда после периода его 20-минутной ишемии увеличивались: SLVP в 1,3 раза ($p < 0,05$; рисунок 49) и DLVP в 1,4 раза ($p < 0,05$; рисунок 50).

У животных с preconditionированием мемантином через минуту от начала реперфузии миокарда после периода его 20-минутной ишемии снижались: ЧСС в 1,1 раза ($p < 0,05$; рисунок 51) и КП перфузирующей жидкости в 1,1 раза ($p < 0,05$; рисунок 52).

Через 30 минут от начала реперфузии миокарда после периода его 20-минутной ишемии снижались и достигали контрольных значений: SLVP в 1,3 раза ($p < 0,05$; рисунок 49) и DLVP в 1,4 раза ($p < 0,05$; рисунок 50).

Через 30 минут от начала реперфузии миокарда после периода его 20-минутной ишемии снижались и не достигали контрольных значений: ЧСС, однако $p > 0,05$ (рисунок 51) и КП перфузирующей жидкости, однако $p > 0,05$ (рисунок 52).

Таким образом, можно сделать вывод о том, что кардиодинамические параметры сердца, после preconditionирования мемантином и подвергающиеся двадцатиминутной ишемии, после тридцатиминутной реперфузии возвращаются к значениям, близким к начальным значениям то есть происходит адекватное их восстановление.

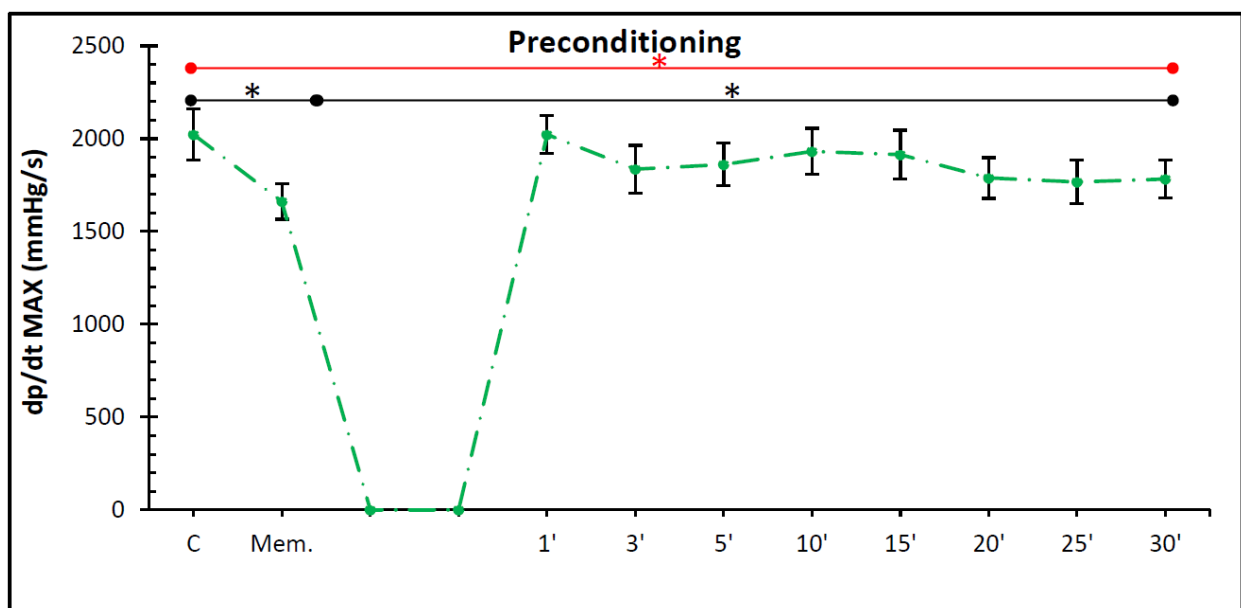


Рисунок 47 - Показатели максимальной скорости изменения давления в левом желудочке ($dp/dt \text{ max}$, в мм рт.ст./сек) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании мемантином

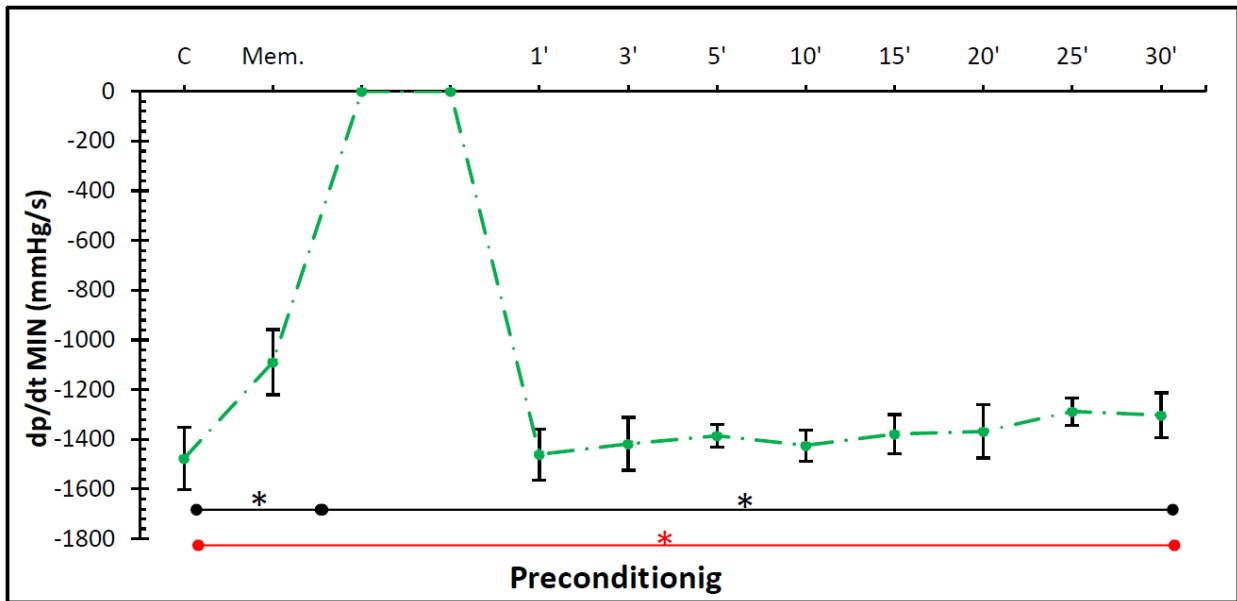


Рисунок 48 - Показатели минимальной скорости изменения давления в левом желудочке ($dp/dt \text{ min}$, в рт.ст./сек) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании мемантином

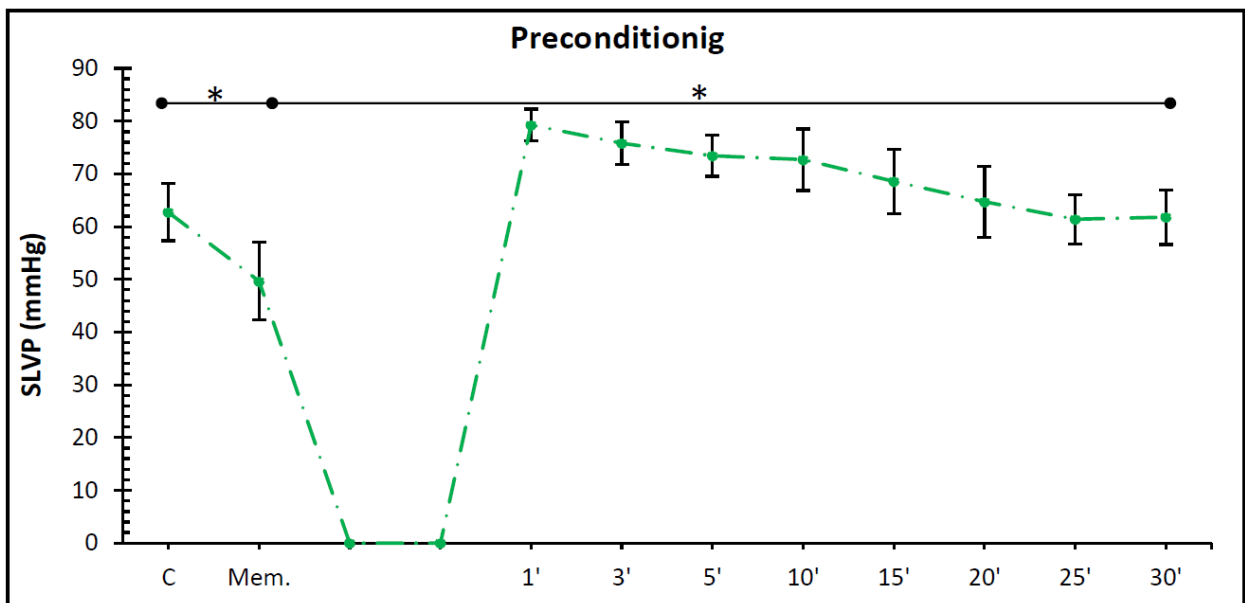


Рисунок 49 - Показатели систолического давления в левом желудочке (SLVP, в мм рт.ст.) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании мемантином

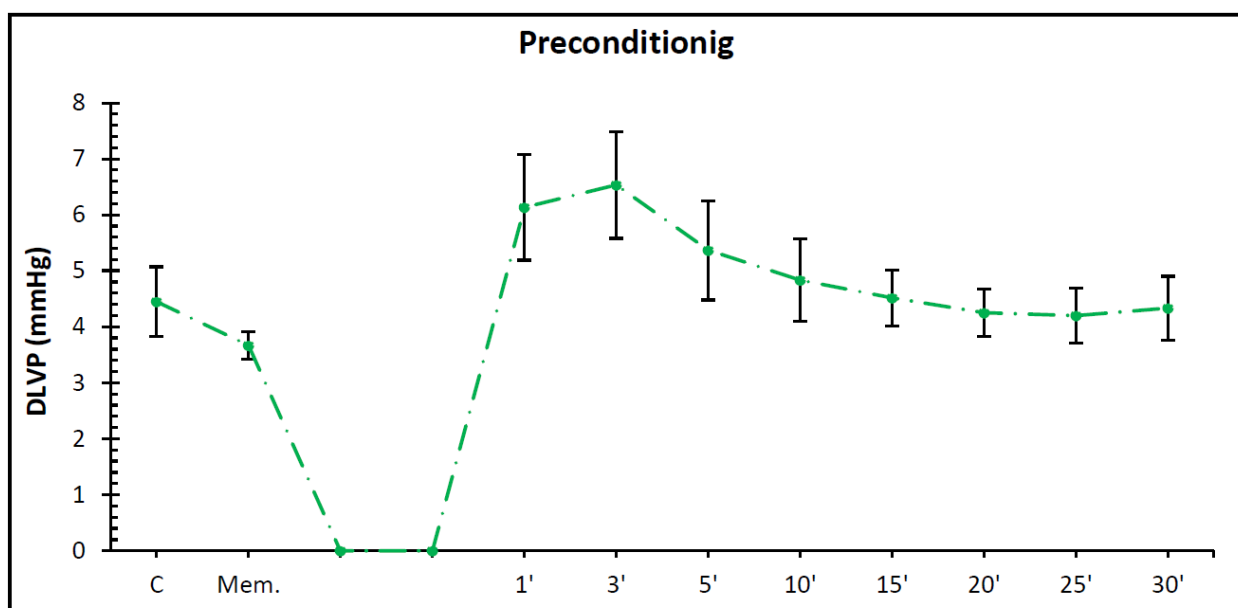


Рисунок 50 - Показатели диастолического давления в левом желудочке (DLVP, в мм рт.ст.) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании мемантином

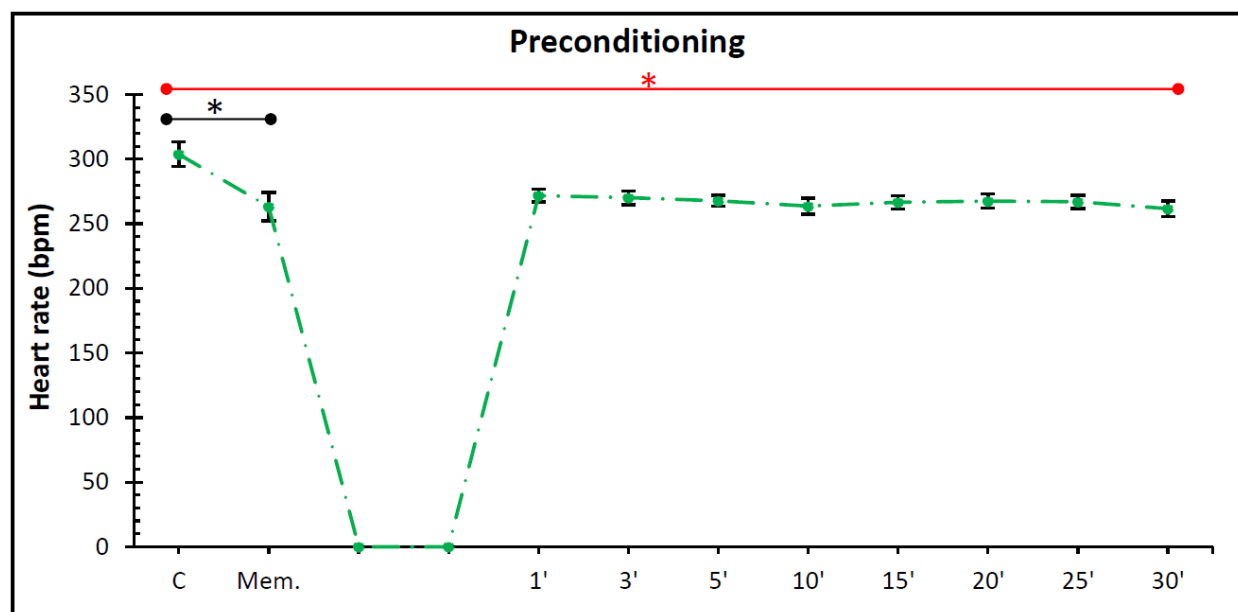


Рисунок 51 - Частота сердечных сокращений (ЧСС, в уд /мин) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании мемантином

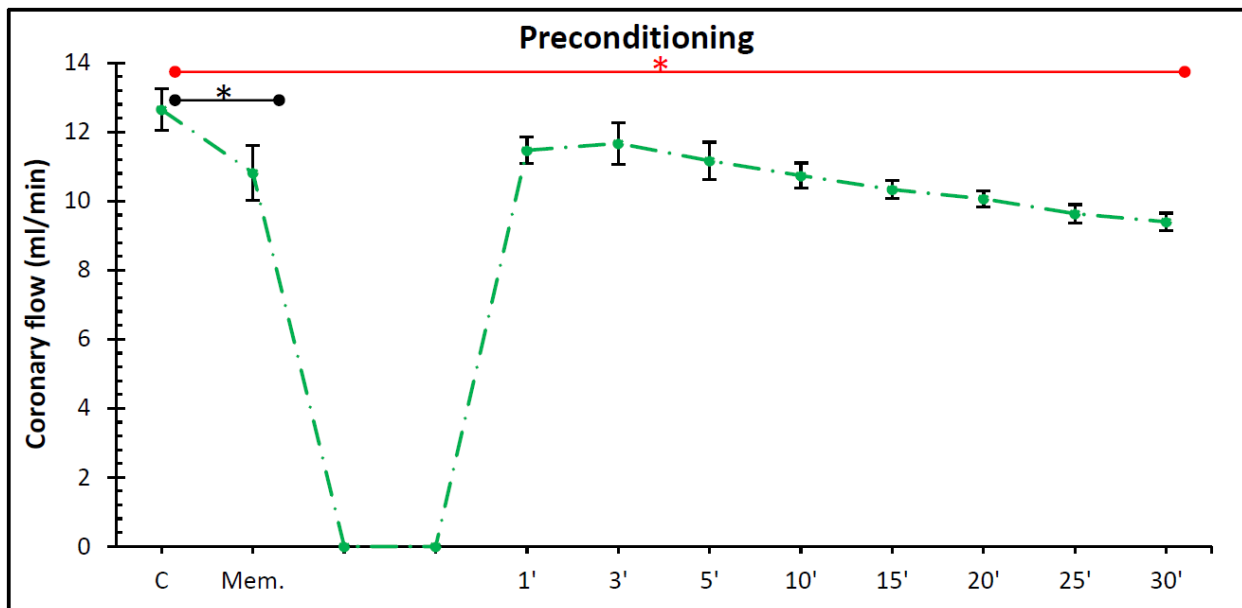


Рисунок 52 - Показатели коронарного потока перфузирующего раствора (КП, в мл/мин) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании мемантином

3.9. Влияние применения мемантина при посткондиционировании на кардиодинамические параметры изолированного сердца крыс

Значения $dp/dt \max$ и $dp/dt \min$ (мм рт.ст./сек), SLVP и DLVP (мм рт.ст.), ЧСС (уд/мин) и КП перфузирующего раствора (КП, в мл/мин) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при посткондиционировании мемантином представлены в таблице 11.

У животных с preconditionированием мемантином через минуту от начала реперфузии миокарда после периода его 20-минутной ишемии увеличивались: SLVP, однако $p > 0,05$ (рисунок 55) и DLVP, однако $p > 0,05$ (рисунок 56).

У животных с посткондиционированием мемантином через минуту от начала реперфузии миокарда после периода его 20-минутной ишемии снижались: максимальная скорость изменения давления в левом желудочке ($dp/dt \max$), однако $p > 0,05$ (рисунок 53), $dp/dt \min$, однако $p > 0,05$, ЧСС в 1,1 раза ($p < 0,05$; рисунок 54) и КП перфузирующей жидкости, однако $p > 0,05$ (рисунок 58).

Таблица 11 - Показатели функции левого желудочка сердца при ишемии и последующей реперфузии изолированного сердца крыс раствором Кребса-Хензелейта *ex vivo* после посткондиционирования мемантином

Посткондиционирование мемантином						
Минуты	dp/dt max (мм рт.ст./сек)	dp/dt min (мм рт.ст./сек)	SLVP (мм рт.ст.)	DLVP (мм рт.ст.)	ЧСС (уд./мин)	КП (мл/мин)
Контроль	2448,3 ± 208,0	-2072,1 ± 155,8	77,3 ± 6,4	2,5 ± 0,3	307,2 ± 9,9	10,4 ± 0,3
Ишемия						
1	2259,4 ± 158,3	-1927,0 ± 115,3	82,7 ± 4,6	2,8 ± 0,1	275,7 ± 7,7*	10,0 ± 0,4
30	2344,0 ± 212,1	-1864,9 ± 139,6	77,3 ± 6,8	2,6 ± 0,2	278,0 ± 3,3	9,6 ± 0,3

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

Через 30 минут от начала реперфузии миокарда после периода его 20-минутной ишемии снижались и достигали контрольных значений: SLVP, однако $p > 0,05$ (рисунок 55) и DLVP, однако $p > 0,05$ (рисунок 56).

Таким образом, можно сделать вывод о том, что кардиодинамические параметры сердца, после посткондиционирования мемантином и подвергающиеся двадцатиминутной ишемии, после тридцатиминутной реперфузии возвращаются к значениям, близким к начальным значениям то есть происходит адекватное их восстановление.

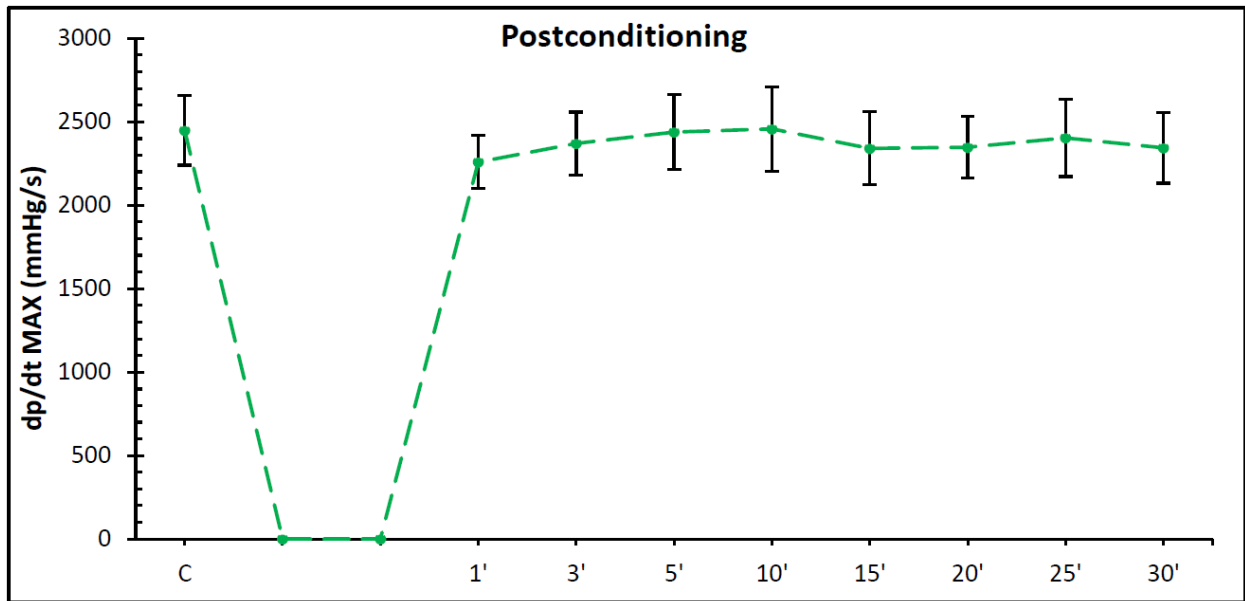


Рисунок 53 - Показатели максимальной скорости изменения давления в левом желудочке ($dp/dt \max$, в мм рт.ст./сек) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при посткондиционировании мемантином

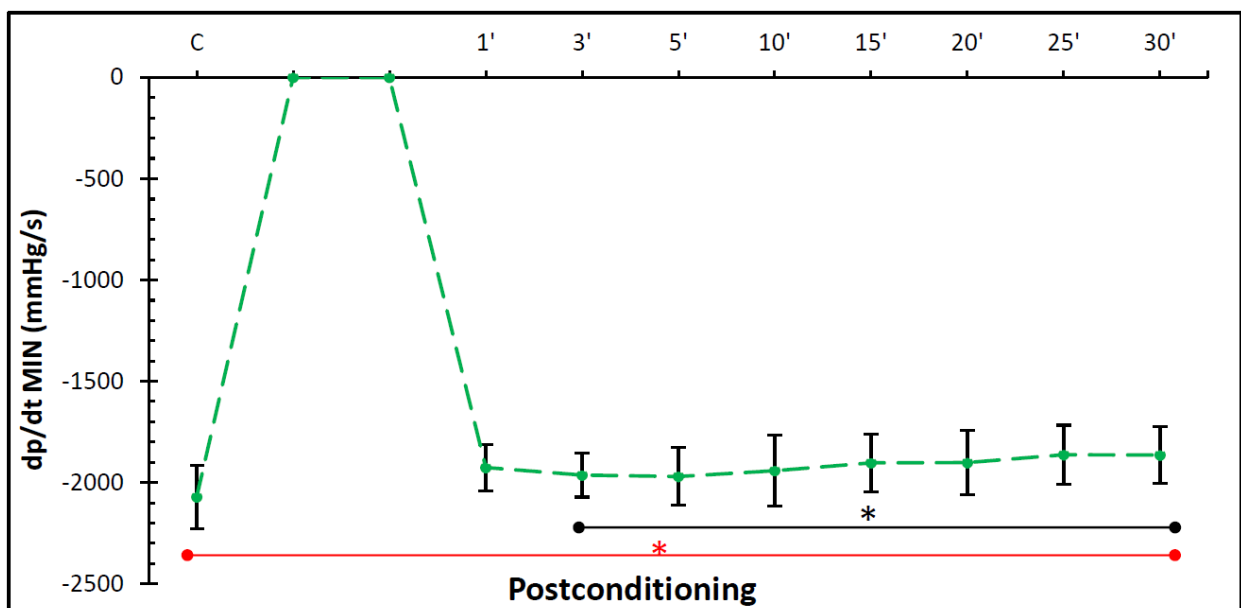


Рисунок 54 - Показатели минимальной скорости изменения давления в левом желудочке ($dp/dt \min$, в рт.ст./сек) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при посткондиционировании мемантином

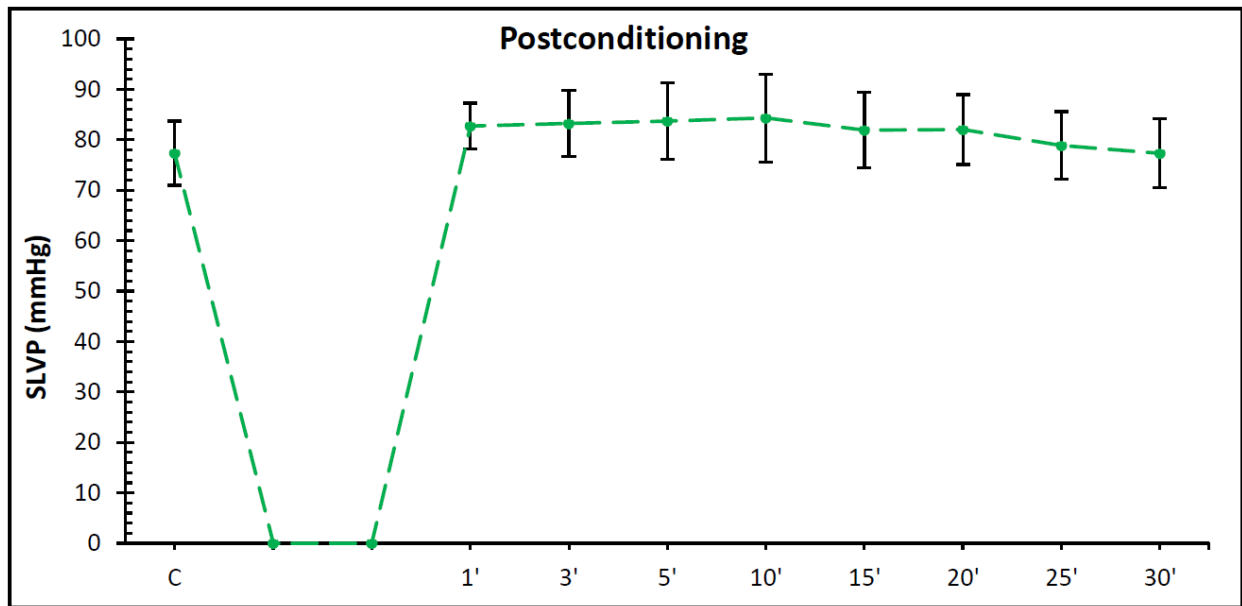


Рисунок 55 - Показатели систолического давления в левом желудочке (SLVP, в мм рт.ст.) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при посткондиционировании мемантином

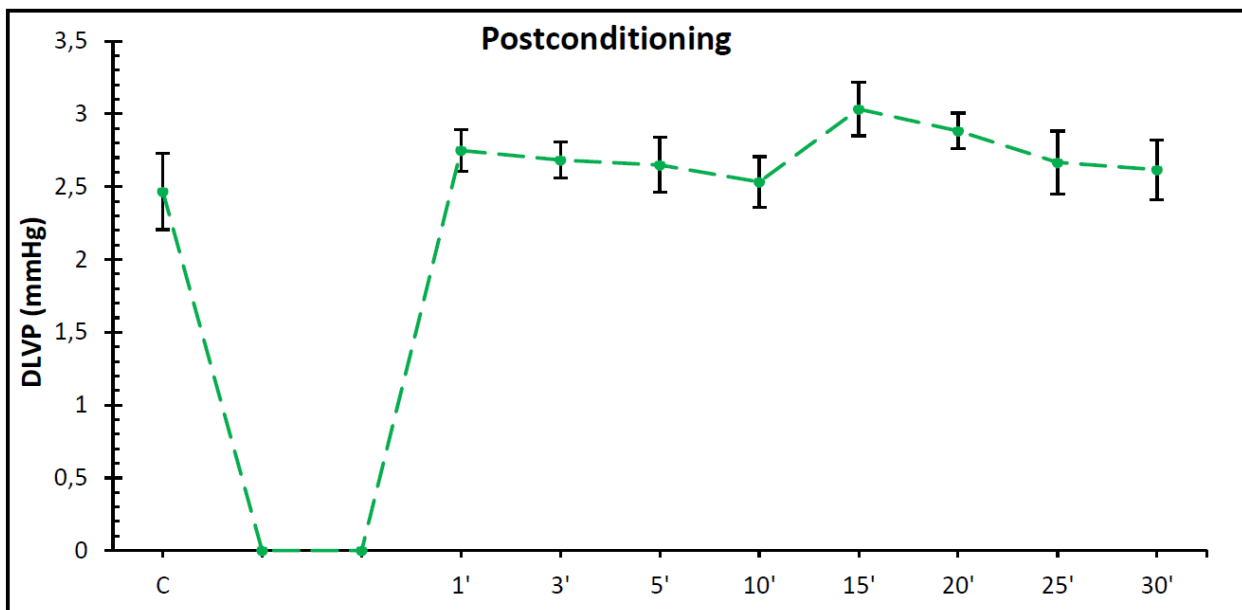


Рисунок 56 - Показатели диастолического давления в левом желудочке (DLVP, в мм рт.ст.) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при посткондиционировании мемантином

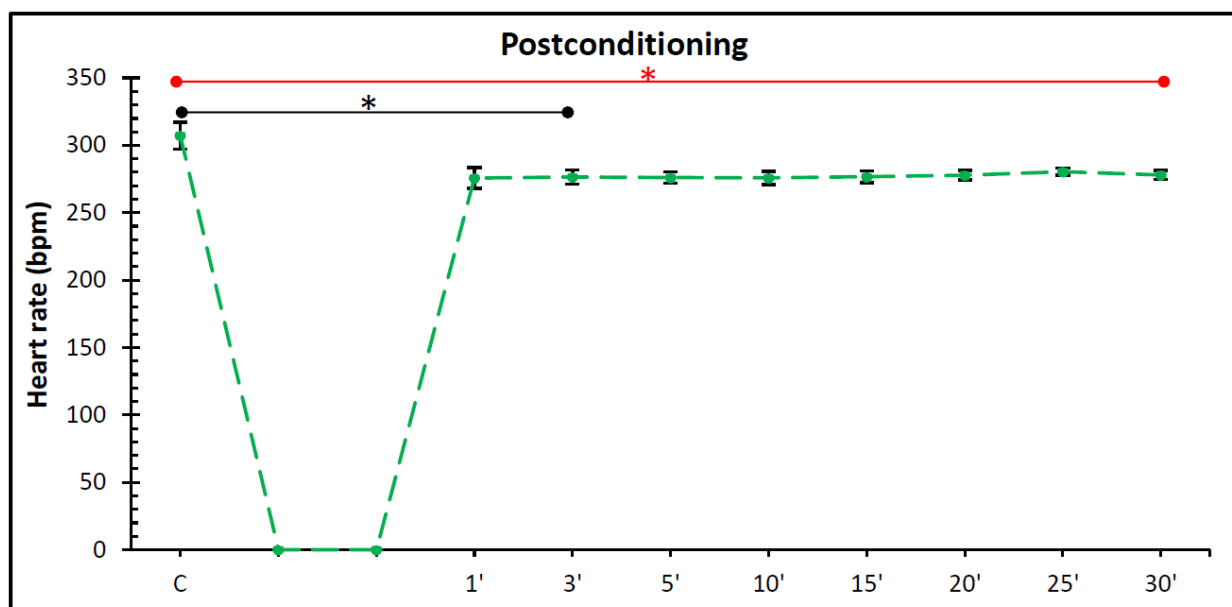


Рисунок 57 - Частота сердечных сокращений (ЧСС, в уд /мин) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при посткондиционировании мемантином

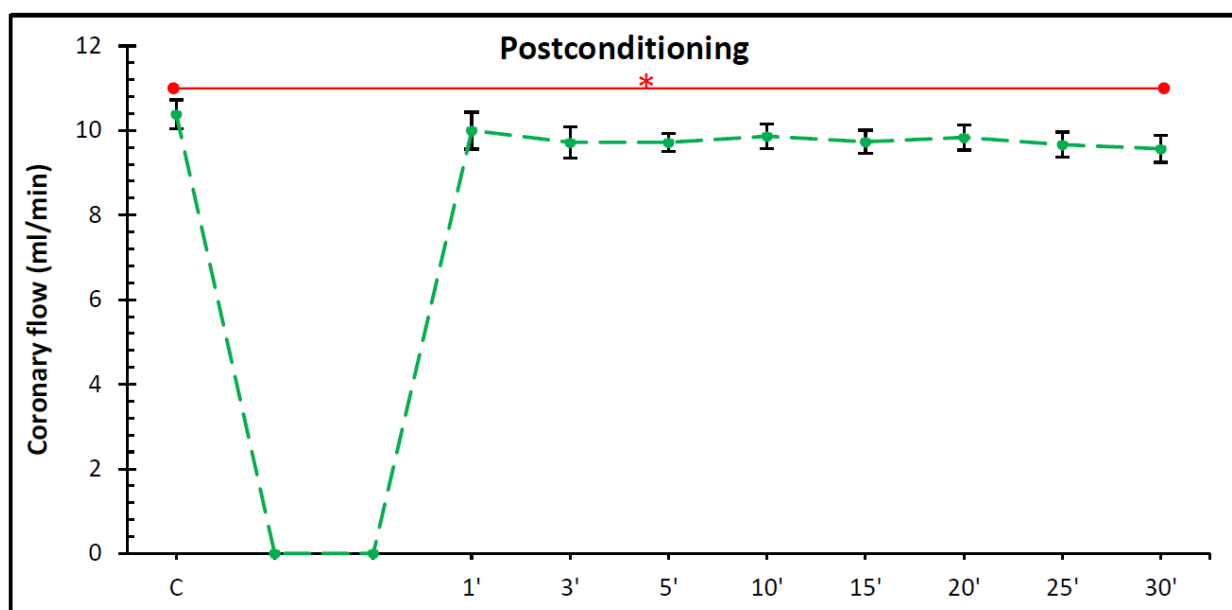


Рисунок 58 - Показатели коронарного потока перфузирующего раствора (КП, в мл/мин) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при посткондиционировании мемантином

3.10. Значения параметров оксидационного стресса изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии без кондиционирования

Значения показателя ИПОЛ, NO_2^- , O_2^- и H_2O_2 изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии без кондиционирования представлены в таблице 12.

Таблица 12 - Показатели оксидативного стресса при ишемии и последующей реперфузии изолированного сердца крыс раствором Кребса-Хензелята *ex vivo* (контроль)

Контрольная группа без кондиционирования				
Минуты	ИПОЛ	NO_2^-	O_2^-	H_2O_2
Контроль	$22,3 \pm 2,4$	$97,7 \pm 4,9$	$52,2 \pm 1,3$	$56,5 \pm 4,2$
Ишемия				
1	$28,5 \pm 1,8^*$	$104,5 \pm 6,7$	$67,0 \pm 1,0^*$	$59,2 \pm 6,2$
30	$27,0 \pm 1,8^*$	$96,2 \pm 5,6$	$65,3 \pm 5,0^*$	$64,5 \pm 2,3^*$

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

У животных контрольной группы через минуту от начала реперфузии миокарда после периода его 20-минутной ишемии увеличивались: ИПОЛ в 1,3 раза ($p < 0,05$; рисунок 59), NO_2^- , однако $p > 0,05$ (рисунок 60), O_2^- в 1,3 раза ($p < 0,05$; рисунок 61) и H_2O_2 , однако $p > 0,05$ (рисунок 62).

Через 30 минут от начала реперфузии миокарда после периода его 20-минутной ишемии практически не изменились и оставались значительно выше контрольных значений.

Таким образом можно сделать вывод о том, что 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.

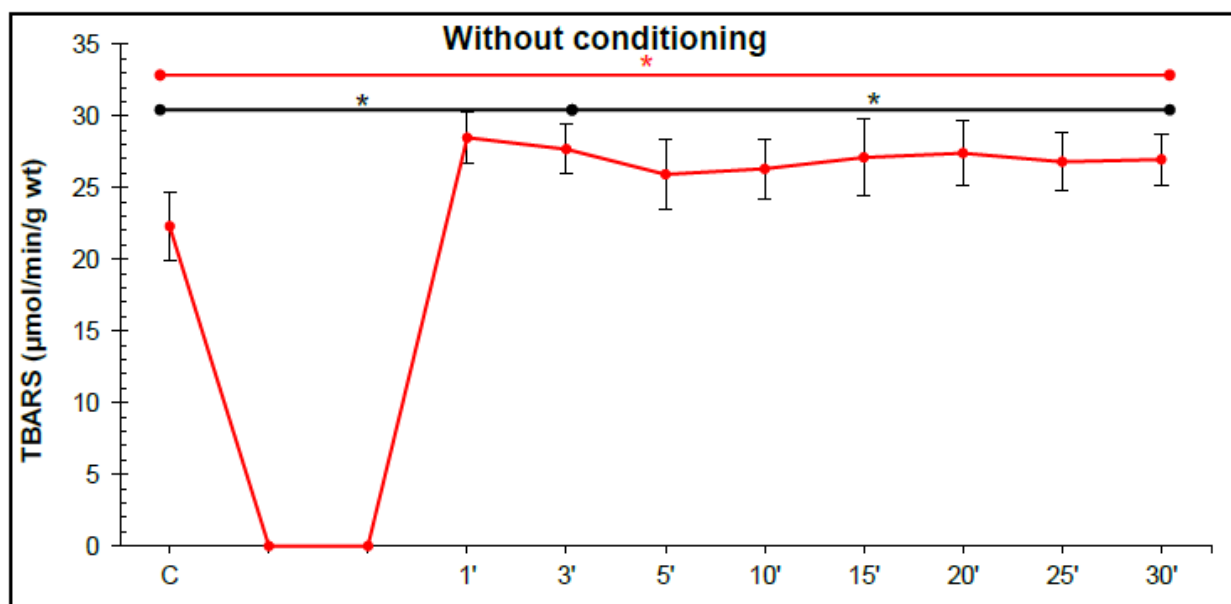


Рисунок 59 - Значения ИПОЛ без кондиционирования

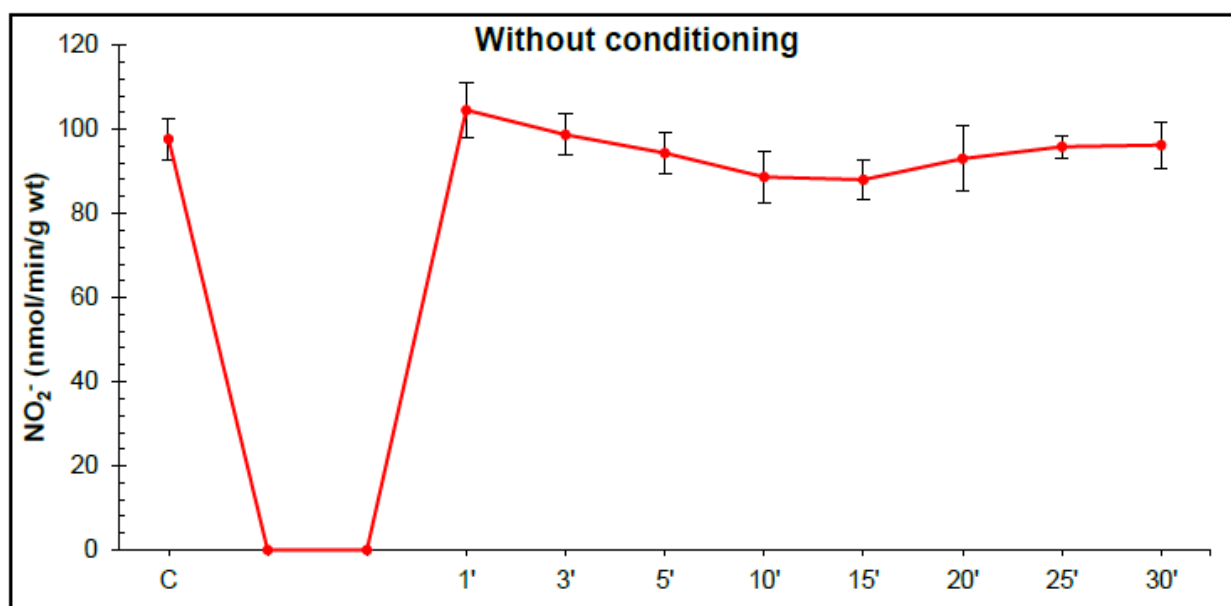


Рисунок 60 - Значения NO₂⁻ без кондиционирования

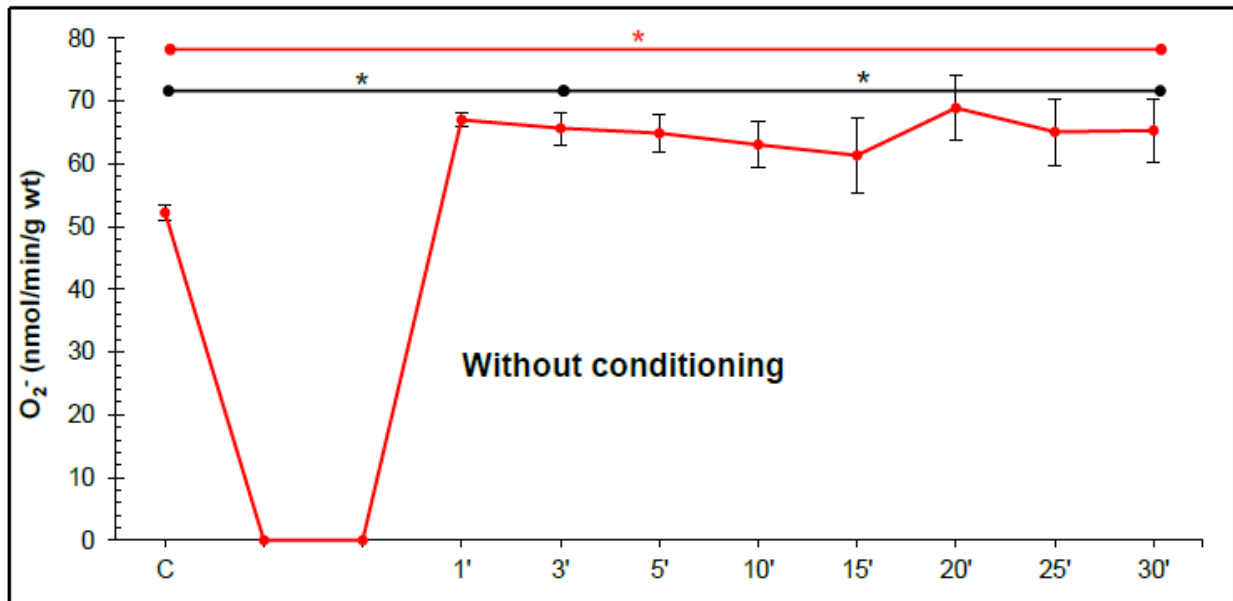


Рисунок 61 - Значения O_2^- без кондиционирования

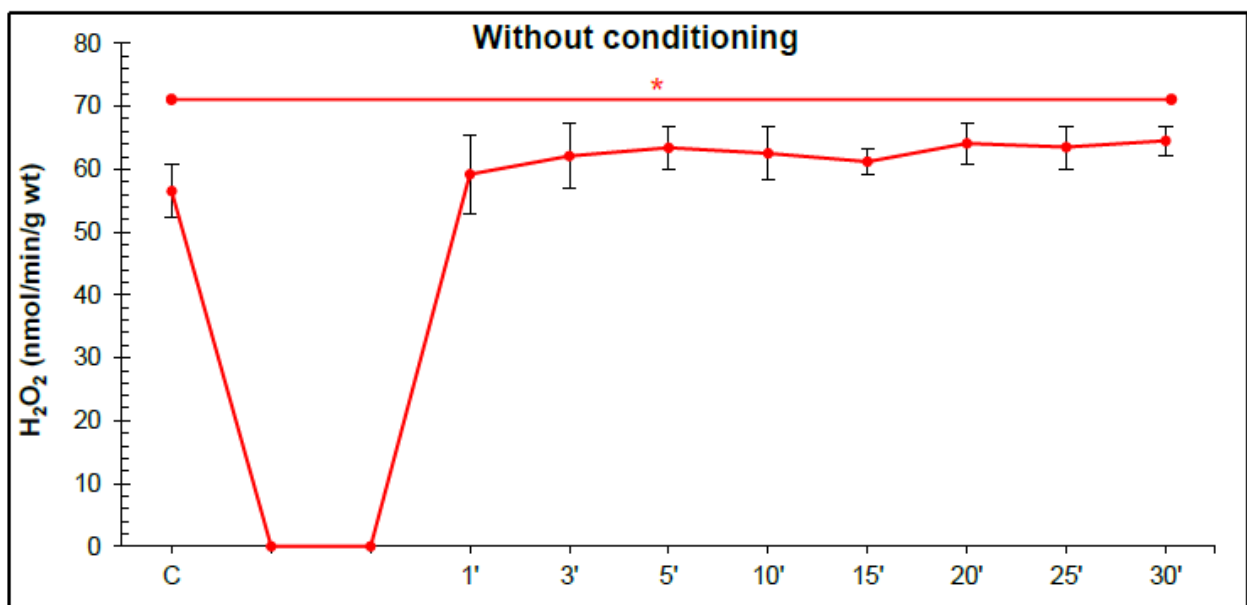


Рисунок 62 - Значения H_2O_2 без кондиционирования

3.11. Влияние применения глутамата при прекондиционировании на параметры оксидационного стресса изолированного сердца крыс

Значения показателя ИПОЛ, NO_2^- , O_2^- и H_2O_2 изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при прекондиционировании глутаматом представлены в таблице 13.

Таблица 13 - Показатели оксидативного стресса при ишемии и последующей реперфузии изолированного сердца крыс раствором Кребса-Хензелята *ex vivo* после preconditionирования глутаматом

Преко́ндициони́рование 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

У животных с preconditionированием глутаматом через минуту от начала реперфузии миокарда после периода его 20-минутной ишемии все показатели практически не изменились.

Через 30 минут от начала реперфузии миокарда после периода его 20-минутной ишемии снижался оставаясь ниже нормы: NO₂⁻ в 1,1 раза ($p < 0,05$; рисунок 64).

Через 30 минут от начала реперфузии миокарда после периода его 20-минутной ишемии увеличивались оставаясь значительно выше контрольных значений: O₂⁻ в 1,3 раза ($p < 0,05$; рисунок 65) и H₂O₂ в 1,1 раза ($p < 0,5$; рисунок 66).

Таким образом можно сделать вывод о том, что параметры оксидативного стресса, после двадцатиминутной ишемии после preconditionирования глутаматом и последующей тридцатиминутной реперфузии возрастают и остаются значительно выше контрольных значений, то есть не происходит адекватного их восстановления.

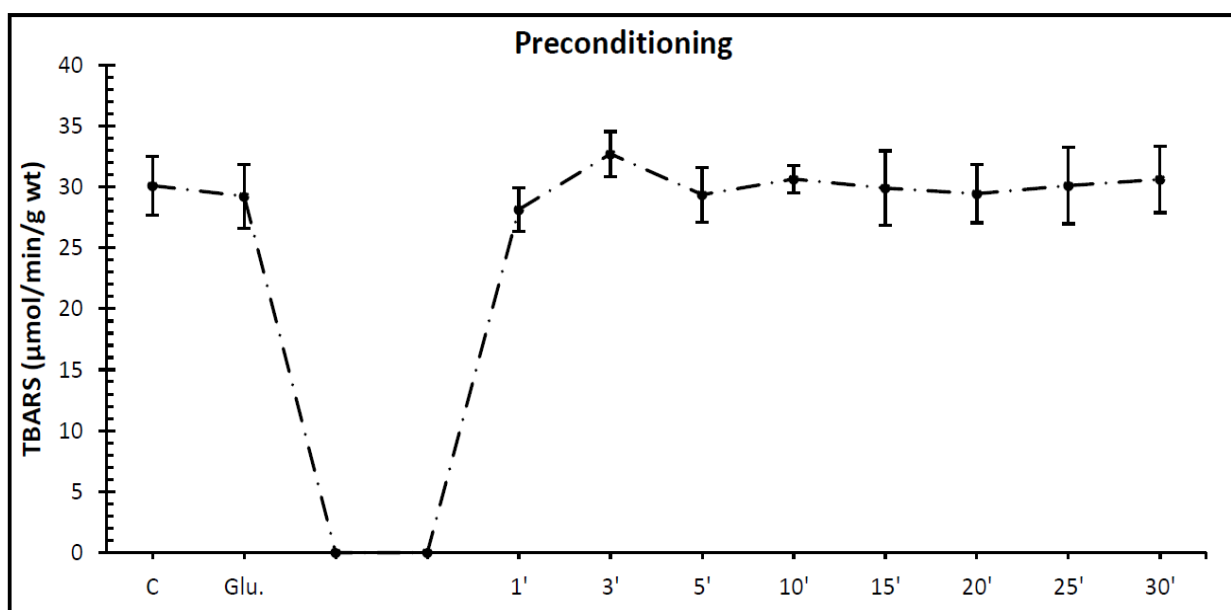


Рисунок 63 - Показатели ИПОЛ изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании глутаматом

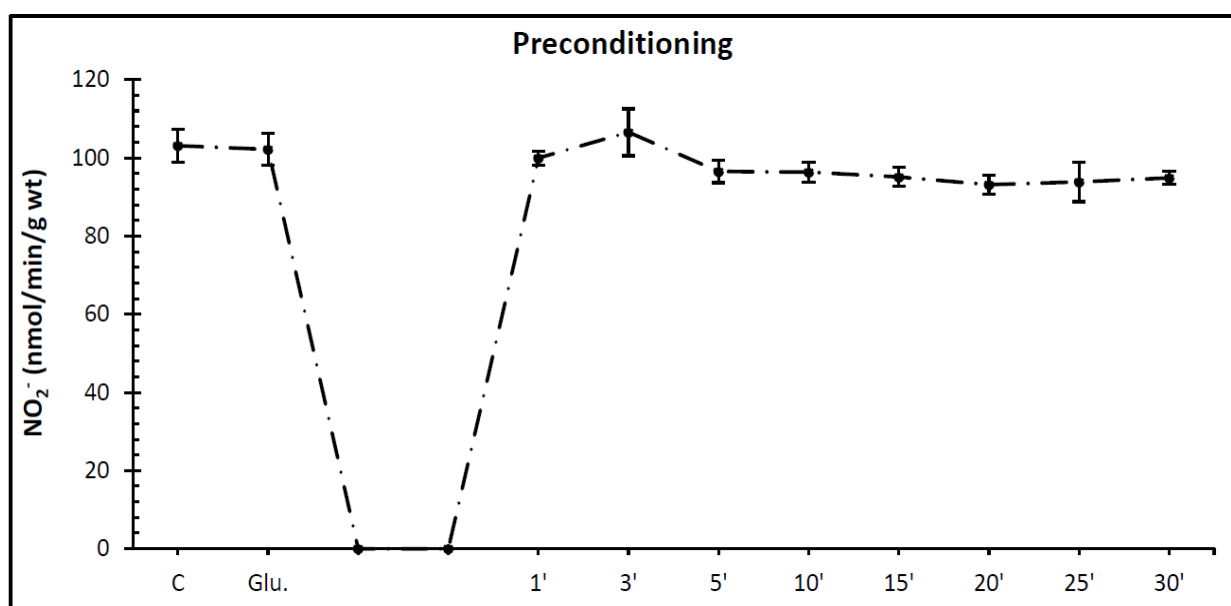


Рисунок 64 - Показатели NO₂⁻ изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании глутаматом

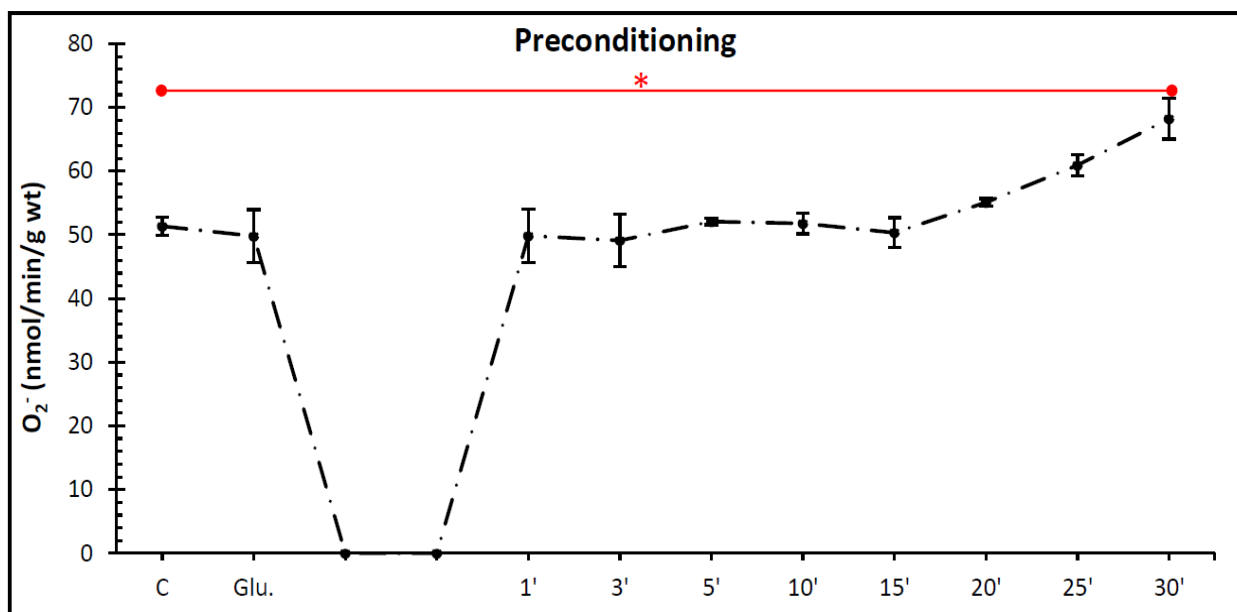


Рисунок 65 - Показатели O_2^- изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании глутаматом

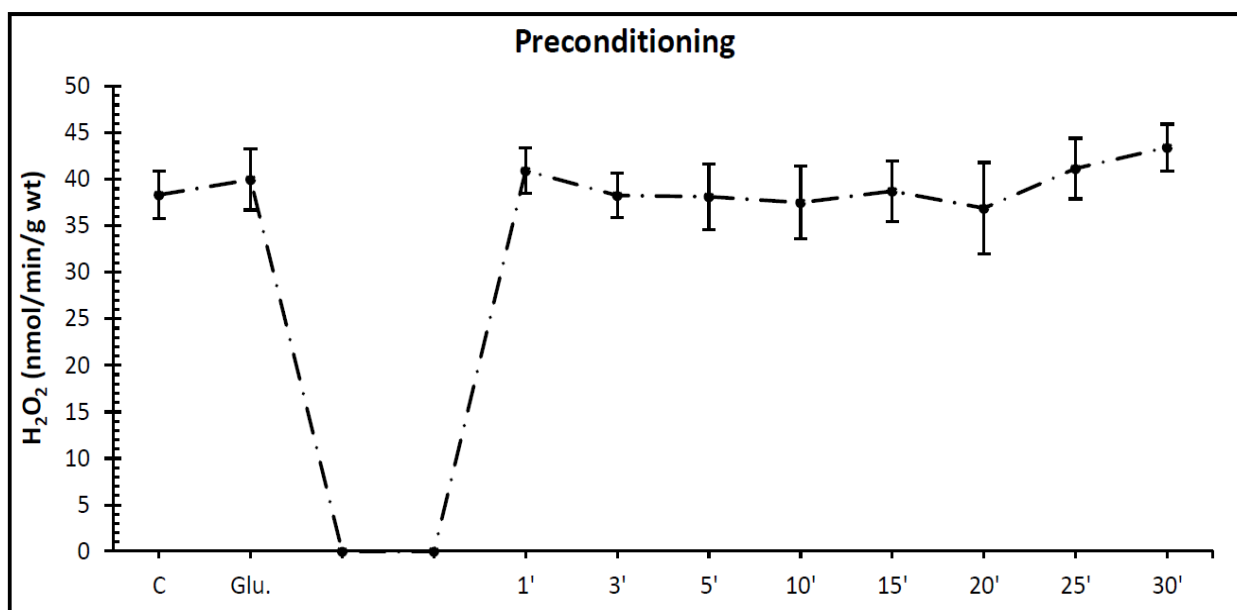


Рисунок 66 - Показатели H_2O_2 изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании глутаматом

3.12. Влияние применения глутамата при посткондиционировании на параметры оксидационного стресса изолированного сердца крыс

Значения показателя ИПОЛ, NO_2^- , O_2^- и H_2O_2 изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при посткондиционировании глутаматом представлены в таблице 14.

Таблица 14 - Показатели оксидативного стресса при ишемии и последующей реперфузии изолированного сердца крыс раствором Кребса-Хензелята *ex vivo* после посткондиционирования глутаматом

Посткондиционирование глутаматом				
Минуты	ИПОЛ	NO_2^-	O_2^-	H_2O_2
Контроль	$39,9 \pm 0,3$	$131,9 \pm 6,0$	$35,8 \pm 2,5$	$40,4 \pm 2,5$
Ишемия				
1	$42,4 \pm 2,4$	$132,6 \pm 4,1$	$43,2 \pm 8,3$	$41,4 \pm 1,8$
30	$48,6 \pm 2,1^* **$	$130,6 \pm 2,0$	$62,5 \pm 4,7^* **$	$38,6 \pm 3,8$

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

У животных с посткондиционированием глутаматом через минуту от начала реперфузии миокарда после периода его 20-минутной ишемии увеличивались: ИПОЛ, однако $p > 0,05$ (рисунок 67) и O_2^- , однако $p > 0,05$ (рисунок 69).

Через 30 минут от начала реперфузии миокарда после периода его 20-минутной ишемии увеличивались оставаясь значительно выше нормы : ИПОЛ в 1,2 раза ($p < 0,05$; рисунок 67) и O_2^- в 1,8 раза ($p < 0,05$; рисунок 69).

Таким образом можно сделать вывод о том, что параметры оксидативного стресса, после двадцатиминутной ишемии после посткондиционирования глутаматом и последующей тридцатиминутной реперфузии возрастают и остаются значительно выше контрольных значений, то есть не происходит адекватного их восстановления.

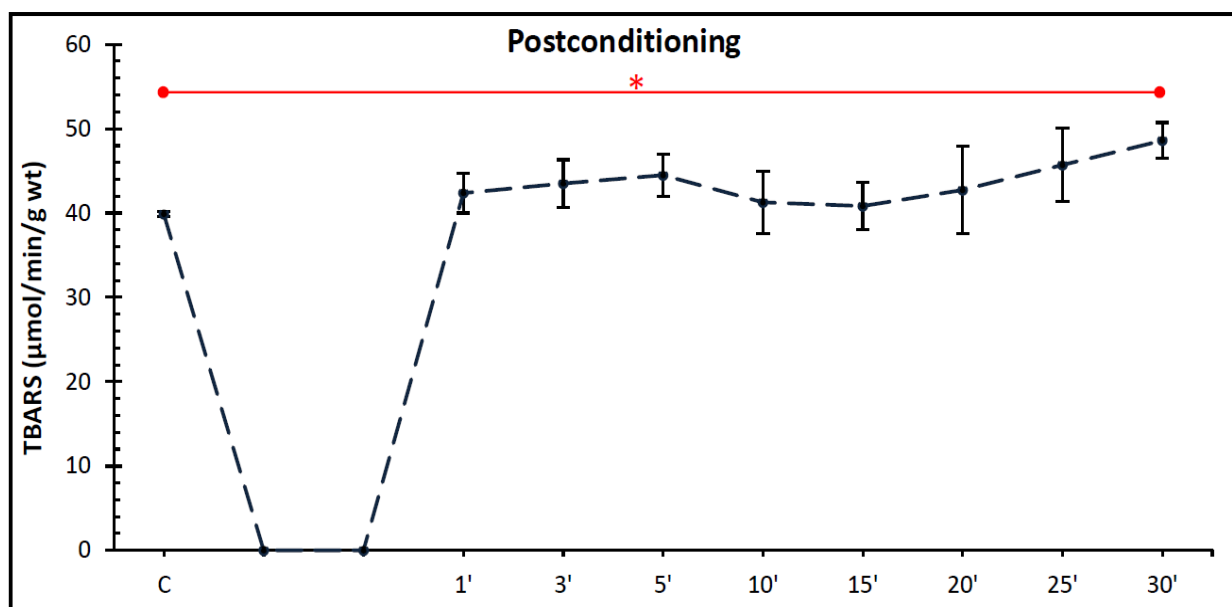


Рисунок 67 - Показатели ИПОЛ изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при посткондиционировании глутаматом

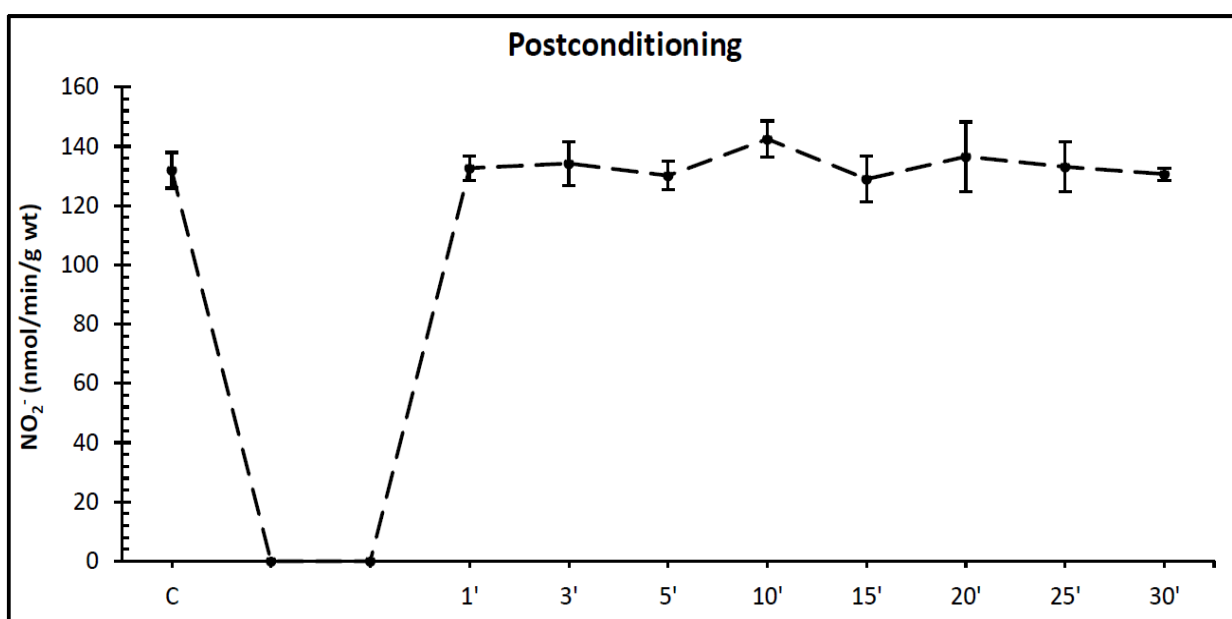


Рисунок 68 - Показатели NO_2^- изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при посткондиционировании глутаматом

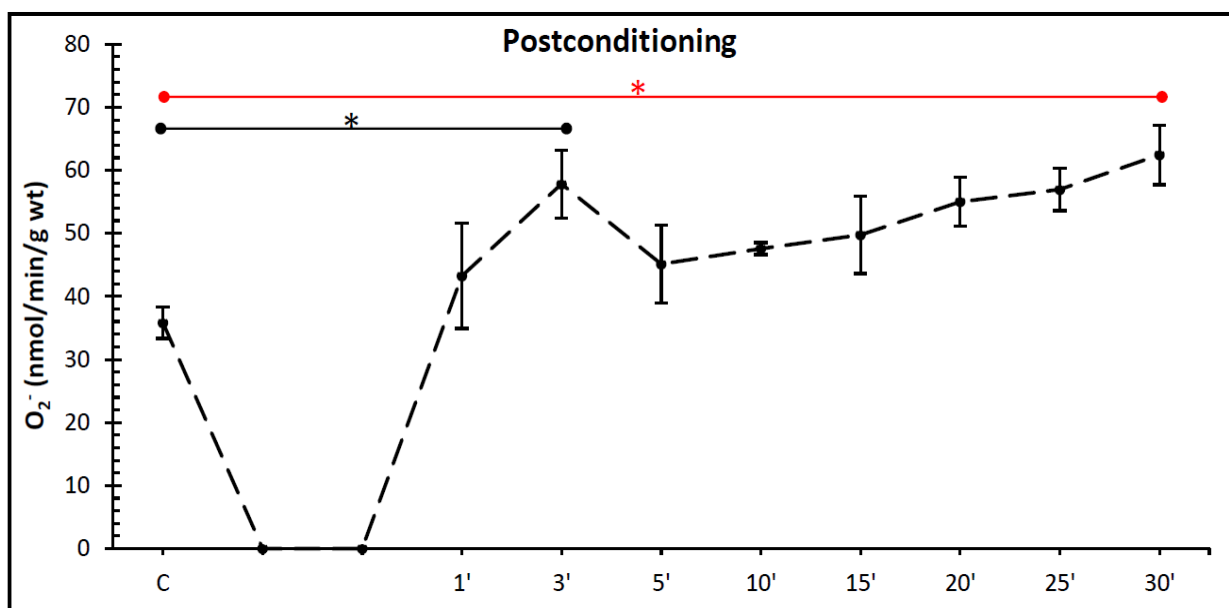


Рисунок 69 - Показатели O_2^- изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании глутаматом

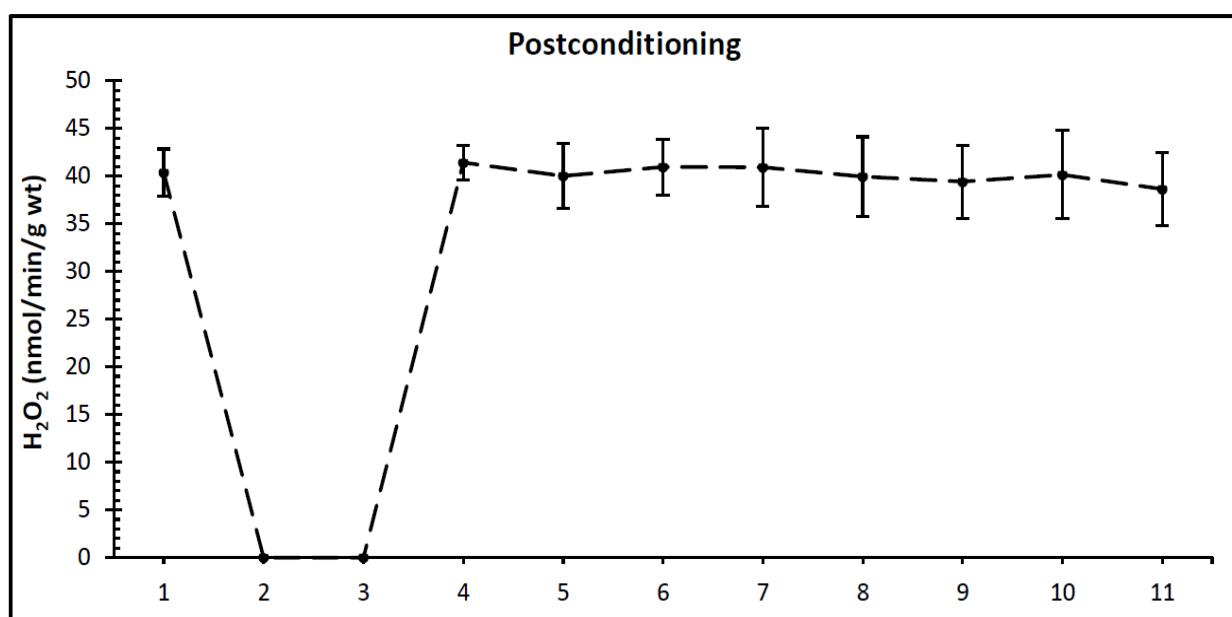


Рисунок 70 - Показатели H_2O_2 изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании глутаматом

3.13. Влияние применения (RS)-(tetrazol-5-YL) глицина при preconditionировании на параметры оксидационного стресса изолированного сердца крыс

Значения показателя ИПОЛ, NO_2^- , O_2^- и H_2O_2 изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании глицином представлены в таблице 15.

Таблица 15 - Показатели оксидативного стресса при ишемии и последующей реперфузии изолированного сердца крыс раствором Кребса-Хензеляйта *ex vivo* после preconditionирования глицином

Preconditionирование глицином				
Минуты	ИПОЛ	NO_2^-	O_2^-	H_2O_2
Контроль	$25,8 \pm 1,7$	$103,7 \pm 7,3$	$50,7 \pm 2,1$	$49,7 \pm 2,3$
Глицин	$25,9 \pm 3,2$	$100,2 \pm 5,7$	$64,7 \pm 4,6$	$50,6 \pm 2,9$
Ишемия				
1	$27,0 \pm 2,2$	$99,5 \pm 7,9$	$60,4 \pm 5,5^*$	$51,4 \pm 2,4$
30	$28,5 \pm 2,3$	$99,2 \pm 8,5$	$66,2 \pm 3,8$	$51,9 \pm 2,2$

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

У животных с preconditionированием глицином через минуту от начала реперфузии миокарда после периода его 20-минутной ишемии увеличивались: ИПОЛ, однако $p < 0,05$ (рисунок 71), O_2^- в 1,2 раза ($p < 0,05$; рисунок 73) и H_2O_2 , однако $p > 0,05$ (рисунок 74).

Через 30 минут от начала реперфузии миокарда после периода его 20-минутной ишемии увеличивались оставаясь значительно выше нормы : ИПОЛ (рисунок 71), O_2^- в 1,3 раза ($p < 0,05$; рисунок 73) и H_2O_2 (рисунок 74).

Таким образом можно сделать вывод о том, что параметры оксидативного стресса, после двадцатиминутной ишемии после preconditionирования

глицином и последующей тридцатиминутной реперфузии возрастают и остаются значительно выше контрольных значений, то есть не происходит адекватного их восстановления.

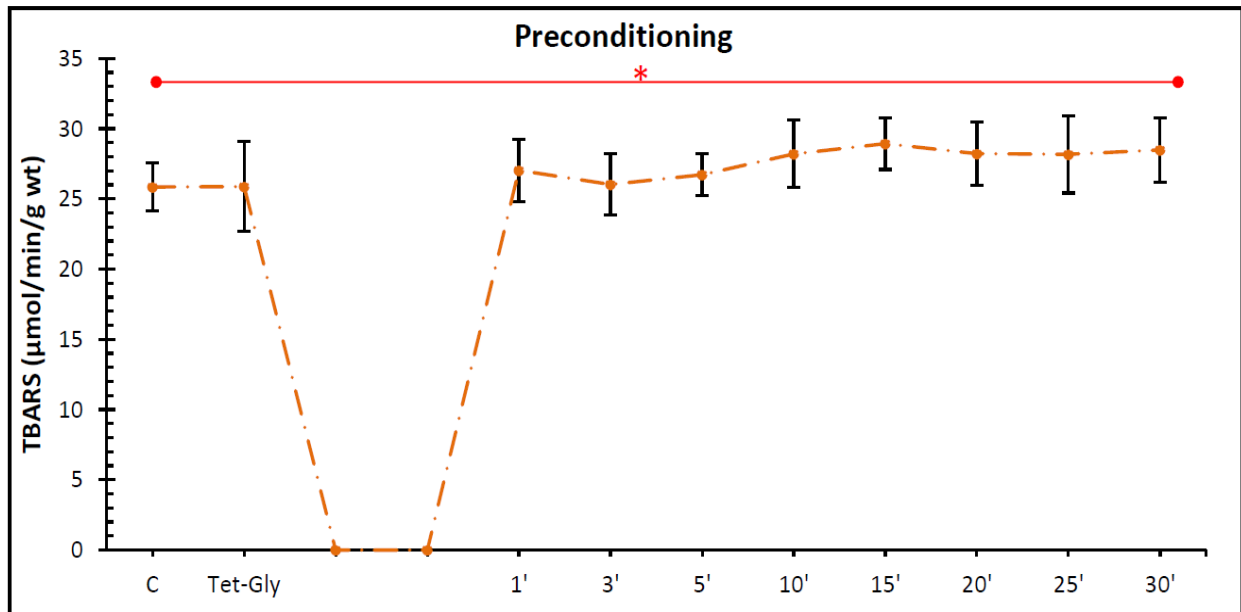


Рисунок 71 - Показатели ИПОЛ изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании глицином

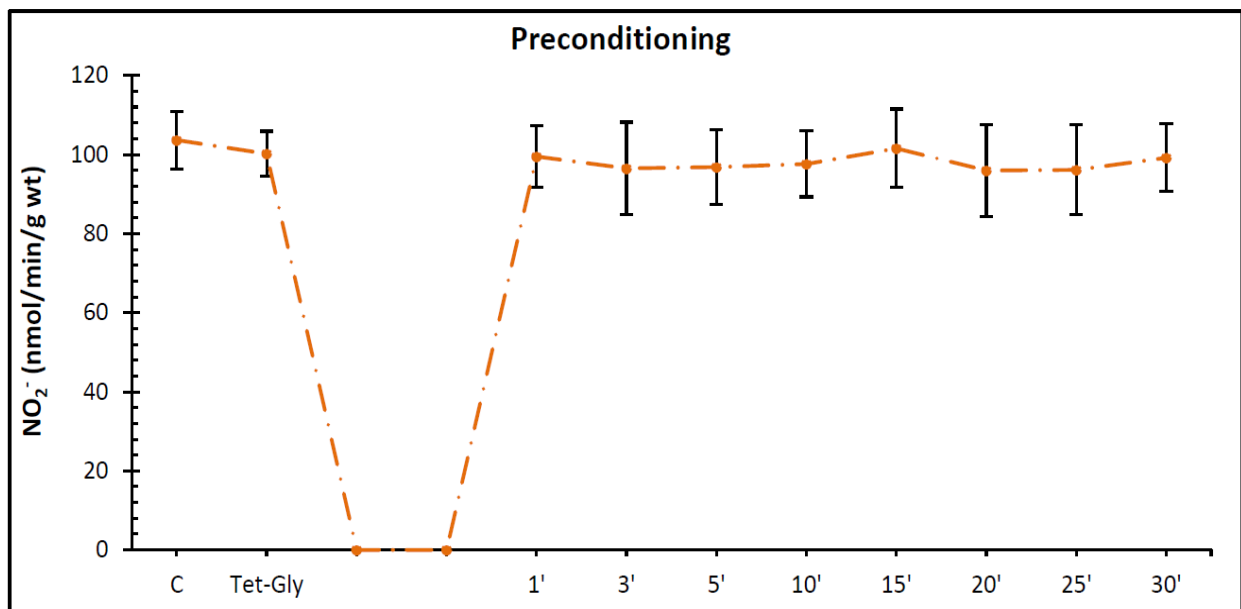


Рисунок 72 - Показатели NO_2^- изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании глицином

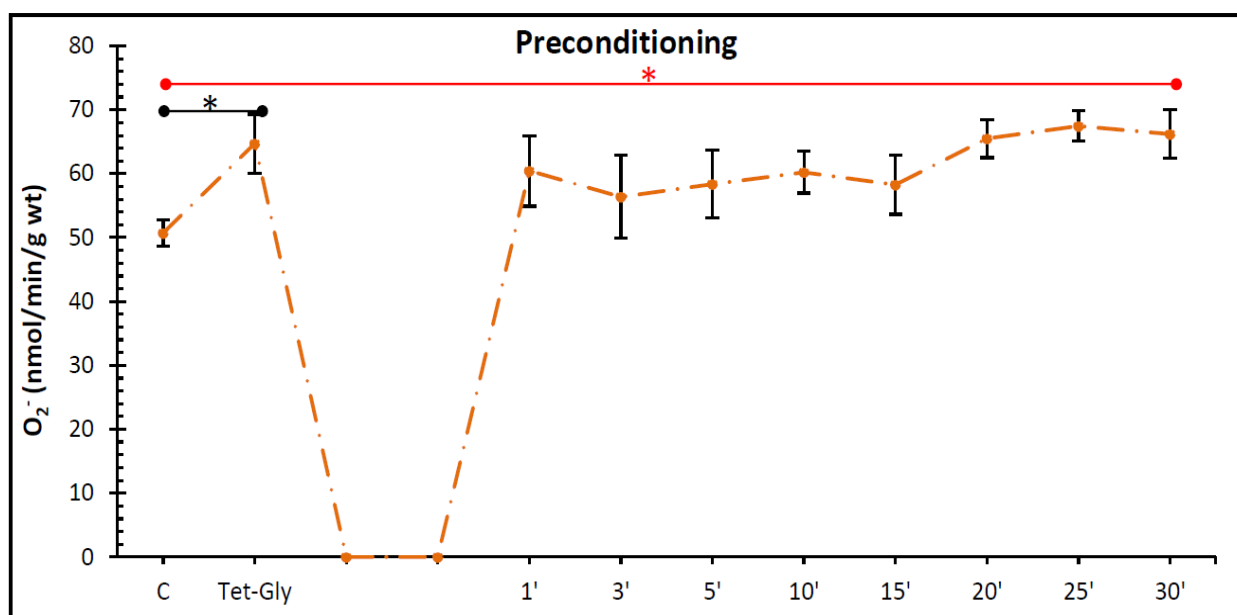


Рисунок 73 - Показатели O_2^- изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании глицином

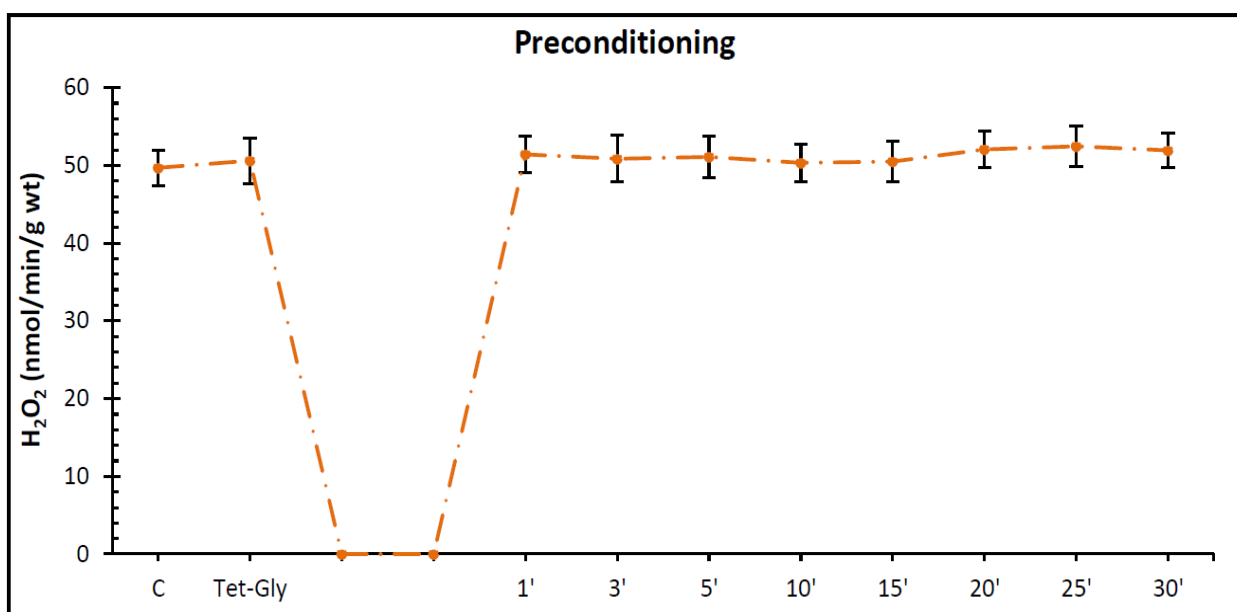


Рисунок 74 - Показатели H_2O_2 изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании глицином

3.14. Влияние применения (RS)-(tetrazol-5-YL) глицина при посткондиционировании на параметры оксидационного стресса изолированного сердца крыс

Значения показателя ИПОЛ, NO_2^- , O_2^- и H_2O_2 изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при посткондиционировании глицином представлены в таблице 16.

Таблица 16 - Показатели оксидативного стресса при ишемии и последующей реперфузии изолированного сердца крыс раствором Кребса-Хензелейта *ex vivo* после посткондиционирования глицином

Посткондиционирование глицином				
Минуты	ИПОЛ	NO_2^-	O_2^-	H_2O_2
Контроль	$30,2 \pm 2,0$	$130,4 \pm 7,5$	$50,1 \pm 1,6$	$50,6 \pm 1,3$
Ишемия				
1	$28,6 \pm 2,2$	$130,7 \pm 7,7$	$65,4 \pm 7,4^*$	$55,4 \pm 7,4$
30	$27,2 \pm 0,8$	$121,9 \pm 11,5$	$67,0 \pm 4,5^*$	$57,0 \pm 4,5^*$

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

У животных с посткондиционированием глицином через минуту от начала реперфузии миокарда после периода его 20-минутной ишемии увеличивался: O_2^- в 1,3 раза ($p < 0,05$; рисунок 75) и H_2O_2 , однако $p > 0,05$ (рисунок 76) .

Через 30 минут от начала реперфузии миокарда после периода его 20-минутной ишемии увеличивались оставаясь значительно выше нормы : O_2^- в 1,4 раза ($p < 0,05$; рисунок 75) и H_2O_2 в 1,1 раза ($p < 0,05$; рисунок 76).

Таким можно сделать вывод о том, что параметры оксидативного стресса, после двадцатиминутной ишемии после посткондиционирования глицином и последующей тридцатиминутной реперфузии возрастают и остаются значительно

выше контрольных значений, то есть не происходит адекватного их восстановления.

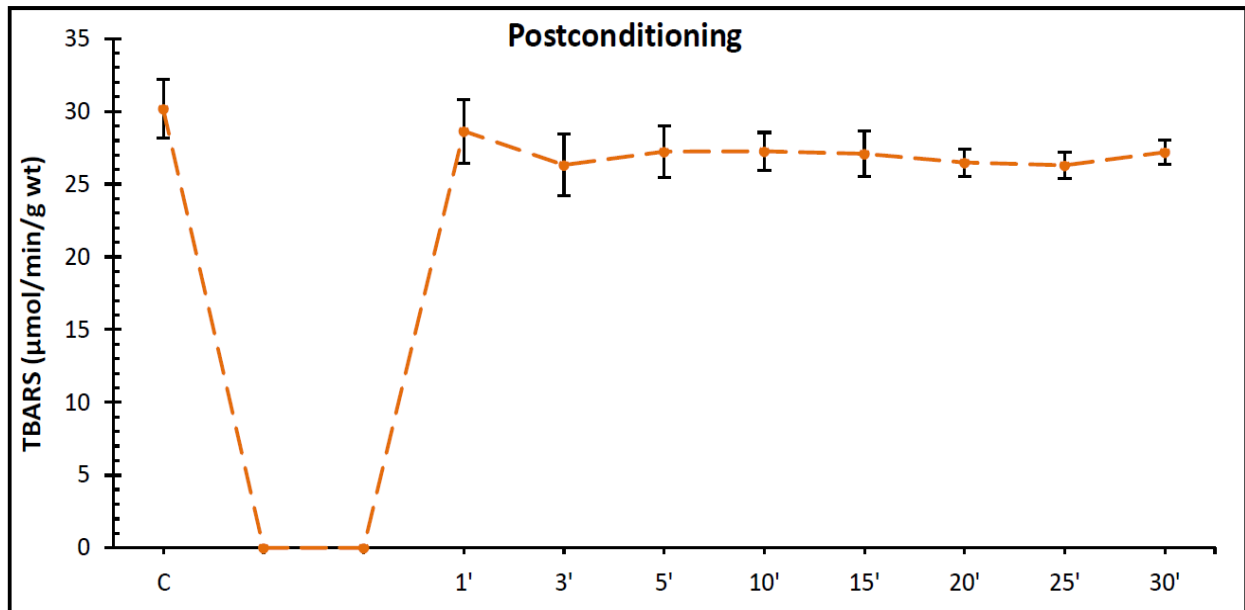


Рисунок 75 - Показатели ИПОЛ изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при посткондиционировании глицином

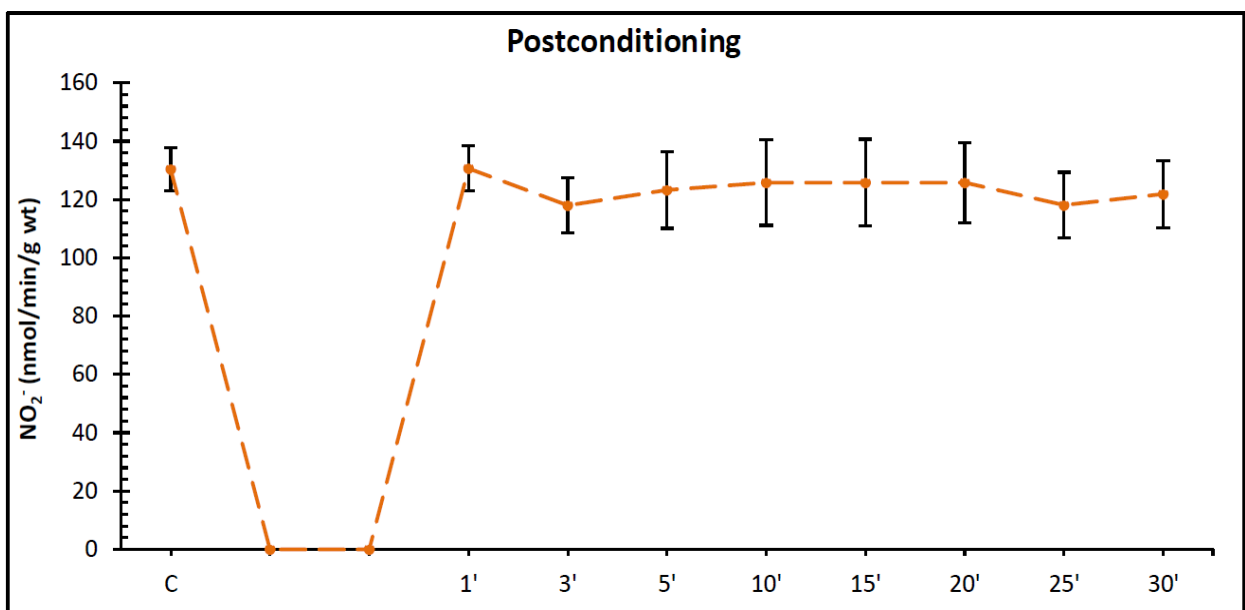


Рисунок 76 - Показатели NO_2^- изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при посткондиционировании глицином

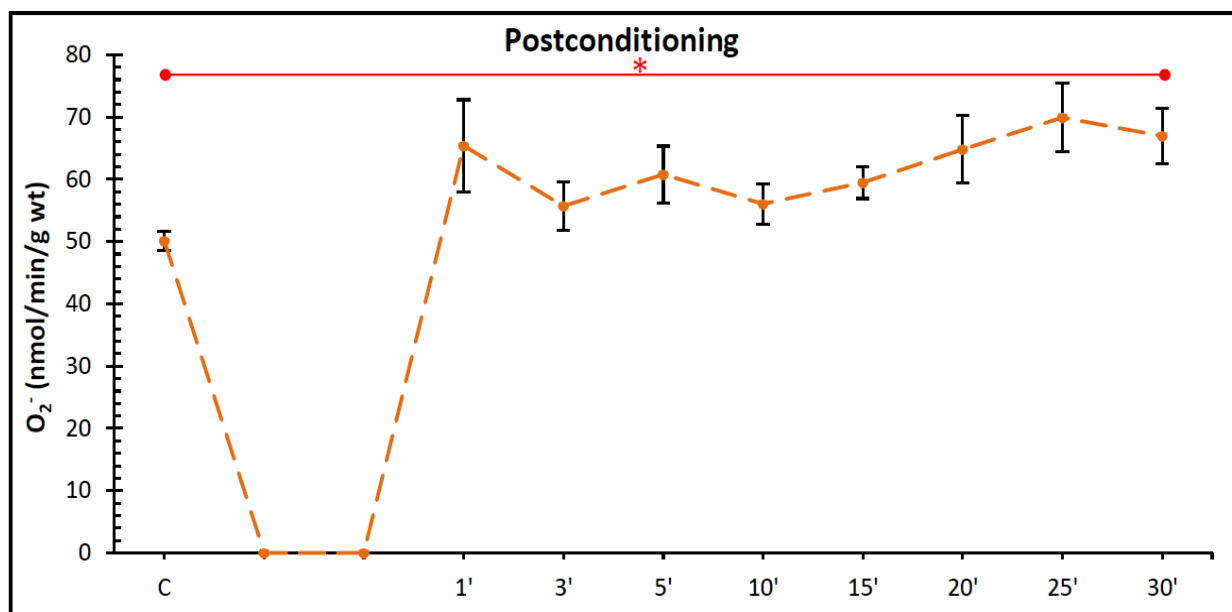


Рисунок 77 - Показатели O_2^- изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при посткондиционировании глицином

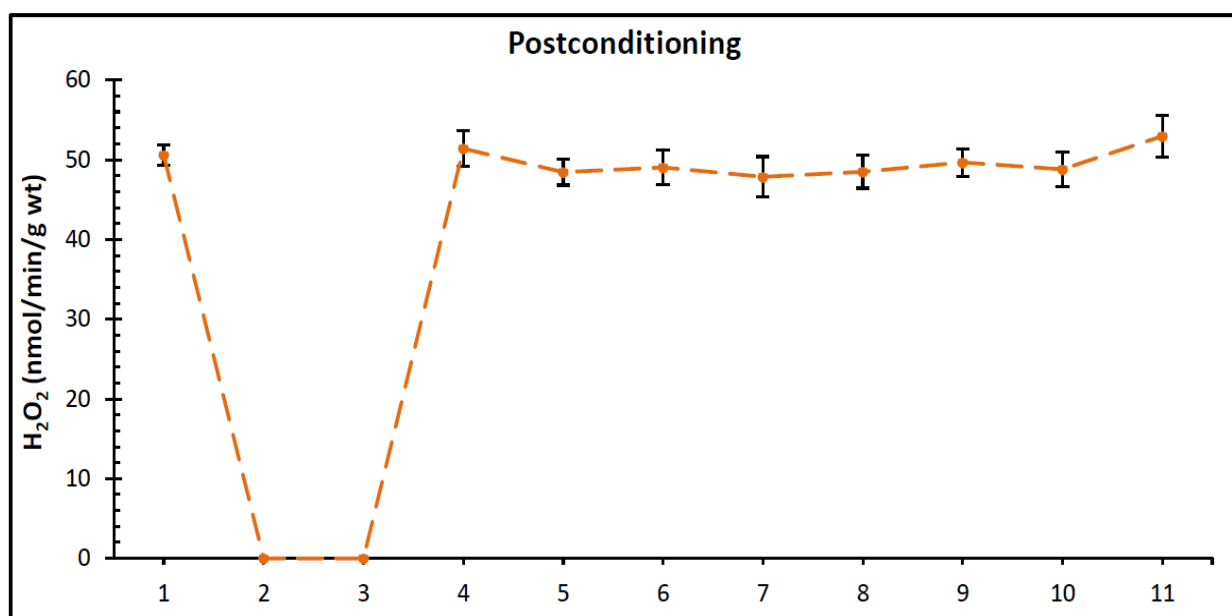


Рисунок 78 - Показатели H_2O_2 изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при посткондиционировании глицином

3.15. Влияние применения МК-801 при preconditionировании на параметры оксидационного стресса изолированного сердца крыс

Значения показателя ИПОЛ, NO_2^- , O_2^- и H_2O_2 изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании МК-801 представлены в таблице 17.

Таблица 17 - Показатели оксидативного стресса при ишемии и последующей реперфузии изолированного сердца крыс раствором Кребса-Хензelayта *ex vivo* после preconditionирования МК-801

Preconditionирование МК-801				
Минуты	ИПОЛ	NO_2^-	O_2^-	H_2O_2
Контроль	$23,1 \pm 1,6$	$105,3 \pm 9,0$	$52,9 \pm 5,4$	$49,6 \pm 3,7$
МК-801	$15,4 \pm 2,0$	$67,3 \pm 6,6$	$35,1 \pm 2,4$	$27,1 \pm 5,6$
Ишемия				
1	$20,6 \pm 2,6$	$90,8 \pm 6,1$	$47,0 \pm 4,7$	$44,4 \pm 5,6$
30	$15,8 \pm 2,4^*$	$95,9 \pm 4,6$	$49,5 \pm 4,6$	$36,2 \pm 4,0^*$

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

У животных с preconditionированием МК-801 через минуту от начала реперфузии миокарда после периода его 20-минутной ишемии снижаются: ИПОЛ, однако $p > 0,05$ (рисунок 79), NO_2^- , однако $p > 0,05$ (рисунок 80), O_2^- , однако $p > 0,05$ (рисунок 81) и H_2O_2 , однако $p > 0,05$ (рисунок 82).

Через 30 минут от начала реперфузии миокарда после периода его 20-минутной ишемии снижаются оставаясь значительно ниже нормы : ИПОЛ в 1,5 раза ($p < 0,05$; рисунок 79), NO_2^- , однако $p > 0,05$ (рисунок 80), O_2^- , однако $p > 0,05$ (рисунок 81) и H_2O_2 в 1,4 раза ($p < 0,05$).

Таким образом можно сделать вывод о том, что параметры оксидативного стресса, после двадцатиминутной ишемии после preconditionирования МК-801 снижаются и после последующей тридцатиминутной реперфузии также остаются значительно ниже контрольных значений.

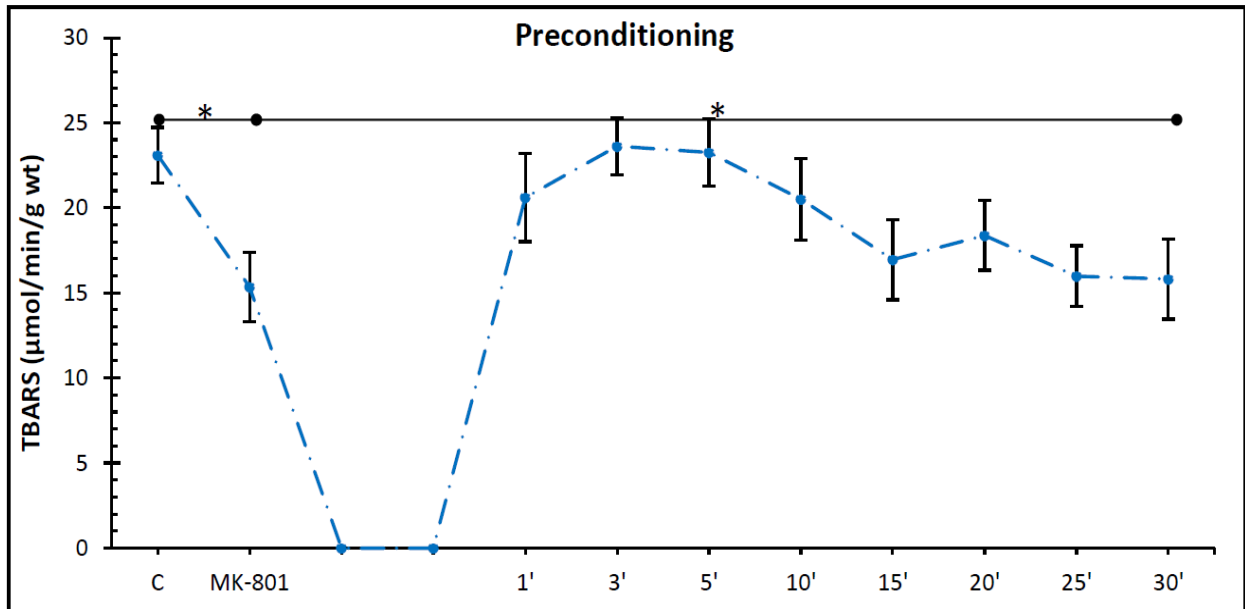


Рисунок 79 - Показатели ИПОЛ изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании МК-801

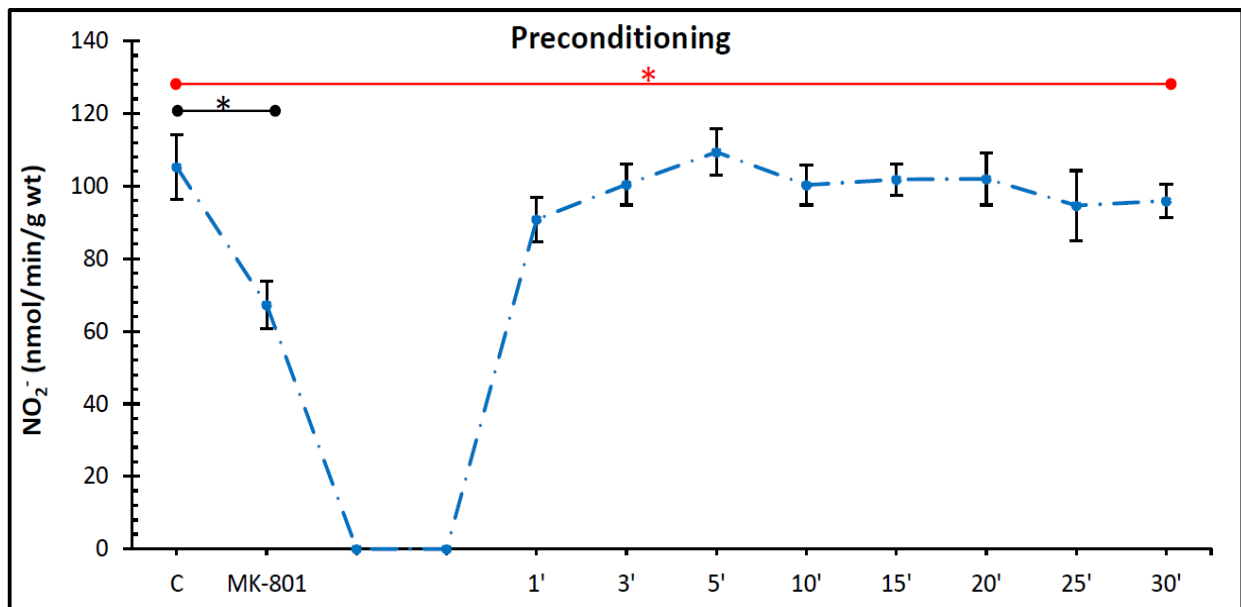


Рисунок 80 - Показатели NO₂⁻ изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании МК-801

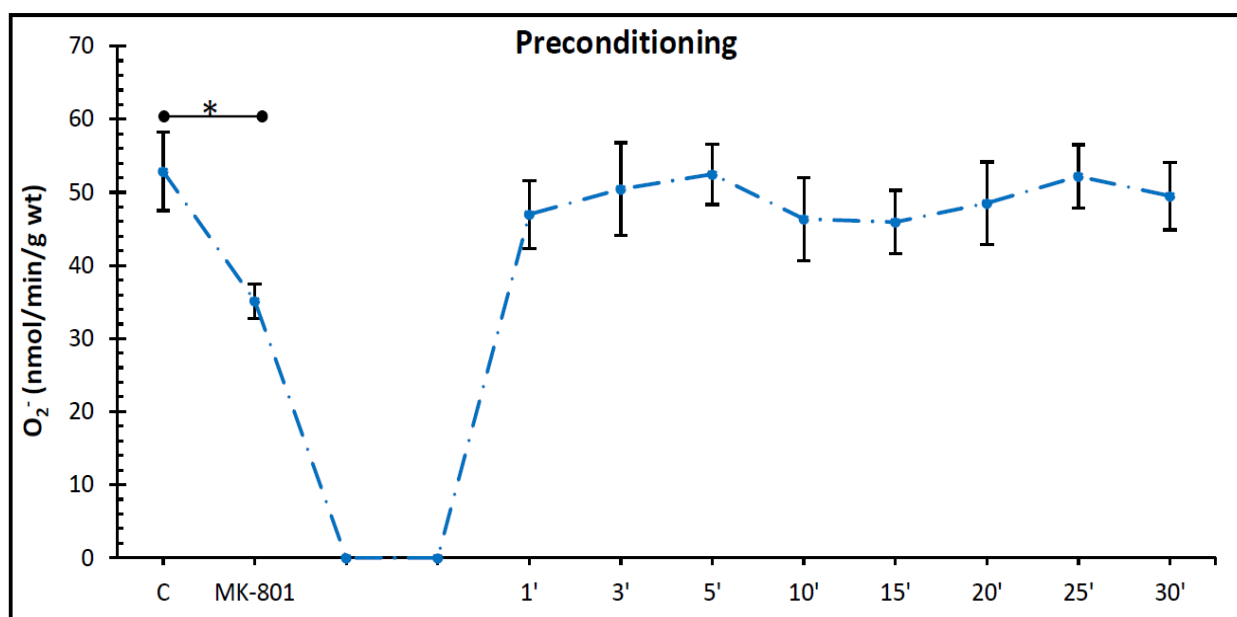


Рисунок 81 - Показатели O_2^- изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании MK-801

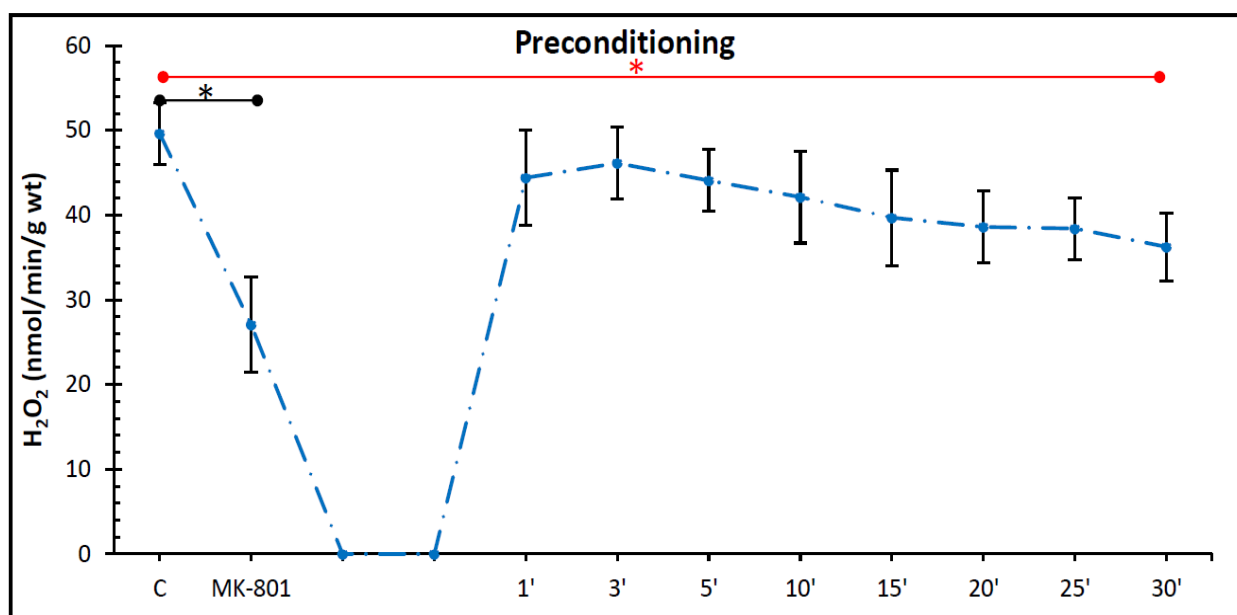


Рисунок 82 - Показатели H_2O_2 изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании MK-801

3.16. Влияние применения МК-801 при посткондиционировании на параметры оксидационного стресса изолированного сердца крыс

Значения показателя ИПОЛ, NO_2^- , O_2^- и H_2O_2 изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при посткондиционировании МК-801 представлены в таблице 18.

Таблица 18 - Показатели оксидативного стресса при ишемии и последующей реперфузии изолированного сердца крыс раствором Кребса-Хензелейта *ex vivo* после посткондиционирования МК-801

Посткондиционирование МК-801				
Минуты	ИПОЛ	NO_2^-	O_2^-	H_2O_2
Контроль	$24,7 \pm 2,4$	$114,6 \pm 14,9$	$50,6 \pm 4,2$	$57,7 \pm 1,3$
Ишемия				
1	$24,1 \pm 1,8$	$99,9 \pm 8,7^*$	$45,6 \pm 6,2$	$51,0 \pm 1,0^*$
30	$25,2 \pm 1,8$	$112,7 \pm 5,6$	$49,0 \pm 2,3$	$48,5 \pm 5,0^*$

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

У животных с посткондиционированием МК-801 через минуту от начала реперфузии миокарда после периода его 20-минутной ишемии снижаются: NO_2^- в 1,2 раза ($p < 0,05$; рисунок 84), O_2^- , однако $p > 0,05$ (рисунок 85) и H_2O_2 в 1,1 раза ($p < 0,05$; рисунок 86).

Через 30 минут от начала реперфузии миокарда после периода его 20-минутной ишемии увеличиваются до контрольных значений : NO_2^- , однако $p > 0,05$ (рисунок 84) и O_2^- , однако $p > 0,05$ (рисунок 85).

Таким образом можно сделать вывод о том, что параметры оксидативного стресса, после двадцатиминутной ишемии после посткондиционирования МК-801 снижаются и после последующей тридцатиминутной реперфузии увеличиваются не превышая контрольных значений.

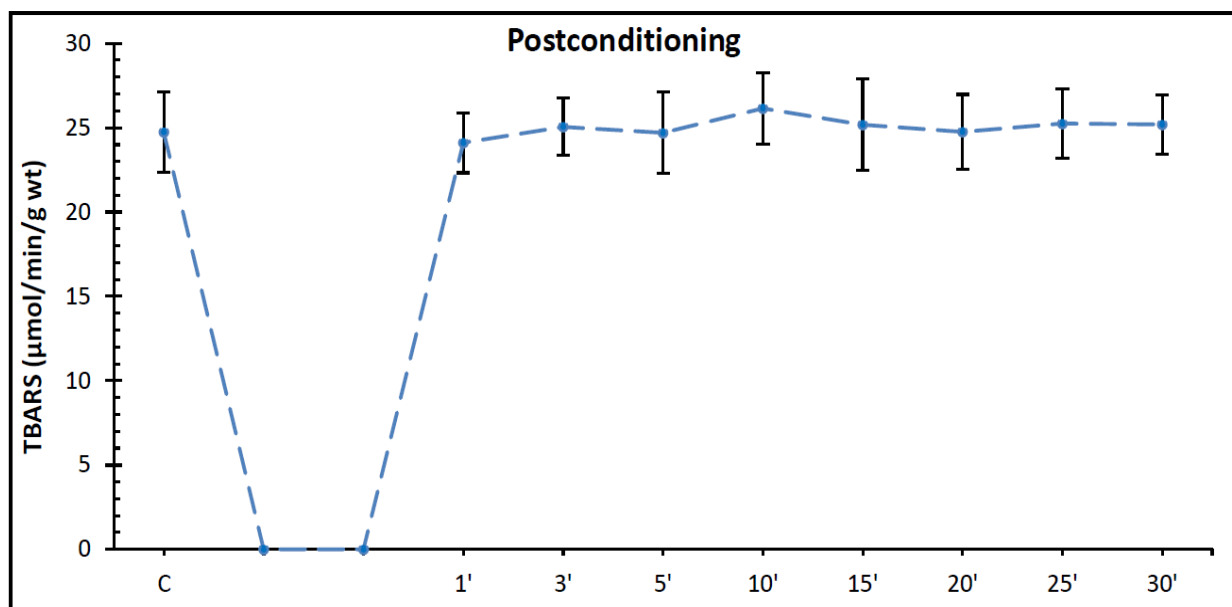


Рисунок 83 - Показатели ИПОЛ изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при посткондиционировании МК-801

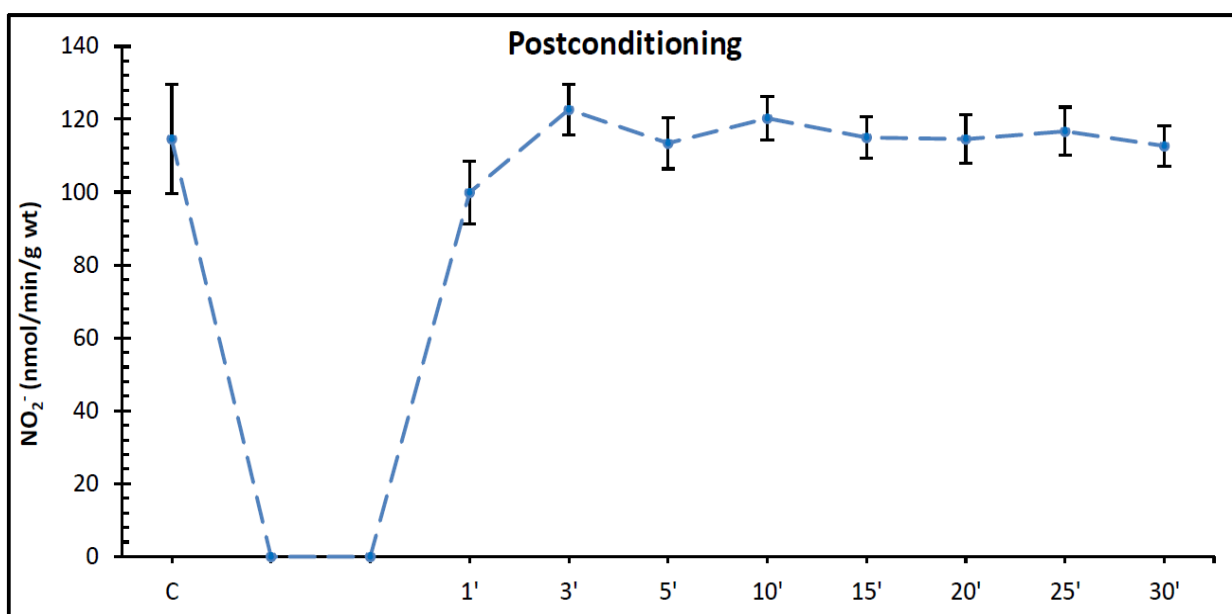


Рисунок 84 - Показатели NO_2^- изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при посткондиционировании МК-801

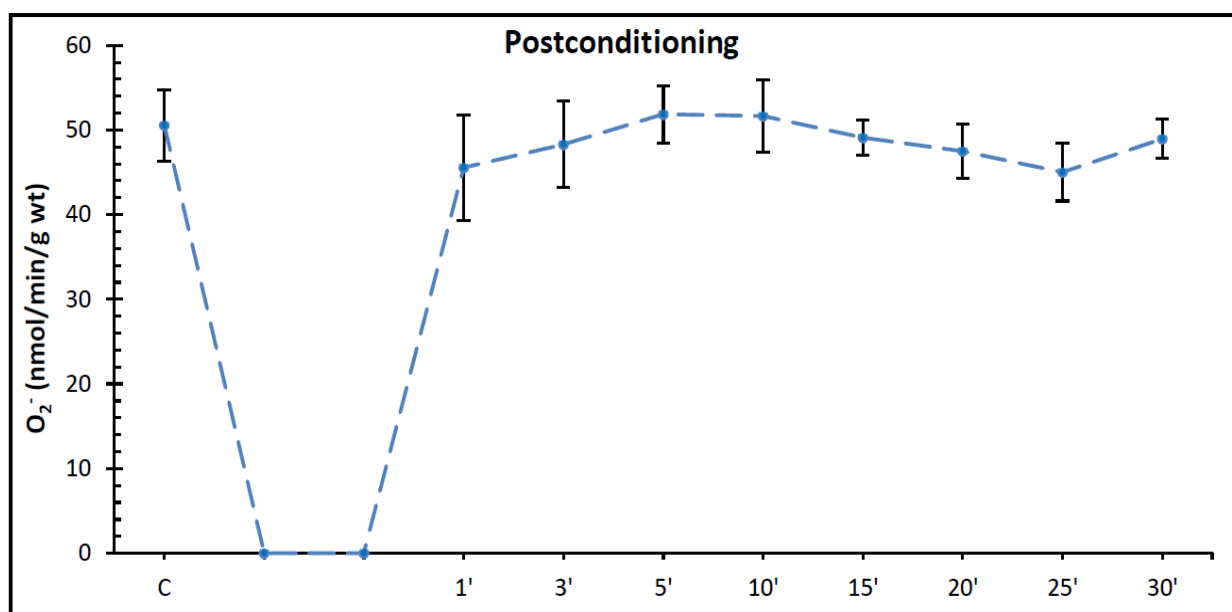


Рисунок 85 - Показатели O₂⁻ изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при посткондиционировании МК-801

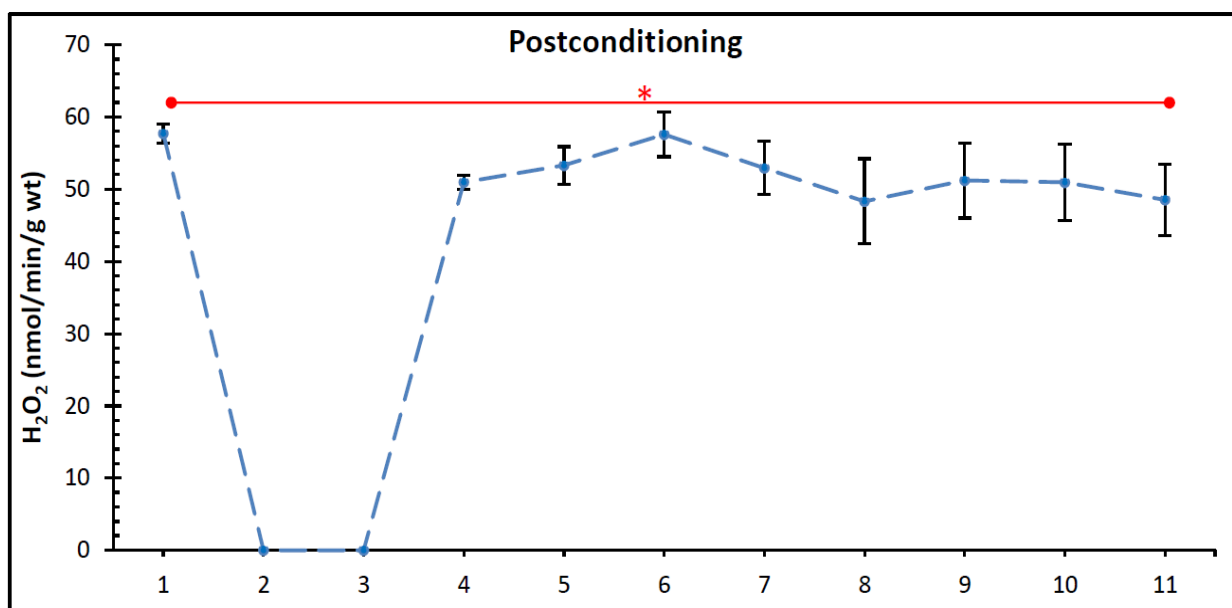


Рисунок 86 - Показатели H₂O₂ изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при посткондиционировании МК-801

3.17. Влияние применения мемантина при прекондиционировании на параметры оксидационного стресса изолированного сердца крыс

Значения показателя ИПОЛ, NO_2^- , O_2^- и H_2O_2 изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при прекондиционировании мемантина представлены в таблице 19.

Таблица 19 - Показатели оксидативного стресса при ишемии и последующей реперфузии изолированного сердца крыс раствором Кребса-Хензелейта *ex vivo* после прекондиционирования мемантином

Прекондиционирование мемантином				
Минуты	ИПОЛ	NO_2^-	O_2^-	H_2O_2
Контроль	$34,5 \pm 2,6$	$141,6 \pm 4,5$	$49,3 \pm 3,1$	$40,8 \pm 2,5$
Мемантин	$32,1 \pm 2,4$	$125,0 \pm 7,0$	$34,4 \pm 4,1$	$41,5 \pm 3,3$
Ишемия				
1	$30,2 \pm 2,3$	$120,8 \pm 8,3^*$	$41,8 \pm 4,5^*$	$40,9 \pm 2,4$
30	$22,2 \pm 1,5^* **$	$93,3 \pm 7,1^* **$	$41,0 \pm 2,3^*$	$29,9 \pm 2,5^* **$

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

У животных с прекондиционированием МК-801 через минуту от начала реперфузии миокарда после периода его 20-минутной ишемии снижаются: ИПОЛ, однако $p > 0,05$ (рисунок 87), NO_2^- в 1,2 раза ($p < 0,05$; рисунок 88) и O_2^- в 1,2 раза ($p < 0,05$; рисунок 89).

Через 30 минут от начала реперфузии миокарда после периода его 20-минутной ишемии снижаются и остаются значительно ниже контрольных значений: ИПОЛ в 1,6 раза ($p < 0,05$; рисунок 87), NO_2^- в 1,5 раза ($p < 0,05$; рисунок 88), O_2^- в 1,2 раза ($p < 0,05$; рисунок 89) и H_2O_2 в 1,4 раза ($p < 0,05$; рисунок 90).

Таким образом можно сделать вывод о том, что параметры оксидативного стресса, после двадцатиминутной ишемии после прекондиционирования

мемантином снижаются и после последующей тридцатиминутной реперфузии остаются значительно ниже контрольных значений.

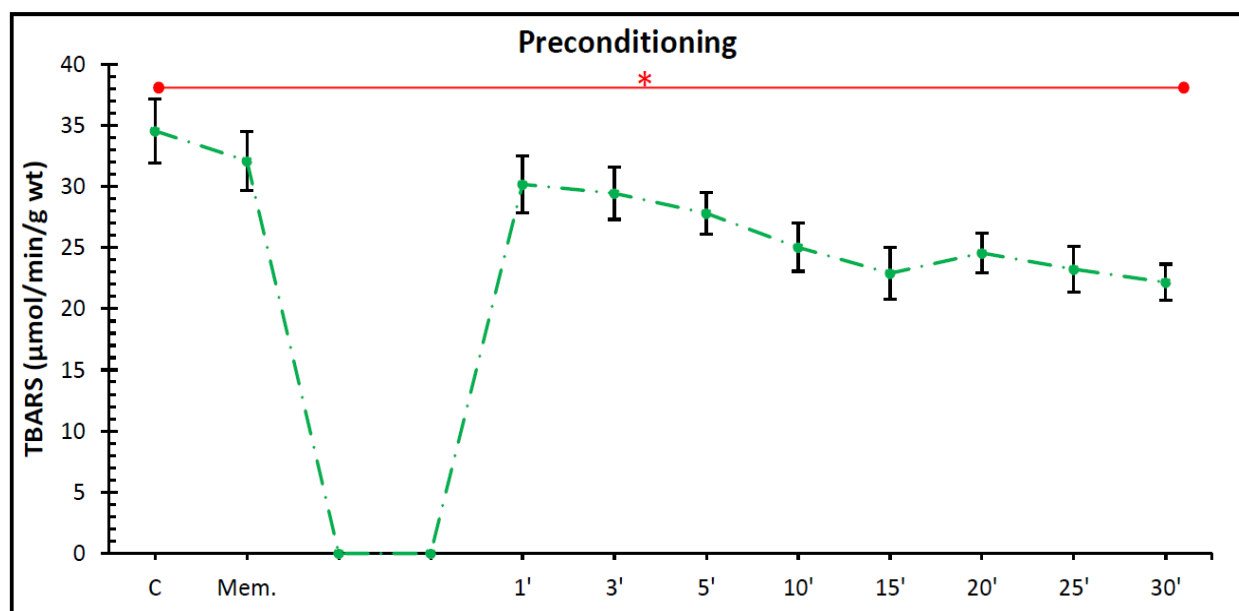


Рисунок 87 - Показатели ИПОЛ изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании мемантином

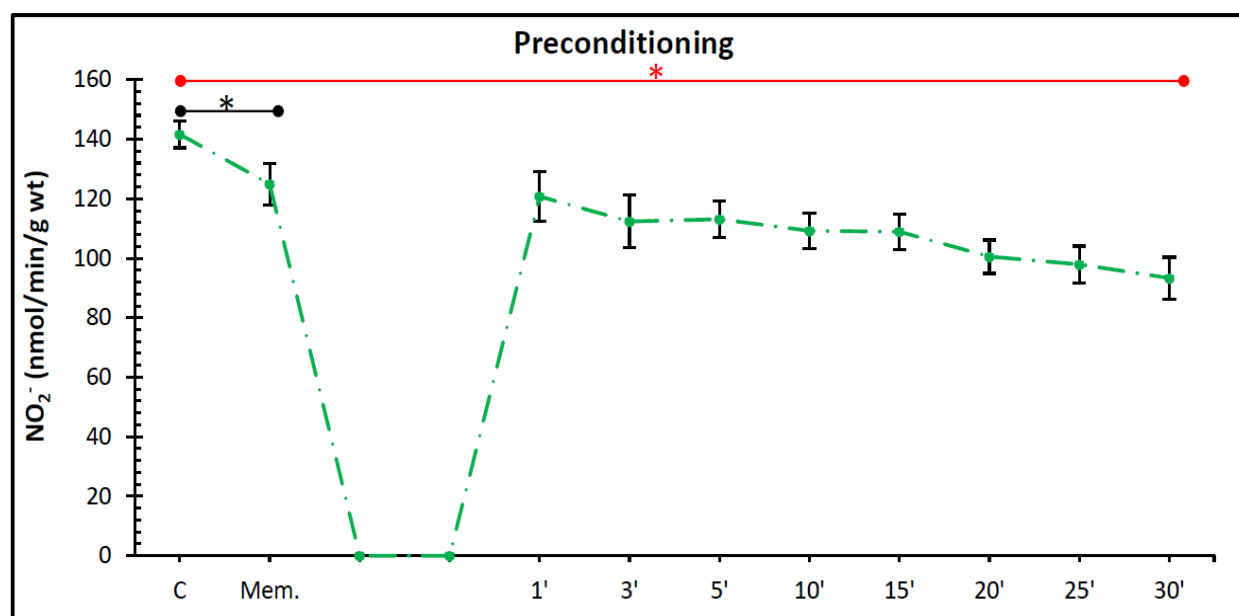


Рисунок 88 - Показатели NO_2^- изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании мемантином

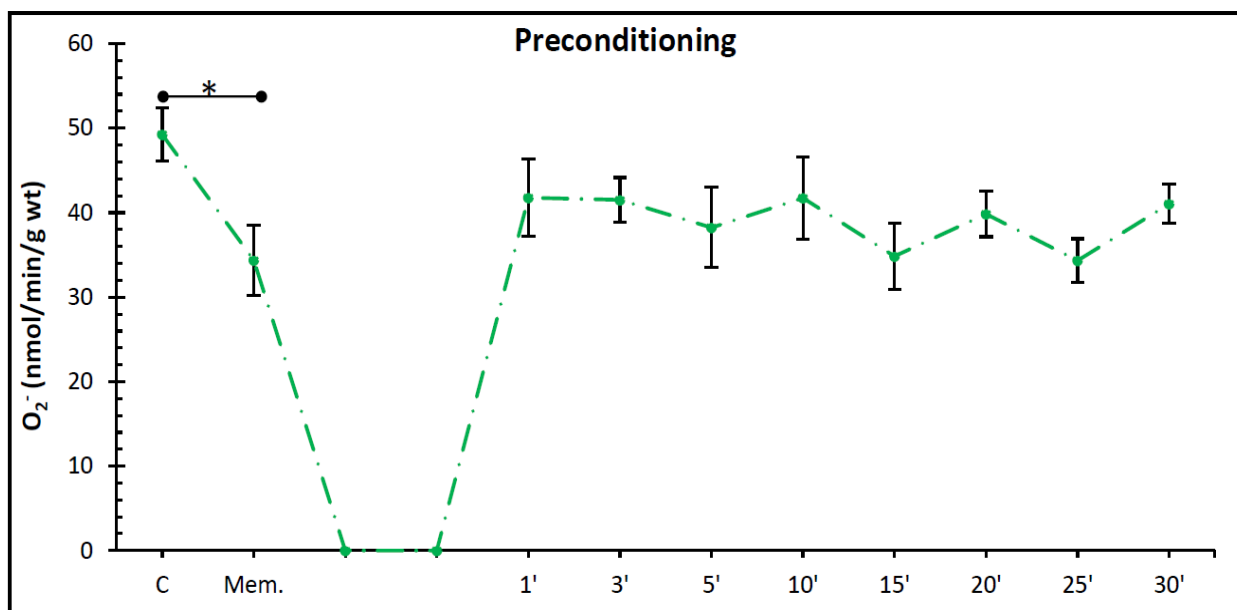


Рисунок 89 - Показатели O_2^- изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании мемантином

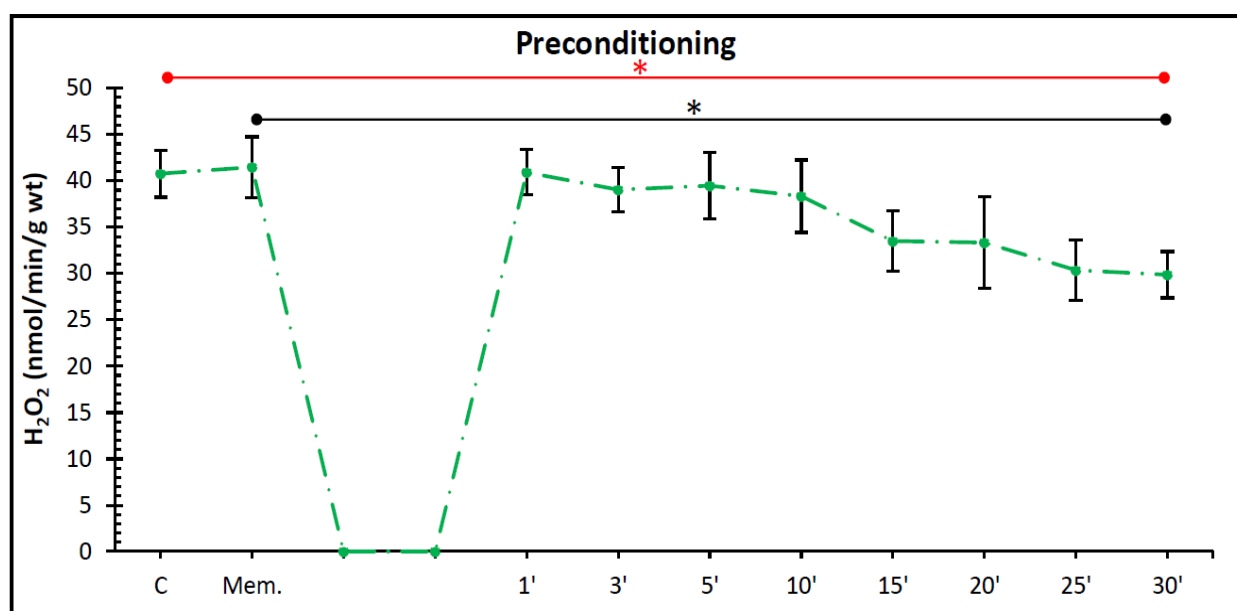


Рисунок 90 - Показатели H_2O_2 изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании мемантином

3.18. Влияние применения мемантина при посткондиционировании на параметры оксидационного стресса изолированного сердца крыс

Значения показателя ИПОЛ, NO_2^- , O_2^- и H_2O_2 изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при посткондиционировании мемантина представлены в таблице 20.

Таблица 20 - Показатели оксидативного стресса при ишемии и последующей реперфузии изолированного сердца крыс раствором Кребса-Хензелейта *ex vivo* после посткондиционирования мемантином

Посткондиционирование мемантином				
Минуты	ИПОЛ	NO_2^-	O_2^-	H_2O_2
Контроль	$51,5 \pm 5,1$	$125,8 \pm 5,4$	$45,7 \pm 3,2$	$53,5 \pm 1,3$
Ишемия				
1	$48,0 \pm 8,4$	$100,5 \pm 7,1^*$	$45,1 \pm 4,7$	$43,9 \pm 3,9^*$
30	$44,2 \pm 6,3^*$	$99,1 \pm 5,1^*$	$43,9 \pm 2,9$	$45,0 \pm 3,2^*$

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

У животных с посткондиционированием мемантином через минуту от начала реперфузии миокарда после периода его 20-минутной ишемии снижаются: ИПОЛ, однако $p > 0,05$ (рисунок 91), NO_2^- в 1,3 раза ($p < 0,05$; рисунок 92), H_2O_2 в 1,2 раза ($p < 0,05$; рисунок 94).

Через 30 минут от начала реперфузии миокарда после периода его 20-минутной ишемии снижаются и остаются значительно ниже контрольных значений: ИПОЛ в 1,2 раза ($p < 0,05$; рисунок 91), NO_2^- в 1,3 раза ($p < 0,05$; рисунок 92), O_2^- , однако $p > 0,05$ (рисунок 93) и H_2O_2 в 1,2 раза ($p < 0,05$; рисунок 94).

Таким образом можно сделать вывод о том, что параметры оксидативного стресса, после двадцатиминутной ишемии после посткондиционирования мемантином снижаются, и после последующей тридцатиминутной реперфузии остаются значительно ниже контрольных значений.

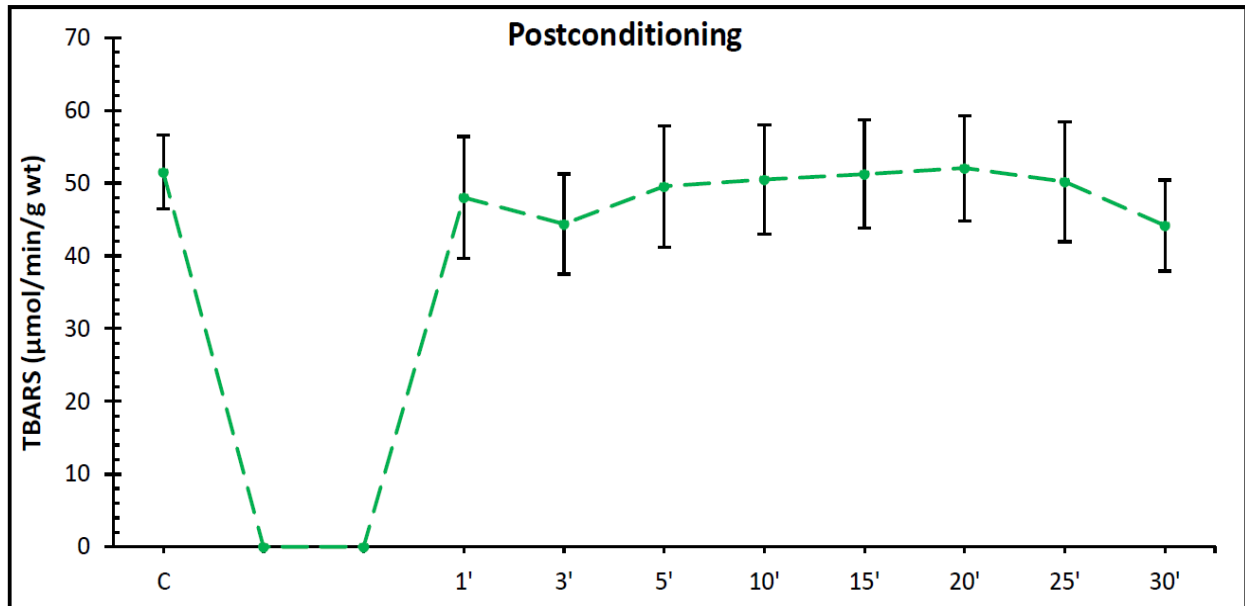


Рисунок 91 - Показатели ИПОЛ изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при посткондиционировании мемантином

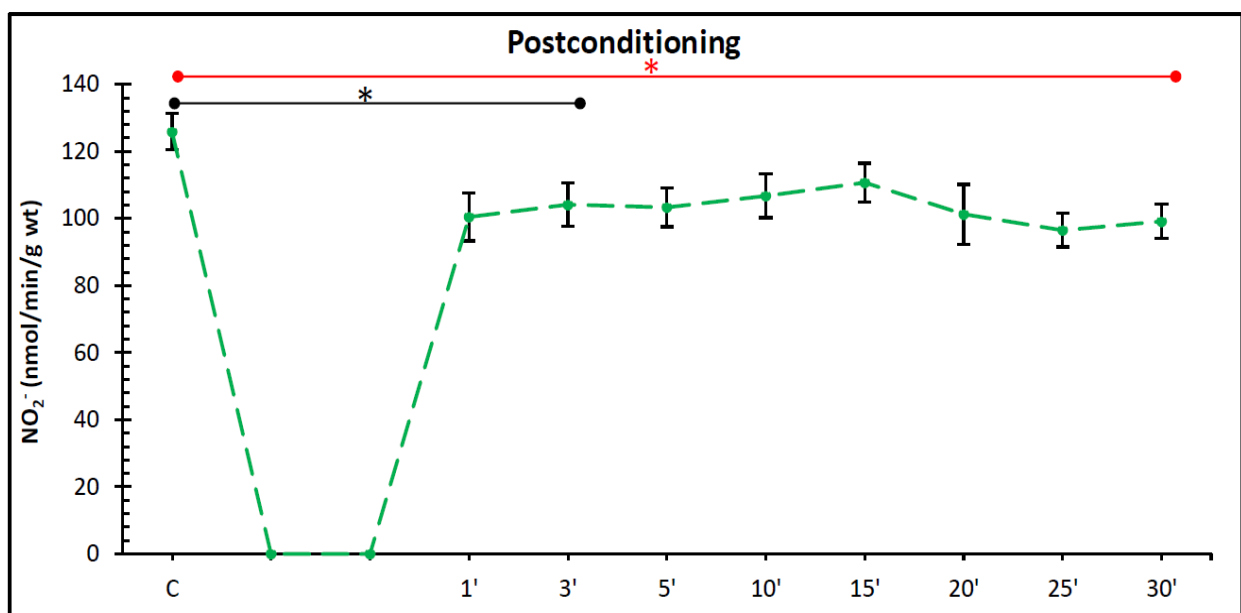


Рисунок 92 - Показатели NO₂⁻ изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при посткондиционировании мемантином

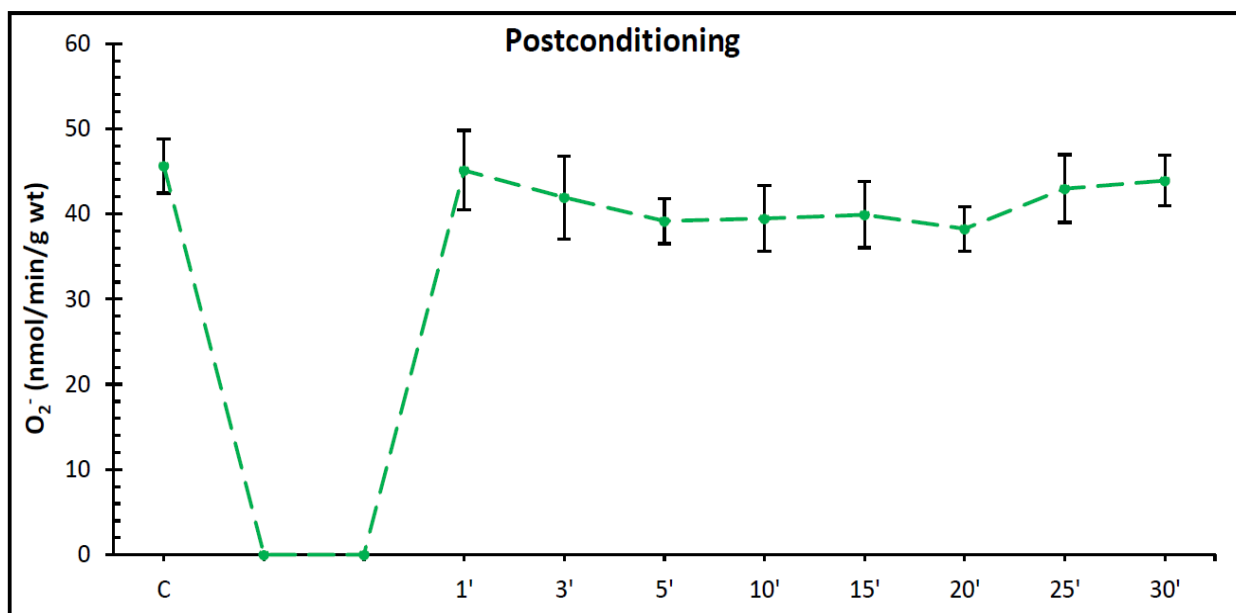


Рисунок 93 - Показатели O_2^- изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при посткондиционировании мемантином

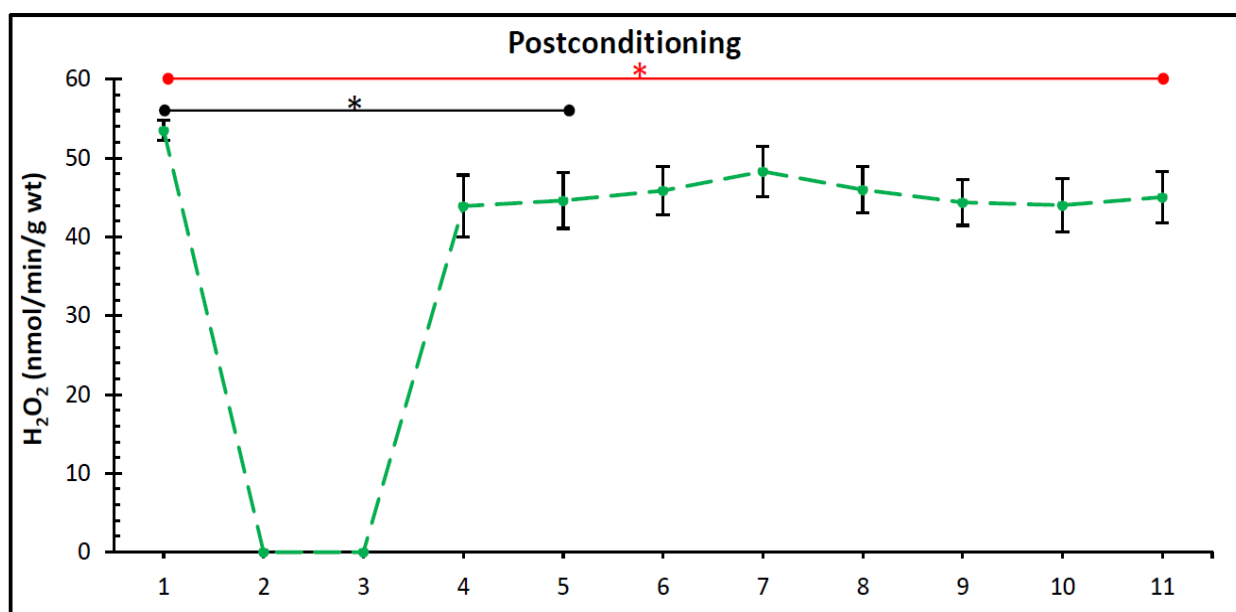


Рисунок 94 - Показатели H_2O_2 изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при посткондиционировании мемантином

ОБСУЖДЕНИЕ

Почти все исследования, направленные на изучение потенциальной роли NMDA-рецепторов в защите тканей в различных моделях кондиционирования, касаются нервных структур. Результаты этого исследования показали, что введение агонистов и антагонистов NMDA-рецепторов проявляло различные эффекты при прекондиционировании и посткондиционировании миокарда.

Ранее было показано, что модуляция активности рецептора NMDA изменяет функцию миокарда, а также окислительно-восстановительный баланс в сердце. Результаты исследования влияния глутамата, глицина и их комбинации на кардиодинамические параметры и биомаркеры окислительного стресса показали наиболее выраженные эффекты именно при их комбинированном применении [167]. Изолированное пятиминутное введение глутамата или глицина в концентрации 100 мкмоль/л не вызывало изменений значений кардиодинамических параметров или динамики образования биомаркеров окислительного стресса. С другой стороны, совместное введение глутамата и глицина привело к снижению $dp/dt \max$ и $dp/dt \min$, соответственно, в качестве параметров, отражающих сократительную способность миокарда, ЧСС и коронарный кровоток, что сопровождалось увеличением маркеров окислительного стресса. Аналогичное исследование той же исследовательской группы показало, что изолированное введение NMDA также не вызывало изменений в значениях кардиодинамических параметров, в то время как совместное введение с глицином приводило к снижению показателей сердечной функции с увеличением синтеза маркеров окислительного стресса [166]. Использование блокаторов NMDA-рецепторов мемантина и ифенпродила в том же исследовании сопровождалось снижением кардиодинамических параметров и генерации АФК. Другое исследование той же исследовательской группы, направленное на сравнение эффектов комбинированного введения глутамата и/или глицина с верапамилом, блокатором кальциевых каналов, показало, что комбинированное введение глутамата и глицина с верапамилом в наименьшей

степени снижает показатели кардиодинамических параметров [169]. Авторы этих исследований сделали вывод, что совместное введение глутамата и глицина позволяет активировать NMDA-рецепторы, вызывая тем самым проникновение Ca^{2+} в кардиомиоциты и, таким образом, данные клетки могут модулировать свои ответы на различные внешние стимулы. Учитывая важность Ca^{2+} в регуляции метаболических процессов, участвующих в синтезе АФК, а также в механизмах регуляции функции миокарда, целью данного исследования явилось изучение возможности применения агонистов и антагонистов NMDA-рецепторов в процессах прекондиционирования и посткондиционирования миокарда.

С.А. Hicks с соавт. сосредоточили свое внимание на характеристике NMDA-рецепторов сердца в качестве мишеней для действия различных эндогенных и синтетических агонистов и антагонистов, сравнивая полученные результаты с эффектами блокаторов кальциевых каналов L-типа [80]. Антагонисты NMDA-рецепторов, в отличие от агонистов, вызывали брадикардию и обладали антиаритмическим действием.

В предыдущих исследованиях, направленных на изучение влияния введения активаторов и ингибиторов NMDA-рецепторов на различных экспериментальных моделях кондиционирования нервной ткани, результаты были противоречивы. С.А. Hicks с соавт. указали на защитные эффекты применения антагонистов NMDA-рецепторов на модели глобальной церебральной ишемии [28]. Авторы применяли несколько антагонистов NMDA-рецепторов за 30 минут до и через 2 часа и 30 минут после двусторонней окклюзии а. carotis comunis у монгольских прыгунов (лат. *meriones unguiculatus*). В данном исследовании использованы блокаторы NMDA-рецепторов МК-801 и ифенпродил. В дополнение к защитным эффектам этих веществ авторы в том же исследовании показали более мощный защитный эффект блокаторов рецептора AMPA, особенно его конкурентных антагонистов [80]. С другой стороны, А. Bond с соавт. показали на той же экспериментальной модели, что введение ингибиторов NMDA-рецепторов ослабляет защитные эффекты ишемического прекондиционирования [28]. Результаты этого исследования практически указывают на важность активации

рецептора NMDA в развитии толерантности к ишемии во время ишемического preconditionирования. М.О. Samoilov с соавт. показали, что антагонисты NMDA-рецепторов, вводимые во время ишемического preconditionирования, снижают защитные эффекты данного метода preconditionирования благодаря молекулярным механизмам, включающим изменение синтеза пептидов в клетках, подверженных аноксии [152].

Учитывая эти результаты, а также результаты других исследований, было сделано предположение, что активация сигнальных путей, которые направляют клетку к некрозу, апоптозу или защите, зависит от степени активации рецептора NMDA при ишемии [155, 180]. Кроме того, эффекты активации NMDA-рецепторов зависят от их положения: внесинаптические NMDA-рецепторы играют роль в развитии эксцитотоксичности, а NMDA-рецепторы в синапсах играют роль в нейропротекции [138]. Например, Hardingham с соавт. представили субклеточный механизм, который опосредует клеточный ответ на активацию рецептора NMDA в зависимости от их локализации и включает функцию CREB (cAMP response element binding protein) [122]. Поступление Ca^{2+} через кальциевые каналы L-типа вызывает активацию CREB и, следовательно, увеличение экспрессии гена нейротрофического фактора, происходящего из мозга (brain derived neurotrophic factor - BDNF). Напротив, стимуляция NMDA-рецептора глутаматом вызывала временное увеличение активации CREB, не влияя на экспрессию гена BDNF [26]. В своем исследовании Hardingham с соавт. показали, что глутамат активирует extrasинаптические NMDA-рецепторы, что приводит к ингибированию CREB из-за его дефосфорилирования. С другой стороны, активация синаптических NMDA-рецепторов вызывает фосфорилирование CREB и его повышенную активность. В дополнение к роли CREB в регуляции нервной системы, CREB также, как было показано, опосредует сигнальные пути в CCC. CREB играет важную роль в регуляции пролиферации клеток гладких мышц сосудов [46], при этом его активность связывается с количеством Ca^{2+} [119]. Тем не менее, результаты исследований, непосредственно касающиеся роли NMDA-рецепторов в CCC, гомеостаза Ca^{2+} и CREB, в настоящее время недоступны, но с

учетом вышеизложенных фактов было бы интересно изучить активность CREB в кардиомиоцитах во время активации и ингибирования NMDA-рецепторов.

Во время инсульта, который приводит к гипоксии и ишемии, активация несинаптических NMDA-рецепторов увеличивается, вызывая дисфункцию митохондрий и гибель клеток, в то время как на митохондриальную функцию не влияет активация синаптических NMDA-рецепторов. Кроме того, результаты того же исследования показывают, что состав NMDA-рецепторов, то есть различное содержание отдельных субъединиц, которые входят в их состав, может быть полезным вариантом для их модуляции. А именно, внесинаптические NMDA-рецепторы в ЦНС, в дополнение к субъединице GluN1, преимущественно содержат субъединицу GluN2B, так что введение субъединичных селективных ингибиторов GluN2B, таких как ифенпрофил, предотвращает активацию экstrasинаптических NMDA-рецепторов, тем самым предотвращая дефосфорилирование и ингибирование CREB. Вследствие этого факта, а также важности NMDA-рецепторов в патогенезе значительного числа неврологических расстройств, существует тенденция к разработке селективных ингибиторов NMDA-рецепторов с минимальными или приемлемыми побочными эффектами [37]. Относительно состава субъединиц, которые составляют NMDA-рецепторы, которые существуют в сердце, существуют противоречивые данные, как уже указывалось во вводном разделе. Y.J. Lin с соавт. указали на существование субъединицы GluN2C в различных частях ЦНС крысы, а также в периферических органах, включая сердце [105]. С другой стороны, J.C. Leung с соавт. указывали на существование субъединицы GluN1 в сердце крыс, но они не регистрировали ни один из подтипов субъединицы GluN2 [103]. S. Seeber с соавт. подтвердили существование субъединицы GluN1 в сердце крысы, но указали на существование GluN2B только на эмбриональной стадии развития [157]. Makhro с соавт. продемонстрировали существование субъединиц GluN3A-GluN2D/2B в желудочках сердца крыс, тогда как субъединицы GluN1 и GluN2A и 2C были обнаружены в предсердиях сердца [80]. Интересным результатом является то, что распространенность субъединицы GluN2B увеличивается с возрастом, а также

указывает на связь этой субъединицы с рианодиновыми рецепторами [124]. При изучении эффектов блокаторов NMDA-рецепторов на изолированное сердце крыс было показано, что введение ифенпродила вызывает снижение ЧСС и КП, а также снижение продукции перекиси водорода [166]. Эти результаты указывают на необходимость дополнительных исследований, конкретно направленных на распространенность отдельных субъединиц рецептора NMDA в клеточных популяциях, представленных в сердечной ткани, в первую очередь в сердечной ткани человека, с учетом возможности различных моделей пространственного и временного распределения рецепторов NMDA в сердце у разных видов.

Результаты нашего исследования показали, что введение активаторов рецепторов NMDA, глутамата и (RS) - (тетразол-5-ил) глицина, оказывало более выраженное негативное влияние на кардиодинамические параметры во время посткондиционирования, чем при применении во время прекондиционирования, по сравнению с контрольной группой без кондиционирования. Прекондиционирование с помощью активаторов рецепторов NMDA проявляет слегка защитный эффект. Принимая во внимание все результаты, наблюдался наиболее выраженный защитный эффект блокаторов рецепторов NMDA при посткондиционировании, причем МК-801 обладал более выраженным защитным эффектом по сравнению с мемантином.

Результаты нескольких исследований указывают на защитные эффекты от введения субтоксической дозы NMDA. К. Ogita с соавт. показали, что использование каината приводит к серьезному повреждению пирамидных нейронов, чего не было при применении NMDA [138]. Результаты того же исследования показали, что предварительное применение NMDA предотвращает вызванное каинатом повреждение пирамидных нейронов. Защитные эффекты введения NMDA или активации NMDA были предотвращены с помощью МК-801 [135]. В исследовании, посвященном молекулярным механизмам, связанным с нейропротекцией, индуцированной ишемическим прекондиционированием, было показано, что ишемическое прекондиционирование ингибирует активацию сигнального пути JNK (JNK - c-Jun N-терминальная киназа) посредством

опосредованной NMDA-рецептором активации akt1 (серин/треонин киназа 1) [35]. Препрекондиционирование с помощью NMDA позволило предотвратить эпилептические припадки, вызванные хинолиновой кислотой, а также гибель клеток в гиппокампе [94]. Достигнутые нейропротекторные эффекты были также подавлены в этом исследовании с помощью МК-801. Было показано, что сигнальные пути зависимы от PKA (cyclic AMP-dependent protein kinase – протеинкиназа зависимая от циклического AMP – PKA), PI3K (phosphatidylinositol-3 kinase - фосфатидилинозитол-3 киназа - PI3K) и MAPK/ERK играют ключевую роль в развитии нейропротективных эффектов введения NMDA во время препрекондиционирования [69]. С другой стороны, было показано, что применение блокаторов NMDA-рецепторов оказывает нейропротекторный эффект в случае посткондиционирования, в отличие от препрекондиционирования [66]. Препрекондиционирование нервной ткани имеет терапевтический потенциал в профилактических условиях, таких как операции на головном мозге, в то время как посткондиционирование может представлять терапевтический вариант в таких условиях, как травматическое повреждение головного мозга или инфаркт головного мозга [73].

Результаты этих исследований частично коррелируют с результатами нашего исследования, в то время как полученные различия, в первую очередь в отношении воздействия тестируемых веществ на препрекондиционирование, могут быть обусловлены различным распределением NMDA-рецепторов, а также возможными различиями в составе NMDA-рецепторов в сердце [97].

Результаты исследований, проведенных R.M. Mitchell и др., указывают на интересную связь между этанолом и NMDA-рецепторами [124]. Принимая во внимание результаты эпидемиологических исследований, согласно которым умеренное потребление алкоголя снижает вероятность развития деменции [65], авторы изучили влияние препрекондиционирования этанолом в клеточных культурах мозга крыс на нейропротекцию во время воздействия β -амилоида. Было показано, что препрекондиционирование этанолом приводит к повышенной экспрессии

синаптических NMDA-рецепторов, а также к повышенной экспрессии пероксиредоксина 2, молекулы с антиоксидантными свойствами [74].

Как следует из вышеизложенного, роль NMDA-рецептора преимущественно изучается в ЦНС, при этом исследования, касающиеся NMDA-рецептора и CCC, в основном направлены на изучение взаимосвязи между NMDA-рецепторной активностью в определенных частях мозга и сердечно-сосудистой реакцией в определенных условиях. Однако Y. Liu с соавт. указали на важность NMDA-рецептора в модели ишемии *in vitro* на кардиомиоцитах человека [108]. Депривация кислорода и глюкозы создает условия для ишемии кардиомиоцитов, изучения активности NMDA-рецепторов, проникновения Ca^{2+} , апоптоза и активности нескольких MAPK. Результаты этого исследования показали, что повышенная активация рецептора NMDA вследствие недостатка кислорода и глюкозы вызывает увеличение притока Ca^{2+} и апоптоза. Введение МК-801 или удаление Ca^{2+} из среды предотвращает эти последствия активации рецептора NMDA. Как следствие активации рецептора NMDA, значительное фосфорилирование и активация p38 MAPK приводили к блокированию частично сниженного апоптоза. Авторы исследования указали на важность NMDA-рецепторов в апоптозы, вызванном ишемией. Те же авторы ранее провели исследование, которое несколько похоже на дизайн данного исследования [109]. С использованием модели *ex vivo* ретроградной перфузии сердца Лангендорфа были исследованы эффекты preconditionирования с помощью NMDA, МК-801 и эффекты раствора КХ без Ca^{2+} . Введение NMDA в контрольных условиях без индукции ишемии существенно не изменяло внутриклеточные значения Ca^{2+} . При индукции глобальной ишемии количество внутриклеточного Ca^{2+} значительно увеличилось, причем это увеличение было более выраженным в группе, preconditionированом с NMDA. С другой стороны, введение МК-801 уменьшало вызванное ишемией поступление Ca^{2+} . Аналогично динамике изменения уровней Ca^{2+} изменялись и значения маркеров некроза миокарда, и применение NMDA в контрольных условиях не вызывало изменения значений СК, СК-МВ, LDH, сTnI и сTnT. С другой стороны, введение NMDA до ишемии вызывало более

выраженное увеличение маркеров некроза по сравнению с состояниями, в которых ишемия индуцировалась без preconditionирования, тогда как введение раствора МК-801 или КХ без Ca^{2+} оказывало противоположный эффект. Что касается кардиодинамических параметров, было показано, что введение NMDA при preconditionировании проявляет более выраженный депрессивный эффект, тогда как введение МК-801 оказывает защитный эффект. Аналогичные эффекты наблюдаются при изучении влияния на некроз и апоптоз. Экспериментальный протокол вышеупомянутого исследования наиболее похож на протокол, используемый в данном исследовании, что позволяет наиболее адекватно сравнивать полученные результаты. Результаты этих двух исследований практически полностью коррелируют. Прежде всего, сравнивая значения кардиодинамических параметров, МК-801 является более мощным защитным фактором при preconditionировании, но введение обоих антагонистов NMDA-рецепторов, МК-801 и мемантина, имеет более выраженные защитные эффекты при применении в postconditionировании. Эти результаты, безусловно, являются причиной нарушения динамики изменений Ca^{2+} , влияющих на большое количество внутриклеточных сигнальных путей, которые играют роль в определении исхода ишемии, как показали результаты предыдущих исследований. В частности, причинно-следственная связь между ишемией, Ca^{2+} и функцией миокарда была ранее исследована, показывая, что сердца, подвергшиеся тридцатиминутной ишемии, демонстрируют значительное увеличение Ca^{2+} во время ишемии и имеют более низкую скорость восстановления давления левого желудочка во время реперфузии по сравнению с сердцами, подвергшиеся кратковременной ишемии.

Результаты большого количества исследований указывают на значительную связь между активностью рецептора NMDA и окислительно-восстановительным балансом. Результаты показали выраженный антиоксидантный эффект мемантина с последующей блокадой сердечных NMDA-рецепторов как при preconditionировании, так и при postconditionировании. Предыдущие исследования, экспериментальный дизайн которых включал введение

антагонистов NMDA-рецепторов и глутамата, на изолированном сердце крыс, показали, что антагонисты NMDA-рецепторов оказывают антиоксидантное действие или значения биомаркеров окислительного стресса увеличиваются после их введения, тогда как комбинированное введение глутамата и глицина оказывает прооксидантный эффект [167, 166]. В этих исследованиях значения маркеров окислительного стресса коррелировали с изменениями значений кардиодинамических параметров. На экспериментальной модели гипоксии, вызванной остановкой сердца, вследствие асфиксии у свиней, было показано, что вскоре после гипоксии происходит фосфорилирование NMDA-рецепторов в стриатуме, их активация с последующим увеличением продукции АФК и окислительной модификации белков. Н. Girouard с соавт. показали, что активация рецептора NMDA в мышинном неокортексе приводит к увеличению мозгового кровотока и продукции АФК [66]. Авторы также показали, что увеличение мозгового кровотока, а также увеличение продукции АФК вследствие активацией рецептора NMDA, опосредовано увеличением активности NOS в нейронах и продукцией NO. Введение ингибиторов eNOS приводит к снижению увеличения мозгового кровотока и продукции АФК, вызванной активацией рецептора NMDA. Увеличение продукции АФК вследствие активации рецептора NMDA опосредуется NADPH-оксидазой или изоферментом NOX2, учитывая, что мышцы, которые не экспрессируют NOX2, менее чувствительны к вызванной глутаматом эксцитотоксичности.

Результаты исследований, сфокусированных на изучении влияния ишемии на почки, указывают на значительную роль NMDA-рецепторов и окислительного стресса в развитии повреждений. Было показано, что использование глицина в качестве ко-агониста рецептора NMDA вызывает значительное увеличение повреждения до индукции острого повреждения почек у крыс в результате окклюзии почечной артерии, тогда как использование стрихнина в качестве блокатора связывания глицина для рецепторов NMDA снижает это нарушение. В этом исследовании окислительное повреждение проявлялось в увеличении образования супероксидных анионных радикалов и перекисей липидов, а также в

уменьшении количества восстановленного глутатиона. Подтверждение постулируемой гипотезы о том, что побочные эффекты глицина реализуются посредством активации рецептора NMDA, подтверждается введением кинуреновой кислоты, которая конкурентно ингибирует связывание глицина, тем самым уменьшая побочные эффекты. Аналогичный экспериментальный дизайн, также сфокусированный на почках, с использованием глутаминовой кислоты и спермидина (положительного модулятора активности NMDA-рецепторов) в качестве агонистов вызывал более интенсивное увеличение анализируемых параметров окислительного стресса, но использование антагонистов NMDA-рецепторов с другим механизмом действия показало более интенсивные противоположные эффекты. Результаты исследования показали, что введение антагонистов рецептора NMDA вызывает большее снижение продукции АФК при ишемии, чем введение агонистов, которые, наоборот, вызывают их увеличение. Кроме того, введение антагонистов NMDA-рецепторов вызывает увеличение количества глутатиона и каталазы. На связь между активностью NMDA-рецепторов и окислительным стрессом при индукции ишемической почечной недостаточности также указывает тот факт, что введение агонистов NMDA-рецепторов ослабляет действие используемых антиоксидантов, таких как куркумин.

Подобно нервной системе и почкам, активация NMDA-рецепторов в сердечно-сосудистых тканях приводит к увеличению выработки АФК. В исследовании неонатальных кардиомиоцитов крыс X. Gao с соавт. показали, что NMDA увеличивает внутриклеточные концентрации Ca^{2+} , что приводит к увеличению продукции АФК и индукции апоптоза [65]. Использование блокаторов рецепторов NMDA, МК-801, а также глутатиона и N-ацетилцистеина для нейтрализации свободных радикалов предотвращает ранее упомянутые эффекты NMDA. Практически аналогичные результаты были получены в предыдущем исследовании, посвященном клеткам нервной системы. Изучение роли NMDA-рецептора в CCC главным образом направлено на изучение побочных эффектов гомоцистеина. Учитывая, что гомоцистеин, по крайней мере

частично, оказывает вредное воздействие на сердечно-сосудистые структуры в организме, активируя NMDA-рецепторы, вызывая тем самым атеросклероз. Различные изоформы гомоцистеина проявляют различную токсичность, причем DL-гомоцистеин тиолактон считается наиболее токсичным. Результаты исследования, протокол эксперимента которого включал введение тиолактона DL-гомоцистеина и МК-801, показали, что введение блокаторов NMDA-рецепторов снижает негативные эффекты гомоцистеина. В частности, МК-801 проявлял антиоксидантные свойства по сравнению с гомоцистеином.

Исходя из результатов предыдущих исследований, а также результатов данного исследования, можно сделать вывод, что связь между NMDA-рецептором, Ca^{2+} и окислительным стрессом в сердечной ткани и ССС в целом является важной осью для появления большого числа патофизиологических состояний. Также было показано, что активация NMDA-рецепторов приводит к более интенсивной работе соответствующих сигнальных путей, которые могут иметь разные результаты, в зависимости от состояния, вызывающего активацию самих рецепторов.

Учитывая специфическую структуру и функцию NMDA-рецепторов, а также их широкое распространение в организме и опосредование большого количества сигнальных путей, эти рецепторы являются постоянной проблемой для терапевтического действия при многих патологических состояниях, включая ССС.

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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бакулин, И.С. Эндотелиальная дисфункция и окислительный стресс при церебральном атеросклерозе и возможности их патогенетической коррекции/ И.С. Бакулин, М.М. Танашян, А.А. Раскуражев// Нервные болезни. - 2018. - №2. - С. 3-11.
2. Бахарева, Ю.О. Синаптическая пластичность первичной зрительной коры на модели фотоповреждения сетчатки, коррекция N-тирозолом/ Ю.О. Бахарева, М.А. Сагнаева, Е.Ю. Варакута и др.// Морфология. - 2019. - Т.156. - №6. - С. 84.
3. Висмонт, Ф.И. Кардиопротекторная эффективность дистантного ишемического preconditionирования при ишемии-реперфузии миокарда у крыс с экспериментальной дислипидемией/ Ф.И. Висмонт, С.Н. Чепелев, А.Н. Глебов и др.// Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия медицинских наук. - 2018. - Т.15. - №2. - С. 215-221.
4. Евдокимов, Д.В. Двойственные трансдукционные функции нейрональных глутаматных рецепторов N-метил-D-аспартата и их роль в физиологии и патологии головного мозга/ Д.В. Евдокимов, Ю.В. Кузнецов, Ю.В. Сидорова// Университетская клиника. - 2020. - №2(35). - С. 67-77.
5. Еникеева, Р.Ф. Роль генов регуляции синаптической пластичности в формировании индивидуальных различий в объеме рабочей памяти/ Р.Ф. Еникеева, М.М. Лобаскова, А.В. Казанцева и др.// Теоретическая и экспериментальная психология. - 2017. - Т.10. - №4. - С. 6-15.
6. Зинченко, В.П. Визуализация, свойства и функции гамкергических нейронов гиппокампа, содержащих проницаемые для кальция каинатные и AMPA-рецепторы/ В.П. Зинченко, С.Г. Гайдин, И.Ю. Теплов и др.// Биологические мембраны. - 2020. - Т.37. - №1. - С. 22-33.
7. Кичерова, О.А. Роль окислительного стресса в патогенезе неврологических заболеваний/ О.А. Кичерова, Л.И. Рейхерт// Медицинская наука и образование Урала. - 2019. - Т.20. - №2(98). - С. 192-195.

8. Котова, Ю.А. Изучение маркеров повреждения эндотелия, окислительного и клеточного стресса у коморбидных больных ИБС с различной выраженностью коронарного атеросклероза/ Ю.А. Котова, А.А. Зуйкова, Н.В. Страхова, О.Н. Красноруцкая// Медико-фармацевтический журнал Пульс. - 2020. - Т.22. - №6. - С. 16-20.
9. Наумовская, Н.А. Мемантин в лечении болезни Альцгеймера: 12-недельное сравнительное рандомизированное открытое клиническое испытание лекарственных средств Мемодекс и Эбикса/ Н.А. Наумовская, И.А. Леявко, Т.С. Голубева и др.// Неврология и нейрохирургия. Восточная Европа. - 2020. - Т.10. - №1. - С. 139-149.
- 10.Нестерова, М.В. Актуальные аспекты диагностики и лечения болезни Альцгеймера на основе современных зарубежных рекомендаций/ М.В. Нестерова// Медицинский совет. - 2018. - №6. - С. 33-37.
- 11.Переверзев, А.П. Безопасность применения ингибиторов холинэстеразы и антагонистов NMDA-рецепторов для лечения пациентов с деменцией/ А.П. Переверзев, О.Д. Остроумова, О.Н. Ткачева, Ю.В. Котовская// Безопасность и риск фармакотерапии. - 2019. - Т.7. - №4. - С. 190-199.
- 12.Пилипович, А.А. Новые стратегии диагностики и лечения болезни Альцгеймера: моноклональные антитела к бета-амилоиду/ А.А. Пилипович, А.Б. Данилов// Медицинский алфавит. - 2019. - Т.1. - №2(377). - С. 35-42.
- 13.Рубаненко, О.А. Клинические, эхокардиографические показатели и маркеры окислительного стресса, ассоциированные с развитием фибрилляции предсердий у пациентов, подвергающихся операции коронарного шунтирования/ О.А. Рубаненко, А.О. Рубаненко, Ю.В. Щукин и др.// Российский кардиологический журнал. - 2020. - Т.25. - №7. - С. 72-79.
- 14.Труфанов, Е.А. Болезнь Альцгеймера: стандарты диагностики и лечения/ Е.А. Труфанов// Психиатрия, психотерапия и клиническая психология. - 2018. - Т.9. - №4. - С. 608-614.

15. Фурман, Ю.В. Окислительный стресс и антиоксиданты/ Ю.В. Фурман, Е.Б. Артюшкова, А.В. Аниканов// Актуальные проблемы социально-гуманитарного и научно-технического знания. - 2019. - №1(17). - С. 1-3.
16. Abushik, P.A. The role of NMDA and mGluR5 receptors in calcium mobilization and neurotoxicity of homocysteine in trigeminal and cortical neurons and glial cells/P.A. Abushik, M. Niittykoski, R. Giniatullina et al.// J Neurochem. - 2014. - №.129(2). - P.264-274.
17. Akanuma, S. Transporter-mediated L-glutamate elimination from cerebrospinal fluid: possible involvement of excitatory amino acid transporters expressed in ependymal cells and choroid plexus epithelial cells/S. Akanuma, T. Sakurai, M. Tachikawa et al.// Fluids Barriers CNS. - 2015. - №.12. - P.11.
18. Aow, J. Conformational signaling required for synaptic plasticity by the NMDA receptor complex/J. Aow, K. Dore, R. Malinow// Proc Natl Acad Sci U S A. - 2015. - №.112(47). - P.14711-14716.
19. Atlason, P.T. N-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunit NR1 forms the substrate for oligomeric assembly of the NMDA receptor/P.T. Atlason, M.L. Garside, E. Meddows et al.// J Biol Chem. - 2007. - №.282(35). - P.25299-25307.
20. Auclair, C. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenvald RA (ed) Handbook of methods for oxygen radical research/C. Auclair, E. Voisin// CRC Press Une, Boca Raton. – 1985. – P.123-132.
21. Baines, C.P. The mitochondrial permeability transition pore and ischemia-reperfusion injury/C.P. Baines// Basic research in cardiology. - 2009. - №.104(2). - P. 181-188.
22. Baines, C.P. The molecular composition of the mitochondrial permeability transition pore/C.P. Baines// Journal of molecular and cellular cardiology. - 2009. - №.46(6). - P. 850-857.
23. Bell, R.M. Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion/R.M. Bell, M.M. Mocanu, D.M. Yellon// J Mol Cell Cardiol. - 2011. - №.50(6). - P.940-950.

24. Burnell, E.S. Positive and Negative Allosteric Modulators of N-Methyl-d-aspartate (NMDA) Receptors: Structure-Activity Relationships and Mechanisms of Action/ E.S. Burnell, M. Irvine, G. Fang, et al.// J Med Chem. – 2019. - №62(1). – P.3-23.
25. Blanpied, T.A. Trapping channel block of NMDA-activated responses by amantadine and memantine/T.A. Blanpied, F.A. Boeckman, E. Aizenman, J.W. Johnson// J Neurophysiol. - 1997. - №.77(1). - P.309-323.
26. Boeck, C.R. NMDA preconditioning protects against seizures and hippocampal neurotoxicity induced by quinolinic acid in mice/C.R. Boeck, M. Ganzella, A. Lottermann, D. Vendite// Epilepsia. - 2004. - №.45(7). - P.745-750.
27. Bolshakov, K.V. Determinants of trapping block of N-methyl-d-aspartate receptor channels/K.V. Bolshakov, V.E. Gmiro, D.B. Tikhonov, L.G. Magazanik// J Neurochem. - 2003. - №.87(1). - P.56-65.
28. Bond, A. NMDA receptor antagonism, but not AMPA receptor antagonism attenuates induced ischaemic tolerance in the gerbil hippocampus/A. Bond, D. Lodge, C.A. Hicks et al.// Eur J Pharmacol. - 1999 Sep 10. - №.380(2-3). - P.91-99.
29. Bórquez, D.A. Dissecting the role of redox signaling in neuronal development/D.A. Bórquez, P.J. Urrutia, C. Wilson et al.// J Neurochem. - 2016. - №.137(4). - P.506-517.
30. Bozic, M. Glutamatergic signaling maintains the epithelial phenotype of proximal tubular cells/M. Bozic, J. de Rooij, E. Parisi et al.// J Am Soc Nephrol. - 2011. - №.22(6). - P.1099-1111.
31. Bozic, M. The potential of targeting NMDA receptors outside the CNS/M. Bozic, J.M. Valdivielso// Expert Opin Ther Targets. - 2015. - №.19(3). - P.399-413.
32. Brauneis, U. Differential sensitivity of recombinant N-methyl-D-aspartate receptor subunits to inhibition by dynorphin/U. Brauneis, M. Oz, R.W. Peoples et al.// J Pharmacol Exp Ther. - 1996. - №.279(3). - P.1063-1068.

33. Broadhead, M.W. KATP channel activation induces ischemic preconditioning of the endothelium in humans in vivo/M.W. Broadhead, R.K. Kharbanda, M.J. Peters, R.J. MacAllister// *Circulation*. - 2004. - №.110(15). - P. 2077-2082.
34. Burnashev, N. Control by asparagine residues of calcium permeability and magnesium blockade in the NMDA receptor/N. Burnashev, R. Schoepfer, H. Monyer et al.// *Science*. - 1992. - №.257(5075). - P.1415-1419.
35. Camargo, L.H. Involvement of N-methyl-D-aspartate glutamate receptor and nitric oxide in cardiovascular responses to dynamic exercise in rats/L.H. Camargo, F.H. Alves, C. Biojone et al.// *Eur J Pharmacol*. - 2013. - №.713(1-3). - P.16-24.
36. Carden, D.L. Pathophysiology of ischaemia–reperfusion injury/T. Kalogeris, C.P. Baines, M. Krenz, R.J. Korthuis// *The Journal of pathology*. - 2000. - №.190(3). - P. 255-266.
37. Celso Constantino, L. The Role of NMDA Receptors in the Development of Brain Resistance through Pre- and Postconditioning/L. Celso Constantino, C.I. Tasca, C.R. Boeck// *Aging Dis*. - 2014. - №.5(6). - P.430-441.
38. Chatterton, J.E. Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits/J.E. Chatterton, M. Awobuluyi, L.S. Premkumar et al.// *Nature*. - 2002. - №.415(6873). - P.793-798.
39. Chen, H. Identification of a homocysteine receptor in the peripheral endothelium and its role in proliferation/H. Chen, R. Fitzgerald, A.T. Brown et al.// *J Vasc Surg*. - 2005. - №.41(5). - P.853-860.
40. Collard, C.D. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury/C.D. Collard, S. Gelman// *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists*. - 2001. - №.94(6). - P. 1133-1138.
41. Collingridge, G.L. A nomenclature for ligand-gated ion channels/G.L. Collingridge, R.W. Olsen, J. Peters, M. Spedding// *Neuropharmacology*. - 2009. - №.56(1). - P.2-5.

42. Croall, D.E. The calpains: modular designs and functional diversity/D.E. Croall, K. Ersfeld// *Genome biology*. - 2007. - №.8(6). - P. 218.
43. Dalva, M.B. EphB receptors interact with NMDA receptors and regulate excitatory synapse formation/M.B. Dalva, M.A. Takasu, M.Z. Lin et al.// *Cell*. - 2000. - №.103(6). - P.945-956.
44. D'Amico, M. Arrhythmias induced by myocardial ischaemia-reperfusion are sensitive to ionotropic excitatory amino acid receptor antagonists/M. D'Amico, C. Di Filippo, F. Rossi, F. Rossi// *Eur J Pharmacol*. - 1999. - №.366(2-3). - P.167-174.
45. Das, S.R. Relationship between mRNA expression of splice forms of the zeta1 subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor and spatial memory in aged mice/S.R. Das, K.R. Magnusson// *Brain Res*. - 2008. - №.1207. - P.142-154.
46. de Araújo Herculano, B. NMDA preconditioning protects against quinolinic acid-induced seizures via PKA, PI3K and MAPK/ERK signaling pathways/B. de Araújo Herculano, S. Vandresen-Filho, W.C. Martins et al.// *Behav Brain Res*. - 2011. - №.219(1). - P.92-97.
47. de Sousa, S.L. Contrasting synaptic actions of the inhalational general anesthetics isoflurane and xenon/S.L. de Sousa, R. Dickinson, W.R. Lieb, N.P. Franks// *Anesthesiology*. - 2000. - №.92(4). - P.1055-1066.
48. Di Lisa, F. Mitochondria and ischemia–reperfusion injury of the heart: fixing a hole/F. Di Lisa, P. Bernardi// *Cardiovascular research*. - 2006. - №.70(2). - P. 191-199.
49. Dickinson, R. Competitive inhibition at the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor by the anesthetics xenon and isoflurane: evidence from molecular modeling and electrophysiology/R. Dickinson, B.K. Peterson, P. Banks et al.// *Anesthesiology*. - 2007. - №.107(5). - P.756-767.
50. Döring, H.J. The isolated perfused heart according to Langendorff technique--function--application/H.J. Döring// *Physiol Bohemoslov*. - 1990. - №.39(6). - P.481-504.

51. Downey, J.M. Signaling pathways in ischemic preconditioning/J.M. Downey, A.M. Davis, M.V. Cohen// Heart failure reviews. - 2007. - №.12(3-4). - P. 181-188.
52. Dravid, S.M. Subunit-specific mechanisms and proton sensitivity of NMDA receptor channel block/S.M. Dravid, K. Erreger, H. Yuan et al.// J Physiol. - 2007. - №.581(Pt 1). - P.107-128.
53. Dröge, W. Free radicals in the physiological control of cell function/W. Dröge// Physiol Rev. - 2002. - №.82(1). - P.47-95.
54. Dudley, S.C. Jr. Atrial fibrillation increases production of superoxide by the left atrium and left atrial appendage: role of the NADPH and xanthine oxidases/S.C. Jr Dudley, N.E. Hoch, L.A. McCann et al.// Circulation. - 2005. - №.112(9). - P.1266-1273.
55. Đukić, M. Oxidative stress: Clinical diagnostic significance/M. Đukić, M. Ninković, M. Jovanović// Journal of Medical Biochemistry. - 2008. - №.27(4). - P.409-425.
56. Dzubay, J.A. Kinetics of NMDA channel opening/J.A. Dzubay, C.E. Jahr// J Neurosci. - 1996. - №.16(13). - P.4129-4134.
57. Esposito, L.A. Mitochondrial oxidative stress in mice lacking the glutathione peroxidase-1 gene/L.A. Esposito, J.E. Kokoszka, K.G. Waymire et al.// Free Radic Biol Med. - 2000. - №.28(5). - P.754-766.
58. Fahlke, C. Molecular physiology of EAAT anion channels/C. Fahlke, D. Kortzak, J.P. Machtens// Pflugers Arch. - 2016. - №.468(3). - P.491-502.
59. Foster, T.C. Dissecting the age-related decline on spatial learning and memory tasks in rodent models: N-methyl-D-aspartate receptors and voltage-dependent Ca^{2+} channels in senescent synaptic plasticity/T.C. Foster// Prog Neurobiol. - 2012. - №.96(3). - P.283-303.
60. Funahashi, S. Mnemonic coding of visual space in the monkey's dorsolateral prefrontal cortex/S. Funahashi, C.J. Bruce, P.S. Goldman-Rakic// J Neurophysiol. - 1989. - №.61(2). - P.331-349.

61. Furukawa, H. Mechanisms of activation, inhibition and specificity: crystal structures of the NMDA receptor NR1 ligand-binding core/H. Furukawa, E. Gouaux// *EMBO J.* - 2003. - №.22(12). - P.2873-2885.
62. Furukawa, H. Subunit arrangement and function in NMDA receptors/ H. Furukawa, S.K. Singh, R. Mancusso, E. Gouaux// *Nature.* - 2005. - №.438(7065). - P.185-192.
63. Ganote, C.E. Adenosine and preconditioning in the rat heart/C.E. Ganote, S.C. Armstrong// *Cardiovascular research.* - 2000. - №.45(1). - P. 134-140.
64. Gao, X. NMDA receptor activation induces mitochondrial dysfunction, oxidative stress and apoptosis in cultured neonatal rat cardiomyocytes/X. Gao, X. Xu, J. Pang et al.// *Physiol Res.* - 2007. - №.56(5). - P.559-569.
65. Gao, X. NMDA receptor activation induces mitochondrial dysfunction, oxidative stress and apoptosis in cultured neonatal rat cardiomyocytes/X. Gao, X. Xu, J. Pang et al.// *Physiol Res.* - 2007. - №.56(5). - P.559-569.
66. Girouard, H. NMDA receptor activation increases free radical production through nitric oxide and NOX2/H. Girouard, G. Wang, E.F. Gallo et al.// *J Neurosci.* - 2009. - №.29(8). - P.2545-2552.
67. Goldman-Rakic, P.S. Cellular basis of working memory/P.S. Goldman-Rakic// *Neuron.* - 1995. - №.14(3). - P.477-485.
68. Gore, A.C. Age-related changes in hypothalamic gonadotropin-releasing hormone and N-methyl-D-aspartate receptor gene expression, and their regulation by oestrogen, in the female rat/A.C. Gore, T. Oung, M.J. Woller// *J Neuroendocrinol.* - 2002. - №.14(4). - P.300-309.
69. Govoruskina, N. The effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade on oxidative status in heart during conditioning maneuvers/N. Govoruskina, I. Srejovic, S. Bolevich et al.// *Ser J Exp Clin Res.* - 2019. - №.20(4). - P.343-350.
70. Green, L.C. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids/L.C. Green, D.A. Wagner, J. Glogowski et al.// *Anal Biochem.* - 1982. - №.126. - P.131-138.

71. Greer, P.L. From synapse to nucleus: calcium-dependent gene transcription in the control of synapse development and function/P.L. Greer, M.E. Greenberg// *Neuron*. - 2008. - №.59(6). - P.846-860.
72. Griffiths, H.R. Redox regulation in metabolic programming and inflammation/H.R. Griffiths, D. Gao, C. Pararasa// *Redox Biol.* - 2017. - №.12. - P.50-57.
73. Guemez-Gamboa, A. Activation of NOX2 by the stimulation of ionotropic and metabotropic glutamate receptors contributes to glutamate neurotoxicity in vivo through the production of reactive oxygen species and calpain activation/A. Guemez-Gamboa, A.M. Estrada-Sánchez, T. Montiel et al.// *J Neuropathol Exp Neurol.* - 2011. - №.70(11). - P.1020-1035.
74. Gunasekar, P.G. NMDA receptor activation produces concurrent generation of nitric oxide and reactive oxygen species: implication for cell death/P.G. Gunasekar, A.G. Kanthasamy, J.K. Borowitz, G.E. Isom// *J Neurochem.* - 1995. - №.65(5). - P.2016-2021.
75. Halliwell, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life/B. Halliwell// *Plant Physiol.* - 2006 Jun. - №.141(2). - P.312-322.
76. Hausenloy, D.J. Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion/D.J. Hausenloy, A. Tsang, M.M. Mocanu, D.M. Yellon// *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* - 2005. - №.288(2). - P.H971-976.
77. Hausenloy, D.J. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target/D.J. Hausenloy, D.M. Yellon// *The Journal of clinical investigation.* - 2013. - №.123(1). - P. 92-100.
78. Hausenloy, D.J. Survival kinases in ischemic preconditioning and postconditioning/D.J. Hausenloy, D.M. Yellon// *Cardiovascular research.* - 2006. - №.70(2). - P. 240-253.
79. Headrick, J.P. Adenosine receptors and reperfusion injury of the heart. In *Adenosine Receptors in Health and Disease*/ J.P. Headrick, R.D. Lasley// Springer, Berlin, Heidelberg. - 2009. - P. 189-214.

80. Hicks, C.A. Evaluation of glycine site antagonists of the NMDA receptor in global cerebral ischaemia/C.A. Hicks, M.A. Ward, N. Ragumoorthy et al.// *Brain Res.* - 1999. - №.819(1-2). - P.65-74.
81. Ibacache, M. Dexmedetomidine preconditioning activates pro-survival kinases and attenuates regional ischemia/reperfusion injury in rat heart/M. Ibacache, G. Sanchez, Z. Pedrozo et al.// *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease.* - 2012. - №.1822(4). - P.537-545.
82. Idigo, W.O. Regulation of endothelial nitric-oxide synthase (NOS) S-glutathionylation by neuronal NOS: evidence of a functional interaction between myocardial constitutive NOS isoforms/W.O. Idigo, S. Reilly, M.H. Zhang et al.// *J Biol Chem.* - 2012. - №.287(52). - P.43665-43673.
83. Johnson, J.W. Recent insights into the mode of action of memantine and ketamine/J.W. Johnson, N.G. Glasgow, N.V. Povysheva// *Curr Opin Pharmacol.* - 2015 Feb. - №.20. - P.54-63.
84. Kalogeris, T. Cell biology of ischemia/reperfusion injury/T. Kalogeris, C.P. Baines, M. Krenz, R.J. Korthuis// *International review of cell and molecular biology.* - 2012. - №.298. - P. 229-317.
85. Kaminski, K.A. Oxidative stress and neutrophil activation—the two keystones of ischemia/reperfusion injury/K.A. Kaminski, T.A. Bonda, J. Korecki, W.J. Musial// *International journal of cardiology.* - 2002. - №.86(1). - P. 41-59.
86. Karakas, E. Structure of the zinc-bound amino-terminal domain of the NMDA receptor NR2B subunit/E. Karakas, N. Simorowski, H. Furukawa// *EMBO J.* - 2009. - №.28(24). - P.3910-3920.
87. Kash, T.L. Alcohol inhibits NR2B-containing NMDA receptors in the ventral bed nucleus of the stria terminalis/T.L. Kash, R.T. Matthews, D.G. Winder// *Neuropsychopharmacology.* - 2008. - №.33(6). - P.1379-1390.
88. Khaliulin, I. Temperature preconditioning is optimal at 26 C and confers additional protection to hypothermic cardioplegic ischemic arrest/I. Khaliulin, A.P. Halestrap, M.S. Suleiman// *Experimental Biology and Medicine.* - 2011. - №.236(6). - P. 736-745.

89. Khan, S.A. Neuronal nitric oxide synthase negatively regulates xanthine oxidoreductase inhibition of cardiac excitation-contraction coupling/S.A. Khan, K. Lee, K.M. Minhas et al.// *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 2004. - №.101(45). - P.15944-15948.
90. Khan, S.A. Rapamycin confers preconditioning-like protection against ischemia–reperfusion injury in isolated mouse heart and cardiomyocytes/S.A. Khan, F. Salloum, A. Das et al.// *Journal of molecular and cellular cardiology*. - 2006. - №.41(2). - P. 256-264.
91. Kim, Y.M. A myocardial Nox2 containing NAD(P)H oxidase contributes to oxidative stress in human atrial fibrillation/Y.M. Kim, T.J. Guzik, Y.H. Zhang et al.// *Circ Res*. - 2005. - №.97(7). - P.629-636.
92. Kim, Y.M. Association of atrial nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity with the development of atrial fibrillation after cardiac surgery/Y.M. Kim, H. Kattach, C. Ratnatunga et al.// *J Am Coll Cardiol*. - 2008. - №.51(1). - P.68-74.
93. Kleckner, N.W. Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes/N.W. Kleckner, R. Dingledine// *Science*. - 1988. - №.241(4867). - P.835-837.
94. Kleiber, A.C. Exercise training normalizes enhanced glutamate-mediated sympathetic activation from the PVN in heart failure/A.C. Kleiber, H. Zheng, H.D. Schultz et al.// *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. - 2008. - №.294(6). - P.R1863-1872.
95. Kohr, M.J. Simultaneous measurement of protein oxidation and S-nitrosylation during preconditioning and ischemia/reperfusion injury with resin-assisted capture/M.J. Kohr, J. Sun, A. Aponte et al.// *Circ Res*. - 2011. - №.108(4). - P.418-426.
96. Kolodney, G. Nuclear compartmentalization of serine racemase regulates d-serine production. Implications for n-methyl-d-aspartate (NMDA) receptor activation/G. Kolodney, E. Dumin, H. Safory et al.// *J Biol Chem*. - 2016. - №.291(6). - P.2630.

97. Kumar, A. Linking redox regulation of NMDAR synaptic function to cognitive decline during aging/A. Kumar, T.C. Foster// J Neurosci. - 2013. - №.33(40). - P.15710-15715.
98. Kumar, A. NMDA Receptor Function During Senescence: Implication on Cognitive Performance/A. Kumar// Front Neurosci. - 2015. - №.9. - P.473.
99. Laketić-Ljubojević, I. Functional characterization of N-methyl-D-aspartic acid-gated channels in bone cells/I. Laketić-Ljubojević, L.J. Suva, F.J. Maathuis et al.// Bone. - 1999. - №.25(6). - P.631-637.
100. LeMaistre, J.L. Coactivation of NMDA receptors by glutamate and D-serine induces dilation of isolated middle cerebral arteries/J.L. LeMaistre, S.A. Sanders, M.J. Stobart et al.// J Cereb Blood Flow Metab. - 2012. - №.32(3). - P.537-547.
101. Lerma, J. In vivo determination of extracellular concentration of amino acids in the rat hippocampus. A method based on brain dialysis and computerized analysis/J. Lerma, A.S. Herranz, O. Herreras et al.// Brain Res. - 1986. - №.384(1). - P.145-155.
102. Lester, R.A. Channel kinetics determine the time course of NMDA receptor-mediated synaptic currents/R.A. Lester, J.D. Clements, G.L. Westbrook, C.E. Jahr// Nature. - 1990. - №.346(6284). - P.565-567.
103. Leung, J.C. Expression and developmental regulation of the NMDA receptor subunits in the kidney and cardiovascular system/J.C. Leung, B.R. Travis, J.W. Verlander et al.// Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. - 2002. - №.283(4). - P.R964-971.
104. Lin, J.W. Yotiao, a novel protein of neuromuscular junction and brain that interacts with specific splice variants of NMDA receptor subunit NR1/J.W. Lin, M. Wyszynski, R. Madhavan et al.// J Neurosci. - 1998. - №.18(6). - P.2017-2027.
105. Lin, Y.J. Cloning of the cDNA for the human NMDA receptor NR2C subunit and its expression in the central nervous system and periphery/Y.J. Lin, S. Bovetto, J.M. Carver, T. Giordano// Brain Res Mol Brain Res. - 1996. - №.43(1-2). - P.57-64.

106. Pirillo, A. The Interplay of Lipids, Lipoproteins, and Immunity in Atherosclerosis/ A. Pirillo, F. Bonacina, G.D. Norata, A.L. Catapano// *Curr Atheroscler Rep.* – 2018. - №20(3). – P.12.
107. Liu, X.B. Switching of NMDA receptor 2A and 2B subunits at thalamic and cortical synapses during early postnatal development/X.B. Liu, K.D. Murray, E.G. Jones// *J Neurosci.* - 2004. - №.24(40). - P.8885-8895.
108. Liu, Y. A preliminary experimental study on the cardiac toxicity of glutamate and the role of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor in rats/Y. Liu, L. Zhou, H.F. Xu et al.// *Chin Med J (Engl).* - 2013. - №.126(7). - P.1323-1332.
109. Liu, Y.O. Ischemic preconditioning protects against infarction in rat heart/Y.O. Liu, J.M. Downey// *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.* - 1992. - №.263(4). - P. 1107-1112.
110. Lomeli, H. Control of kinetic properties of AMPA receptor channels by nuclear RNA editing/H. Lomeli, J. Mosbacher, T. Melcher et al.// *Science.* - 1994. - №.266(5191). - P.1709-1713.
111. Magi, S. Glutamate-induced ATP synthesis: relationship between plasma membrane $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger and excitatory amino acid transporters in brain and heart cell models/S. Magi, S. Arcangeli, P. Castaldo et al.// *Mol Pharmacol.* - 2013. - №.84(4). - P.603-614.
112. Magnusson, K.R. The effects of aging on different C-terminal splice forms of the zeta1(NR1) subunit of the N-methyl-d-aspartate receptor in mice/K.R. Magnusson, L. Bai, X. Zhao// *Brain Res Mol Brain Res.* - 2005. - №.135(1-2). - P.141-149.
113. Maldonado, C. Hyperhomocysteinemia and sudden cardiac death: potential arrhythmogenic mechanisms/C. Maldonado, C.V. Soni, N.D. Todnem et al.// *Curr Vasc Pharmacol.* - 2010. - №.8(1). - P.64-74.
114. Martin, S.J. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis/S.J. Martin, P.D. Grimwood, R.G. Morris// *Annu Rev Neurosci.* - 2000. - №.23. - P.649-711.

115. Matsuda, K. Specific assembly with the NMDA receptor 3B subunit controls surface expression and calcium permeability of NMDA receptors/K. Matsuda, M. Fletcher, Y. Kamiya, M. Yuzaki// *J Neurosci.* - 2003. - №.23(31). - P.10064-10073.
116. Mayer, M.L. Glutamate receptors at atomic resolution/M.L. Mayer// *Nature.* - 2006. - №.440(7083). - P.456-462.
117. Mayer, M.L. Structure and function of glutamate receptor ion channels/M.L. Mayer, N. Armstrong// *Annu Rev Physiol.* - 2004. - №.66. - P.161-181.
118. McGee, M.A. Enhanced vascular neuronal nitric-oxide synthase-derived nitric-oxide production underlies the pressor response caused by peripheral N-methyl-D-aspartate receptor activation in conscious rats/M.A. McGee, A.A. Abdel-Rahman// *J Pharmacol Exp Ther.* - 2012. - №.342(2). - P.461-471.
119. McMurtrey, R.J. Isoflurane preconditioning and postconditioning in rat hippocampal neurons/R.J. McMurtrey, Z. Zuo// *Brain Res.* - 2010 Oct 28. - №.1358. - P.184-190.
120. Mealing, G.A. Differences in degree of trapping of low-affinity uncompetitive N-methyl-D-aspartic acid receptor antagonists with similar kinetics of block/G.A. Mealing, T.H. Lanthorn, C.L. Murray et al.// *J Pharmacol Exp Ther.* - 1999. - №.288(1). - P.204-210.
121. Meneghini, A. Memantine prevents cardiomyocytes nuclear size reduction in the left ventricle of rats exposed to cold stress/A. Meneghini, C. Ferreira, L.C. Abreu et al.// *Clinics (Sao Paulo).* - 2009. - №.64(9). - P.921-926.
122. Miao, B. Neuroprotective effects of preconditioning ischemia on ischemic brain injury through down-regulating activation of JNK1/2 via N-methyl-D-aspartate receptor-mediated Akt1 activation/B. Miao, X.H. Yin, D.S. Pei et al.// *J Biol Chem.* - 2005. - №.280(23). - P.21693-21699.
123. Minners, J. Dinitrophenol, cyclosporin A, and trimetazidine modulate preconditioning in the isolated rat heart: support for a mitochondrial role in cardioprotection/J. Minners, E.J. van den Bos, D.M. Yellon et al.// *Cardiovascular research.* - 2000. - №.47(1). - P.68-73.

124. Mitchell, R.M. Ethanol preconditioning of rat cerebellar cultures targets NMDA receptors to the synapse and enhances peroxiredoxin 2 expression/R.M. Mitchell, N. Tajuddin, E.M. Campbell et al.// *Brain Res.* - 2016. - №.1642. - P.163-169.
125. Mony, L. Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors. - P. molecular mechanisms and therapeutic potential/L. Mony, J.N. Kew, M.J. Gunthorpe, P. Paoletti// *Br J Pharmacol.* - 2009. - №.157(8). - P.1301-1317.
126. Monyer, H. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors/H. Monyer, N. Burnashev, D.J. Laurie et al.// *Neuron.* - 1994. - №.12(3). - P.529-540.
127. Morhenn, V.B. Evidence for an NMDA receptor subunit in human keratinocytes and rat cardiocytes/V.B. Morhenn, N.S. Waleh, J.N. Mansbridge et al.// *Eur J Pharmacol.* - 1994. - №.268(3). - P.409-414.
128. Moroni, F. The presence of N-methyl-D-aspartate-type receptors for glutamic acid in the guinea pig myenteric plexus/F. Moroni, S. Luzzi, S. Franchi-Micheli, L. Zilletti// *Neurosci Lett.* - 1986. - №.68(1). - P.57-62.
129. Morris, R.G. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5/R.G. Morris, E. Anderson, G.S. Lynch, M. Baudry// *Nature.* - 1986. - №.319(6056). - P.774-776.
130. Moshal, K.S. Mitochondrial matrix metalloproteinase activation decreases myocyte contractility in hyperhomocysteinemia/K.S. Moshal, S.M. Tipparaju, T.P. Vacek et al.// *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* - 2008. - №.295(2). - P.890-897.
131. Mothet, J.P. Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and SNARE protein-dependent release of the gliotransmitter D-serine/J.P. Mothet, L. Pollegioni, G. Ouanounou et al.// *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2005. - №.102(15). - P.5606-5611.
132. Murry, C.E. Preconditioning with ischaemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium/C.E. Murry, R.B. Jennings, K.A. Reimer// *Circulation.* - 1986. - №.74(5). - P. 1124–1136.

133. Nahum-Levy, R. Desensitization of NMDA receptor channels is modulated by glutamate agonists/R. Nahum-Levy, D. Lipinski, S. Shavit, M. Benveniste// *Biophys J.* - 2001. - №.80(5). - P.2152-2166.
134. Näsström, J. Tissue distribution of two NMDA receptor antagonists, [3H]CGS 19755 and [3H]MK-801, after intrathecal injection in mice/J. Näsström, E. Böö, M. Ståhlberg, O.G. Berge// *Pharmacol Biochem Behav.* - 1993. - №.44(1). - P.9-15.
135. Neafsey, E.J. Moderate alcohol consumption and cognitive risk/E.J. Neafsey, M.A. Collins// *Neuropsychiatr Dis Treat.* - 2011. - №.7. - P.465-484.
136. Nishikawa, T. Stimulation of catecholamine release from isolated adrenal glands by some amino acids/T. Nishikawa, K. Morita, K. Kinjo, A. Tsujimoto// *Jpn J Pharmacol.* - 1982. - №.32(2). - P.291-297.
137. O'Donnell, C.J. Genomics of cardiovascular disease/C.J. O'Donnell, E.G. Nabel// *New England Journal of Medicine.* - 2011. - №.365(22). - P. 2098-2109.
138. Ogita, K. In vivo neuroprotective role of NMDA receptors against kainate-induced excitotoxicity in murine hippocampal pyramidal neurons/K. Ogita, H. Okuda, Y. Yamamoto et al.// *J Neurochem.* - 2003. - №.85(5). - P.1336-1346.
139. Ohkawa, H. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction/H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi// *Anal Biochem.* - 1979. - №.95. - P.351-358.
140. Ota, H. Protective effects of NMDA receptor antagonist, memantine, against senescence of PC12 cells: A possible role of nNOS and combined effects with donepezil/H. Ota, S. Ogawa, Y. Ouchi, M. Akishita// *Exp Gerontol.* - 2015. - №.72. - P.109-116.
141. Panatier, A. Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory/A. Panatier, D.T. Theodosis, J.P. Mothet et al.// *Cell.* - 2006. - №.125(4). - P.775-784.
142. Panatier, A. Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory/A. Panatier, D.T. Theodosis, J.P. Mothet et al.// *Cell.* - 2006. - №.125(4). - P.775-784.

143. Paoletti, P. Zinc at glutamatergic synapses/P. Paoletti, A.M. Vergnano, B. Barbour, M. Casado// *Neuroscience*. - 2009. - №.158(1). - P.126-136.
144. Perez-Otano, I. Assembly with the NR1 subunit is required for surface expression of NR3A-containing NMDA receptors/I. Perez-Otano, C.T. Schulteis, A. Contractor et al.// *J Neurosci*. - 2001. - №.21(4). - P.1228-1237.
145. Philpot, B.D. Effect of transgenic overexpression of NR2B on NMDA receptor function and synaptic plasticity in visual cortex/B.D. Philpot, M.P. Weisberg, M.S. Ramos et al.// *Neuropharmacology*. - 2001. - №.41(6). - P.762-770.
146. Pick, E. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture/E. Pick, Y. Keisari// *J Immunol Methods*. - 1980. - №.38. - P.161-170.
147. Purohit, A. Oxidized Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II triggers atrial fibrillation/A. Purohit, A.G. Rokita, X. Guan et al.// *Circulation*. - 2013. - №.128(16). - P.1748-1757.
148. Qiu, S. Subunit assembly of N-methyl-d-aspartate receptors analyzed by fluorescence resonance energy transfer/S. Qiu, Y.L. Hua, F. Yang et al.// *J Biol Chem*. - 2005. - №.280(26). - P.24923-24930.
149. Ralphe, J.C. Localization and function of the brain excitatory amino acid transporter type 1 in cardiac mitochondria/J.C. Ralphe, J.L. Segar, B.C. Schutte, T.D. Scholz// *J Mol Cell Cardiol*. - 2004. - №.37(1). - P.33-41.
150. Reffellmann, T. The no-reflow phenomenon: a basic mechanism of myocardial ischemia and reperfusion/T. Reffellmann, R.A. Kloner// *Basic research in cardiology*. - 2006. - №.101(5). - P. 359-372.
151. Salloum, F.N. Vardenafil: a novel type 5 phosphodiesterase inhibitor reduces myocardial infarct size following ischemia/reperfusion injury via opening of mitochondrial KATP channels in rabbits/F.N. Salloum, R.A. Ockaili, M. Wittkamp et al.// *Journal of molecular and cellular cardiology*. - 2006. - №.40(3). - P.405-411.

152. Samoilov, M.O. The adaptive effects of hypoxic preconditioning of brain neurons/M.O. Samoilov, E.V. Lazarevich, D.G. Semenov et al.// *Neurosci Behav Physiol.* - 2003. - №.33(1). - P.1-11.
153. Sanada, S. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures/S. Sanada, I. Komuro, M. Kitakaze// *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.* - 2011. - №.301(5). - P. 1723-1741.
154. Sattler, R. Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein/R. Sattler, Z. Xiong, W.Y. Lu et al.// *Science.* - 1999. - №.284(5421). - P.1845-1848.
155. Schaller, B. Cerebral ischemic preconditioning. An experimental phenomenon or a clinical important entity of stroke prevention?/B. Schaller, R. Graf// *J Neurol.* - 2002. - №.249(11). - P.1503-1511.
156. Schüler, T. Formation of NR1/NR2 and NR1/NR3 heterodimers constitutes the initial step in N-methyl-D-aspartate receptor assembly/T. Schüler, I. Mesic, C. Madry et al.// *J Biol Chem.* - 2008. - №.283(1). - P.37-46.
157. Seeber, S. Transient expression of NMDA receptor subunit NR2B in the developing rat heart/S. Seeber, K. Becker, T. Rau et al.// *J Neurochem.* - 2000. - №.75(6). - P.2472-2477.
158. Shi, S. Chronic N-methyl-D-aspartate receptor activation induces cardiac electrical remodeling and increases susceptibility to ventricular arrhythmias/S. Shi, T. Liu, Y. Li et al.// *Pacing Clin Electrophysiol.* - 2014. - №.37(10). - P.1367-1377.
159. Sia, Y.T. Improved post-myocardial infarction survival with probucol in rats: effects on left ventricular function, morphology, cardiac oxidative stress and cytokine expression/Y.T. Sia, T.G. Parker, P. Liu et al.// *Journal of the American College of Cardiology.* - 2002. - №.39(1). - P.148-156.
160. Simon, J.N. Compromised redox homeostasis, altered nitroso-redox balance, and therapeutic possibilities in atrial fibrillation/J.N. Simon, K. Ziberna, B. Casadei// *Cardiovasc Res.* - 2016. - №.109(4). - P.510-518.

161. Simon, J.N. Nitric oxide synthase regulation of cardiac excitation-contraction coupling in health and disease/J.N. Simon, D. Duglan, B. Casadei, R. Carnicer// J Mol Cell Cardiol. - 2014. - №.73. - P.80-91.
162. Snyder, E.M. Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta/E.M. Snyder, Y. Nong, C.G. Almeida et al.// Nat Neurosci. - 2005. - №.8(8). - P.1051-1058.
163. Sobolevsky, A.I. Structure and gating of tetrameric glutamate receptors/A.I. Sobolevsky// J Physiol. - 2015. - №.593(1). - P.29-38.
164. Sobolevsky, A.I. Subunit-specific contribution of pore-forming domains to NMDA receptor channel structure and gating/A.I. Sobolevsky, M.L. Prodromou, M.V. Yelshansky, L.P. Wollmuth// J Gen Physiol. - 2007. - №.129(6). - P.509-525.
165. Sonntag, W.E. Age and insulin-like growth factor-1 modulate N-methyl-D-aspartate receptor subtype expression in rats/W.E. Sonntag, S.A. Bennett, A.S. Khan et al.// Brain Res Bull. - 2000. - №.51(4). - P.331-338.
166. Srejovic, I. Modulation of N-methyl-d-aspartate receptors in isolated rat heart/I. Srejovic, V. Zivkovic, T. Nikolic et al.// Can J Physiol Pharmacol. - 2017. - №.95(11). - P.1327-1334.
167. Srejovic, I. The effects of glycine, glutamate and their combination on cardiodynamics, coronary flow and oxidative stress in isolated rat heart/I. Srejovic, V. Jakovljevic, V. Zivkovic et al.// Curr Res Cardiol. - 2015. - №.2(2). - P.63-68.
168. Stern-Bach, Y. Agonist selectivity of glutamate receptors is specified by two domains structurally related to bacterial amino acid-binding proteins/Y. Stern-Bach, B. Bettler, M. Hartley et al.// Neuron. - 1994. - №.13(6). - P.1345-1357.
169. Stojic, I. The effects of verapamil and its combinations with glutamate and glycine on cardiodynamics, coronary flow and oxidative stress in isolated rat heart/I. Stojic, I. Srejovic, V. Zivkovic et al.// J Physiol Biochem. - 2017. - №.73(1). - P.141-153.

170. Sun, X. Increasing glutamate promotes ischemia-reperfusion-induced ventricular arrhythmias in rats in vivo/X. Sun, J. Zhong, D. Wang et al.// Pharmacology. - 2014. - №.93(1-2). - P.4-9.
171. Symons, M.C. Radicals generated by bone cutting and fracture/M.C. Symons// Free Radic Biol Med. - 1996. - №.20(6). - P.831-835.
172. Texidó, L. Amyloid β peptide oligomers directly activate NMDA receptors/L. Texidó, M. Martín-Satué, E. Alberdi, C. Solsona, C. Matute// Cell Calcium. - 2011. - №.49(3). - P.184-190.
173. Toyokuni, S. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology/S. Toyokuni// Pathology international. - 1999. - №.49(2). - P. 91-102.
174. Traynelis, S.F. Control of voltage-independent zinc inhibition of NMDA receptors by the NR1 subunit/S.F. Traynelis, M.F. Burgess, F. Zheng et al.// J Neurosci. - 1998. - №.18(16). - P.6163-6175.
175. Traynelis, S.F. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function/S.F. Traynelis, L.P. Wollmuth, C.J. McBain et al.// Pharmacol Rev. - 2010. - №.62(3). - P.405-496.
176. Traynelis, S.F. Proton inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in cerebellar neurons/S.F. Traynelis, S.G. Cull-Candy// Nature. - 1990. - №.345(6273). - P.347-350.
177. Tu, S. Oligomeric A β -induced synaptic dysfunction in Alzheimer's disease/S. Tu, S. Okamoto, S.A. Lipton, H. Xu// Mol Neurodegener. -2014. - №.9. - P.48.
178. Tyagi, N. Cardiac specific deletion of N-methyl-d-aspartate receptor 1 ameliorates mtMMP-9 mediated autophagy/mitophagy in hyperhomocysteinemia/N. Tyagi, J.C. Vacek, S. Givvimani et al.// J Recept Signal Transduct Res. - 2010. - №.30(2). - P.78-87.
179. Vissel, B. Intracellular domains of NR2 alter calcium-dependent inactivation of N-methyl-D-aspartate receptors/B. Vissel, J.J. Krupp, S.F. Heinemann, G.L. Westbrook// Mol Pharmacol. - 2002. - №.61(3). - P.595-605.

180. Vizi, E.S. Role of nonsynaptic GluN2B-containing NMDA receptors in excitotoxicity: evidence that fluoxetine selectively inhibits these receptors and may have neuroprotective effects/E.S. Vizi, M. Kisfali, T. Lőrincz// *Brain Res Bull.* - 2013. - №.93. - P.32-38.
181. Vyklicky, V. Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels/V. Vyklicky, M. Korinek, T. Smejkalova et al.// *Physiol Res.* - 2014. - №.63(1). - P.191-203.
182. Wang, M. Contribution of NMDA receptors to dorsolateral prefrontal cortical networks in primates/M. Wang, A.F. Arnsten// *Neurosci Bull.* - 2015. - №.31(2). - P.191-197.
183. Wang, X.J. Synaptic reverberation underlying mnemonic persistent activity/X.J. Wang// *Trends Neurosci.* - 2001. - №.24(8). - P.455-463.
184. Wang, Z.C. Dysregulation of synaptic and extrasynaptic N-methyl-D-aspartate receptors induced by amyloid- β /Z.C. Wang, J. Zhao, S. Li// *Neurosci Bull.* - 2013. - №.29(6). - P.752-760.
185. Watabe, S. SP-22 is a thioredoxin-dependent peroxide reductase in mitochondria/S. Watabe, T. Hiroi, Y. Yamamoto et al.// *Eur J Biochem.* - 1997. - №.249(1). - P.52-60.
186. Weerateerangkul, P. Roles of the nitric oxide signaling pathway in cardiac ischemic preconditioning against myocardial ischemia-reperfusion injury/P. Weerateerangkul, S. Chattipakorn, N. Chattipakorn// *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research.* - 2011. - №.17(2). - P. 44.
187. Westbrook, G.L. Micromolar concentrations of Zn^{2+} antagonize NMDA and GABA responses of hippocampal neurons/G.L. Westbrook, M.L. Mayer// *Nature.* - 1987. - №.328(6131). - P.640-643.
188. Winterbourn, C.C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species/C.C. Winterbourn// *Nat Chem Biol.* - 2008. - №.4(5). - P.278-286.
189. Xia, Z. Myocardial ischaemia reperfusion injury: the challenge of translating ischaemic and anaesthetic protection from animal models to humans/Z. Xia, H.

- Li, M.G. Irwin// BJA: British Journal of Anaesthesia. - 2016. - №.117(suppl_2). - P.44-62.
190. Yang, Y. Nicotinic $\alpha 7$ receptors enhance NMDA cognitive circuits in dorsolateral prefrontal cortex/Y. Yang, C.D. Paspalas, L.E. Jin et al.// Proc Natl Acad Sci U S A. - 2013. - №.110(29). - P.12078-12083.
 191. Yao, Y. Molecular mechanism of ligand recognition by NR3 subtype glutamate receptors/Y. Yao, C.B. Harrison, P.L. Freddolino et al.// EMBO J. - 2008. - №.27(15). - P.2158-2170.
 192. Yao, Y. Molecular mechanism of ligand recognition by NR3 subtype glutamate receptors/Y. Yao, C.B. Harrison, P.L. Freddolino et al.// EMBO J. - 2008. - №.27(15). - P.2158-2170.
 193. Yellon, D.M. Myocardial reperfusion injury/D.M. Yellon, D.J. Hausenloy// New England Journal of Medicine. - 2007. - №.357(11). - P. 1121-1135.
 194. Yuan, H. Control of NMDA receptor function by the NR2 subunit amino-terminal domain/H. Yuan, K.B. Hansen, K.M. Vance et al.// J Neurosci. - 2009. - №.29(39). - P.12045-12058.
 195. Zhang, W. Structural and single-channel results indicate that the rates of ligand binding domain closing and opening directly impact AMPA receptor gating/W. Zhang, Y. Cho, E. Lolis, J.R. Howe// J Neurosci. - 2008. - №.28(4). - P.932-943.
 196. Zhang, X. Postsynaptic response to stimulation of the Schaffer collaterals with properties similar to those of synaptosomal aspartate release/X. Zhang, J.V. Nadler// Brain Res. - 2009. - №.1295. - P.13-20.
 197. Zhao, X. The effects of aging on N-methyl-D-aspartate receptor subunits in the synaptic membrane and relationships to long-term spatial memory/X. Zhao, R. Rosenke, D. Kronemann et al.// Neuroscience. - 2009. - №.162(4). - P.933-945.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК - активные формы кислорода

И/Р повреждение – ишемическо-реперфузионное повреждение

ИПОЛ - индекс перекисного окисления липидов

КП - коронарный поток

КХ - раствор Кребс-Хенселейта

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

СОД - супероксиддисмутаза

ССС – сердечно-сосудистая система

ТБК - тиобарбитуровая кислота

ЦНС – центральная нервная система

ЧСС – частота сердечных сокращений (уд./мин)

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

АТD - аминокс-терминальный домен

Аβ - амилоид бета

СТD - карбокси-терминальный домен

CREB - cAMP response element binding protein - cAMP-зависимый связывающий белок

DLVP - диастолическое давление в левом желудочке [мм рт.ст.]

dp/dt max - максимальная скорость развития давления в левом желудочке [мм рт.ст./сек]

dp/dt min - минимальная скорость развития давления в левом желудочке [мм рт.ст./сек]

eNOS – оксид азота синтаза

ERK - extracellular signal-regulated kinase - внеклеточная регулируемая киназа

GluN1 – глутаматная субъединица N1

GluN2 – глутаматная субъединица N2

GluN3 – глутаматная субъединица N3

H₂O₂ - перекись водорода

LBD - лиганд-связывающий домен

MAPK - mitogen-activated protein kinase - митоген-активируемая протеинкиназа

NMDA - N-метил-D-аспартат

NO - оксида азота

NO₂ – нитрит

NOX2 – NADPH-оксидаза 2

O₂⁻ - супероксидный анион-радикала

PKC – протеинкиназа C

RNS - reactive nitrogen species – активные формы азота

SLVP - систолическое давление в левом желудочке [мм рт.ст.]

TMD - трансмембранный домен