

Говорушкина Наталия Станиславовна

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

14.03.03 - Патологическая физиология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2021

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

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Болевич Сергей Бранкович

доктор медицинских наук, профессор

Яковлевич Владимир

Официальные оппоненты:

Мартынов Анатолий Иванович - академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра внутренних болезней №1, заведующий кафедрой;

Цыган Василий Николаевич - доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Минобороны России, кафедра патологической физиологии, заведующий кафедрой;

Ведущая организация: федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Защита диссертации состоится 18 мая 2021 г. в 14.00 часов на заседании Диссертационного совета ДСУ 208.001.08 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д.8. строение 2.

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

Автореферат разослан «_____» _____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор



Калюжин Олег Витальевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 [Traynelis S.F., 2010]. Нарушение активности рецептора NMDA связано с рядом неврологических заболеваний. Ключевым расстройством при болезни Альцгеймера является неадекватная регуляция индуцированной амилоидом бета(A β)-активности NMDA-рецептора [Переверзев А.П., 2019].

Несколько десятилетий назад результаты некоторых исследований показали возможность существования NMDA-рецепторов и вне нервных тканей [Collingridge G.L., 2009]. Существуют данные об их распространенности в большом количестве тканей и органов, в том числе и в сердце, где они впервые были обнаружены в кардиомиоцитах крысы [Vyklicky V., 2014]. Исследование временного и пространственного распределения в тканях радиоактивно меченных антагонистов NMDA-рецепторов ($[^3\text{H}]$ CGS и $[^3\text{H}]$ МК-801) выявило их широкое распространение в ряде органов, таких как сердце, легкие, почки и желудок [Lin, J.W., 1998]. Также имеются данные о NMDA-рецепторах в эндотелии кровеносных сосудов в разных частях тела. Введение глутамата и D-серина (которые связываются с глицином) вызывает активацию NMDA-рецепторов, которые активируют эндотелиальную 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 [Sattler, R., 1999]. Изучение влияния гомоцистеина и механизмов, посредством которых он оказывает негативное влияние на сердечно-сосудистую систему, показало наличие GluN1 и GluN2A в сонных артериях крыс, а также экспрессию всех субъединиц рецептора NMDA в эндотелии аорты крысы. В том же исследовании также сообщалось об увеличении экспрессии GluN1 под действием гомоцистеина и увеличении пролиферации клеток, а также об уменьшении пролиферации при предыдущем введении МК-801 [Chatterton, J.E., 2002].

Цель исследования:

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

Задачи исследования:

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

- 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.
- 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.

- 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 перекиси 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 минуте 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 посткондиционировании этим же веществом значения ИПОЛ и O_2 - были значительно выше в последнюю минуту реперфузии по сравнению с контрольными значениями.

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

4. МК-801 вызывал статистически значимое снижение всех кардиодинамических параметров через 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 посткондиционированием 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

прекондиционировании вызывал значительное снижение всех измеряемых биомаркеров окислительного стресса. При посткондиционировании МК-801 значения H_2O_2 были значимо ниже в последнюю минуту реперфузии по сравнению с базовыми значениями, в то время как значения других биомаркеров существенно не изменились.

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

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).

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.

Степень достоверности результатов диссертации

Достоверность результатов диссертационного исследования базируется на адекватном количестве животных (90 крыс, разделенных на 9 групп по 10 в каждой группе), применением современных и общепринятых методологических подходов исследования для достижения поставленной цели, а также параметрических и непараметрических методов статистического анализа и сопоставимостью полученных результатов с данными отечественных и зарубежных авторов. Все вышперечисленное позволило автору диссертационного исследования сформулировать объективные выводы, которые определены высокой точностью результатов, обосновать важную научную и практическую значимость работы.

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.

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.

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.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

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

Протокол эксперимента одобрен локальным Комитетом по этике в интересах экспериментальных животных Факультета медицинских наук Университета г. Крагуевац и локальным этическим комитетом Сеченовского университета.

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

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

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

Использована методика и параметры перфузии коронарных сосудов изолированного сердца крысы раствором Кребса-Хензelayта [Jakovljevic V., 2017, 2018].

Биохимические анализы проводили, используя перфузат из коронарных сосудов изолированных сердец крыс собранном в конце контрольного периода, в последнюю минуту применения испытуемого вещества, в первую, третью, пятую, десятую, пятнадцатую, двадцатую и тридцатую минуты реперфузии в экспериментах с прекондиционированием. В экспериментах с посткондиционированием пробы с перфузатом из коронарных сосудов изолированных сердец крыс отбирались практически на одинаковых временных отрезках, исключая последнюю минуту применения вещества в прекондиционировании. Все реактивные молекулы, представляющие интерес для

нашего исследования, были измерены спектрофотометрическим методом на спектрофотометре *Shimadzu UV-1800*, Северная Америка.

Определяли уровень нитрита (NO_2^-), супероксидного анион радикала, перекиси водорода, индекса перекисного окисления липидов [Prokić V., 2019; Jakovljević V., 2017, 2018]

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

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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

Значения максимальной и минимальной скорости изменения давления в левом желудочке ($dp/dt \max$ и $dp/dt \min$, в мм рт.ст./сек), систолического и диастолического давления в левом желудочке (SLVP и DLVP, в мм рт.ст.), частоты сердечных сокращений (ЧСС, в уд/мин) и коронарного потока перфузирующего раствора (КП, в мл/мин) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии без кондиционирования представлены в таблице 1.

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

Контрольная группа без кондиционирования						
Минуты	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 ± 235,2	-1401,9 ± 99,3	53,4 ± 8,8	5,5 ± 0,6	290,5 ± 8,9	8,5 ± 0,5
Ишемия						
1	2115,8 ± 123,5	-1445,3 ± 73,3	58,1 ± 7,7	5,3 ± 0,4	250,5 ± 25,8*	7,2 ± 0,4*
30	1805,6 ± 78,5	-1140,3 ± 96,5*	40,3 ± 6,3*	4,7 ± 0,2*	225,6 ± 15,4	6,0 ± 0,5

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

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

Влияние применения глутамата при прекондиционировании на кардиодинамические параметры изолированного сердца крыс

Значения максимальной и минимальной скорости изменения давления в левом желудочке (dp/dt max и dp/dt min, в мм рт.ст./сек), систолического и диастолического давления в левом желудочке (SLVP и DLVP, в мм рт.ст.), частоты сердечных сокращений (ЧСС, в уд / мин) и коронарного потока перфузирующего раствора (КП, в мл/мин) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при прекондиционировании глутаматом представлены в таблице 2.

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

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

Preconditionирование 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

Аналогичные результаты были зарегистрированы и при применении глутамата в посткондиционировании.

Влияние применения глицина при preconditionировании на кардиодинамические параметры изолированного сердца крыс

Значения максимальной и минимальной скорости изменения давления в левом желудочке (dp/dt max и dp/dt min, в мм рт.ст./сек), систолического и диастолического давления в левом желудочке (SLVP и DLVP, в мм рт.ст.), частоты сердечных сокращений (ЧСС, в уд / мин) и коронарного протока перфузирующего раствора (КП, в мл/мин) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании глицином представлены в таблице 3.

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.

Таблица 3 - Показатели функции левого желудочка сердца при ишемии и последующей реперфузии изолированного сердца крыс раствором Кребса-Хензелята *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 ± 100,4	-1551,9 ± 83,5	54,5 ± 2,4	2,4 ± 0,3	308,7 ± 12,2	9,1 ± 0,6
Глицин	1484,0 ± 158,6	-1297,4 ± 116,4	61,1 ± 3,8	2,7 ± 0,2	256,6 ± 14,9	8,2 ± 0,8
Ишемия						
1	1789,8 ± 136,5	-1521,6 ± 96,4	71,2 ± 2,8	3,4 ± 0,4	233,8 ± 30,3*	8,5 ± 0,7
30	1695,4 ± 135,8*	-1482,6 ± 76,1	54,8 ± 2,9	2,3 ± 0,3	258,4 ± 3,4*	7,7 ± 0,8*

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

Аналогичные результаты были зарегистрированы и при применении глицина в посткондиционировании.

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

Значения максимальной и минимальной скорости изменения давления в левом желудочке (dp/dt max и dp/dt min, в мм рт.ст./сек), систолического и диастолического давления в левом желудочке (SLVP и DLVP, в мм рт.ст.), частоты сердечных сокращений (ЧСС, в уд / мин) и коронарного протока перфузирующего раствора (КП, в мл/мин) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при preconditionировании МК-801 представлены в таблице 4.

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.

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

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

Прекондиционирование МК-801						
Минуты	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 ± 104,5	-1393,6 ± 41,6	59,6 ± 2,4	5,3 ± 0,1	311,7 ± 7,0	10,2 ± 0,8
МК-801	1537,8 ± 77,6	-948,7 ± 57,5	42,2 ± 2,5	3,9 ± 0,1	254,9 ± 15,3	7,3 ± 0,4
Ишемия						
1	2363,6 ± 182,1*	-1573,7 ± 63,1*	84,1 ± 3,4*	8,2 ± 0,6*	256,7 ± 18,6	10,7 ± 0,3
30	2021,0 ± 110,9**	-1317,5 ± 40,0**	59,1 ± 2,0**	5,2 ± 0,2**	302,4 ± 8,4	9,4 ± 0,7

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

Влияние применения мемантина при прекондиционировании на кардиодинамические параметры изолированного сердца крыс

Значения dp/dt max и dp/dt min (мм рт.ст./сек), SLVP и DLVP (мм рт.ст.), частоты сердечных сокращений (ЧСС, в уд/мин) и коронарного протока перфузирующего раствора (КП, в мл/мин) изолированного сердца крыс после ишемии и во время реперфузии при прекондиционировании мемантином представлены в таблице 5.

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

Прекондиционирование мемантином						
Минуты	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 ± 138,7	-1476,6 ± 126,2	62,7 ± 5,4	4,5 ± 0,6	303,8 ± 9,6	12,7 ± 0,6
мемантин	1661,9 ± 96,8	-1088,9 ± 131,2	49,6 ± 7,4	3,7 ± 0,2	263,2 ± 11,0	10,8 ± 0,8
Ишемия						
1	2021,7 ± 102,6	-1460,6 ± 103,0	79,3 ± 3,0*	6,1 ± 0,9*	271,8 ± 4,9*	11,5 ± 0,4*
30	1782,6 ± 100,6	-1302,6 ± 90,6	61,8 ± 5,2**	4,3 ± 0,6**	261,5 ± 6,1	9,4 ± 0,3

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

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

Аналогичные результаты были зарегистрированы и при применении мемантина в посткондиционировании.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Аналогичные результаты были зарегистрированы и при применении глутамата в посткондиционировании.

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

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

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

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

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

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

Аналогичные результаты были зарегистрированы и при применении глицина в посткондиционировании.

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

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

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

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

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

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

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

Влияние применения мемантина при преко́ндиционировании на параметры оксидационного стресса изолированного сердца крыс

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

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

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

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

Параметры оксидативного стресса, после двадцатиминутной ишемии после преко́ндиционирования мемантином снижаются и после последующей

тридцатиминутной реперфузии остаются значительно ниже контрольных значений.

Аналогичные результаты были зарегистрированы и при применении мемантина в посткондиционировании.

ВЫВОДЫ

1. Уровни 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 перекиси 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 оксидативного стресса, т.е. обладают кардиопротекторным действием.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Govoruskina N.** The Role of Cardiac N-Methyl-D-Aspartate Receptors in Heart Conditioning-Effects on Heart Function and Oxidative Stress/ **N. Govoruskina, V. Jakovljevic, V. Zivkovic** // *Biomolecules*. – 2020. - №10(7). – P.1065.

2. **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**// *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research*. - 2019. – №20 (4). – P.343-349.

3. **Говорушкина Н.С.** Влияние соединения МК-801, глутамата и глицина через модуляцию N-метил-D-аспартатных рецепторов на изолированное сердце крысы/ **Н.С. Говорушкина, С.Б. Болевич, В. Яковлевич**// *Сеченовский вестник*. – 2020. - Т. 11, № 1. – С. 37-47.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК - активные формы кислорода

ИПОЛ - индекс перекисного окисления липидов

И/Р повреждение – ишемическо-реперфузионное повреждение

КП - коронарный поток

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

ЧСС – частота сердечных сокращений

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

DLVP - диастолическое давление в левом желудочке

dp/dt max - максимальная скорость развития давления в левом желудочке

dp/dt min - минимальная скорость развития давления в левом желудочке

NMDA - N-метил-D-аспартат

SLVP - систолическое давление в левом желудочке