

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
Первый Московский государственный медицинский университет имени
И.М. Сеченова
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(Сеченовский Университет)
Институт клинической медицины
Кафедра патологии человека

На правах рукописи

Болевич Стефани Сергеевна

**Обоснование патогенетической терапии ингибиторами
дипептидилпептидазы-4 повреждения сердца у крыс
с индуцированным сахарным диабетом 2-го типа в условиях
гипоперфузии и последующей реперфузии миокарда.**

14.03.03 Патологическая физиология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научные руководители:

член-корр. РАН, д.м.н., профессор
Литвицкий П.Ф.

д.м.н., профессор
Яковлевич В.

Москва- 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	16
1.1 Сахарный диабет: эпидемиология, типы, ключевые звенья патогенеза, диагностика и лечение	16
1.1.1 Эпидемиология сахарного диабета	16
1.1.2 Типы сахарного диабета.....	17
1.1.3 Ключевые звенья патогенеза и проявления сахарного диабета.....	17
1.1.4 Диагностика сахарного диабета	19
1.1.5 Лечение сахарного диабета.....	20
1.2 Повреждение миокарда при его ишемии и реперфузии кровью, гипоперфузии и последующей реперфузии раствором Кребса-Хензеляйта и другими кровезаменителями.....	21
1.2.1 Патофизиология ишемии и последующей реперфузии миокарда кровью	22
1.2.2 Патофизиология гипоперфузии и последующей реперфузии миокарда раствором Кребса – Хензеляйта и другими растворами.....	23
1.2.3. Роль активных форм кислорода в повреждении миокарда при его постишемической реперфузии кровью	29
1.2.4 Роль избытка Ca^{2+} в повреждении кардиомиоцитов при их постишемической реперфузии.....	29
1.2.5 Роль открытия мембранных каналов митохондрий в повреждении кардиомиоцитов при постишемической реперфузии миокарда	30
1.2.6 Факторы риска ишемического и реперфузионного повреждения сердца.....	31
1.3 Феномен прекондиционирования сердца	31
1.3.1 Эффекты прекондиционирования сердца путем воздействия на него преходящей эпизодов ишемией	33
1.3.2 Механизм ишемического прекондиционирования сердца	34

1.3.3 Другие методы нефармакологического preconditionирования сердца.....	36
1.3.4 Фармакологическая подготовка сердца.....	38
1.4 Ингибиторы эффектов дипептидилпептидазы-4	41
1.4.1 Дипептидилпептидаза 4 (ДПП-4).....	41
1.4.2 Ингибиторы ДПП-4	43
1.4.3 Химическая структура ингибиторов ДПП-4.....	43
1.4.4 Взаимодействие ингибиторов ДПП-4 с другими лекарственными средствами.....	48
1.4.5 Селективность ингибиторов ДПП-4	49
1.4.6 Роль ингибиторов ДПП-4 в феномене preconditionирования	50
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	52
2.1 Экспериментальные животные.....	52
2.2 Моделирование сахарного диабета типа 2 у крыс.....	52
2.3 Используемые препараты, их дозы и пути введения.....	53
2.4 Подготовка изолированного сердца крысы по Лангердорфу и ретроградная перфузия его коронарных сосудов раствором Кребса-Хензelayта при постоянном давлении	54
2.5 Методика и перфузии коронарных сосудов изолированного сердца крысы раствором Кребса-Хензelayта.....	59
2.6 Оценка функции и структурно-геометрические показатели сердца крысы <i>in vivo</i>	60
2.7 Электрофизиологические методы исследования (регистрация уровня артериального давления, ЭКГ, показателей силы и скорости сократительной функции сердца).....	60
2.8 Биохимические методы исследования (определение содержания липидов в сыворотке венозной крови; инсулина и глюкозы в плазме венозной крови крыс <i>in vivo</i> ; нитрита (NO_2^-), супероксидного анион радикала кислорода, перекиси водорода, индекса перекисного окисления липидов в крови	

коронарных вен крыс; активности супероксиддисмутазы и каталазы, содержания восстановленного глутатиона в лизате эритроцитов).....	61
2.9 Статистический анализ результатов работы	69
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	
.....	70
3.1 Влияние ингибиторов ДПП-4: саксаглиптина и ситаглиптина на развитие у крыс индуцируемого стрептозотоцином СД2 и его ключевое проявление – гипергликемию.	70
3.1.1. Влияние ингибиторов ДПП-4: саксаглиптина и ситаглиптина на содержание глюкозы плазмы венозной крови у крыс с сахарным диабетом 2-го типа до и после пероральной нагрузки глюкозой <i>in vivo</i>	70
3.1.2. Влияние ингибиторов ДПП-4: саксаглиптина и ситаглиптина на содержание инсулина в венозной крови у крыс с сахарным диабетом 2-го типа до и после пероральной нагрузки глюкозой <i>in vivo</i>	71
3.2 Влияние ингибиторов ДПП-4: саксаглиптина и ситаглиптина на показатели сократительной функции сердца крыс с СД2 <i>in vivo</i> , миокарда его левого желудочка <i>in vitro</i> и на коронарный проток раствора Кребса-Хензелята.	73
3.2.1. Влияние ингибиторов ДПП-4: саксаглиптина и ситаглиптина на уровень артериального давления и частоту сердечных сокращений у крыс с сахарным диабетом 2-го типа <i>in vivo</i>	73
3.2.2. Влияние ингибиторов ДПП-4 саксаглиптина и ситаглиптина на показатели сократительной функции сердца у крыс с сахарным диабетом 2-го типа <i>in vivo</i>	77
3.2.3. Влияние ингибиторов ДПП-4: ситаглиптина и саксаглиптина на показатели СФМ при гипоперфузии и последующей реперфузии изолированного сердца крыс.....	83

3.3 Влияние ингибиторов ДПП-4: саксаглиптина и ситаглиптина у крыс с индуцированным СД2 на содержание в венозной крови липидов с про- и антиатерогенными свойствами <i>in vivo</i>	96
3.4 Влияние ингибиторов ДПП-4: саксаглиптина, ситаглиптина и валдаглиптина на содержание прооксидантных факторов в миокарде и в перфузате изолированного сердца крыс с СД2.....	101
3.5 Влияние ингибиторов ДПП-4: саксаглиптина, ситаглиптина и валдаглиптина на активность антиоксидантных факторов крови крыс с индуцированным СД2.....	114
ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ	119
ВЫВОДЫ.....	121
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	123
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	143

ВВЕДЕНИЕ

АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ. В 1980-х годах достоверно установлено, что сахарный диабет (СД) 2-го типа (СД2) входит в группу высокого риска возникновения сердечно-сосудистых заболеваний и особенно инфаркта миокарда у пациентов как европейского, так и азиатского регионов [1,5,169].

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) является частым осложнением инсулиннезависимого диабета и основной причиной повышенной смертности и заболеваемости при СД2 [2,3,6,59,154]. У этих пациентов коронарные артерии в существенно более высокой степени поражены процессом атеросклерогенеза, чем у не страдающих СД2 [4,119]. Кроме того, зарегистрирован факт значительно более частого развития фатальных аритмий при инфаркте миокарда у больных СД2 в сравнении с пациентами без установленного диагноза СД [7,56,111].

К нередким причинам смертности и инвалидизации пациентов с СД2 относят ишемию миокарда, за которой следует его реперфузия [14]. Выявлено, что постишемическая реперфузия миокарда приводит к дополнительной его альтерации. Она включает необратимое повреждение кардиомиоцитов, гладкой мускулатуры стенки сосудов, эндотелия, микротромбоз коронарных артерий и др. В совокупности это приводит к существенным расстройствам коронарного кровотока в реперфузируемом миокарде [14].

Доказано, что в течение реперфузионного периода, особенно на его начальном этапе, происходит перегрузка митохондрий кардиоцитов ионами Ca^{2+} и накопление внеклеточного K^{+} . Одновременно с этим, уже с первых секунд периода постишемической реперфузии, инициируется окислительный стресс, сочетающийся с чрезмерной генерацией активных форм кислорода (АФК), развитием острого воспаления и с интенсивной инфильтрацией ранее ишемизированного миокарда нейтрофилами [15].

В связи с приведенными выше фактами были начаты интенсивные поиски методов уменьшения размеров поврежденного миокарда как при его ишемии,

так и в условиях его реперфузии [10]. С этой целью были предприняты попытки разработать различные схемы и методы ишемического preconditionирования миокарда, а также использовать фармакологические и нефармакологические кардиопротективные средства с разными механизмами защиты миокарда. Вместе с тем, ишемическое preconditionирование в клинической практике имеет определенные ограничения, в том числе из-за опасности развития аритмий и сердечной недостаточности. В связи с этим, в настоящее время все большее внимание уделяется поиску фармакологических методов кардиопротекции, которые могли бы использоваться при коронарной окклюзии, глобальной ишемии миокарда, а также в периоде его постишемической реперфузии [12].

Учитывая факт ускоренного развития у пациентов с СД2 системного атеросклероза, в том числе ИБС в форме стенокардии различного клинического течения и инфаркта миокарда, особое внимание уделяется сочетанию именно этих двух форм патологии: СД2 и ИБС. В связи с этим, высока актуальность и необходимость обеспечения оптимального уровня глюкозы плазмы крови (ГПК) как способа сдерживания скорости и масштаба развития макро- и микроангиопатий, включая ИБС, у пациентов с СД2. Отсутствие рекомендаций по применению ингибиторов дипептидилпептидазы-4 (ДПП-4) при СД различных типов течения, в том числе при СД2, ставит важную задачу по их разработке и апробации как в эксперименте, так и в реальной врачебной практике.

С учетом приведенных выше данных в настоящем исследовании была поставлена ЦЕЛЬ:

изучить, на модели индуцированного стрептозотоцином сахарного диабета 2-го типа у крыс и на их изолированном перфузируемом по Лангердорфу сердце в условиях его реперфузии после периода гипоперфузии раствором Кребса-Хензелята, эффективность антидиабетического, антиатерогенного и кардиопротективного действия ингибиторов ДПП-4: саксаглиптина, ситаглиптина и валдаглиптина.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие ЗАДАЧИ:

1. Изучить влияние ингибиторов ДПП-4: саксаглиптина и ситаглиптина на механизмы развития и появления индуцируемого стрептозотоцином СД у крыс.

2. Выявить эффекты воздействия ингибиторов ДПП-4: саксаглиптина и ситаглиптина на биохимические показатели крови и миокарда, сократительную функцию левого желудочка сердца *in vivo* и *in vitro*, а также на коронарный проток раствора Кребса-Хензelayта в условиях гипоперфузии и последующей реперфузии изолированного сердца крыс с индуцированным СД2.

3. Исследовать влияние ингибиторов ДПП-4: саксаглиптина и ситаглиптина у крыс с индуцированным СД2 на содержание в крови липидов с про- и антиатерогенным свойствами.

4. Оценить эффекты действия ингибиторов ДПП-4: саксаглиптина, ситаглиптина и валдаглиптина на содержание прооксидантных факторов и продуктов липопероксидации в миокарде и в крови крыс с индуцированным СД2.

5. Изучить влияние ингибиторов ДПП-4: саксаглиптина, ситаглиптина и валдаглиптина на эффективность антиоксидантных факторов в миокарде и в крови крыс с индуцированным СД2.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты диссертационной работы впервые выявили, что:

1. Применение ингибиторов ДПП-4: ситаглиптина и саксаглиптина у крыс в течение трех недель до индукции стрептозотоцином СД2 снижает выраженность его проявлений. При тесте с пероральной нагрузкой глюкозой у крыс с СД2 наблюдается статистически достоверное снижение уровня гипергликемии под влиянием указанных ингибиторов ДПП-4. Учитывая наличие гипергликемии при повышенном уровне в крови инсулина у животных с СД2 свидетельствуют, во-первых, о развитии у них сахарного диабета именно второго типа - с относительной инсулиновой недостаточностью, во-вторых, о высокой антидиабетической эффективности саксаглиптина и ситаглиптина за

счет снижения степени инсулинорезистентности тканей. Это позволяет рекомендовать использование указанных ингибиторов ДПП-4 для профилактики и патогенетической терапии сахарного диабета второго типа.

2. Ингибиторы ДПП-4: ситаглиптин, саксаглиптин обеспечивают у крыс с индуцированным СД2 существенный кардиопротективный эффект. Этот факт аргументируют данные о: - снижении, ранее повышенного, уровня диастолического давления в его левом желудочке; - сохранении исходной толщины межжелудочковой перегородки сердца; - меньшей степени снижения показателей сократительной функции миокарда и - коронарного протока перфузата (раствора Кребса-Хензelayта) как при гипоперфузионном, так и при реперфузионном повреждении миокарда у крыс с СД2. Полученные данные являются основанием для рекомендации применения указанных ингибиторов ДПП-4 с целью кардиопротекции как при СД2, так и при гипо- и реперфузии миокарда при нем.

3. Раздельное применение ингибиторов ДПП-4: ситаглиптина и саксаглиптина оказывает антиатерогенное действие у крыс с СД2, вызывая значительное снижение содержания в миокарде и крови проатерогенных липидов: холестерина и триглицеридов низкой плотности при одновременной тенденции к повышению уровня антиатерогенных липопротеинов высокой плотности в сравнении с животными без применения указанных препаратов.

4. Ингибиторы ДПП-4: саксаглиптин, ситаглиптин и вилдаглиптин снижают в миокарде и в крови животных с индуцированным СД2 содержание прооксидантных факторов: супероксидного анион радикала кислорода и перекиси водорода, инициирующих процесс липопероксидации, продукты которого оказывают выраженный цитотоксический эффект. Это означает наличие у изученных ингибиторов ДПП-4 антиоксидантного и, обусловленного этим, кардиопротективного эффекта;

5. Трехнедельное профилактическое введение животным с СД2 ингибиторов ДПП-4: саксаглиптина и, особенно, ситаглиптина и вилдаглиптина обеспечивает повышение эффективности антиоксидантных факторов организма

(активности ферментов: супероксиддисмутазы и каталазы, а также - содержания глутатиона в миокарде и крови). Это позволяет рекомендовать указанные ингибиторы ДПП-4 для снижения степени альтерации сердца как при СД2, так и при гипо- и реперфузии миокарда при нем.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ РАБОТЫ

Результаты исследования выявили антидиабетическое и кардиопротективное действие ингибиторов ДПП-4: саксаглиптина, ситаглиптина, вилдаглиптина у крыс с СД2. В существенной мере это обусловлено их способностью: – снижать степень инсулинорезистентности тканей; – оказывать антиатерогенное действие; – ингибировать процесс избыточной генерации прооксидантных факторов (O_2^- и H_2O_2 , инициирующих процесс липопероксидации); – повышать эффективность антиоксидантных факторов (активности супероксиддисмутазы и каталазы, а также - содержания глутатиона в крови). Эти данные расширяют и аргументируют теоретические представления, с одной стороны, о ключевых звеньях патогенеза индуцированного стрептозотоцином СД2, а с другой – о механизмах реализации действия исследованных ингибиторов ДПП-4: саксаглиптина, ситаглиптина, вилдаглиптина.

Материалы диссертации по исследованию эффектов ингибиторов ДПП-4 рекомендуются для использования в практике научных исследований патогенеза СД2, его ранних и поздних осложнений, а также – для разработки и апробации методов его патогенетической терапии и профилактики в практической медицине для обеспечения кардиопротективного эффекта как при сахарном диабете, так и при гипо- и реперфузии миокарда при нем.

Теоретические представления о патогенезе СД2, сформулированные в работе, могут использоваться в образовательном процессе медицинских вузов.

РАБОЧАЯ ГИПОТЕЗА ИССЛЕДОВАНИЯ.

Учитывая, что ингибиторы ДПП-4 обуславливают повышение уровней глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1) и глюкозозависимого

инсулинотропного полипептида (ГИП) путем ингибирования процесса их деградации и, тем самым - снижают содержание глюкозы в плазме крови, уровень синтеза глюкагона, а также активируют секрецию инсулина в условиях гипергликемии, в настоящем исследовании в эксперименте на крысах изучена эффективность антидиабетического действия ингибиторов ДПП-4.

Принимая во внимание факт потенцирования при различных типах сахарного диабета повреждения сердца и сосудов в связи с развитием микро- и макроангиопатий, в работе исследовано наличие у ингибиторов ДПП-4 кардиопротективного действия.

Для проверки рабочей гипотезы об антидиабетическом и кардиопротективном действии ингибиторов ДПП-4 использованы модели индуцированного стрептозотоцином СД2 у крыс, а также - поврежденного (в результате гипоперфузии и последующей реперфузии раствором Кребса-Хензеляйта) их изолированного по Лангердорфу левого желудочка сердца.

Эффекты препаратов оценивали с помощью электрофизиологических (регистрация уровня артериального давления, ЭКГ, показателей силы и скорости сократительной функции миокарда), биохимических (оценка содержания в крови липидов, инсулина, глюкозы, NO_2^- , супероксидного анион радикала кислорода, перекиси водорода, активности супероксиддисмутазы и каталазы, содержания восстановленного глутатиона, расчет индекса перекисного окисления липидов) и морфологических методов исследования.

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ:

1. Применение ингибиторов ДПП-4: ситаглиптина, саксаглипина, вилдаглиптина в течение трех недель до индукции стрептозотоцином СД2 снижает выраженность его проявлений. Это является основанием для рекомендации применения указанных веществ с целью профилактики и патогенетической терапии сахарного диабета второго типа.
2. Ингибиторы ДПП-4: ситаглиптин и саксаглипин обладают кардиопротективным эффектом при развитии индуцированного стрептозотоцином СД2. Это позволяет рекомендовать к использованию

указанных препаратов для снижения степени альтерации сердца как при СД2, так и в условиях гипо- и реперфузии миокарда при нем, а также – при проведении экспериментальных исследований и апробации ингибиторов ДПП-4 в клинике.

3. При использованных в настоящей работе дозах и схемах применения ингибиторы ДПП-4: ситаглиптин и саксаглиптин оказывают антиатерогенное действие у крыс с СД2, вызывая существенное снижение содержания у них в крови проатерогенных веществ: холестерина и триглицеридов низкой плотности, с одновременной тенденцией к повышению уровня антиатерогенных липопротеинов высокой плотности по сравнению с животными с СД2, которым указанные препараты не вводили. Это аргументирует рекомендацию к исследованию эффективности указанных препаратов в клинической практике у пациентов с СД2.

4. Ингибиторы ДПП-4: ситаглиптин, саксаглиптин, вилдаглиптин при их профилактическом трехнедельном введении крысам с последующим моделированием стрептозотоцином СД2, обладают антиоксидантным и, как следствие - кардиопротективным эффектом. Эти препараты снижают в миокарде животных уровень прооксидантов (O_2^- и H_2O_2), повышают активность в нем антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы, каталазы), а также - содержание глутатиона в крови как при СД2, так и при гипо- и реперфузии миокарда при нем.

ЛИЧНЫЙ ВКЛАД АВТОРА ДИССЕРТАЦИИ

Автору принадлежит ведущая роль в выборе направления исследования, формулировании 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, формулирование и научное обоснование результатов и выводов; теоретическая, практическая

значимость и рекомендации, основанные на результатах работы; подготовка научных публикаций и докладов; работа по их внедрению в практику.

ВНЕДРЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИИ В ПРАКТИКУ

Результаты диссертационной работы внедрены в практику экспериментальных исследований механизма развития индуцированного стрептозотоцином СД2 и разработки методов его патогенетического лечения, обеспечения кардиопротекции у животных на модели сахарного диабета второго типа, а также и в условиях гипо- и реперфузии миокарда крыс при нем.

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 и патофизиологии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ, а также на кафедре физиологии медицинского факультета университета г. Крагуевац (Сербия).

СТЕПЕНЬ ДОСТОВЕРНОСТИ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИИ.

Достоверность результатов диссертационного исследования базируется на презентативном количестве животных (60 крыс, разделенных на 5 групп по 12 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 приказом проректора по научно-исследовательской работе ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) профессора М.И. Секачевой, приказ от 16 сентября 2019 г. №

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, кафедры профессиональных болезней Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России и кафедры физиологии факультета медицинских наук университета г. Крагуевац (Сербия) 16 декабря 2019 г.

МАТЕРИАЛЫ ДИССЕРТАЦИИ ДОЛОЖЕНЫ НА:

1. Satelite symposium “OXIDATIVE STRESS IN HEATH AND DISEASE: FROM BASIC SCIENCE TO APPLIED INVESTIGATIONS” 03 September 2018, Kragujevac, Serbia of the 8th International Congress of Pathophysiology, 5-8 September 2018, Bratislava, Slovakia.

2. Third Joint Meeting of National Physiological Societes in the organisation of a Slovak and Serbian Physiological Societes:”HEALTH RISK, NUTRITION AND DIETARY SUPPLEMENTS: OXIDATIVE STRESS AND POLYPHENOLS IN THE HEART OF SERBIAN WINERIES”, 20-22 June 2019, Oplenac, Topola, Serbia.

3. 6th Meeting of European Section and 7th Meeting of North American Section of the International Academy of Cardiovascular Sciences (IACS): "CARDIOMETABOLIC DISEASES: HOW NEW RESEARCH MAY LEAD TO NEW CARDIOPROTECTIVE THERAPY", 11-14 September 2019, Vrnjacka Banja, Serbia.

ПУБЛИКАЦИИ.

Основное содержание диссертационного исследования отражено в 4 научных работах соискателя в зарубежных изданиях, 2 из которых - в журналах базы данных Scopus.

ОБЪЕМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ.

Диссертация изложена на 144 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения и списка литературы, включающего 175 источников, из которых 19 отечественных и 156 зарубежных. Работа иллюстрирована 30 рисунками и 8 таблицами.

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. Сахарный диабет: эпидемиология, типы, ключевые звенья патогенеза, диагностика и лечение

Сахарный диабет представляет собой заболевание, характеризующееся нарушением всех видов обмена веществ и расстройством жизнедеятельности организма в результате абсолютной или относительной недостаточности эффектов инсулина (т.е. абсолютного или относительного гипoinsулинизма) [12,16,18].

Для СД характерно развитие осложнений, в том числе - тяжелых. Их подразделяют на ранние (острые) и поздние (хронические). К первым относят коматозные состояния, ко вторым – микро- и макроангиопатии, невропатии, нефропатии, ретинопатии, снижение эффективности системы иммунобиологического надзора за индивидуальным и постоянным антигенным составом организма. Причиной осложнений является более или менее выраженный и/или длительный гипoinsулинизм. Именно поэтому контроль и обеспечение оптимальных эффектов инсулина имеет существенное значение для предотвращения и/или устранения этих осложнений [107, 150].

1.1.1. Эпидемиология сахарного диабета

Заболеваемость СД постоянно растет и приобрела характер глобальной эпидемии. По оценкам Международной федерации диабета на 2015 год у одного из одиннадцати взрослых пациентов имеется диагноз «сахарный диабет». По данным ВОЗ, в настоящее время в мире насчитывается 180 миллионов больных СД. Примерно столько же людей не знают о наличии у них этого заболевания. Каждые 13-15 лет число больных СД удваивается. К 2030 году численность пациентов СД может составить более 300 миллионов человек, а к 2040 году во всем мире от этого заболевания могут страдать 630 миллионов человек.

По данным Госрегистра, в России в 2000-2008 гг. зарегистрирован неуклонный рост численности больных СД, как 1-го типа, и 2-го типа. В 2008 году число больных СД достигло 2 миллиона 833 тысяч. При этом, данные

эпидемиологических исследований, проводимых Эндокринологическим научным центром в различных регионах России, показали, что реальная численность больных СД в 3-4 раза больше и достигает 8 миллионов человек [8,9,15].

Называется большое число причин увеличения числа людей, страдающих СД: старение населения, малоподвижный образ жизни, вредные привычки, неправильное питание и др. У более чем 90% пациентов диагностируется сахарный диабет 2 типа. Ожидается, что в будущем доля этих пациентов будет увеличиваться, особенно принимая во внимание прогрессирующее увеличение доли населения, страдающей ожирением [174].

СД – смертельно опасное заболевание ввиду своих осложнений. При позднем выявлении к моменту первого обращения пациента в лечебно-профилактическое учреждение около 40% больных уже имеют необратимые сосудистые осложнения, не поддающиеся лечению. Ежегодно в мире умирают около 4 миллиона больных СД, т.е. каждые 10 секунд умирает 1 больной СД.

1.1.2. Типы сахарного диабета

С учетом особенностей этиологии и патогенеза СД в настоящее время выделяют несколько его наиболее значимых форм:

- тип 1, инсулинозависимый, ювенильный СД;
- тип 2, инсулинонезависимый, СД взрослых;
- гестационный СД;
- СД специфического патогенеза при: - заболеваниях экзокринной части поджелудочной железы (панкреатит, муковисцидоз), - эндокринопатиях (синдром Кушинга, акромегалия), - СД медикаментозного генеза (под влиянием глюкокортикоидов, нейролептиков, α -интерферона, пентамидина), - инфекциях, - генетическом дефиците инсулина [53].

1.1.3. Ключевые звенья патогенеза и проявления сахарного диабета

Характерными проявлениями СД являются: - полифагия (повышенные аппетит и избыточное потребление пищи), - полидипсия (избыточное потье жидкости), - полиурия (выведение большого количества мочи) и - потеря массы

тела. Это происходит потому, что, несмотря на повышенный аппетит и гипергликемию в условиях гипoinsулинизма, клетки используют для энергетических потребностей жиры из депо. В связи с этим, масса тела уменьшается, а отрицательный энергетический баланс стимулирует полифагию. Когда уровень глюкозы в крови превышает 10 ммоль/л, развивается глюкозурия. Глюкоза, как осмотически активное вещество, стимулирует ток жидкости в кровь и далее в почках - в мочу. Это и приводит к полиурии. Потеря организмом жидкости обуславливает увеличение осмолярности сыворотки крови, активацию осморецепторов, формирование чувства жажды и увеличение потребления воды [11,138].

Описано два основных механизма формирования состояния персистирующей гипергликемии в организме:

- 1) развитие иммуногенного инсулита, который вызывает СД 1 типа;
- 2) повышение резистентности клеток организма к инсулину, особенно у больных с ожирением, приводящее к СД 2 типа.

СД 1 типа представляет собой, в большинстве случаев, иммунное аутоагрессивное заболевание с прогрессирующим разрушением бета-клеток поджелудочной железы и постепенным уменьшением их массы. СД 1 типа характеризуется ранним и быстрым появлением симптомов заболевания, а также пожизненной потребностью во введении экзогенного инсулина [107].

СД 2 типа обусловлен повышенной инсулинорезистентностью клеток органов и тканей, а также, как правило - снижением инкреции инсулина бета-клетками. Резистентность к инсулину с последующей гиперинсулинемией может длиться годами и является фактором риска ускоренного развития атеросклероза, особенно если пациент ведет нездоровый образ жизни. Со временем истощение синтетической функции бета-клеток поджелудочной железы приводит к переходу от фазы гиперинсулинемии к гипoinsулинемии. Во время этого перехода способность бета-клеток к синтезу инсулина уже недостаточна для преодоления инсулинорезистентности. Развивается относительная недостаточность уровня инсулина в крови и его эффектов, и как

результат - гипергликемия. Вначале выявляется ее относительно умеренная степень, особенно в периоды после приема богатых углеводами продуктов, что обозначают как снижение толерантности к глюкозе. Позднее постоянная гипергликемия выявляется уже не только после, но и перед едой, что характерно для СД 2 типа [133].

Выделяют несколько этапов развития СД второго типа:

1) этап инсулинорезистентности. Он характеризуется: - гиперинсулинемией, - центральным ожирением, - артериальной гипертензией, - нарушением липидного обмена;

2) этап «предиабета». Этот этап проявляется: - гипергликемией натощак, - сниженной толерантностью к глюкозе, - и/или их комбинацией.

3) манифестный этап с характерными признаками СД2.

1.1.4. Диагностика сахарного диабета

С целью выявления СД повторно определяют уровень гликемии натощак. Диагноз сахарного диабета допускается при уровне глюкозы натощак выше 7,0 ммоль/л.

Если показатель ниже 7,0 ммоль/л, но выше 6,1 ммоль/л, то проводят пероральный тест с нагрузкой глюкозой.

При гипергликемии в 11,1 ммоль/л и выше в любое время суток ставится диагноз СД.

Пероральный тест на нагрузку глюкозой проводится с использованием 75 ее грамм и определением ее уровня в крови через 0 и 120 минут. Если гликемия в 0 минут больше или равна 6,1 ммоль/л и ниже 7,0 ммоль/л, речь идет о гипергликемии натощак. При исследовании уровня ГПК через 120 минут от начала пробы, результаты пробы интерпретируются следующим образом: если уровень глюкозы ниже 7,8 ммоль/л говорят о нормальной толерантности организма к глюкозе; в диапазоне от 7,8 ммоль/л до 11,1 ммоль/л - о сниженной толерантности к глюкозе. Если значения ГПК превышают 11,1 ммоль/л - это свидетельствует о наличии СД [45,107].

1.1.5. Лечение сахарного диабета

При СД 1 типа инсулин в плазме крови практически не обнаруживается, в то время как уровень глюкагона повышен. Именно поэтому этот тип диабета лечат с использованием препаратов инсулина. Только введением инсулина можно обеспечить оптимальный метаболизм углеводов, липидов, и белков, воды и электролитов [36,172]. С другой стороны, при сахарном диабете 2 типа уровень инсулина в крови обычно достаточен для предотвращения кетоацидоза. Именно поэтому пациентов с этим типом диабета вначале успешно лечат пероральными гипогликемическими препаратами. На инсулиновую терапию пациентов с СД2 типа переводят в периоды значительных физических и/или эмоциональных нагрузок (например, хирургического вмешательства, тяжелого инфекционного заболевания, беременности).

В незначительном числе случаев лечения пациентов с СД2 типа достаточны нефармакологические меры, такие как правильное питание, снижение массы тела и физические упражнения. В дополнение к изменению образа жизни пациентам назначают один или несколько оральных гипогликемических препаратов. По механизму действия эти препараты делятся на: - сенситизаторы к инсулину с их первичным эффектом в печени (например, бигуаниды); - сенситизаторы к инсулину с их первичным эффектом в периферических тканях (например, глитазоны); - усиливающие секрецию инсулина (такие как препараты сульфонилмочевины); - препараты, замедляющие всасывание углеводов (такие, как ингибиторы α -глюкозидазы). Препараты, воздействующие на клетки периферической ткани и имитирующие эффекты инсулина (пиоглитазон и росиглитазон) выведены из употребления из-за склонности вызывать сердечную недостаточность [162,172].

Современные антидиабетические препараты сходны с инкретинами - желудочно-кишечными гормонами, которые выделяются в кровь после того, как пища попадает в желудок и двенадцатиперстную кишку. Их функция состоит в том, чтобы облегчить поглощение и использование питательных веществ и особенно глюкозы. В настоящее время называется два наиболее

важных инкретина: ГИП и ГПП-1. Результатом выяснения роли инкретинов в регуляции углеводного обмена явилось создание принципиально нового класса сахароснижающих препаратов – инкретомиметиков.

К инкретомиметикам, используемым в терапии СД2, относится два класса препаратов: вещества, имитирующие действие ГПП-1 (миметики и аналоги ГПП-1) и вещества, пролонгирующие действие эндогенного ГПП-1 (ингибиторы ДПП-4).

Современные экспериментальные и клинические исследования выявили существенный факт: воспалительный процесс, являющийся облигатным компонентом патогенеза СД2, играет важную роль в развитии его сосудистых осложнений. На этом основании в клиническую практику вводятся препараты, которые обеспечивают не только гипогликемический эффект, но и тормозят прогрессирование воспаления и предотвращают развитие осложнений. В эту группу входят ингибиторы дипептидилпептидазы 4, которые, при сниженной деградации инкретинов, оказывают терапевтический эффект у пациентов с СД2 [99].

1.2. Повреждение миокарда при его ишемии и реперфузии кровью, гипоперфузии и последующей реперфузии раствором Кребса-Хензеля и другими кровезаменителями

Раннее восстановление кровотока в ишемизированной зоне сердца в результате тромболитической терапии или хирургической реваскуляризации миокарда является доказанной эффективной стратегией, которая имеет существенное значение для уменьшения размера инфаркта миокарда [130,170]. Вместе с тем, постишемическая реперфузия миокарда может усугубить его повреждение, вызванное гипоксическим (ишемическим) стрессом [46]. Это явление, известное как ишемически-реперфузионное повреждение миокарда, является важной проблемой и находится в центре внимания исследований уже более четырех десятилетий.

1.2.1. Патопфизиология ишемии и последующей реперфузии миокарда кровью

Длительная ишемия вызывает многочисленные метаболические и структурные изменения. Во время ишемии преобладает анаэробный метаболизм, вызывающий снижение pH внутри клетки с развитием ацидоза. В связи с этим в кардиомиоцитах активируется Na^+/H^+ насос, обеспечивающий выведению из них ионов H^+ в обмен на ионы Na^+ , транспортируемые в клетку [149]. Уменьшение эффективности процесса окислительного фосфорилирования в клетках во время ишемического периода, ингибирует активность Na^+/K^+ АТФазы. Это препятствует ресинтезу АТФ и креатинфосфата. Кроме того, катаболизм аденина в зоне ишемии миокарда приводит к внутриклеточному накоплению гипоксантина, что потенцирует генерацию АФК, обладающих высокой цитотоксичностью [46]. В условиях ишемии наблюдается также чрезмерное накопление в кардиомиоцитах Ca^{2+} , что активирует внутриклеточные протеазы, вызывающие повреждение ферментов и структурных белков. При этом, в целом степень повреждения миокарда существенно варьирует в зависимости от степени и длительности снижения кровотока.

Таким образом, нарастание во время ишемии миокарда степени подавления в кардиомиоцитах ресинтеза и активации деградации АТФ и креатинфосфата, дисбаланса в них ионов и жидкости, избыточной генерации АФК, альтерации ферментов и структурных белков являются ключевыми факторами развития необратимого повреждения клеток [57,149].

Ишемия миокарда сопровождается существенными изменениями в эндотелии его сосудов. Это сочетается с повышенной экспрессией различных медиаторов повреждения: провоспалительных цитокинов, молекул адгезии, нейромедиаторов и др. Одновременно снижается эффективность адаптивных процессов, реализующихся с участием тромбомодулина, простациклина, оксида азота и других. В целом, в условиях ишемии миокарда формируется состояние,

которое во время реперфузии снижает его резистентность к повреждающим факторам, потенцируя степень его альтерации [39,46].

Несмотря на то, что постишемическое возобновление кровотока в коронарных артериях восстанавливает приток к миокарду кислорода и субстратов метаболизма, уменьшает размер зоны его инфаркта, реперфузия вызывает также и дополнительное повреждение сердца. Считается, что последствия постишемической реперфузии различны на различных ее этапах [41].

Механизмы реперфузионного повреждения сердца многофакторны и включают в себя, по меньшей мере, следующие:

1. Чрезмерная генерация АФК;
2. Накопление в кардиомиоцитах избытка ионов Ca^{2+} ;
3. Открытие митохондриальных переходных каналов;
4. Эндотелиальная дисфункция;
5. Формирование протромбогенного состояния;
6. Развитие воспаления [41].

1.2.2. Патофизиология гипоперфузии и последующей реперфузии миокарда раствором Кребса – Хензеля и другими растворами

Защита миокарда от повреждения при его ишемии и последующей реперфузии кровью и/или кровозамещающими растворами при операциях на открытом сердце с его остановкой, а также при различных вариантах реваскуляризации и реперфузии миокарда у пациентов с ИБС остается актуальной проблемой реальной клинической практики[80].

Несмотря на прогресс в достижении защиты миокарда от повреждения при его ишемии с последующей реперфузией, отдельные факторы, такие как возраст пациента, наличие сопутствующих заболеваний и тяжелой дисфункции миокарда, требуют дальнейшей оптимизации интраоперационной защиты сердца [124, 141]. В настоящее время известно, что изотермическая кардиоплегия с использованием консервированной крови, обеспечивает определенную защиту сердца, приводя к менее выраженному повреждению

миокарда при ишемии с последующей реперфузии и дает лучшие клинические результаты, чем холодная кристаллоидная кардиоплегия [102,103,166]. С другой стороны, проведение кардиоплегии влечет за собой определенные ограничения, включая повышенный риск системной гиперкалиемии [95] и технические проблемы при кардиохирургических операциях в педиатрической популяции, особенно у младенцев [72,155]. Хирургическое лечение сложных врожденных пороков сердца у новорожденных обычно связано с длительной глубокой гипоксемией, что требует адекватной защиты миокарда с использованием новых и модернизированных кристаллоидных кардиоплегических растворов.

Учитывая, что введение раствора КХ считается оптимальным при перфузии изолированного сердца млекопитающих, кардиоплегия, основанная на применении этого раствора, может быть продуктивной стратегией в предотвращении повреждения миокарда при его гипоперфузии и последующей реперфузии. Опубликованы результаты исследований ряда научных групп, которые изучали возможность защиты сердца с помощью модифицированных растворов КХ [122]. В этих исследованиях использованы, например, растворы с повышенной концентрацией калия (20 ммоль/л) и кальция (0,1-2,5 ммоль/л) для непрерывной коронарной перфузии изолированного сердца крысы в течение 180 минут при температуре 37°C. При этом, минимальное реперфузионное повреждение миокарда выявлялось при перфузии сердца раствором, содержащим кальций в концентрации 1,5 ммоль/л [123].

Положительный эффект такого раствора КХ при реперфузии изолированного сердца наблюдался в условиях его нормотермической или умеренно гипотермической остановки. Авторы считают, что кардиопротективный эффект КХ в таких условиях обусловлен следующими факторами:

- 1) наличием в растворе КХ глюкозы в концентрации 11 ммоль/л, которая, как было показано авторами, способствует образованию АТФ во время гипоперфузии. Более высокая концентрация глюкозы подавляет этот процесс, а

также может вызвать повреждение миоцитов из-за их осмотической нагрузки и увеличить риск внутриклеточного отека [123];

2) оптимальным содержанием в перфузирующем сердце растворе ионов кальция. Показано, что кардиомиоциты более чувствительны к альтерации, вызванной наличием кальция в перфузирующей жидкости, при непрерывной реперфузии миокарда, по сравнению с прерывистой [16]. Известно также, что более низкие концентрации кальция (например, 0,3 ммоль/л) могут способствовать меньшему реперфузионному повреждению клеток миокарда. Такая гипотеза подтверждается фактом о том, что более низкие концентрации кальция (0,3 ммоль/л - 0,9 ммоль/л) в перфузионном растворе обеспечивают лучшее постгипоперфузионное восстановление изолированного сердца крысы [146];

3) использованием в перфузирующем растворе бикарбонатного и фосфатного буферов, содержащих такую же общую емкость неорганических буферов как и в плазме человека. Эти буферы демпфируют изменения внеклеточного и внутриклеточного pH во время гипоперфузионно-реперфузионного повреждения сердца [123];

4) предотвращением отека миокарда в ранний период реперфузии благодаря несколько более высокой осмолярности (380 мосм/л) раствора КХ [123].

Анализ доступной литературы показывает, что раствор КХ не является единственной кардиоплегической жидкостью, по крайней мере, для антеградной кардиopleгии. В ряде исследований упоминается кардиопротекторное действие кардиоплегического раствора под названием St. Thomas Cardioplegic Solution No.2 (Кардиоплегический раствор №2 больницы Святого Томаса, STH2). При его использовании обеспечивается выраженная кардиопротекция, особенно при добавлении к раствору высокоэнергетических фосфатов или антиоксидантов [44,80,147,148]. Показано также, что добавление агониста калиевого канала, закоприда, к раствору STH2 при перфузии сердец крыс по Лангендорфу приводит к значительному уменьшению размера инфаркта, а

также улучшению функции левого желудочка после 45 минут нормотермической кардиopleгии[158].

За последние два десятилетия разработано несколько кристаллоидных кардиopleгических растворов с кардиопротекторными свойствами, которые впоследствии были проверены экспериментально. Защитную эффективность новых растворов сравнивали с STН2, как золотым стандартом для кристаллоидной кардиopleгии. Таким образом, внеклеточный раствор кардиopleгии, содержащий 10 ммоль/л глюкозы, 10 ммоль л L-аспарагиновой кислоты и 5 ммоль/л лактобионовой кислоты, достиг лучшей кардиозащиты при длительной гипотермической остановке по сравнению с STН2 [43]. Другой кристаллоидный кардиopleгический раствор был разработан на основе перфузионного раствора без фосфатного буфера Aqix® RS-I [118]. Этот раствор, обогащенный ионами магния, позволил улучшить функциональное восстановление левого желудочка сердца крысы с глобальной ишемией в нормотермических условиях по Лангендорфу относительно STН2.

Исследование Lawtonetal, проведенное в Соединенных Штатах (США), было направлено на сравнение кардиопротекторных свойств четырех кардиopleгических растворов при гипотермической ишемии и остром повреждении изолированного сердца кролика. Сравнивали свойства следующих растворов: раствор КХ, применяемый отдельно, КХ с агонистом калиевого канала-пинацидилом (50 мкмоль/л), КХ с пинацидилом (50 мкмоль/л) и блокатором калиевых каналов-глибенкламидом (10 мкмоль/л) и одним STН2 [105]. Пинацидил, вводимый в этой дозе, обеспечивал сравнимую кардиозащиту с раствором STН2, в то время как, с другой стороны, демонстрировал более эффективную защиту по сравнению с раствором КХ во время гипотермической кардиopleгии перфузируемого изолированного сердца кролика. Однако более выраженная кардиозащита, достигаемая пинацидилом, теряется при добавлении глибенкламида в кардиopleгический раствор. Это указывает на активность канала K_{ATP} во время гипотермии, что противоречит предыдущим результатам [117, 140].

Кардиопротекторные свойства другого кардиоплегического раствора были проанализированы в исследовании Escobaretal, гипотеза которого заключалась в том, что 7,5% гипертонический раствор (HSS), применяемый до ишемии, снижал системное и тканевое воздействие ишемическо-реперфузионного повреждения [96]. Механизмы, с помощью которых HSS оказывает кардиопротекцию, включают быструю оптимизацию внутрисосудистого тока раствора и сократимости миокарда вместе с установленной дилатацией терминальных артериол и коронарного кровотока. HSS также поддерживает объем клеток, уменьшая связывание нейтрофилов с эндотелием, а также уменьшает воспаление. Результаты этого исследования показывают, что HSS, вводимый за 15 минут до ишемии, не изменяет воспалительный ответ и что этот раствор не влияет на гемодинамический ответ на окклюзию аорты и реперфузию миокарда. Тем не менее, отмечено, что инфузия HSS влияет на его работу из-за значительного увеличения систолического индекса через один час после восстановления кровотока через аорту в условиях, сходных с физиологическими [96].

Исследование 2019 года указывает на наличие кардиопротективного эффекта посткондиционирования липидной эмульсией под названием Intralipid® на интактные и поврежденные сердца грызунов [76]. Механизм, с помощью которого эта эмульсия оказывает кардиопротективное действие, тесно связан с пальмитоилкарнитином, который путем ингибирования митохондриального комплекса IV вызывает высвобождение АФК из каналов транспорта электронов в начале периода реперфузии, тем самым активируя киназы, которые предотвращают повреждение в периоде реперфузии [157]. Следовательно, небольшие количества высвобождаемого АФК в начале реперфузии необходимы для достижения кардиопротекции, а также инициации защитной сигнализации [22,37,87,121,145], в отличие от продолжающейся генерации АФК, вызывающей гибель клеток [109]. Это исследование также продемонстрировало, что кардиопротекторный эффект липидной эмульсии Intralipid не возникает из-за кардиотонического эффекта, вызванного

повышенным выделением ацетил-КоА из-за добавления жирных кислот. Таким образом, кардиозащита, достигаемая посткондиционированием с помощью Intralipid, отражается в увеличении инотропии, уменьшении повреждения клеточных мембран, защите ткани левого желудочка от карбонилирования белка и в снижении активности миелопероксидазы в реперфузируемых сердцах [76].

Синдром «каменного» сердца является редким и смертельным осложнением, описанным у новорожденных и взрослых, перенесших операцию искусственного кровообращения [93,153]. Общими признаками синдрома «каменного» сердца являются гипертрофия и фиброз миокарда с быстрым сокращением левого желудочка, в то время как в некоторых случаях может отмечаться фибрилляция желудочков [49]. Механизм возникновения этого синдрома еще полностью не выяснен, однако, сократительное состояние каменного сердца можно сравнить с состоянием латентного окоченения, когда эти сокращения происходят в результате недостатка АТФ [49,139].

Исследования на новорожденных животных показали, что сердца с более низкими уровнями АТФ более чувствительны к возникновению этого синдрома, чем сердца с нормальными уровнями АТФ [129]. Учитывая, что гипертрофированные сердца имеют низкие ресурсы АТФ, их неспособность расслабиться может быть объяснена таким образом. Кроме того, колебания внутриклеточной концентрации кальция и деградация саркоплазматического ретикулума считаются одним из основных факторов этого процесса [49]. Феномен «каменного» сердца при его реперфузии возникает в результате накопления в нем избытка кальция как при быстрой, так и при медленной нормализации уровней энергетических молекул в кардиомиоцитах [139]. Экспериментальные исследования на собаках показали, что внутриклеточные изменения происходят после длительного периода аноксии во время остановки сердца, что приводит к началу деградации миофибрилл, пропорционально продолжительности аноксической остановки сердца [159].

1.2.3. Роль активных форм кислорода в повреждении миокарда при его постишемической реперфузии кровью

Реперфузия ранее ишемизированного миокарда сопровождается генерацией избытка цитотоксичных форм кислорода. К ним относят супероксидный анионный радикал ($O_2^{\cdot-}$), гидроксильный радикал ($\cdot OH$), гипохлорную кислоту ($HOCL$), перекись водорода (H_2O_2) и пероксинитрит [16].

В норме клеточный пул АТФ подвергается трансформации до гипоксантина, который при участии ксантидегидрогеназы превращается в ксантин. В условиях ишемии образуется ксантиноксидаза, что делает невозможным трансформацию гипоксантина в ксантин. Это приводит к накоплению избытка гипоксантина в ткани миокарда. Когда кровоток в нем и, следовательно, уровень кислорода, во время реперфузии увеличивается, образование гипоксантина существенно нарастает. Этот процесс сочетается с образованием избытка АФК, являющихся сильными окислителями. Они интенсифицируют процесс ПОЛ, вызывая повреждение клеточных мембран и ферментов кардиомиоцитов [171]. Кроме того, АФК стимулируют активацию и таксис в зону повреждения миокарда лейкоцитов, а также активирует фосфолипазу A_2 с образованием избытка эйкозаноидов (тромбоксана A_2 , лейкотриена B_4 и др.). Это, в свою очередь, инициирует процесс воспаления. Экспрессия генов цитокинов, при активации фактора транскрипции и участии нуклеарного фактора $Nk\beta$, также способствует развитию воспаления. Считается, что первая фаза восстановления кровотока в ранее ишемизированной области сердца играет основную роль в генерации АФК и развитии ишемическо-реперфузионного повреждения сердца [132,163].

1.2.4. Роль избытка Ca^{2+} в повреждении кардиомиоцитов при их постишемической реперфузии

Накопление избытка ионов Ca^{2+} во время ишемии кардиомиоцитов приводит к гибели многих из них. Один из ее механизмов в условиях летального увеличения внутриклеточного уровня ионов кальция связан с митохондриальным переносчиком Ca^{2+} в цитоплазму. В условиях реперфузии

миокарда избыток Ca^{2+} поступает в кардиомиоциты также из интерстиция, где его концентрация значительно выше. Это вызывает патологическую активацию Ca^{2+} -кальмодулин-зависимой протеинкиназы, которая также способствует инициации гибели кардиоцитов и последующей дисфункции сердца [39]. Кроме того, повышенный уровень Ca^{2+} активирует цистеиновые протеазы, обозначаемые как кальпаины. Эти протеазы обеспечивают массивное разрушение в реперфузируемом миокарде белка, входящего в структуры цитоскелета, эндоплазматической сети и митохондрий. Показано, что ингибиторы кальпаина, известные как кальпастатины, играют существенную защитную роль в ткани мозга, сердца и почек при нарушении кровотока в них. В условиях ишемии и реперфузии тканей происходит разрушение кальпастина, что потенцирует гибель клеток при участии кальпаина [50].

1.2.5. Роль открытия мембранных каналов митохондрий в повреждении кардиомиоцитов при постишемической реперфузии миокарда

Массивное открытие в условиях постишемической реперфузии миокарда каналов внутренней мембраны митохондрий для ионов H^+ является существенным звеном механизма гибели кардиомиоцитов. При низких значениях pH в течение ишемического периода митохондриальные каналы блокированы. Однако быстрое повышение уровня Ca^{2+} в митохондриях при относительно высоком содержании в них АФК при реперфузии миокарда приводит к открытию каналов для H^+ . В условиях повышенного тока ионов H^+ в клеточный матрикс синтез АТФ ингибируется. Одновременно с этим, по градиенту осмотического давления в митохондрии интенсивно поступает жидкость. В результате этого митохондрии набухают и разрушаются [32,33]. В клетках миокарда нарастает степень нарушения их энергетического обеспечения.

1.2.6. Факторы риска ишемического и реперфузионного повреждения сердца.

Большинство эпизодов коронарогенной ишемии, наблюдаемых в клинической практике, связаны с тромбозом или тромбозом атеросклеротически измененных коронарных артерий. Вместе с тем, важными факторами риска ишемии и инфаркта миокарда являются также неблагоприятные наследственные факторы, возраст, мужской пол, курение, чрезмерное употребление алкоголя, артериальная гипертензия, гиперхолестеринемия, гипер- и дислипидемия, низкая физическая активность, ожирение и, особенно - СД [155]. Существенно потенцируют повреждение сердца как при его ишемии, так и при реперфузии изменения, формирующиеся у пациентов с СД макро- и микроангиопатии, дисбаланс ионов, нарушения энергетического обеспечения кардиомиоцитов и др. [159].

Хотя многие терапевтические подходы, применяемые в клинике и на экспериментальных моделях у животных, снижают и/или ограничивают повреждение миокарда при его постишемической реперфузии, результаты этих исследований неоднозначны, особенно у пациентов.

Учитывая, что ранняя стадия реперфузии миокарда представляет собой критический период, в течение которого сердце дополнительно травмируется и чревато фатальным исходом, основной целью стратегии лечения является именно этот период постишемической реперфузии. Разработка и внедрение эффективных методов профилактики и лечения постишемических расстройств сердечной деятельности в клиническую практику позволит добиться успехов в работе по снижению частоты кардиогенных расстройств при терапевтических и хирургических методах реперфузии сердца.

1.3. Феномен прекондиционирования сердца

За последние два десятилетия предприняты значительные усилия для разработки стратегий по уменьшению размеров инфаркта миокарда и других клинических проявлений при его постишемической реперфузии. Своевременное применение фармакологических и хирургических вмешательств

в период реперфузии имеет большое значение. Хотя терапевтический успех достигается в основном за счет использования новых антитромбоцитарных и антиагрегационных препаратов, до сих пор не существует оптимальной стратегии снижения степени и/или предотвращения реперфузионного повреждения миокарда.

С целью снижения фатального влияния на сократительную функцию и метаболизм миокарда были использованы различные подходы. Они включают использование блокаторов адренергических рецепторов, ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента, антиоксидантов. Фибринолитическая терапия или чрескожная транслюминальная коронарная ангиопластика путем разрушения тромба приводит к реперфузии в ишемических сегментах сердца, но это редко удается сделать достаточно быстро, чтобы предотвратить некроз миокарда. В связи с этим проводится интенсивный поиск методов, которые создавали бы возможность сохранения жизнеспособного миокарда до начала его реперфузии [88].

Одним из вмешательств, которое является общепринятым и является предметом пристального внимания ученых, является феномен preconditionирования сердца с помощью его преходящей повторной ишемии.

Получены доказательства того, что реализацию адаптивного эффекта preconditionирования миокарда обеспечивают такие эндогенные вещества как аденозин [90], брадикинин, простагландин и NO [146]. Однако, как и где реализуются механизмы эффекта preconditionирования, до сих пор во многом остается загадкой.

Учитывая, что наше исследование относится к эффектам preconditionирования на модели изолированного сердца крысы, далее основное внимание уделяется характеристике именно типам и эффектам preconditionирования.

1.3.1. Эффекты preconditionирования сердца путем воздействия на него проходящих эпизодов ишемии.

Ишемическое preconditionирование сердца относится к явлению, при котором повторное воздействие коротких периодов ишемии, с последующим периодом реперфузии снижает патогенное воздействие длительного периода ишемии и, соответственно, размер инфаркта. Экспериментальные исследования показали, что preconditionирование улучшает сократительную функцию миокарда и снижает накопление и адгезию в нем нейтрофилов посредством, помимо прочего, уменьшения масштаба апоптоза миоцитов при их ишемии[114].

Термин ишемическое preconditionирование впервые был введен Murry C.E., Jennings R.B., Reimer K.A. в 1986 году, когда в эксперименте на собаках авторы применяли кратковременные периоды окклюзии коронарной артерии: 4 раза по 5 минут с последующей ее реперфузией в течение 5 минут. В конце теста та же самая коронарная артерия была полностью окклюзирована в течение 40 минут, что вызвало инфаркт миокарда. Размер инфаркта, вызванный окклюзией коронарной артерии после предварительных повторных эпизодов кратковременной ишемии, был на 75% меньше, чем в группе животных, у которых не было предшествующих кратковременных периодов ишемии миокарда [122].

Выделяют два этапа ишемического preconditionирования миокарда:

- ранний этап. Его эффекты реализуются сразу после эпизода ишемии, приводящего к preconditionированию. Этот этап длится около 1-2 часов.
- поздний этап preconditionирования. Его эффекты выявляются в пределах 24 часов после ишемического эпизода и длится около 4 суток. Эти эффекты заключаются в предотвращении развития инфаркта миокарда и/или в значительном сокращении его размера, а также в профилактике сердечной недостаточности и желудочковых аритмий как в кратковременные периоды ишемии, так и последующей реперфузии.

Для достижения эффекта preconditionирования ишемия миокарда должна длиться у животных около 2-5 минут, а у человека - около 1.5 минут. Достаточно провести один эпизод ишемии, чтобы защитить миокард от повреждения. При этом, несколько эпизодов ишемии не приносят большего эффекта preconditionирования. Это явление обозначается как феномен «все или ничего» [41].

Обнаружение явления ишемического preconditionирования указывает на то, что ответ сердца на ишемию является бимодальным, т.е. более длительные периоды ишемии вызывают дисфункцию кардиомиоцитов и/или их существенное повреждение, которые усугубляется при реперфузии. В отличие от этого кратковременная ишемия дает защитный эффект: ткань миокарда становится более устойчивой к повреждающим эффектам длительной ишемии, сменяющейся реперфузией, благодаря активации интракардиальных программ выживания [41].

1.3.2. Механизм ишемического preconditionирования сердца

Различные механизмы ишемического preconditionирования способствуют уменьшению степени повреждения и размера инфаркта миокарда, дисфункции эндотелия сосудов, снижению количества нейтрофилов в зоне ишемии и последующей реперфузии сердца, предотвращению апоптоза миоцитов. Механизмы, с участием которых ишемическое preconditionирование обеспечивает терапевтический эффект, включает воздействие на многочисленные вещества как на «мишени», которые, образуются в миокарде во время его ишемии (например, аденозин, простагландины, брадикинин, эндогенные опиаты и АФК) [88].

Считают, что аденозин является основным посредником в достижении терапевтического эффекта ишемического preconditionирования. Он стимулирует рецептор аденозина A_2 и приводит к образованию NO, который, в свою очередь, активирует протеинкиназу C и p38 MAPK. Полагают также, что аденозин или агонисты α_1 -адренергических рецепторов активирует G-белок, участвующий в процессе ишемического preconditionирования, принимая во

внимание, что он стимулирует фосфолипазы С и D и активирует протеинкиназу С. Показано, что протеинкиназа С играет значимую роль в реализации ишемического preconditionирования миокарда [81]. Разными сигнальными путями активация рецепторов аденозина, брадикинина и опиоидных рецепторов приводит к высвобождению протеинкиназы С. Воздействие аденозина может активировать протеинкиназу С и с участием фосфолипаз через образование диацилглицерола из мембранных фосфолипидов. Активация опиоидных рецепторов опосредуется трансактивацией металлопротеиназы из фактора роста эпидермиса. В случае воздействия брадикинина, каскадный путь похож на активацию опиоидных рецепторов, за исключением посредничества эпидермального фактора роста [67]. Результатом этого является повышенное образование эндотелиальной NO-синтетазы, под влиянием которой высвобождается NO. Последующая активация гуанилциклазы с образованием циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) также потенцирует выработку протеинкиназы С. Общеизвестно, что независимо от сигнальных путей, участвующих в указанных процессах, они приводят к транслокации и активации протеинкиназы С. Биохимические и иммунологические исследования прямо продемонстрировали существенное участие протеинкиназы С в феномене ишемического preconditionирования миокарда. Экспериментальные исследования на животных и их изолированных сердцах выявили решающую роль протеинкиназы С в развитии ишемического preconditionирования сердца: ингибирование протеинкиназы С привело к подавлению эффектов preconditionирования [89].

Высвобождение аденозина, брадикинина, эндогенных опиатов и АФК в течение периода ишемического preconditionирования активирует многочисленные сигнальные пути с участием митохондрий. Они реализуются через активацию митохондриальных АТФ-чувствительных K^+ (митоK_{АТФ}) каналов как важного звена в достижении адаптивного эффекта этого типа preconditionирования. В эксперименте на животных выявлено, что диазоксид имитирует открытие mitoK_{АТФ} каналов, а глибенкламид блокирует их. В связи

с этим можно сделать вывод, что использование этого гипогликемизирующего средства противодействует терапевтически благоприятным эффектам ишемического preconditionирования [106].

Помимо избытка АФК, существует также большое количество других токсичных продуктов, которые способствуют возникновению ишемически-реперфузионных повреждений. Известно, что в условиях ишемии происходит повреждение и деградация большого числа внутриклеточных белков. Так, система убиквитинпротеазы становится малоэффективной, что может привести к избирательной дисрегуляции сигнальных путей и накоплению цитотоксических метаболитов. Ишемическое preconditionирование предотвращает дисфункцию этого белка, тем самым благоприятно влияя на концентрацию и активность адаптивных сигнальных молекул, таких как эпсилон и дельта-изоформы ПК С [89].

На ранней стадии постишемической реперфузии наблюдается также увеличение синтеза NO, а также потенцирование генерации избытка АФК. Образующийся NO весьма быстро взаимодействует со свободными радикалами образуя пероксинитрит, обладающий сильными окислительными свойствами [167]. Благодаря этому в условиях preconditionирования миокарда ингибируется генерация NO, что способствует развитию кардиопротективного эффекта.

1.3.3. Другие методы нефармакологического preconditionирования сердца

Исследования на животных показали, что гипоксемия и гипотермия миокарда может смягчить последствия ишемии и последующей реперфузии сердца. Так, в условиях гипербарической оксигенации уменьшается размер инфаркта миокарда, снижается его отек, образование в нем перекисных липидных радикалов, ингибируется адгезия лейкоцитов к эндотелию, восстанавливается объем микроциркуляции. В условиях гипотермии, (при температуре 32-33°C) выявлено ограничение размера ишемического инфаркта миокарда, снижение его потребности в субстратах метаболизма, торможение

процесса периинфарктного воспаления, увеличение сократимости миокарда, а также – ингибирование агрегации тромбоцитов [108]. Исследование эффектов гипербарической оксигенации привело к выводу о том, что в основе механизма защиты гипербарической оксигенации от ишемического и реперфузионного повреждения миокарда лежит противовоспалительный эффект, а также - способность модулировать процесс аутофагии. Chen С. и авторы исследовали уровни экспрессии провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 и ICAM-1 в ткани миокарда после его реперфузии и сравнили эти значения с уровнем указанных цитокинов при preconditionировании гипербарической оксигенацией. После 14 суток применения гипербарической оксигенации уровни провоспалительных цитокинов были значительно снижены. Предполагается, что противовоспалительная способность гипербарической оксигенации обусловлена блокированием сигнального пути TLR4-NF- κ B, являющегося посредником развития воспаления, тогда как модуляция аутофагии достигается за счет предотвращения передачи сигнала по пути Akt-mTOR [94].

Поиск природных агентов, имитирующих эффекты ишемического preconditionирования и, таким образом, смягчающих патогенное воздействие факторов ишемии и реперфузии на миокард, также находится в последние годы в центре внимания исследователей. Принимая во внимание высокое содержание полифенольных соединений и антиоксидантов в лекарственных растениях, был сделан вывод, что preconditionирование миокарда этими агентами также может снизить степень повреждения, вызванного ишемией, и в то же время достичь противовоспалительного эффекта. В исследовании Sharma А.К. и соавт. [101] кардиопротективный эффект водного экстракта белого чеснока описан как preconditionирующий. Кардиопротективное действие этого растения обеспечивается эффектами H₂S, которые проявляются уменьшением величины инфаркта миокарда, снижением уровня в крови лактатдегидрогеназы, а также повышением - нитритов и аденозина.

Кардиозащитные эффекты H_2S отчасти связаны с открытием каналов K_{ATP} . Хотя это растение обладает сильным кардиопротекторным действием, более сильный эффект в снижении степени ишемического и реперфузионного повреждения миокарда достигается в том случае, если во время ишемии предварительно применяется водный экстракт белого лука [101,128].

Важно подчеркнуть, что умеренная физическая активность также может значительно снизить патогенные последствия ишемического и реперфузионного повреждения сердца. Поскольку эффективность условной защиты зависит от интенсивности и характера физической активности, введение ежедневных упражнений в обычную жизненную активность значительно снижает частоту инфаркта миокарда. Во время упражнений активируются опиоидные и аденозиновые рецепторы, которые через протеинкиназу C запускают адаптивные механизмы в миокарде.

Показано, что среди многочисленных изоформ протеинкиназы C наиболее важную роль в кардиопротекции играет протеинкиназа $C\epsilon$. С другой стороны, активация 70 белков теплового шока с помощью протеинкиназы C не дает существенного эффекта в прекондиционировании в этой нефармакологической стратегии. Вместе с тем, открытие канала K_{ATP} в митохондриальной саркоме под действием протеинкиназы C [78] имеет существенное значение.

Описанные выше методы немедикаментозного прекондиционирования и их механизмы для достижения кардиопротективного воздействия на сердце следует принимать с осторожностью, т.к. их эффекты в значительной степени зависят от типа и вида стимула, который выполняется при прекондиционировании. Так, прекондиционирование короткими эпизодами ишемией также имеет клинические ограничения, поскольку ишемия не всегда применима, особенно если она требует снижения кровоснабжения ткани.

1.3.4. Фармакологическая подготовка сердца

Ишемическое прекондиционирование - хорошо описанный адаптивный ответ сердца. В последние годы интенсивно разрабатывается фармакологическая альтернатива для достижения подобного эффекта.

Многочисленные фармакологические агенты активируют и/или инициируют эндогенные адаптивные механизмы от ишемического и реперфузионного повреждения сердца. Кардиопротекция, достигнутая с помощью этих агентов, зависит от активации протеинкиназ, включая Akt и Erk1/2, что в фазе ишемического preconditionирования или реперфузии приводит к существенному кардиопротекторному действию [105]. Использование селективного агониста α_2 -адренергических рецепторов дексмедетомидина во время глобальной ишемии сердца обеспечивает кардиопротекцию, снижающую степень повреждения миокарда. Применение дексмедетомидина активирует протеинкиназы Akt и Erk1/2, а также eNOS, что значительно уменьшает размер инфаркта в условиях как ишемического, так и реперфузионного повреждения сердца. Напротив, ингибирование PI3K и последующее фосфорилирование eNOS приводит к устранению кардиозащитного действия дексмедетомидина. Это означает, что кардиозащита, достигаемая при применении дексмедетомидина, зависит от активности PI3K/Akt пути, а не от стимуляции вегетативной нервной системы [55].

Кроме агонистов α_2 -адренергических рецепторов, синтеза NO и последующей активации цГМФ в качестве вторичного мессенджера в активации протеинкиназ, указанный эффект может быть достигнут также применением ингибиторов фосфодиэстеразы 5, силденафила. Расширение коронарных сосудов, достигнутое с помощью силденафила, обеспечило существенную кардиопротекцию от ишемического и реперфузионного повреждения сердца у кроликов. С другой стороны, вальденафил – другой ингибитор фосфодиэстеразы 5, обладает более сильным защитным эффектом благодаря открытию под его влиянием митоK_{ATP} [165].

Значимым кардиопротекторным эффектом при ишемии и реперфузии миокарда обладает антиоксидантная терапия, как тип фармакологического preconditionирования против ишемического и реперфузионного повреждения сердца. Использование в этих условиях СОД, каталазы, манитола, N-

ацетилцистеина, аллопуринола, витамина Е в качестве средств preconditionирования обеспечивает выраженную кардиопротекцию [46].

Блокаторы β -адренергических рецепторов, карведилол и метопролол также снижают интенсивность липопероксидации. С другой стороны, они повышают уровень антиоксидантного фактора – глутатиона, действуя как «мусорщик» свободных радикалов и, таким образом, предотвращают и/или снижают степень окислительного стресса.

Антиоксидантную защиту обеспечивают также амиодарон и пробукол, которые, как показали результаты исследования на крысах, предотвращали развитие инфаркта миокарда путем снижения выраженности окислительного стресса и провоспалительных цитокинов [98].

Исследования на изолированных сердцах крыс показали, что preconditionирование их рапамицином, циклоспорином А и динитрофенолом уменьшает размер инфаркта, обеспечивая кардиозащитный эффект. Рапамицин, как мощный иммуносупрессивный препарат, снижает частоту коронарного ретромбоза, а кардиозащита, достигаемая с помощью этого препарата, связана с ингибированием mTOR киназы с последующей компенсаторной регуляцией и других киназ, таких как Akt и PI3K. Это приводит к снижению размеров инфаркта миокарда и масштаба апоптоза миоцитов [144].

Эффект циклоспорина, как кардиопротективного агента, связан с ингибированием митохондриальных мембранных каналов и кальцийнеурина в связи с блокадой фосфатазы PP2B. Подобный механизм реализуется и при использовании динитрофенола, обеспечивающего кардиопротекцию в связи с модификацией митохондрий, участвующих в процессе preconditionирования миокарда и защиты его от инфаркта во время ишемии [61].

Учитывая, что уровень смертности от острого инфаркта миокарда у пациентов с СД2 во всех странах мира увеличивается, маловероятно, что эта клиническая проблема может быть решена только путем контроля уровня гликемии. Кардинальные изменения в решении этой проблемы произошли в связи с осознанием того, что ингибиторы дипептидилпептидазы-4 эффективно

защищают сердце от его ишемического и реперфузионного повреждения. Активируя многочисленные внутриклеточные пути, включая Akt, Erk1/2, p70S6K и K_{AMF} , а также последующее торможение процесса апоптоза кардиоцитов, эта группа гипогликемических препаратов обеспечивает существенное кардиопротективное действие.

В эксперименте на собаках эти препараты приводили к массивному открытию Ca^{2+} каналов L типа, что стимулировало образование цГМФ-зависимой протеинкиназы A и, таким образом, защищали сердце, подвергшееся ишемическому и реперфузионному повреждению [65]. Таким образом, результаты указанных исследований свидетельствуют о том, что повышение эндогенного уровня аналогичного ГПП-1 с использованием клинически доступных препаратов - ингибиторов ДПП-4, может способствовать не только профилактике осложнений СД2, но и защите сердца при его ишемическом и реперфузионном повреждении.

1.4. Ингибиторы эффектов дипептидилпептидазы-4

1.4.1. Дипептидилпептидаза 4 (ДПП-4)

Дипептидилпептидаза 4 (ДПП-4) представляет собой мембранную гликопротеиновую эктопептидазу, принадлежащую к семейству пролил-олигопептидных ферментов [114]. Впервые фермент был описан в 1960 году как аминопептидаза, а в следующем десятилетии он послужил моделью для объяснения каталитической активности сериновых пептидаз и проведения исследований пролин-связывающих мест с пептидами. Открытие потенциальной активности ДПП-4 в процессе превращения биоактивных пептидов *invitro* еще более активировало исследования *invivo*.

В начале 1990-х годов была продемонстрирована роль ДПП-4 в иммунном ответе, особенно в активации Т-клеток иммунной системы, передаче сигнала и пролиферации Т-лимфоцитов [54]. Т-лимфоциты, экспрессирующие ДПП-4, массивно пролиферируют после воздействия антигена на ДПП-4-негативные Т-лимфоциты. Выявлено также, что большее высвобождение IFN- γ происходит после взаимодействия рецепторов ДПП-4 и аденозина на мембране

дендритных клеток. В дополнение к экспрессии на CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитах, ДПП-4 была также обнаружена на поверхности В лимфоцитов [156]. Ткани, экспрессирующие ДПП-4, включают экзокринную часть поджелудочной железы, почки, желудочно-кишечный тракт и желчевыводящие пути, тимус, лимфатические узлы, матку, плаценту, предстательную железу, надпочечники, молочные, потные и слюнные железы. Помимо того, что ДПП-4 связана с плазматической мембраной эпителиальных и эндотелиальных клеток этих органов, она растворима и имеется во всех жидкостях организма, включая плазму крови и спинномозговую жидкость [83].

Известно, что ДПП-4, как плейотропный фермент, обладает способностью инактивировать широкий спектр пептидных гормонов. Особенно важной являются инактивирующие кишечные гормоны, известные как инкретины, которые включают ГЛП-1 и ГИП. Терапевтическое применение инкретина, как потенциального антидиабетического препарата, было обусловлено знанием того, что этот гормон способен усиливать секрецию инсулина и, как следствие, снижать скачки глюкозы в плазме крови. Было подсчитано, что 50-60% общего количества инсулина, выделяемого во время еды, в результате реакции на инъекцию, чаще всего опосредовано комбинированным действием ГЛП-1 и ГИП.

Показано также, что инкретины стимулируют пролиферацию и дифференцировку β -клеток поджелудочной железы, а также ингибируют их апоптоз. Помимо этого, ГЛП-1 способен ингибировать секрецию глюкагона и опорожнение желудка [68]. Однако деградация ГЛП-1 и ГИП под действием ДПП-4 происходит довольно быстро (период полураспада менее двух минут). Это приводит к образованию метаболитов, которые не способны высвободить инсулин [95]. Существует также большое количество фактических данных, свидетельствующих о другом положительном терапевтическом эффекте ГЛП-1 и ГИП, которое заключается в защите миокарда от негеморрагических повреждений, тем самым уменьшая размер инфаркта. Следовательно,

предотвращение деградации гормона инкретина с помощью ингибиторов ДПП-4 может представлять собой новую стратегию лечения пациентов с СД 2 типа.

1.4.2. Ингибиторы ДПП-4

Основной механизм, посредством которого ингибиторы ДПП-4 оказывают терапевтическое действие, заключается в повышении уровней ГЛП-1 и ГИП вследствие ингибирования их деградации под действием ферментов ДПП-4. Эти вещества снижают уровень глюкозы в плазме крови, предотвращая скачки ее содержания после приема пищи, а также уменьшают уровень продукции глюкагона. Считается, что ингибиторы ДПП-4 также увеличивают секрецию инсулина в ответ на повышенные уровни глюкозы в крови [83].

При анализе различий в степени ингибирования ферментов ДПП-4, достигаемых применением таких препаратов, как ситаглиптина, саксаглиптина и вилдаглиптина у пациентов, страдающих СД2, между указанными ингибиторами ДПП-4 наблюдалась значительная разница. Использование ситаглиптина в однократной суточной дозе и вилдаглиптина два раза в день приводит к высокой степени ингибирования активности фермента ДПП-4 (90%) в течение 24 часов, в то время как несколько более низкий уровень ингибирования наблюдался при применении саксаглиптина (75%) и вилдаглиптина, вводимых в однократной дозе (30%) [63].

1.4.3. Химическая структура ингибиторов ДПП-4

Поскольку фермент дипептидилпептидаза-4 относится к протеазной группе, ингибиторы этого фермента в основном имеют пептидную структуру [168]. Ингибиторы ДПП-4 обычно включают электрофильную группу, которая может взаимодействовать с гидроксильным локусом серинов в каталитическом положении. Эта группа относится к нитрильному пулу, но она также может представлять собой и бороновую кислоту или дифенилфосфонат.

Разработаны также ингибиторы, которые не содержат указанную электрофильную группу, но они проявляют аффинную токсичность для других дипептидилпептидаз, таких как ДПП-2, ДПП-8 и ДПП-9 [162]. Ингибиторы фермента ДПП-4 обычно делятся на те, которые структурно аналогичны

природному субстрату и те, которые структурно отличаются от природного субстрата [134].

Конструктивно похожие на природные ингибиторы субстрата чаще всего содержат аминокислотный пролин, который связывается с «карманом S1». Наиболее известными препаратами цианопирролидина являются вилдаглиптин и саксаглиптин. В комплексе с ДПП-4 цианопирролидины действуют как ингибиторы обратимого действия и имеют два ключевых места взаимодействия с активным локусом ферментов. Нитрильная группа образует обратимые ковалентные связи с гидроксильной группой серина в положении 630 и является триггером ее активности. Все цианопирролидины содержат первичную или вторичную аминогруппу, которая в протонированной форме образует водородные связи с отрицательно заряженной областью белка, состоящей из глутаминовой кислоты в положениях 205 и 206 и тирозина в положении 662.

Особой проблемой при использовании ингибиторов ДПП-4 является их нестабильность в связи с внутримолекулярной циклизацией в результате переключения транс-ротамеров в цис-ротамеры. Предотвращение процесса циклизации повышает их активность. Введение амидной группы в кольцо ротамеров были синтезированы стабильные соединения, которые ингибируют ДПП-4. С целью повышения стабильности транс-ротамера саксаглиптина провели замещение цис-4,5-метана в его пирролидиновом кольце [135]. Вместе с тем известно, что молекулы ситаглиптина относятся к ингибиторам, структура которых не идентична природным субстратам. Этот тип ингибитора ДПП-4 приводит к нековалентному подавлению активности фермента. Он обычно содержит ароматическое кольцо вместо остатка пролина. Ситаглиптин является производным β -аминоамида, который проявляет необычайную эффективность *in vivo* [173].

Фармакокинетика, метаболизм и механизмы эффектов ситаглиптина

Ситаглиптин является пиразинским ингибитором ДПП-4. По химической структуре он представляет собой (3R)-3-амино-1-[3-(трифлуорометил)-6,8-дигидро-5Н-[1,2,5]триазоло[4,3-а]пиразин-7-ил]-4-(2,4,5-трифлуорофенил)

бутан-1-он. Эмпирическая формула его: $C_{16}H_{15}F_6N_5O$. Ситаглиптин состоит из атомов углерода, водорода, фтора, азота и кислорода, от 407,314 г/моль. Элементный анализ показал процентный состав элементов структуры ситаглиптина: С - 47,18%, Н - 3,71%, F - 27,99%, N - 17,19%, О - 3,93%.

Ситаглиптин успешно применяется для лечения сахарного диабета 2 типа или инсулиннезависимого сахарного диабета.

Фармакокинетические параметры ситаглиптина изучали как на человеческой популяции, так и на модели СД у различных лабораторных животных.

Ситаглиптин хорошо всасывается после перорального приема в дозе 100 мг в день. Абсолютная биодоступность у здоровых добровольцев составляет около 87%. Из-за быстрого всасывания время, необходимое для достижения максимальной концентрации препарата в крови (T_{max}), составляет от 2 до 4 часов. Содержание этого препарата относительно низко в белках плазмы крови (38%), а масштаб его распределения высок при внутривенном введении[77]. При пероральном применении меченного радиоактивным изотопом ситаглиптина (^{14}C) показано, что основным путем элиминации неизмененного препарата являются почки. В среднем 16% радиоактивно меченного препарата выводится в виде метаболитов (13% с мочой и 3% с фекалиями), а 10% - в неизмененном виде с фекалиями.

Метаболиты ситаглиптина включают изоформы CYP3A4 и CYP2C8. Два основных метаболита: N-сульфат и N-карбамоил глюкуроноид, выделяются с фекалиями. Время, необходимое для извлечения половины перорально вводимого препарата ($1/2$) составляет около 12 часов. Поскольку большая часть выведения ситаглиптина происходит через почки, ожидается определенное взаимодействие его с другими лекарственными средствами. Исследования на животных показали сходные фармакокинетические свойства ситаглиптина с человеческой популяцией. У собак большая часть препарата выводится с мочой в неизмененном виде, а у крыс основной путь экскреции - через желчь.

Метаболиты, наблюдаемые в популяции человека, также выявлены в плазме, желчи, моче и фекалиях экспериментальных животных [120].

Ситаглиптин является сильнодействующим селективным ингибитором ДПП-4 со значением IC_{50} 18 нМ. Применяемый в однократной суточной дозе у пациентов с СД2, ситаглиптин ингибирует ДПП-4 в плазме крови, что приводит к повышенному выделению инсулина и С-реактивного белка. Кроме того, препарат снижает секрецию глюкагона и уровень глюкозы после теста на переносимость, когда этот сахар вводится перорально. При хроническом введении ситаглиптина после 12 недель терапии уровни HbA_{1c} и глюкозы натощак значительно снижаются [120].

Фармакокинетика, метаболизм и механизмы эффектов вилдаглиптина

Вилдаглиптин представляет собой производное пирролидин-карбонитрила и является мощным ингибитором ДПП-4, используемым при лечении СД2. По химической структуре представляет (2S) -1- [2 - [(3-гидрокси-1-адамантил) амино] ацетил] пирролидин- 2-карбонитрил, эмпирическая формула $C_{17}H_{25}N_3O_2$, состоящий из атомов углерода, водорода, азота и кислорода, молекулярная масса 303,399 г/моль. Элементный анализ показал процентный состав элементов, составляющих структуру вилдаглиптина: С - 67,30%, Н - 8,31%, N - 13,85%, О - 10,55%.

Фармакокинетический профиль вилдаглиптина описан в доклинических исследованиях у здоровых добровольцев, а также у лиц с установленным диагнозом СД2. В обоих исследованиях его вводили в одной и той же дозе 100 мг перорально [112].

Вилдаглиптин быстро всасывается после приема внутрь, при этом максимальные концентрации в крови достигаются через 1-2 часа после последней введенной дозы. Пероральная биодоступность этого препарата составляет 85%, и никакого эффекта от введенной пищи не наблюдается. Для устранения половины введенной дозы вилдаглиптина (t_{max}) требуется около 90 минут, в то время как максимальный ингибирующий эффект этого препарата

ождается в течение первых 30 минут после введения дозы. Вилдаглиптин подвергается интенсивному метаболизму в печени, который происходит в результате реакций гидролиза с образованием его неактивного метаболита LAY151. Препарат минимально метаболизируется через CYP P450, тогда как элиминация происходит преимущественно с мочой. Процент неизменной экскреции препарата составляет около 18-22% [112].

Ингибируя фермент ДПП-4, вилдаглиптин повышает уровень активного ГЛП-1. Этот гормон секретируется кишечными L-клетками, наиболее распространенными эндокринными клетками в кишечнике, в ответ на присутствие в них пищи. Считается, что помимо стимуляции секреции инсулина ГЛП-1 замедляет опорожнение желудка, ингибирует секрецию глюкагона и снижает аппетит. Секреция ГЛП-1 значительно уменьшается у пациентов с СД2. В связи с этим, применение вилдаглиптина у этих пациентов весьма оправдано [26].

Фармакокинетика, метаболизм и механизмы эффектов саксаглиптина

Саксаглиптин является мощным, селективным перорально активным ингибитором цианопирролидина ДПП-4. По химической структуре он представляет собой (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-амино-2-(3-гидрокси-1- адамантил) ацетил]-2-азабицикло[3.1.0]гексан-3-карбонитрил. Эмпирическая формула: $C_{18}H_{25}N_3O_2$, Молекулярная масса 315,410 г/моль. Элементный анализ продемонстрировал процентный состав элементов, образующих структуру саксаглиптина в соотношении: С - 68,54%, Н - 7,99%, N - 13,32%, О - 10,15%.

Саксаглиптин легко всасывается после приема внутрь, Биодоступность его равна 75%. Максимальная концентрация в крови (C_{max}) 25,7 ng/mL достигается через полтора часа при назначении в обычно рекомендуемой дозе 5 мг. Время, необходимое для достижения T_{max} , находится в диапазоне равном другим ингибиторам ДПП-4, однако концентрация саксаглиптина в плазме крови несколько ниже при лечении другими препаратами этой группы, что делает саксаглиптин наиболее мощным ингибитором ДПП-4. Это можно объяснить тем, что при введении в более низкой дозе по сравнению с другими

ингибиторами ДПП-4 (0,5 нмоль/л) достигается 50% ингибирование фермента ДПП-4 (IC_{50}). Применение в разовой суточной дозе позволяет ингибировать этот фермент в течение 24 часов. Саксаглиптин связан с белками плазмы (<10%) в небольшом процентном соотношении, в то время как объем распределения составляет около 151 L. Саксаглиптин является единственным ингибитором ДПП-4, который подвергается метаболизму с участием комплекса печеночных ферментов CYP3A4/5, когда 50% препарата метаболизируется до 5-гидроксисаксаглиптина. Этот активный метаболит достигает C_{max} в среднем через 4 часов. Выделение саксаглиптина происходит через почки и печень, при этом около 25% препарата выводится с мочой, а 22% - с фекалиями. Активный метаболит этого препарата в значительной степени выводится через почки [136].

Саксаглиптин, как ингибитор ДПП-4, предотвращает эндогенный катаболизм GLP-1 и, следовательно, стимулирует высвобождение инсулина и в то же время ингибирует инкрецию глюкагона. Используемый в качестве монотерапии, он эффективно регулирует уровень глюкозы, в том числе - после приема пищи [136].

1.4.4. Взаимодействие ингибиторов ДПП-4 с другими лекарственными средствами

Ингибиторы ДПП-4 не обладают способностью значительно активировать или ингибировать изоформу ферментной системы CYP и поэтому редко вступают в клинически значимые взаимодействия с другими лекарственными средствами, которые метаболизируются этими ферментами. Не установлено, чтобы ингибиторы ДПП-4 взаимодействовали с препаратами, которые назначаются по одному и тому же показанию, включая метформин, пиоглитазон, розиглитазон, глибурид и симвастатин. Это указывает на безопасность совместного применения ингибиторов ДПП-4 с этими препаратами без необходимости корректировки режима дозирования любого из них [51].

Ограниченный путь метаболизма этих препаратов в печени очень редко вызывает взаимодействие этого ингибитора ДПП-4 с другими лекарственными средствами. Метаболизм саксаглиптина осуществляется с помощью изоформы CYP 3A4/5, поэтому кетоконазол, являясь сильным ингибитором этого фермента, как и Р-гликопротеина, значительно повышают $C_{\max}$ (62%) и AUC (145%) саксаглиптина при значении аналогичных параметров активного метаболита саксаглиптина снижаются при одновременном введении кетоконазола ($C_{\max}$ (95%) и AUC (88%). По этим причинам доза саксаглиптина обязательно должна быть на 50% меньше (2,5 мг) при одновременном применении с мощными ингибиторами CYP 3A4/5 [92]. Блокада терапевтического эффекта саксаглиптина наблюдалось при совместном введении этого ингибитора ДПП-4 с метформином, глибуридом, пиоглитазоном, дигоксином, симвастатином и дилтиаземом [127].

Отсутствие значительных взаимодействий между лекарственными средствами при применении ингибиторов ДПП-4 может быть объяснено тем фактом, что эта группа препаратов не оказывает значительного влияния на активность фермента P450 и в очень небольшом проценте связывается с белками плазмы крови. Одним из возможных фармакодинамических взаимодействий этой группы препаратов является их применение вместе с производными сульфонилмочевины, когда повышается риск развития гипогликемии [151].

1.4.5. Селективность ингибиторов ДПП-4

ДПП-4 представляет собой большое семейство протеаз, которое включает протеазы ДПП-8 и ДПП-9, обладавшие токсическими эффектами в доклинических исследованиях. По этой причине очень важно, чтобы препараты этой группы были способны селективно ингибировать фермент ДПП-4 для обеспечения безопасной терапии ими и, учитывая, что их применение по этим показаниям является длительным [161].

Во время исследований *in vitro* ситаглиптин показал высокую селективность по отношению к ДПП-4 без ингибирующей активности по

отношению к другим типам протеаз. С другой стороны, саксаглиптин проявлял несколько меньшую селективность в отношении ингибирования ДПП-8/9 *in vitro* по сравнению с ситаглиптином. Однако до сих пор неизвестно, какую селективность показал бы этот препарат, если бы он был протестирован и *in vivo* учитывая, что ДПП-8/9 локализованы только внутриклеточно [51].

1.4.6. Роль ингибиторов ДПП-4 в феномене preconditionирования

В двух исследованиях была изучена роль вилдаглиптина, как возможного фармакологического агента, обеспечивающего предварительное кондиционирование. Во исследования на свиньях, авторы его пришли к выводу, что предварительное кондиционирование вилдаглиптином значительно уменьшало размер инфаркта, снижая чувствительность миокарда к аритмиям, вызванным ишемическо-реперфузионным повреждением. Кардиопротекторное действие вилдаглиптина заключалось в защите митохондрий сердечной мышцы от повреждающего действия факторов окислительного стресса при ишемическо-реперфузионном повреждении [40]. Другое исследование, проведенное на изолированных сердцах крыс, подтвердило кардопротекторный эффект вилдаглиптина в условиях повреждения миокарда при ишемии и последующей реперфузии, о чем свидетельствовало улучшение всех параметров функции левого желудочка [64].

Результаты исследования Chang и соавторов показали, что применение ситаглиптина за две недели до воспроизведения ишемии и реперфузии миокарда значительно уменьшило степень повреждения сердца [142]. Подобно исследованию Sun и его коллег [116], эта группа ученых отметила значительное увеличение ЛНП и КФК-МВ после ишемического и реперфузионного повреждения миокарда у крыс. Однако введение ситаглиптина значительно снижало высвобождение ЛНП и КФК-МВ до повреждения миокарда. Это объясняется способностью ситаглиптина ингибировать развитие окислительного стресса и одновременно повышать эффективность антиоксидантной защиты.

Рандомизированное клиническое исследование показало кардиопротекторный эффект саксаглиптина у пациентов, страдающих СД2. Частота сердечно-сосудистых катастроф была значительно снижена у пациентов, получавших саксаглиптин в качестве основного препарата по сравнению с контрольной группой [23]. Однако до настоящего времени отсутствуют исследования кардиопротекторного эффекта саксаглиптина при ишемическом, гипоперфузионном и реперфузионном повреждении сердца, а также исследований, которые бы выявили ключевые звенья механизма кардиозащитное действие этого ингибитора ДПП-4.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

2.1. Экспериментальные животные.

Экспериментальное исследование проведено в Лаборатории физиологии сердечно-сосудистой системы (зав. профессор В. Яковлевич) факультета медицинских наук города Крагуевце (Сербия).

В исследовании использовано 60 белых крыс линии Wistaralbinosja обоего пола массой тела 250 ± 30 грамм и их изолированные сердца. Животных содержали в стандартных лабораторных условиях (температура воздуха $23 \pm 1^\circ\text{C}$, относительная влажность воздуха 50%, циклы освещенности помещения 12/12 (свет/темнота) с началом периода освещения в 9:00 час и свободным доступом к воде и пище (adlibitum). Животные были разделены на 5 групп (по 12 крыс в каждой).

В работе соблюдались требования Директивы ЕС по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях 86/609/EEC, а также принципы этики. Протокол эксперимента был одобрен Комитетом по этике в интересах экспериментальных животных Факультета Медицинских Наук Университета г. Крагуевац.

2.2. Моделирование сахарного диабета типа 2 у крыс

Принимая во внимание, что большинство пациентов с СД2 резистентны к инсулину, была выбрана модель СД2 на крысах, что было оптимально с учетом цели нашего исследования.

Модель СД2 у крыс базируется на использовании умеренной дозы стрептозотоцина в условиях диеты с высоким содержанием жиров. В нашем исследовании СД2 был индуцирован у 48-ми 6-недельных крыс *Wistar albino* массой тела 200 ± 30 грамм. Вначале крыс кормили рационом с высоким содержанием жира в течение 4 недель. После 4 недель такого питания и после 12-часового ночного голода внутрбрюшинно вводили стрептозотцин в однократной дозе 25 мг/кг. Через трое суток (72 часа) измеряли в крови уровни глюкозы и инсулина, а также артериальное давление. Животные с уровнями

ГПК натощак более 7 ммоль/л и инсулина натощак более 6 ммоль/л считались крысами с СД2 [20,38,86] и они были включены в исследование.

2.3. Используемые препараты, их дозы и пути введения

Для исследования прямого воздействия ингибиторов ДПП-4 в изолированном сердце крыс были использованы коммерческие реагенты производителя - Sigma-AldrichChemieGmbH (Германия): ситаглиптин (Sitagliptin) MW = 523,32, Саксаглиптин (Saxagliptin), MW = 315,41) и вилдаглиптин (Vildagliptin) MW = 303, 40). Исследования проводились на изолированных сердцах крыс, разделенных на пять групп по 12 сердец в каждой:

Первая группа: изучение изменений функции, структурно-геометрических и биохимических показателей изолированных сердец интактных крыс в условиях ретроградной перфузии их коронарных сосудов по методу Лангендорфа (контроль).

Вторая группа: исследование изменений функции, структурно-геометрических и биохимических показателей изолированных сердец крыс с сахарным диабетом 2-го типа при ретроградной перфузии их коронарных сосудов по методу Лангендорфа.

Третья группа: изучение изменений функции, структурно-геометрических и биохимических показателей изолированных сердец крыс с СД2 после фармакологического preconditionирования животных в течение 3 недель ингибитором ДПП-4: ситаглиптином в дозе 0,6 мг/кг per os.

Четвертая группа: исследование изменений функции, структурно-геометрических и биохимических показателей изолированных сердец крыс с СД2 после фармакологического preconditionирования животных в течение 3 недель ингибитором ДПП-4: саксаглиптином в дозе 0,45 мг/кг per os.

Пятая группа: изучение изменений функции, структурно-геометрических и биохимических показателей изолированных сердец крыс с СД2 после фармакологического preconditionирования животных в течение 3 недель ингибитором ДПП-4: вилдаглиптином в дозе 9 мг/кг per os.

2.4. Подготовка изолированного сердца крысы по Лангендорфу и ретроградная перфузия его коронарных сосудов раствором Кребса-Хензелята при постоянном давлении

Техника подготовки изолированного сердца крысы для ретроградной перфузии по методу Лангендорфа

Животные после кратковременного наркоза, вызванного внутрибрюшинным применением кетамина (10 мг/кг) и ксилазина (5 мг/кг), (долгосрочный наркоз может вызвать сердечную недостаточность, которая противопоказана в наших исследованиях) декапитировали и крепились на операционном столике. После этого быстро вскрывалась брюшная полость, диафрагма разрезалась слева направо и грудная полость открывалась вдоль линии молочных желез. Для поддержания относительного гомеостаза сердце сразу после вскрытия грудной клетки омывали физиологическим раствором (+4°C). После вскрытия грудной клетки в верхней части сердца разрезали перикард: таким образом оно было готово к изоляции. У основания сердца пересекали 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. После этого проводили обработку основания сердца для устранения всех тканей кроме восходящей аорты, необходимой для проведения ретроградной перфузии сердца. Подготовленную аорту прикрепляли и фиксировали лигатурой к канюле прибора Лангендорфа. Для получения стандартных и результатов и обеспечения жизнеспособности препаратов сердца указанная процедура выполнялась быстро - в течение нескольких минут.

После фиксации изолированного сердца кустрою 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. Благодаря этому обеспечивался однонаправленный ток перфузионного раствора по следующему пути: - аорта – левое предсердие - левый желудочек - коронарный синус - коронарные артерии - коронарные вены, что давало возможность непосредственно оценивать показатели функции изолированного сердца и характеристики коронарного тока перфузирующего раствора;

2) разрушение митрального клапана обеспечивал вход и установку в левом желудочке датчика - преобразователя BS4 73-0184. С его помощью мониторировали показатели сократительной функции миокарда.

После начала перфузии коронарных сосудов раствором Кребса-Хензелейта, установления его постоянного давления (70 см водного столба) и достижения стабильной работы сердца в условиях изотермической (37°C) реперфузии миокарда (для чего требовалось около 30 мин, в течение которых миокард находился в состоянии относительной гипоперфузии), регистрировали показатели функции левого желудочка изолированного сердца. Испытуемые вещества вводились с помощью инфузионного насоса через аорту, вместе с перфузирующим раствором КХ, в сердце.

Прибор Лангендорфа LF-01 F-P для ретроградной перфузии изолированного сердца

Экспериментальные исследования проводились с использованием прибора Лангендорфа марки LF-01 F-P (Experimetria Ltd, Будапешт, Венгрия) для перфузии изолированного сердца. Основные компоненты прибора включали:

1) две вертикальные стеклянные трубки одинаковой высоты, из которых трубка меньшего диаметра находится в трубке большего калибра. В пространстве между этими двумя трубками циркулирует вода, которая поступает в трубу большего калибра через боковые трубы и систему шлангов,

предварительно нагретая до определенной температуры в водяной бане. В трубку меньшего калибра, методом отрицательного давления, вводится физиологический раствор (в наших опытах мы использовали раствор Кребса-Хенселейта), который имеет те же характеристики, что и внеклеточная жидкость. Циркулирующая вода в трубке большего калибра нагревается, так чтобы раствор в трубе малого калибра на выходе из системы имел постоянную температуру 37°C, соответствующую температуре тела. Трубка меньшего калибра заканчивается канюлей, на которой размещался препарат изолированного сердца;

2) резервуар, содержащий раствор КХ объемом 4 литра. С одной стороны он соединен с внутренней трубкой меньшего калибра, а с другой - баллоном с газовой смесью кислорода и диоксида углерода (O_2/CO_2).

3) баллон с газовой смесью в соотношении $O_2/CO_2 = 95\%/5\%$, подключен к резервуару, в котором находится раствор КХ. Баллон с газовой смесью необходим для достижения физиологического парциального давления кислорода и углекислого газа, имеющегося в артериальной крови и создания отрицательного давления в резервуаре с целью введения раствора во внутреннюю трубку устройства;

4) канюлю, через которую соединяется выходящая трубка системы трубок с восходящей аортой изолированного сердца крысы;

5) водяную баню, которая нагревает воду во внешней трубе и, таким образом - перфузирующий раствор КХ до 37°C (изотермическая температура);

6) инфузионные насосы, с помощью которых исследуемое вещество с соответствующей скоростью (в зависимости от базального коронарного потока) вводится непосредственно в канюлю и далее – в восходящую аорту.

7) компьютер с программным обеспечением (SpelAdvancedHaemoSysv3.24), к которому подключены датчики для непрерывного мониторинга кардиодинамических параметров с учетом.

8) датчики - преобразователи, связанные с различными структурами изолированного сердца и непрерывно передающие данные о функции миокарда

левого желудочка (изменение систолического и диастолического давления перфузирующей жидкости, частоты сердечных сокращений, давления жидкости в аорте) на компьютер. С этой целью применяли три типа датчиков: один датчик (преобразователь BS4 73-0184) подключался к тонкой металлической трубке на конце которой находится баллончик (диаметр 5 мм, латексная /нейлоновая пленка), заполненный дистиллированной водой. Этот баллончик вводился в полость левого желудочка (после надреза кольца митрального клапана) позволял непосредственно регистрировать давление и частоту сердечных сокращений. При этом, записывались следующие параметры функции левого желудочка: dp/dt_{max} - максимальная скорость изменения давления в полости левого желудочка (мм рт.ст./сек); dp/dt_{min} - минимальная скорость изменения давления в левом желудочке (мм рт.ст./сек); SLVP - систолическое давление в полости левого желудочка (мм рт.ст.), DLVP - диастолическое давление в левом желудочке, (мм рт.ст.) и ЧСС - частота сердечных сокращений (уд/мин). Учитывая морфологическое и функциональное доминирование в нативном сердце его левого желудочка, мониторинг указанных параметров позволяет адекватно описывать функцию всего сердца; другой датчик (датчик перфузионного давления) находился в фиксированном положении непосредственно на канюле (то есть - на аорте). Это позволяет оценивать динамику давления жидкости (в мм рт.ст.) в ней; третий датчик (датчик температуры) находился также в фиксированном положении в стеклянной емкости, которая окружала изолированное сердце и регистрирует его температуру.

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

Ретроградная перфузии изолированного сердца крысы раствором Кребса-Хенселейта при постоянном перфузионном давлении

Функция сердца и поток перфузирующей жидкости (раствор Кребса-Хенселейта) по коронарным сосудам оценивались нами на модифицированной модели изолированного по Лангендорфу сердца крысы.

В эксперименте наиболее часто используют два классических варианта модели изолированного по Лангендорфу сердца при перфузии его коронарных сосудов жидкостью при:

- 1) различном ее давлении, но постоянном потоке;
- 2) различном объеме ее потока, но при постоянном давлении.

В первом варианте модели переменная величина - это давление перфузирующего раствора. Давление его мониторируется с помощью специальной системы датчиков (преобразователей). Во втором варианте модели мониторируется меняющаяся величина потока перфузирующего раствора. Эта величина регистрируется с помощью либо флоуметра (датчики которого расположены на коронарных артериях), либо путем сбора жидкости из венозных сосудов сердца через определенные промежутки времени. В обеих экспериментальных моделях перфузии сердца оцениваются средние уровни переменной величины.

В нашем исследовании использована модифицированная модель перфузии изолированного сердца по Лангендорфу, при которой постоянным было давление перфузирующего раствора (70 см водного столба), а величина потока раствора – была переменной составляющей. Соотношение этих показателей определяется по следующей формуле:

$$p = \text{const} / \text{поток} = l / \text{radius}^4$$

где: p - давление; const - постоянная величина; radius – внутренний радиус трубки.

Перфузия коронарных сосудов изолированного сердца при постоянном давлении раствора имеет преимущество в сравнении с другими вариантами модели, поскольку при физиологических условиях циркуляции жидкости перфузионное давление в коронарных сосудах поддерживается постоянным [45].

2.5 Методика перфузии коронарных сосудов изолированного сердца крысы раствором Кребса-Хензеляйта

Испытуемые вещества вводили в течение 5 минут в растворе Кребса-Хензеляйта в левый желудочек сердца через канюлю устройства Лангендорфа.

Перфузат, оттекавший по коронарным венам собирали на следующих этапах эксперимента: - в точке стабилизации функции сердца после его извлечения из грудной клетки, фиксации к устройству Лангендорфа и достижения оптимальной перфузии после периода относительной гипоперфузии (занимавшего в среднем 30 мин); - далее: на 1, 3, 5, 10, 15, 30, 45 и 60-е минуте периода реперфузии.

Все животные были разделены на пять групп. Первая группа: здоровые крысы (контроль). Сердца этих животных, после периода относительной гипоперфузии раствором Кребса-Хензеляйта, стабилизации тока перфузата по коронарным сосудам и функции левого желудочка, подвергались реперфузии в течение 60 минут. Перфузат, оттекавший по коронарным венам собирали во временные точки, указанные выше. Вторая группа: животные с индуцированным стрептозотоцином сахарным диабетом 2-го типа и гипоперфузией/реперфузией их сердец раствором Кребса-Хензеляйта. У животных остальных трех групп проводили в течение 3 недель предварительное фармакологическое прекондиционирование одним из ингибиторов ДПП-4 путем введения препарата per os. Изолированные сердца этих крыс, после стабилизации протока раствора Кребса-Хензеляйта по коронарным сосудам и функции левого желудочка, перфузировали в течение 60 минут. Одновременно с этим, регистрировали изменения функции, структурно-геометрических и биохимических показателей.

2.6. Оценка функции и структурно-геометрические показателей сердца крысы *invivo*

Эхокардиографию проводил во всех группах животных *invivo* с использованием секторального сканера Hewlett-Packard Sonas 5500, Andover, MA, USA, оснащенного преобразователем фазовой линии 15,0 МГц, как описано ранее [29,70]. Перед началом исследования и в течение последней недели экспериментального протокола, после трех недель введения ингибитора ДПП-4, выполнялась трансторакальная эхокардиография. Перед этим крыс анестезировали внутрибрюшинным введением 50 мг/кг кетамина (100 мг/мл; Ketaset, Fort Dodge, Fort Dodge, IA) и 10 мг/кг ксилазина (100 мг/мл; Anased, Lloyd Laboratories, Shenandoah, IA).

Регистрировали данные о состоянии межжелудочковой перегородки и стенки левого желудочка (ЛЖ) на уровне папиллярных мышц. Измерялись следующие величины: - толщина стенки межжелудочковой перегородки в конце диастолы (IVSd), - внутренний размер ЛЖ в конце диастолы (LVIDd), - толщина стенки ЛЖ в конце диастолы (LVPVd), - толщина межжелудочковой перегородки в конце систолы (IVSs), - внутренний диаметр ЛЖ в конце систолы (LVIDs), - толщина задней стенки ЛЖ в конце систолы (LVPVs) и ее фракционное укорочение (FS) в сравнении с исходной длиной, выраженное в процентах. Средние значения получены из пяти циклов сердечного ритма в М-режиме.

2.7. Электрофизиологические методы исследования (регистрация уровня артериального давления, ЭКГ, показателей силы и скорости сокращения миокарда)

Известно, что СД2 характеризуется повышенным уровнем артериального давления (АД). С учетом этого была поставлена задача изучить в группах интактных крыс и крыс с СД2 влияния ингибиторов ДПП-4 на уровни систолического и диастолического АД, а также на частоту сердечных сокращений (ЧСС) [98].

В начале исследования и за сутки до умерщвления у здоровых животных и у крыс с СД2 (ингибиторы СД2 + ДПП-4) измеряли АД и ЧСС с использованием неинвазивных систем записи артериального давления (Rat Tail Cuff Method Blood Pressure Systems (MRBP-R), IITC Life Science Inc., Los Angeles, CA, USA) (MRBP-R) [144]. В каждом сеансе было сделано не менее десяти измерений с усреднением значений.

2.8. Биохимические методы исследования (определение содержания липидов в сыворотке венозной крови; инсулина и глюкозы в плазме венозной крови крыс *in vivo*; нитрита (NO_2^-), супероксидного анион радикала кислорода, перекиси водорода, индекса перекисного окисления липидов в крови коронарных вен крыс; активности супероксиддисмутазы и каталазы, содержания восстановленного глутатиона в лизате эритроцитов).

Биохимические анализы проводили, используя перфузат из сосудов изолированных сердец крыс (собранны в конце контрольного периода и в конце периода введения испытуемого вещества), а также в крови животных после их декапитации. Кровь собирали в пробирки объемом 5 мл, содержащие антикоагулянт (цитрат натрия). Плазму и эритроциты разделяли с помощью центрифугирования образца крови в течение 10 минут при 3000 об/мин. Затем немедленно проводили разделение плазмы и эритроцитов. Плазму хранили при -80°C . Эритроциты лизировали с помощью дистиллированной воды в соотношении 1:7 и также хранили при той же температуре. Прооксиданты (индекс ПОЛ, NO_2^- , H_2O_2 и O_2) измеряли в миокарде и плазме крови, а антиоксидантные факторы (СОД, каталаза и глутатион), измеряли в лизате эритроцитов крови. Активность и содержание веществ определяли спектрофотометрически на приборе SpecordS-600 AnalyticJena, UnitedKingdom.

Определение содержания сывороточных липидов в плазме крови крыс *in vivo*

Учитывая, что повышение уровня глюкозы в плазме крови при СД2 часто сопровождается увеличением содержания триглицеридов, ЛПНП и снижением

ЛПВП в сыворотке, были проанализированы их уровни в сыворотке крыс всех серий с использованием метода спектрофотометрии и коммерческих реактивов (Siemens Healthcare Diagnostics, Frimley, Camberley, Surrey, UK) в соответствии с инструкциями производителя, на биохимическом анализаторе (Dimension Xpand, Siemens, IL, USA).

Определение уровня инсулина и глюкозы в плазме крови крыс *invivo* в условиях перорального теста на нагрузку глюкозой (ПТНГ)

Оценка концентрация глюкозы во время ПТНГ используется, в основном, для диагностики либо СД2, либо преддиабетических состояний (т.е. повышенного риска развития СД2). Обычно уровень глюкозы контролируется в течение 2-3 часов, а уровень инсулина измеряется в течение периода голодания и в последний час ПТНГ [82].

В нашем исследовании ПТНГ был выполнен в конце периода экспериментального лечения крыс ингибиторами ДПП-4 с СД2. Образцы крови для определения уровней глюкозы натощак и инсулина брались из хвостовой вены. Затем вводили перорально глюкозу в дозе 2 г/кг массы тела, и образцы крови отбирали из хвостовой вены через 30, 60, 120 и 180 минут. Уровни глюкозы оценивали немедленно через 0, 30, 60, 120 и 180 минут, используя глюкометр (Accu-Chek, RocheDiagnostics, Indianapolis, IN, USA, с его сравнительными лентами). На 0 и 180 минуты уровни инсулина в образцах плазмы оценивали иммуноферментным методом (ELISA), как описано ранее [106]. ПТНГ изучали в группах здоровых животных и крыс с СД2 (СД2 + ингибиторы ДПП-4).

Определение индекса перекисного окисления липидов

Индекс перекисного окисления липидов (ИПОЛ-TBARS), 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, а также в плазме из образцов крови. [30]. Метод основан на

тестировании уровня 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.

В случае использования коронарного венозного перфузата выполняется еще один этап, на котором количество TBARS определяется на грамм ткани сердца следующим образом:

$$nmol\ TBARS/минуту/g\ wt = \Delta A / 1.56 \times 1.25 \times CF / m_{сердца}$$

где m - масса сердца; wt - вес крысы; CF - коронарный проток.

Важно отметить, что уровень TBARS выражается в мкМ, тогда как количество других молекул выражается 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 активных форм кислорода и азота, в то время как все другие параметры, относящиеся к отдельным молекулам кислорода и азота, имеют разные механизмы действия как отдельные формы кислорода.

Определение содержания оксида азота.

Определение уровня оксида азота в коронарном венозном перфузате и в плазме крови (в зависимости от образца), проводилось косвенным методом по тестированию эндотелиальной системы: L-аргинин:NO в коронарной и системной циркуляции. Так как методы прямого определения оксида азота (NO) отсутствуют, спектрофотометрический метод определения количества нитрита [27] считается доступным и достаточно надежным [60,110].

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)-этилендиамина 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 или плазмы использовали эквивалентное количество раствора Кребса-Хензенлейта (в случае перфузата) или дистиллированной воды (в случае плазмы крови).

Концентрацию высвобожденного нитрита в образцах определяли на основе калибровочной кривой. Кривая строится 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 (или дистиллированной воды) 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 NO_2^- /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.

В случае использования коронарного венозного перфузата выполняли еще один этап, на котором количество нитрита определяли на грамм ткани сердца следующим образом:

$$\text{nmol NO}_2^-/\text{минуту/g wt} = \Delta E/F \times CF/m_{\text{сердца}}$$

где m-масса сердца; wt-вес крысы; CF-коронарный проток.

Определение содержания супероксидного анион радикала (O_2^-).

Определение количества супероксидного анион-радикала (O_2^-) в коронарном венозном перфузате или в плазме крови (в зависимости от образца) основано на реакции O_2^- с нитросиним тетразолием (НСТ) с образованием нитросинего формазана [28]. Оценка количества O_2^- в коронарной венозной крови основана на реакции O_2^- с НСТ до нитросинего формазана [59]. Измерение проводили на длине волны максимального поглощения $\lambda_{\text{max}} = 550$ нм. Анализируемая смесь (“assay mixture“) содержит: 50 mM TRIS-HCl буфер

(рН 8,6), 0,1 мМ ЭДТА, 0,1 мг/мл желатина и 0,1 мМ 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 или плазмы использовали эквивалентное количество раствора Кребса-Хензенлейта (в случае перфузата) или дистиллированной воды (в случае плазмы).

В самом начале реакции измеряли исчезновение содержания смеси и помечали как исчезновение содержания E1. 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 E2. Ту же процедуру применяли в контроле. Концентрация высвобожденного O₂- получали используя следующие уравнения:

$$\Delta E_u = E2_u - E1_u \text{ (для образца)}$$

$$E_{sp} = E2_{sp} - E1_{sp} \text{ (для контроля)}$$

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

$$\text{нмоль O}_2^-/\text{мл образца} = \Delta E / 0.015 \times 1/0.05$$

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

В случае использования коронарного венозного перфузата выполняли еще один этап, на котором количество нитрита определяли на грамм ткани сердца следующим образом:

$$\text{нмоль O}_2^-/\text{минуту/g} = \Delta E / 0.015 \times CF/m_{\text{сердца}}$$

где m-масса сердца; CF-коронарный проток.

Определение перекиси водорода (H₂O₂).

Определение количества перекиси водорода (H₂O₂) в коронарном венозном перфузате или в плазме (в зависимости от образца) 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 $\lambda_{\text{max}}=610\text{nm}$ [137].

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 или плазмы 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 или плазмы использовали эквивалентное количество раствора КХ (в случае перфузата) или дистиллированной воды (в случае плазмы). 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 $\lambda_{\text{max}}=610$ нм в стеклянных кюветах объемом 1 мл на спектрофотометре LKBBiochrome. модель: Ulltrospec 4050. От полученных значений оптической плотности вычитали величину

оптической плотности контроля (В), 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 $\lambda_{\text{max}}=610$ нм (Au) и его сравнения с контролем (Asp) рассчитывается конечная оптическая плотность (ΔA) ($A = Au - Asp$). 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:

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

В случае использования коронарного венозного перфузата выполняется еще один этап, на котором количество H_2O_2 определяется на грамм ткани сердца следующим образом:

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

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

Определение активности каталазы

Активность каталазы определяли в лизате эритроцитов крови. После разбавления лизата дистиллированной водой в соотношении 1:7 и добавления этанола в соотношении 0,6:1 переходили к дальнейшей процедуре. 50 мкл каталазы буфера, 100 мкл образца и 1 мл 10 мМ H_2O_2 помещали в пробирку, и образцы измеряли при длине волны 360 нм [19].

Определение активности супероксиддисмутазы (СОД)

Активность супероксиддисмутазы, выделенной из лизата эритроцитов, определяли эpineфрин-методом поBeutler. При перемешивании 100 мкл лизата и 1 мл карбонатного буфера начинался процесс, после чего добавляли 100 мкл эpineфрина. Измерение проводили спектрофотометрически при длине волны 470 нм [35].

Определение восстановленного глутатиона (GSH)

Активность антиоксидантной восстановленной молекулы глутатиона оценивали в лизате эритроцитов и измеряли спектрофотометрическим методом, который основан на реакции окисления глутатиона с помощью 5,5-дитио-бис-6,2-нитробензойной кислоты по методу Beutlery [34].

2.9. Статистический анализ результатов работы

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, t-критерия Парного типа, критерия Манна-Уитни, критерия абсолютной вероятности Фишера, однофакторного или двухфакторного дисперсионного анализа. При тестировании достоверности разницы между параметрами, в случае нескольких подгрупп, использовали тест Бонферрони;

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

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

На первом этапе работы изучено действие ингибиторов ДПП-4 на звенья патогенеза сахарного диабета 2-го типа и на одно из его основных проявлений – гипергликемию. Учитывая, что для выявления именно СД2 (и повышенного риска его развития) в практической медицине и экспериментальных лабораториях используется пероральный тест с нагрузкой организма глюкозой, в этом фрагменте работы проводилась такая проба.

3.1. Влияние ингибиторов ДПП-4: саксаглиптина и ситаглиптина на развитие у крыс индуцируемого стрептозотоцином СД2 и его ключевое проявление – гипергликемию.

С целью выявления наличия (или отсутствия) воздействия саксаглиптина и ситаглиптина на развитие у крыс индуцируемого стрептозотоцином СД2 и его ключевое проявление – гипергликемию были исследованы уровни глюкозы и инсулина в венозной крови крыс до и после нагрузки глюкозой.

3.1.1. Влияние ингибиторов ДПП-4: саксаглиптина и ситаглиптина на содержание глюкозы плазмы венозной крови у крыс с сахарным диабетом 2-го типа до и после пероральной нагрузки глюкозой *in vivo*.

Результаты влияния саксаглиптина и ситаглиптина на уровень ГПП представлены на рисунке 1.

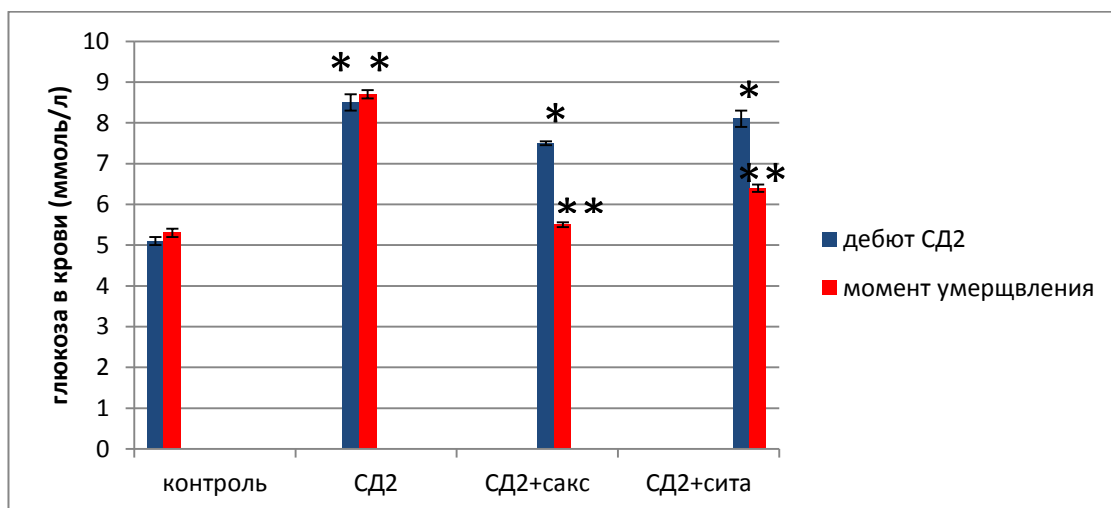


Рисунок 1. Влияние саксаглиптина и ситаглиптина на уровень глюкозы в плазме венозной крови у крыс с СД2 до и после пероральной нагрузки глюкозой *in vivo*.

Обозначения: СД2: животные с СД2 без лечения; СД2+сакс: животные с СД2 получавшие саксаглиптин; СД2+сита: животные с СД2 получавшие ситаглиптин; * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем, ** - $p < 0,05$ по сравнению с СД2.

Как видно, у крыс с СД2 до применения препаратов ДПП-4 уровень ГКП ($8,55 \pm 0,29$ ммоль/л) как основного проявления сахарного диабета, был статистически достоверно (в 1,6 раза) выше, чем в контроле у интактных крыс ($5,24 \pm 0,28$; $p < 0,05$). После применения ситаглиптина и саксаглиптина содержание ГКП у крыс СД2 (синие столбцы) также оставалось повышенным (соответственно, $8,12 \pm 0,21$ ммоль/л и $7,5 \pm 0,64$; $p > 0,05$). Следовательно, оба лекарственных препарата существенно не влияли на уровень ГКП у животных с СД2.

В отличие от этого, при тесте с пероральной нагрузкой глюкозой (2 г/кг массы тела) на 180 минуте от его начала у крыс с СД2 наблюдалось статистически достоверное снижение (красные столбцы) уровня гипергликемии под влиянием как ситаглиптина до $6,41 \pm 0,09$ ммоль/л (в 1,4 раза; $p < 0,05$), так и саксаглиптина до $5,54 \pm 0,05$ ммоль/л (в 1,6 раза; $p < 0,05$). В то же время, у животных с СД2 без применения ДПП-4 уровень ГПК при тесте с нагрузкой глюкозой повысился. В контрольной группе крыс уровень ГПК оставался на базальном уровне в течение всего времени исследования.

Далее было исследовано содержание инсулина в крови животных с СД2.

3.1.2. Влияние ингибиторов ДПП-4: саксаглиптина и ситаглиптина на содержание инсулина в венозной крови у крыс с сахарным диабетом 2-го типа до и после пероральной нагрузки глюкозой *in vivo*.

На рисунке 2 приведены данные о содержании инсулина в венозной крови крыс всех групп (контрольной, с СД2, при применении саксаглиптина и ситаглиптина у животных с СД2) до и на 180-й минуте после начала перорального нагрузочного теста с глюкозой.

Видно, что и до и на 180 минуте нагрузки глюкозой исследования уровень инсулина у животных с СД2 статистически значимо выше, чем в контроле.

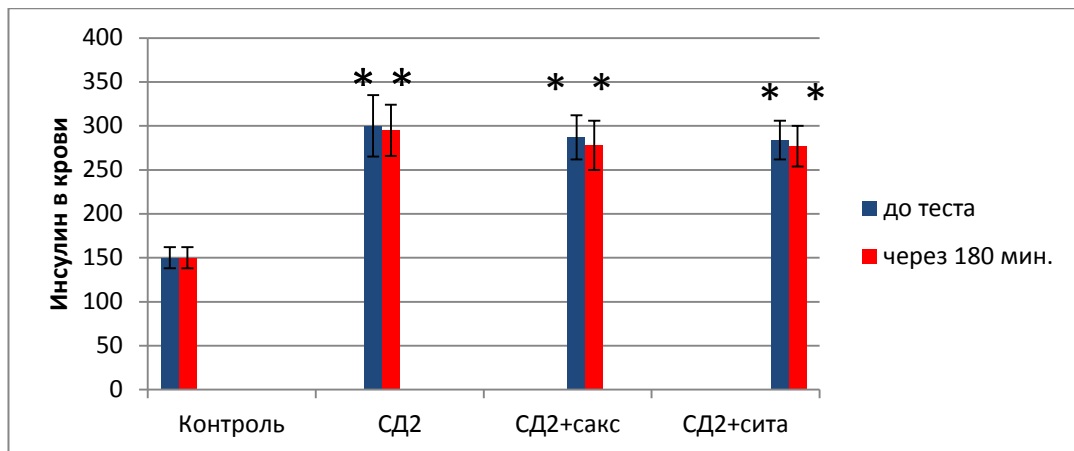


Рисунок 2. Влияние саксаглиптина и ситаглиптина на уровень инсулина в венозной крови крыс с СД2 до и на 180-й минуте после начала перорального нагрузочного теста с глюкозой *in vivo*.

Обозначения: те же, что на рисунке 1.

Как видно на рисунке 2, уровень инсулина в крови у крыс с СД2 ($300 \pm 0,29$) до применения препаратов ДПП-4 (саксаглиптина и ситаглиптина) был в 2,0 раза выше, чем у животных контрольной группы (150 ± 12 ; $p < 0,05$). После 3-х недельного лечения саксаглиптином и ситаглиптином уровень инсулина в крови менялся незначительно (287 ± 25 и 277 ± 22 , соответственно; $p > 0,05$) и оставался значительно выше нормы ($p < 0,05$).

Через 180 минут от начала нагрузочного теста с глюкозой уровень инсулина в крови животных без назначения препаратов ДПП-4 оставался практически неизменным (295 ± 25) и был в 2,0 раза выше, чем в контроле ($p < 0,05$). После 3-х недельного применения саксаглиптином и ситаглиптином уровень инсулина в крови крыс через 180 минут от начала нагрузочного теста с глюкозой также менялся незначительно (278 ± 28 и 284 ± 23 , соответственно; $p > 0,05$) и оставался существенно выше нормы ($p < 0,05$).

Таким образом, имеется лишь незначительная тенденция к снижению уровня инсулина в крови у животных с СД2 на фоне лечения саксаглиптином и

ситаглиптином как до нагрузочного теста с глюкозой, так и через 180 минут после его начала.

Заключение. Приведенные выше факты (значительная гипергликемия при одновременно повышенном уровне в крови инсулина у тех же животных) свидетельствуют, во-первых, о развитии у них сахарного диабета именно второго типа, т.е. с относительной инсулиновой недостаточностью, а во-вторых, о высокой антидиабетической эффективности ДПП-4: саксаглиптина и ситаглиптина при тесте с пероральной нагрузкой глюкозой у крыс с СД2. Очевидно, что такой эффект достигался, в том числе, за счет снижения степени инсулинорезистентности тканей, что позволяет рекомендовать применение указанных ингибиторов дипептидилпептидазы-4 для патогенетической терапии СД2.

На следующем этапе работы была поставлена задача изучить влияние ингибиторов ДПП-4: саксаглиптина и ситаглиптина на сократительную функцию сердца крыс с СД2 *in vivo* и миокарда левого желудочка *in vitro*, а также на коронарный проток перфузата в нем в условиях его гипоперфузии и последующей реперфузии раствором Кребса-Хензеляйта.

3.2. Влияние ингибиторов ДПП-4: саксаглиптина и ситаглиптина на показатели сократительной функции сердца крыс с СД2 *in vivo* и миокарда его левого желудочка *in vitro* и на коронарный проток раствора Кребса-Хензеляйта.

3.2.1. Влияние ингибиторов ДПП-4: саксаглиптина и ситаглиптина на уровень артериального давления и частоту сердечных сокращений у крыс с сахарным диабетом 2-го типа *in vivo*.

Результаты влияния саксаглиптина и ситаглиптина на уровень систолического АД у крыс с СД2 представлены на рисунке 3.

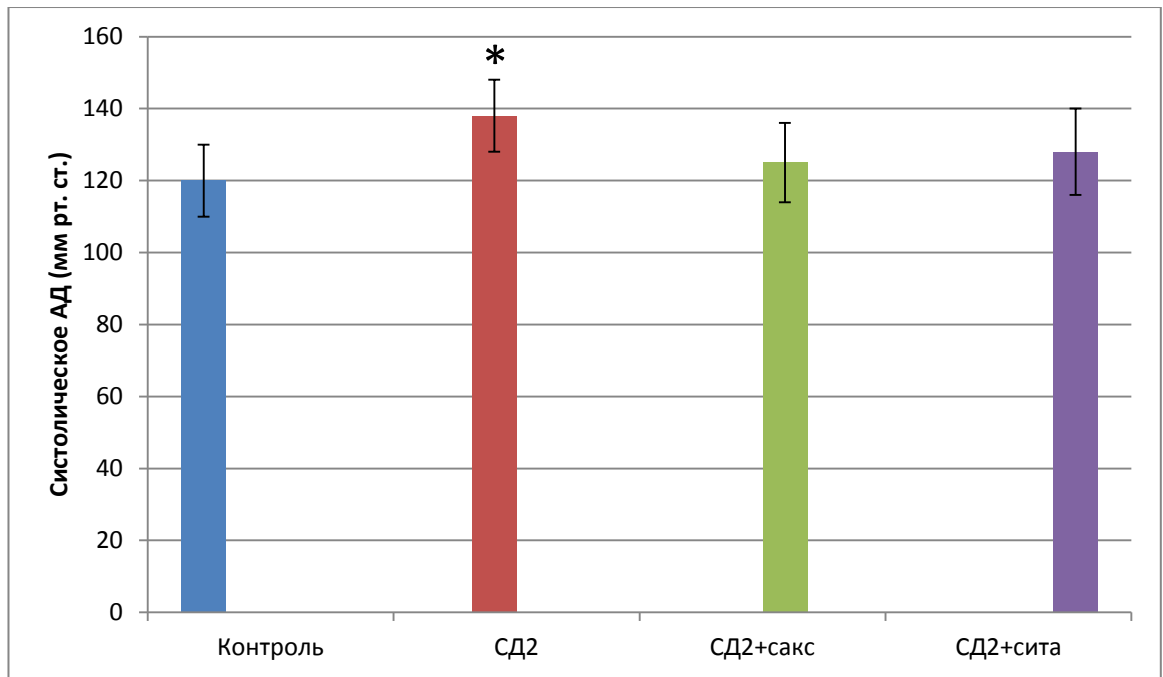


Рисунок 3. Влияние саксаглиптина и ситаглиптина на уровень систолического АД в левом желудочке сердца крыс с СД2 *in vivo*.

Обозначения: те же, что на рисунке 1

Данные рисунка 3 свидетельствуют о том, что у крыс с СД2 уровень систолического АД (138 ± 10 мм рт. ст.) был в 1,2 раза выше, чем в контроле (120 ± 10 ; $p < 0,05$).

После введения и саксаглиптина и ситаглиптина систолическое АД понижалось, хотя статистически и недостоверно (125 ± 11 мм рт.ст. и 128 ± 12 мм рт.ст. соответственно; $p > 0,05$) и оставалось выше.

Следовательно, оба препарата обеспечивали тенденцию к снижению систолического АД и, как следствие – степень нагрузки на миокард у животных с СД2.

В отличие от этого, применение в течение 3-х недель ингибиторов ДПП-4 саксаглиптина и ситаглиптина у крыс с СД-2 вызывало достоверное снижение уровня диастолического артериального давления в сравнении с группой крыс с СД2 без использования ингибиторов ДПП-4 (рисунок 4).

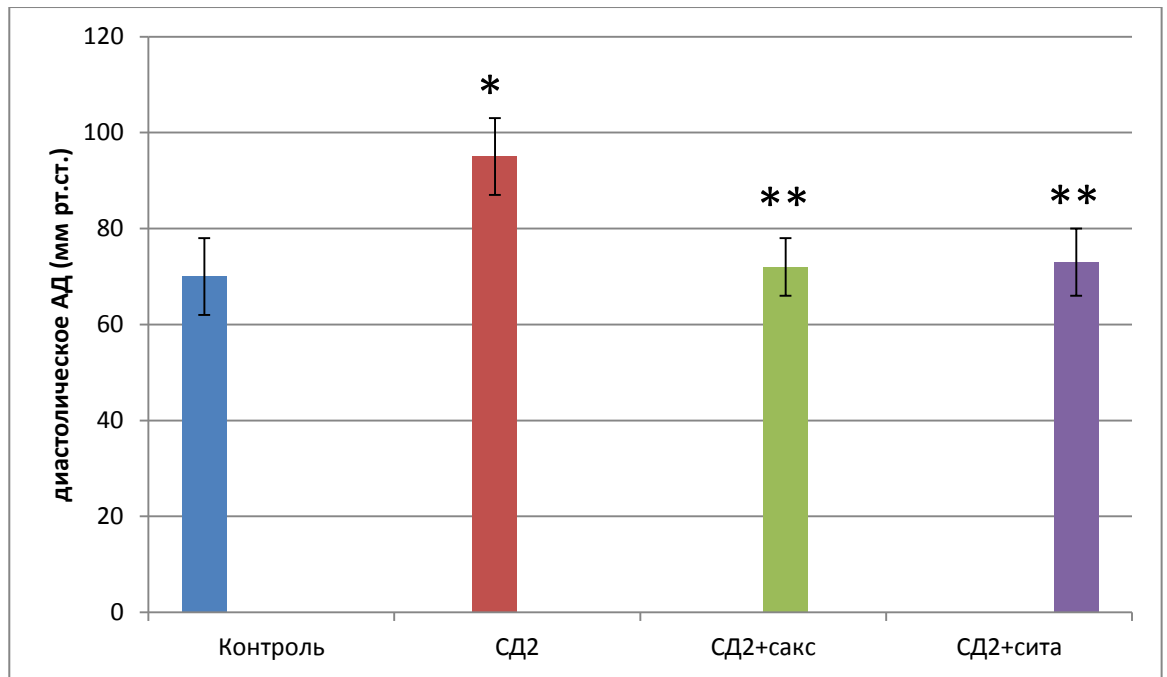


Рисунок 4. Влияние саксаглиптина и ситаглиптина на уровень диастолического АД в левом желудочке сердца у крыс с CD2 *in vivo*.

Обозначения: те же, что на рисунке 1.

Данные рисунка 4 свидетельствуют о том, что у крыс с сахарным диабетом 2-го типа уровень диастолического АД (95 ± 8 мм рт. ст.) в левом желудочке сердца был достоверно: в 1,4 раза выше, чем в контроле (70 ± 8 ; $p < 0,05$). После применения саксаглиптина и ситаглиптина уровень диастолического АД значительно снижался в сравнении с крысами с CD2, соответственно до 72 ± 6 мм рт.ст. и 73 ± 7 мм рт.ст., т.е. в 1,3 и 1,3 раза соответственно ($p < 0,05$).

Таким образом, оба ингибитора ДПП-4 статистически достоверно снижали уровень диастолического АД в левом желудочке сердца крыс с сахарным диабетом 2-го типа *in vivo* в сравнении с крысами с диабетом без применения указанных препаратов. Это свидетельствует о снижении нагрузки на миокард под влиянием как саксаглиптина, так и ситаглиптина.

Ранее было показано, что ситаглиптин по-разному влияет на уровень кровяного давления, когда он используется в качестве монотерапии и при комбинации с другими ингибиторами ДПП-4 [71].

Таким образом, использование ситаглиптина у нормотензивных крыс вызывало снижение диастолического и систолического давления, чего не было

у крыс со спонтанной гипертензией [71]. С другой стороны, когда речь идет о пациентах с сахарным диабетом 2-го типа, исследователи указывали на статистически значимое снижение и систолического давления после терапии ингибиторами ДПП-4 (вильдаглиптином и ситаглиптином) [69].

Результаты влияния саксаглиптина и ситаглиптина на частоту сердечных сокращений у крыс различных групп представлена на рисунке 5.

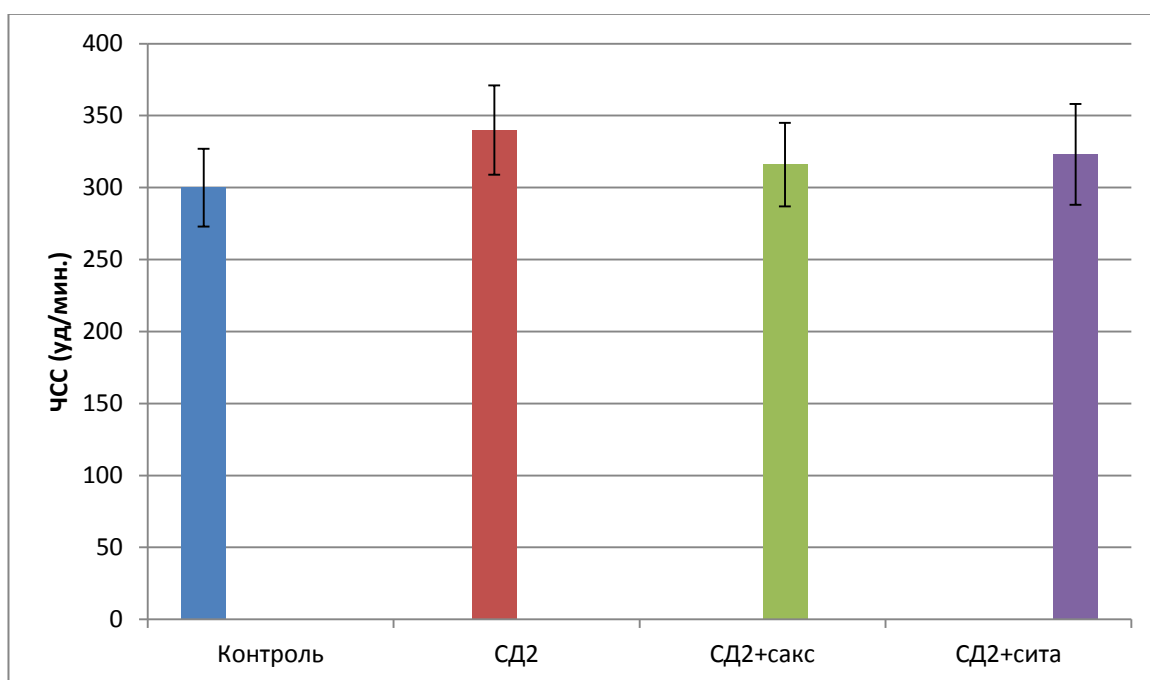


Рисунок 5. Влияние саксаглиптина и ситаглиптина на ЧСС у крыс с СД2 *in vivo*.

Обозначения: те же, что на рисунке 1.

Как видно, ЧСС между группами животных статистически значимо не отличалась. Следовательно, в условиях нашего исследования ингибиторы ДПП-4 не оказывали существенного влияния на ЧСС у крыс с сахарным диабетом 2-го типа.

В целом, результаты этого фрагмента работы показали, что у крыс с сахарным диабетом 2-го типа по сравнению с интактными животными контрольной группы уровни систолического и, особенно, диастолического АД были достоверно выше, а ЧСС имело тенденцию к увеличению, что

свидетельствует о повышении нагрузки на сердце у крыс в процессе развития диабета.

Оба ингибитора ДПП-4: и саксаглиптин и ситаглиптин у животных с сахарным диабетом 2-го типа существенно снижали диастолическое АД, а также обеспечивали статистически незначимую, но закономерную тенденцию к понижению показателей систолического АД и ЧСС в сравнении с крысами с сахарным диабетом 2-го типа, не получавшими эти препараты. Эти данные свидетельствуют об уменьшении, под влиянием указанных ингибиторов ДПП-4, нагрузки на миокард и, следовательно, об их кардиопротективном действии у крыс с сахарным диабетом 2-го типа по сравнению с животными с диабетом 2-го типа, но без применения ингибиторов ДПП-4.

На следующем этапе работы были изучены эффекты ингибиторов ДПП-4 в отношении показателей сократительной функции сердца у крыс с СД2 *in vivo*.

3.2.2. Влияние ингибиторов ДПП-4 саксаглиптина и ситаглиптина на показатели сократительной функции сердца у крыс с сахарным диабетом 2-го типа *in vivo*.

Моделирование сахарного диабета 2-го типа у крыс сопровождается снижением сократительной функции левого желудочка сердца, о чем свидетельствуют изменения структурно-геометрических показателей сердца: уменьшение показателя фракционного сокращения миокарда животных с СД2 по сравнению со здоровыми животными. Кроме того, выявлено снижение толщины межжелудочковой перегородки в конце диастолы и утолщение стенки левого желудочка в конце систолы (рисунки 6-12).

Морфологические исследования у человека показали, что при вскрытии умерших пациентов с сахарным диабетом 2-го типа и наличием у них диабетической кардиомиопатии часто обнаруживаются признаки гипертрофии левого желудочка сердца [126].

На рис.6 представлены показатели фракционного сокращения (FS) стенки миокарда левого желудочка сердца на уровне папиллярных мышц в сравнении

с ее исходной длиной, выраженное в процентах у крыс с сахарным диабетом 2-го типа.

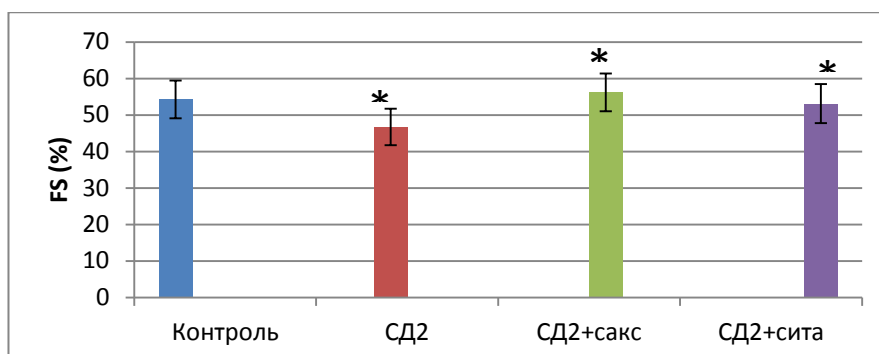


Рисунок 6. Влияние саксаглиптина и ситаглиптина на фракционное сокращение (FS) миокарда стенки левого желудочка сердца у крыс с CD2 *in vivo*.

Обозначения те же, что на рисунке 1.

Как видно из рисунка 6 при развитии у крыс с сахарным диабетом 2-го типа показатель фракционного сокращения миокарда левого желудочка сердца ($46,71 \pm 5,02\%$) был в 1,2 раза меньше, чем в контроле ($54,24 \pm 5,18\%$; $p < 0,05$). Следовательно, моделирование диабета 2-го типа у животных сопровождалось уменьшением показателя фракционного сокращения миокарда по сравнению со здоровыми, что свидетельствует о снижении у них сократительной функции сердца.

Применение у крыс с CD2 в течение 3-х недель саксаглиптина и ситаглиптина обуславливало увеличение FS до $56,20 \pm 5,15\%$ и $53,12 \pm 5,33\%$, соответственно (т.е. в 1,2 раза и 1,1 раза, соответственно; $p < 0,05$), что достигало показателя в контроле.

Таким образом, оба ингибитора ДПП-4: и саксаглиптин и ситаглиптин способствовали восстановлению уровня фракционного сокращения миокарда у крыс с сахарным диабетом 2-го типа до значений у интактных животных.

Толщина межжелудочковой перегородки сердца крыс на уровне папиллярных мышц в конце диастолы (IVSd) представлена на рисунке 7.

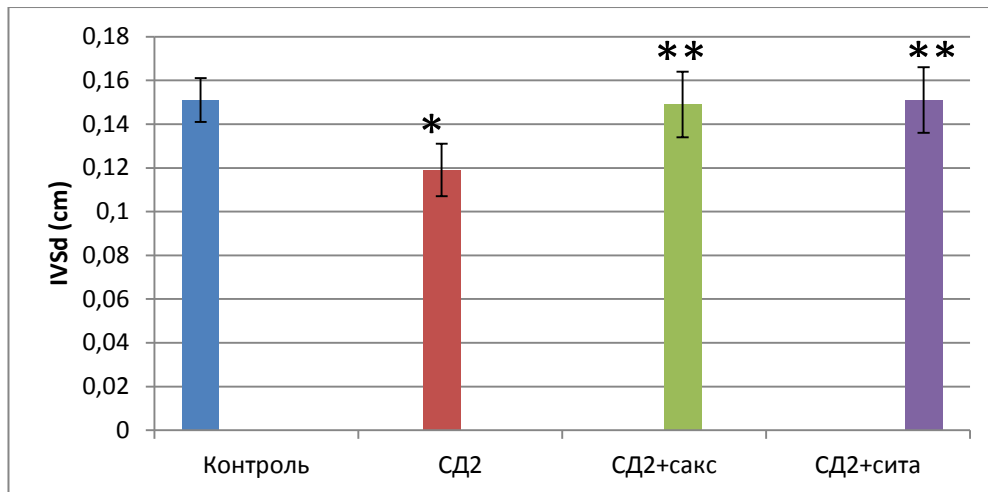


Рисунок 7. Влияние саксаглиптина и ситаглиптина на толщину межжелудочковой перегородки сердца крыс с CD2 в конце диастолы (IVSd) *in vivo*.

Обозначения: те же, что на рисунке 1.

Из данных рисунка 7 следует, что развитие сахарного диабета 2-го типа у крыс сопровождается статистически значимым уменьшением толщины межжелудочковой перегородки сердца на уровне папиллярных мышц. В конце диастолы ($0,119 \pm 0,05$ см) перегородка была в 1,3 раза тоньше, чем в контроле ($0,151 \pm 0,04$ см; $p < 0,05$). Возможно, это связано с ее перерастяжением в связи с дилатацией желудочков сердца у крыс с сахарным диабетом.

Применение саксаглиптина и ситаглиптина сочеталось с восстановлением этого показателя до $0,149 \pm 0,03$ см и $0,151 \pm 0,04$ см, соответственно, т.е. в 1,3 раза ($p < 0,05$), что практически соответствовало толщине в контрольной серии животных.

Таким образом, оба ингибитора ДПП-4: и саксаглиптин и ситаглиптин обеспечивали восстановление у крыс с CD2 толщины межжелудочковой перегородки в конце диастолы до нормальных значений.

Толщина межжелудочковой перегородки сердца в конце систолы (IVSs) представлена на рисунке 8.

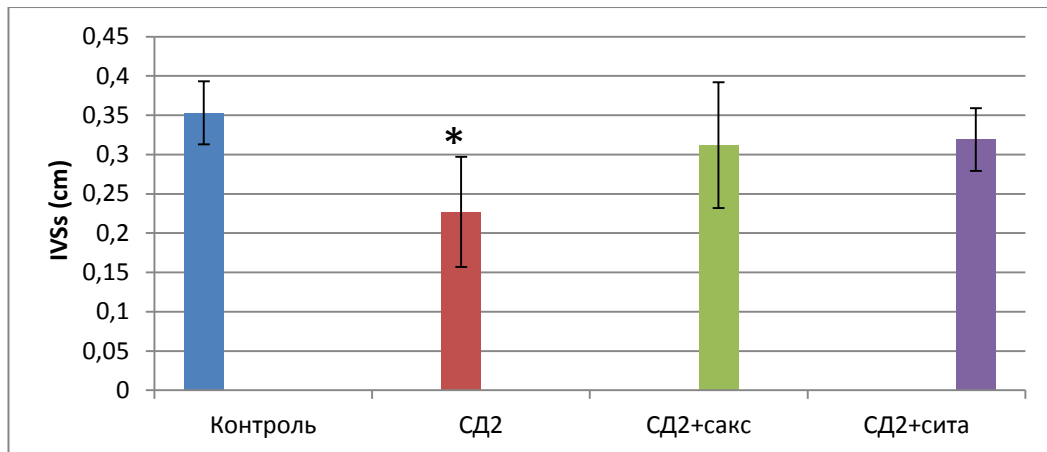


Рисунок 8. Влияние саксаглиптина и ситаглиптина на толщину межжелудочковой перегородки сердца крыс CD2 в конце систолы (IVSs) *in vivo*.

Обозначения: те же, что на рисунке 1.

Как следует из данных рисунка 8, толщина межжелудочковой перегородки на уровне папиллярных мышц в конце систолы у животных с CD2 (0.231 ± 0.04 см) была 1,5 раза ниже, чем в контроле (0.350 ± 0.06 см; $p < 0.05$). После 3-х недельного курса введения per os саксаглиптина и ситаглиптина указанный показатель увеличился до 0.319 ± 0.07 см (в 1,4 раза; $p > 0.05$) и 0.320 ± 0.04 см; $p > 0.05$), соответственно.

Толщина стенки левого желудочка сердца на уровне папиллярных мышц в конце диастолы (LVPVd) представлена на рисунке 9.

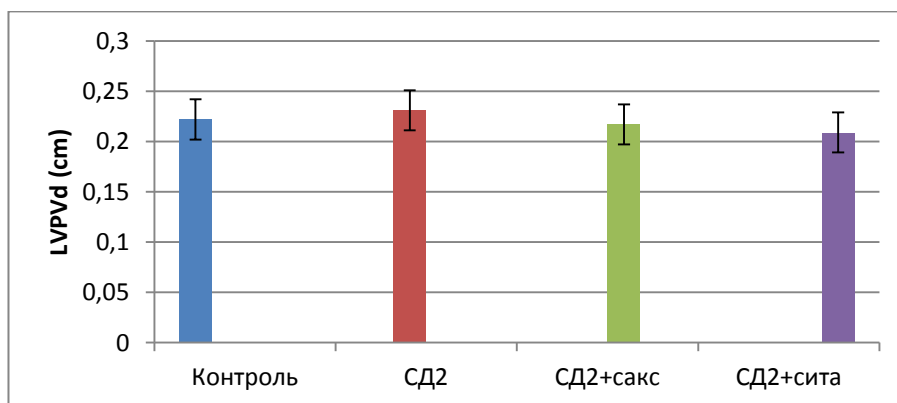


Рисунок 9. Влияние саксаглиптина и ситаглиптина на толщину стенки левого желудочка сердца крыс с CD2 в конце диастолы (LVPVd) *in vivo*.

Обозначения: те же, что на рисунке 1.

У животных с сахарным диабетом 2-го типа толщина стенки левого желудочка сердца в конце диастолы (0.231 ± 0.04 см) была незначительно

(статистически недостоверно) большей, чем у контрольных крыс ($0,222 \pm 0,06$ см; $p > 0,05$). После 3-х недельного применения и саксаглиптина и ситаглиптина этот показатель несколько снижался ($0,217 \pm 0,07$ см и $0,209 \pm 0,03$ см, соответственно; $p > 0,05$) по сравнению с контролем и крысами с СД2.

Таким образом, оба ингибитора ДПП-4 существенно не изменяли толщины стенки ЛЖ животных с сахарным диабетом 2-го типа в конце диастолы.

Толщина стенки ЛЖ сердца в конце систолы (LVPVs) представлена на рисунке 10.

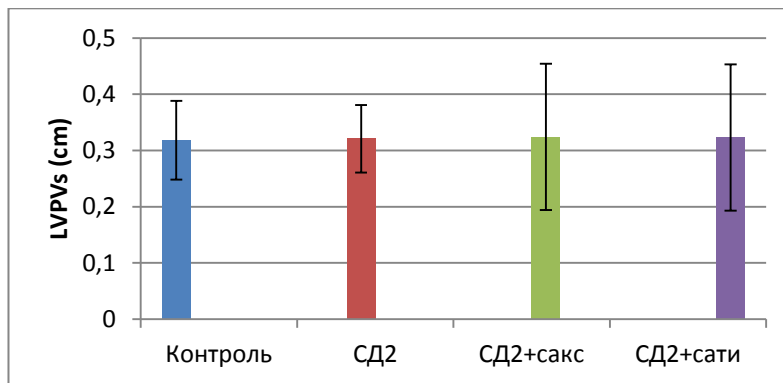


Рисунок 10. Влияние саксаглиптина и ситаглиптина на толщину стенки левого желудочка сердца крыс с СД2 в конце систолы (LVPVs) *in vivo*.

Обозначения те же, что на рисунке 1.

Как следует из данных рисунка 10, у животных с сахарным диабетом 2-го типа толщина стенки левого желудочка сердца в конце систолы ($0,321 \pm 0,06$ см) практически не отличалась от контроля ($0,318 \pm 0,07$ см; $p > 0,05$). После применения и саксаглиптина и ситаглиптина этот показатель также не изменился ($0,324 \pm 0,13$ см и $0,323 \pm 0,13$ см, соответственно; $p > 0,05$).

Следовательно, оба ингибитора ДПП-4 не изменяли и толщины стенки ЛЖ у крыс с сахарным диабетом в конце систолы.

Изменение внутреннего диаметра ЛЖ в конце диастолы (LVIDd) представлено на рисунке 11.

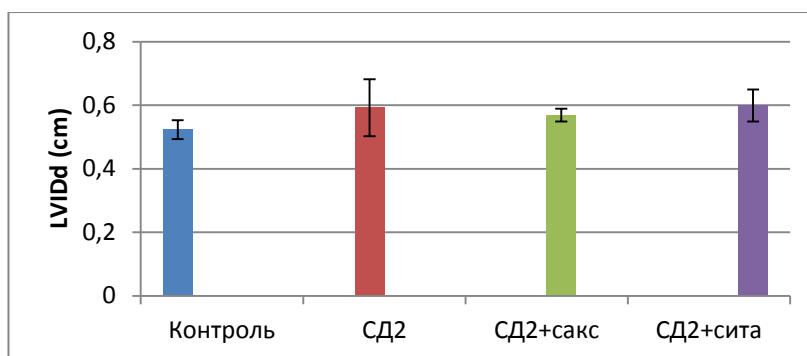


Рисунок 11. Влияние саксаглиптина и ситаглиптина на внутренний диаметр левого желудочка сердца крыс с CD2 в конце диастолы (LVIDd) *in vivo*.

Обозначения: те же, что на рисунке 1.

На рисунке 11 видно, что у животных с сахарным диабетом 2-го типа такой структурно-геометрический показатель сердца как внутренний диаметр ЛЖ в конце диастолы ($0,592 \pm 0,09$ см) был в 1,1 раза больше, чем в контроле ($0,523 \pm 0,03$ см; $p > 0,05$), что позволяет допускать развитие дилатации желудочка у крыс с сахарным диабетом. После раздельного применения саксаглиптина и ситаглиптина этот показатель изменялся разнонаправленно и статистически недостоверно ($0,569 \pm 0,02$ см и $0,599 \pm 0,05$ см, соответственно; $p > 0,05$).

Таким образом, оба ингибитора ДПП-4 существенно не влияли на внутренний размер ЛЖ сердца в конце диастолы.

Внутренний диаметр ЛЖ сердца в конце систолы (LVIDs) представлен на рисунке 12.

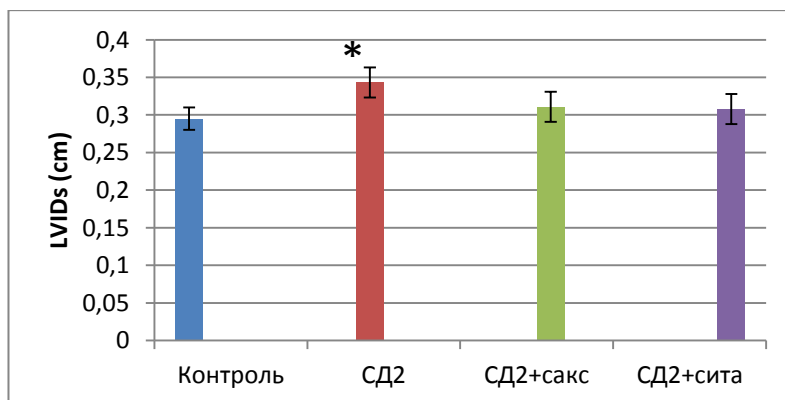


Рисунок 12. Влияние саксаглиптина и ситаглиптина на внутренний диаметр левого желудочка сердца у крыс с CD2 в конце систолы (LVIDs) *in vivo*.

Обозначения те же, что на рисунке 1.

Как видно, у животных с сахарным диабетом 2-го типа внутренний диаметр левого желудочка сердца в конце систолы ($0,343 \pm 0,03$ см) был статистически значимо: в 1,2 раза больше, чем в контроле ($0,295 \pm 0,01$ см; $p < 0,05$). Это можно рассматривать как признак дилатации желудочка у крыс с СД2.

Раздельное применение саксаглиптина и ситаглиптина в течение 3-х недель привело к некоторому уменьшению внутреннего диаметра левого желудочка у крыс с СД2 этих групп, но было статистически недостоверно ($0,311 \pm 0,02$ см и $0,308 \pm 0,02$ см соответственно; $p > 0,05$).

Следовательно, и саксаглиптин и ситаглиптин не оказывали значимого влияния на внутренний диаметр ЛЖ сердца животных с СД2 в конце систолы.

С учетом полученных данных, далее была поставлена задача исследовать эффекты прямого влияния ингибиторов ДПП-4 на сократительную функцию миокарда (СФМ) левого желудочка изолированного сердца крыс *in vitro* при его гипоперфузии и последующей реперфузии раствором Кребса-Хензелята.

3.2.3. Влияние ингибиторов ДПП-4: ситаглиптина и саксаглиптина на показатели СФМ при гипоперфузии и последующей реперфузии изолированного сердца крыс.

Известно, что разработка новых фармакологических и нефармакологических методов для профилактики и лечения повреждения миокарда при его ишемии и реперфузии имеет решающее значение для медицины в настоящее время. Особенно важными являются те формы патологии, которые представляют собой факторы риска для коморбидных состояний и других заболеваний.

В настоящем исследовании на животных с СД2, которые в течение трех недель получали ингибиторы активности ДПП-4 (саксаглиптин или ситаглиптин), выявлен их существенный антигипергликемический эффект. Помимо этого, подтвержден тезис о том, что препараты этой групп безопасны

для организма и оказывают выраженный протективный эффект в отношении гипоперфузионно-реперфузионного и ишемическо-реперфузионного повреждения миокарда.

В последние годы получены достаточно убедительные доказательства того, что один из гормонов, синтезируемый в желудочно-кишечном тракте при приеме пищи – инкретин, оказывает существенный кардиопротективный эффект. Инкретин повышает резистентность сердца к повреждающим факторам острой ишемии и последующей реперфузии миокарда, а также и уменьшает размер зоны его инфаркта [66]. Выработка инкретина возрастает уже через несколько десятков секунд после приема пищи и потенцирует секрецию инсулина β -клетками поджелудочной железы. Кроме того, инкретин тормозит реакции апоптоза в β -клетках, синтез глюкагона α -клетками и потенцирует репаративно-регенеративные процессы в β -клетках поджелудочной железы.

Учитывая эти факты, есть основания считать, что предотвращение деградации гормона инкретина ингибиторами ДПП-4 может представлять собой новую стратегию как лечения пациентов с СД2, так и профилактики развития у них сердечно-сосудистых заболеваний.

Показатели, использованные в нашем исследовании, объективно характеризуют состояние сократительной функции именно левого желудочка изолированного сердца (таблица 1).

Данные табл. 1 свидетельствуют о том, что показатели СФМ у крыс контрольной группы: - максимальная скорость изменения давления в левом желудочке изолированного сердца; - минимальная скорость изменения давления в нем; - систолическое давление в левом желудочке; - диастолическое давление в нем; - ЧСС; - коронарный проток перфузирующего раствора у животных контрольной группы уже через минуту от начала реперфузии миокарда после периода его 30-минутной гипоперфузии существенно снижались. Это свидетельствует о подавлении у крыс группы контроля сократительной функции миокарда уже к концу первой минуты реперфузии.

Таблица 1. Показатели СФМ левого желудочка изолированного сердца крыс контрольной группы при его гипоперфузии и последующей реперфузии.

Точки записи показателей	Показатели СФМ у крыс контрольной группы		
Стабилизации	dp/dt max (mmHg/sec)	dp/dt min (mmHg/sec)	SLVP (mmHg)
	1300.23 ± 121.22	-699.51 ± 73.21	44.75 ± 4.34
	1 мин 900.30 ± 97.34*	-431.77 ± 42.87*	38.67 ± 1.34
	60 мин 721.87 ± 65.32*	-643.85 ± 96.45#	27.45 ± 1.95*#
Стабилизации	DLVP (mmHg)	ЧСС (уд/мин)	КП (мл/мин)
	2.98 ± 0.15	295.67 ± 27.54	8.03 ± 0.87
	1 мин 2.87 ± 0.13	200.56 ± 25.64*	9.03 ± 1.02
	60 мин 1.52 ± 0.09*#	162.33 ± 18.76*#	5.93 ± 0.23*#

Обозначения: **исходная** (точка записи показателей): точка стабилизации показателей СФМ; **1, 60 мин** – 1, 60 минута периода реперфузии миокарда после 30 мин его гипоперфузии; **dp/dt max (mmHg/sec)** - максимальная скорость изменения давления в левом желудочке; **dp/dt min (mmHg/sec)** - минимальная скорость изменения давления в левом желудочке; **SLVP (mmHg)** - систолическое давление в левом желудочке; **DLVP (mmHg)** - диастолическое давление в левом желудочке; **ЧСС (уд/мин)** – частота сердечных сокращений; **КП (мл/мин)** – объем коронарного протока перфузирующего раствора; *- p<0,05 по сравнению с началом реперфузии миокарда, #- p<0,05 в сравнении с первой минутой периода реперфузии

Данные таблицы 1 свидетельствуют о том, что показатели СФМ у крыс контрольной группы: - максимальная скорость изменения давления в левом желудочке изолированного сердца; - минимальная скорость изменения давления в нем; - систолическое давление в левом желудочке; - диастолическое давление в нем; - ЧСС; - коронарный проток перфузирующего раствора у животных контрольной группы уже через минуту от начала реперфузии миокарда после периода его 30-минутной гипоперфузии существенно снижались. Это свидетельствует о подавлении у крыс группы контроля сократительной функции миокарда уже к концу первой минуты реперфузии.

Через 60 минут от начала периода реперфузии миокарда изолированного сердца после периода его 30-минутной гипоперфузии у крыс группы контроля продолжали понижаться показатели: - максимальной скорости изменения давления в левом желудочке, - систолического давления в левом желудочке, -

диастолического давления в левом желудочке, - ЧСС, - объема коронарного протока перфузирующего раствора Кребса-Хензелейта.

Показатели СФМ у крыс с сахарным диабетом 2-го типа представлены в таблице 2.

Таблица 2. Показатели СФМ левого желудочка изолированного сердца крыс с СД2 при его гипоперфузии и последующей реперфузии.

Точки записи показателей	Показатели СФМ у крыс с СД2		
Стабилизации 1 мин 60 мин	dp/dt max (mmHg/sec)	dp/dt min (mmHg/sec)	SLVP (mmHg)
	1376.45 ± 111.82	-856.88 ± 62.13	33.90 ± 3.99
	1234.50 ± 108.43	-896.58 ± 61.83	45.15 ± 4.41
	984.34 ± 51.24*#	-807.55 ± 88.45	30.35 ± 2.12#
Стабилизации 1 мин 60 мин	DLVP (mmHg)	ЧСС (уд/мин)	КП (мл/мин)
	1.95 ± 0.25	223.08 ± 23.24	9.87 ± 0.67
	2.25 ± 0.18	208.20 ± 21.64	9.30 ± 1.15
	0.98 ± 0.13*#	170.28 ± 14.65*	7.37 ± 1.03*#

Обозначения: те же, что в таблицы 1.

Как следует из данных таблицы 2, у животных с моделью с сахарного диабета 2-го типа максимальная скорость изменения давления в левом желудочке изолированного сердца через минуту от начала реперфузии после периода 30-минутной гипоперфузии миокарда снизилась незначительно ($p>0,05$), а через 60 минут от начала реперфузии упала статистически значимо: в 1,4 раза ($p<0,05$).

Минимальная скорость изменения давления в левом желудочке изолированного сердца через минуту и через 60 минут от начала реперфузии миокарда после периода его 30-минутной гипоперфузии практически не изменялась.

Систолическое давление в левом желудочке изолированного сердца через минуту от начала реперфузии миокарда после периода его 30-минутной гипоперфузии увеличивалось в 1,4 раза ($p>0,05$), а через 60 минут от начала реперфузии снижалось до нормы и незначительно ниже ее.

Диастолическое давление в левом желудочке изолированного сердца через 1 минуту от начала реперфузии миокарда после его 30-минутной гипоперфузии несущественно повышалось ($p > 0,05$), а через 60 минут от начала реперфузии оно уже снизилось статистически достоверно: в 2,0 раза ($p < 0,05$) по сравнению и с 1 и 60-ой минутами.

ЧСС через минуту от начала периода реперфузии миокарда после периода его 30-минутной гипоперфузии незначительно снижалась ($p > 0,05$), а через 60 минут от начала периода реперфузии упала в 1,3 раза ($p < 0,05$).

Коронарный проток перфузирующего раствора Кребса-Хензеляита через минуту от начала реперфузии миокарда после его 30-минутной гипоперфузии несколько снижался ($p > 0,05$), а через 60 минут от начала реперфузии упал в 1,3 раза ($p < 0,05$).

Таким образом, у животных с сахарным диабетом 2-го типа на 60 минуте от начала реперфузии миокарда изолированного сердца после периода его 30-минутной гипоперфузии снижались: - максимальная скорость изменения давления в левом желудочке; - диастолическое давление в нем (два последних показателя можно рассматривать как признаки сниженной сократительной функции миокарда); - ЧСС; - коронарный проток перфузирующей жидкости, что, очевидно, и стало причиной подавления сократимости миокарда левого желудочка изолированного сердца крыс с СД2.

Показатели СФМ левого желудочка изолированного сердца крыс с сахарным диабетом 2-го типа, предварительно - в течение трех недель получавших рег ос ситаглиптин, при гипоперфузии и последующей реперфузии миокарда приведены в табл.3.

Видно, что у животных с с сахарным диабетом 2-го типа, предварительно получавших в течение трех недель рег ос ситаглиптин максимальная скорость изменения давления в левом желудочке через минуту от начала реперфузии миокарда после периода его 30-минутной гипоперфузии возросла значительно: в 1,3 раза ($p < 0,05$), а через 60 минут снизилась в 1,1 раза ($p > 0,05$), но оставалась выше таковой в исходной точке стабилизации.

Таблица 3. Показатели СФМ левого желудочка изолированного сердца крыс с СД2, предварительно получавших в течение трех недель per os ситаглиптин, при гипоперфузии и последующей реперфузии миокарда.

Точки записи показателей	Показатели СФМ у крыс с СД2+Сит			
Стабилизации	dp/dt max (mmHg/sec)	dp/dt min (mmHg/sec)	SLVP (mmHg)	
	1 мин	1295.70 ± 106.54	-933.20 ± 41.32	43.90 ± 2.19
	60 мин	1655.55 ± 131.32*	-1035.00 ± 56.31	55.15 ± 3.34*
		1467.00 ± 112.43	-913.00 ± 62.22	34.35 ± 1.92*#
Стабилизации	DLVP (mmHg)	ЧСС (уд/мин)	КП (мл/мин)	
	1 мин	1.65 ± 0.28	311.00 ± 32.14	11.60 ± 1.02
	60 мин	3.15 ± 1.21*	213.60 ± 17.43	10.80 ± 1.07
		1.75 ± 0.30#	269.35 ± 18.99	10.70 ± 1.09

Обозначения: те же, что в таблицы 1.

Минимальная скорость изменения давления в левом желудочке как через минуту, так и через 60 минут от начала реперфузии миокарда после его 30-минутной гипоперфузии значимо не менялась.

Систолическое давление в левом желудочке через 1 минуту от начала реперфузии миокарда после периода его 30-минутной гипоперфузии существенно увеличилось: в 1,3 раза ($p < 0,05$), а через 60 минут от начала реперфузии упало в 1,6 раза ($p < 0,05$) и было статистически ниже ее и исходного уровня.

Близким образом менялось и диастолическое давление в левом желудочке: через 1 минуту от начала реперфузии миокарда после 30-минут его гипоперфузии оно увеличилось в 1,8 раза ($p < 0,05$), однако через 60 минут от начала реперфузии статистически значимо снизилось по сравнению с ним: в 1,8 раза ($p < 0,05$).

ЧСС через минуту от начала реперфузии миокарда после периода его 30-минутной гипоперфузии упала в 1,5 раза ($p < 0,05$), а через 60 минут возросла в 1,3 раза ($p < 0,05$), но была все еще ниже, чем в исходной точке.

Величина коронарного потока как через минуту, так и через 60 минут от начала реперфузии миокарда после 30-минут его гипоперфузии снижалась незначительно.

Таким образом, предварительное введение животным с сахарным диабетом 2-го типа *per os* ситаглиптина в течение трех недель обуславливало к 60 минуте периода реперфузии миокарда после его получасовой гипоперфузии увеличение: - максимальной скорости изменения давления в левом желудочке сердца, - систолического давления в левом желудочке, - диастолического давления в нем. Эти изменения можно расценивать как признаки повышения сократительной функции миокарда у крыс с СД2 при его гипоперфузии и последующей реперфузии в условиях предварительного применения ситаглиптина.

Показатели СФМ левого желудочка изолированного сердца крыс с сахарным диабетом 2-го типа, предварительно - в течение трех недель, получавших *per os* саксаглиптин, при гипоперфузии и последующей реперфузии миокарда приведены в таблицы 4.

Таблица 4. Показатели СФМ левого желудочка изолированного сердца крыс с СД2, предварительно получавших в течение трех недель *per os* саксаглиптин, при гипоперфузии и последующей реперфузии миокарда.

Точки записи показателей	Показатели СФМ у крыс с СД2+Сак		
	dp/dt max (mmHg/sec)	dp/dt min (mmHg/sec)	SLVP (mmHg)
Стабилизации	1341.65 ± 104.21	-1093.75 ± 39.12	42.60 ± 2.22
1 мин	1522.33 ± 121.21	-1011.43 ± 40.21	63.75 ± 3.76*
60 мин	1287.23 ± 120.01	-880.18 ± 58.87	38.25 ± 1.99#
	DLVP (mmHg)	ЧСС (уд/мин)	КП (мл/мин)
Стабилизации	2.13 ± 1.02	212.78 ± 28.98	12.30 ± 1.21
1 мин	3.45 ± 1.56*	225.88 ± 16.35	12.15 ± 1.74
60 мин	2.20 ± 0.76#	232.03 ± 12.59	9.40 ± 1.23*#

Обозначения: те же, что в таблицы 1.

Как видно из таблицы. 4, у животных с СД2, которым предварительно в течение трех недель вводили *per os* саксаглиптин, и максимальная и

минимальная скорость изменения давления в левом желудочке сердца как через минуту, так и через 60 минут от начала реперфузии после периода его 30-минутной гипоперфузии изменялись статистически незначимо, но на 60 мин были несколько ниже, чем в исходной точке.

Систолическое давление в левом желудочке через 1 минуту от начала реперфузии миокарда увеличилось статистически значимо: в 1,5 раза ($p < 0,05$), а через 60 минут от начала реперфузии после периода его 30-минутной гипоперфузии упало ниже исходного в 1,7 раза ($p < 0,05$).

Близким образом менялось и диастолическое давление в левом желудочке: через 1 минуту от начала реперфузии миокарда после 30 минут его гипоперфузии оно существенно увеличилось в 1,6 раза ($p < 0,05$). Однако через 60 минут от начала реперфузии упало ниже исходного в 1,7 раза ($p < 0,05$).

ЧСС при реперфузии миокарда после 30 минут его гипоперфузии имело лишь тенденцию к увеличению.

Коронарный проток перфузирующей жидкости через минуту от начала реперфузии миокарда после 30-минут его гипоперфузии не менялся, а через 60 минут он снизился статистически достоверно: в 1,3 раза.

Таким образом, трехнедельное применение ингибитора ДПП-4: саксаглиптина у крыс с сахарным диабетом 2-го типа обеспечивало сохранение показателей СФМ левого желудочка изолированного сердца на уровнях, близких к исходным, несмотря на сниженный объем коронарного потока перфузирующего раствора Кребса-Хензелейта.

Сравнительная характеристика показателей СФМ левого желудочка изолированного сердца крыс в контроле и у животных с СД2, регистрируемых на 1-60 минутах в течение часа периода реперфузии после 30 мин гипоперфузии, до и после 3-х недельного применения рег ос ситаглиптина и саксаглиптина, представлена на рисунках 13-18. Видно, что ингибиторы ДПП-4 значительно влияли на сократительную функцию миокарда уже на первой минуте реперфузии, а также в конце 60-ти минут реперфузии.

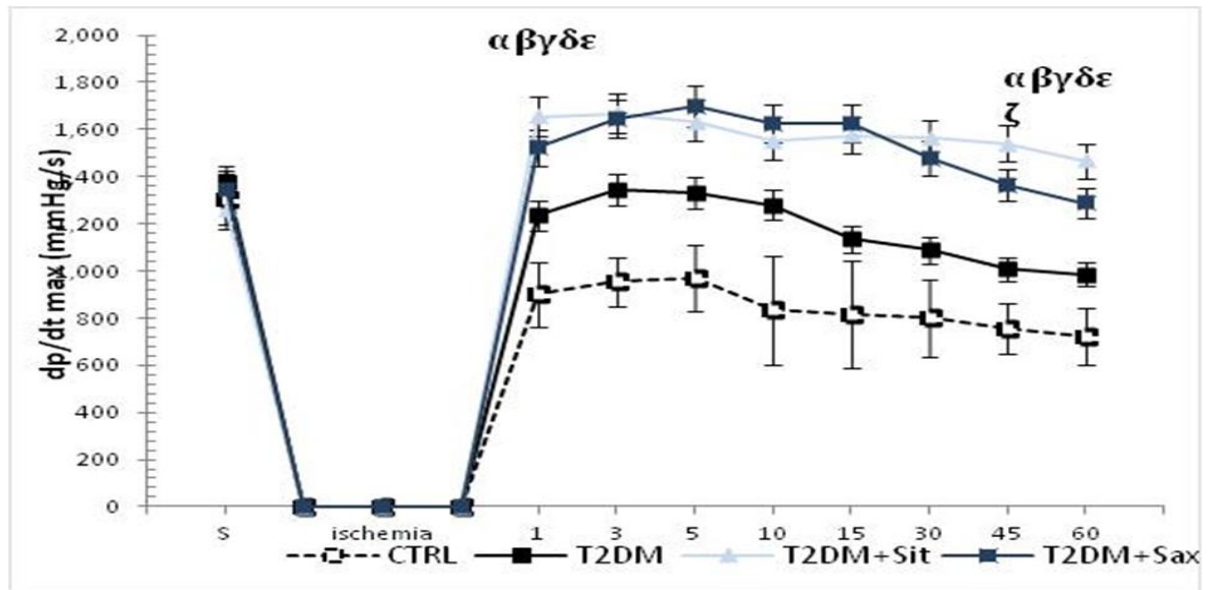


Рисунок 13. Влияние ингибиторов ДПП-4: ситаглиптина и саксаглиптина на максимальную скорость изменения давления жидкости в левом желудочке (dp/dt_{max}) в мм рт. ст. за секунду (mmHg/s).

Обозначения: CTRL – контрольные крысы; T2DM – крысы с СД2; Sit – крысы с СД2, получавшие в течение 3-х недель ситаглиптин; Sax – крысы с СД2, получавшие в течение 3-х недель саксаглиптин.

Сравнения: α : контрольные крысы/крысы с СД2; β : контроль/СД2+саксаглиптин; γ : контроль/СД2+ситаглиптин; δ : СД2/СД2+саксаглиптин; ϵ : СД2/СД2+ситаглиптин; ζ : СД2+саксаглиптин/СД2+ситаглиптин.

Данные рисунка 13 свидетельствуют о статистически значимом ($p < 0.05$) повышении показателя максимальной скорости изменения давления в левом желудочке на первой же минуте периода реперфузии в сравнении с 30 мин периода гипоперфузии миокарда левого желудочка сердца у крыс всех групп, но в существенно большей мере – у получавших ингибиторы ДПП-4.

В последующем: до 3-5 минуты периода реперфузии этот показатель имел тенденцию к увеличению, а затем снижался, особенно у контрольных крыс, а также у крыс с СД2 без применения ингибиторов ДПП-4 и к 60 мин он был статистически ниже, чем в точке стабилизации показателя. У животных, получавших препараты - он был в диапазоне, близком к исходной точке стабилизации. При этом, у крыс с применением ситаглиптина снижение показателя максимальной скорости увеличения давления в желудочке сердца было наименьшим.

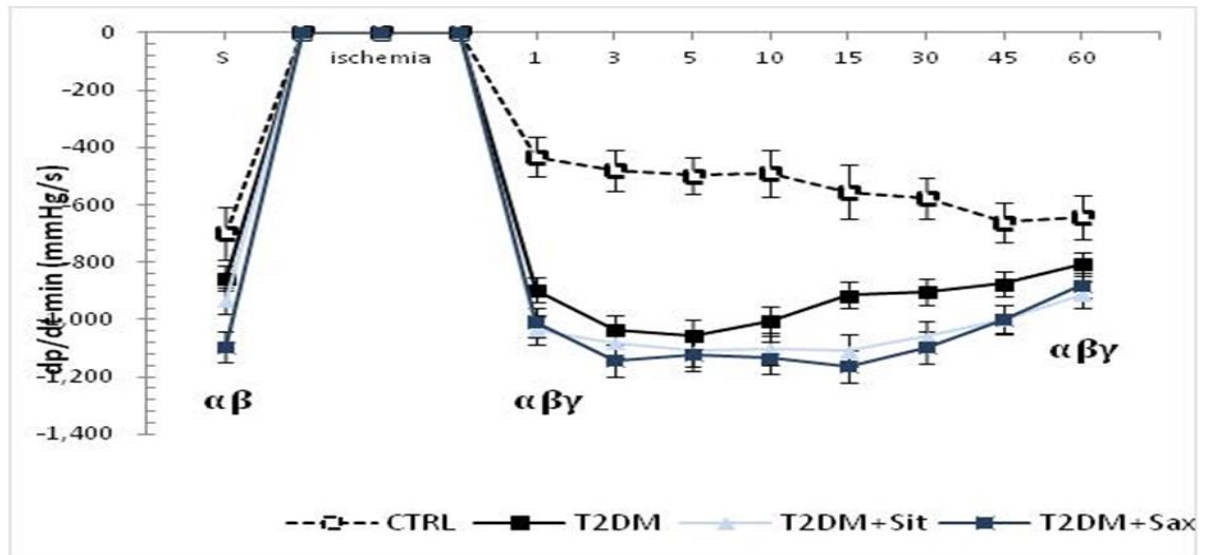


Рисунок 14. Влияние ингибиторов ДПП-4: ситаглиптина и саксаглиптина на минимальную скорость изменения давления жидкости в левом желудочке (dp/dt_{min}) в мм рт.ст./сек.(mmHg/s).

Обозначения: те же, что на рисунке 13.

На рисунке 14 видно статистически значимое ($p < 0.05$) нарастание минимальной скорости изменения давления в левом желудочке на первой минуте периода реперфузии миокарда после 30 мин его гипоперфузии у крыс всех групп, но в большей мере – у получавших ингибиторы ДПП-4.

В последующем: до 3-5 минуты периода реперфузии минимальная скорость изменения давления в левом желудочке имела тенденцию к увеличению у животных всех групп. Далее – к 60-й минуты периода реперфузии минимальная скорость изменения давления в левом желудочке сердца у контрольных крыс, а также у крыс с СД2 и получавших ситаглиптин приблизилась к таковой в их исходной точке. У животных с СД2, получавших саксаглиптин, минимальная скорость изменения давления в левом желудочке была значимо меньше, чем в их точке стабилизации.

Систолическое давление (рисунок 15) статистически значимо повышалось в первую минуту реперфузии после 30 минут гипоперфузии у животных всех групп, затем оно снижалось и к 60-ой минуте периода было в диапазоне точек стабилизации.

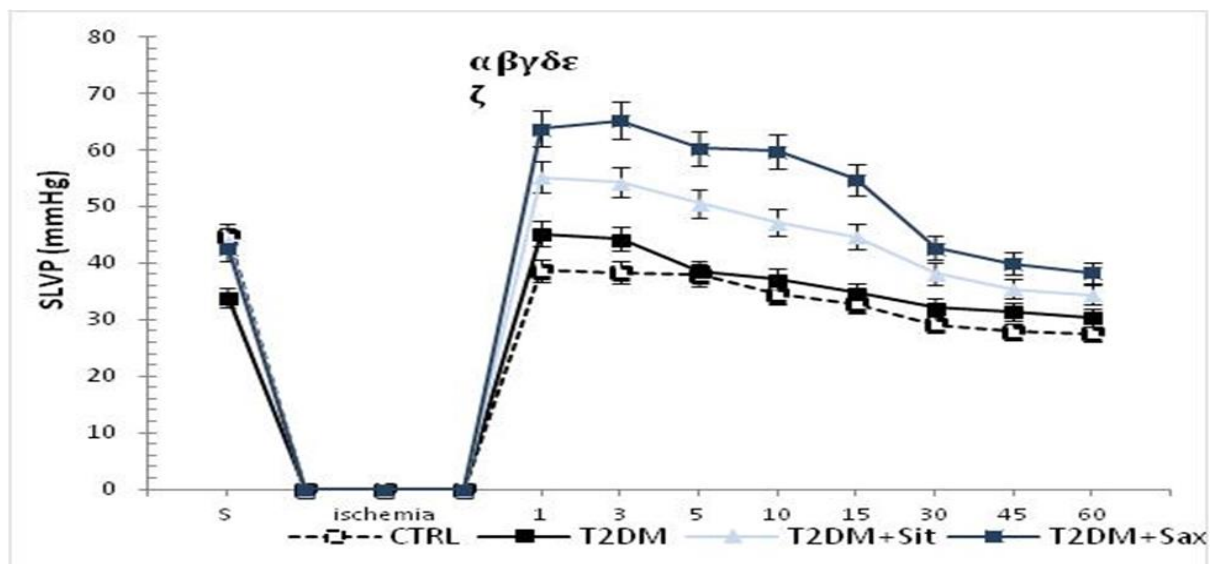


Рисунок 15. Влияние ингибиторов ДПП-4: ситаглиптина и саксаглиптина на систолическое давление в левом желудочке (SLVP в mmHg).

Обозначения: те же, что на рисунке 13.

Близким образом менялись и показатели изменений диастолического давления в левом желудочке сердца у крыс всех групп (рисунок 16).

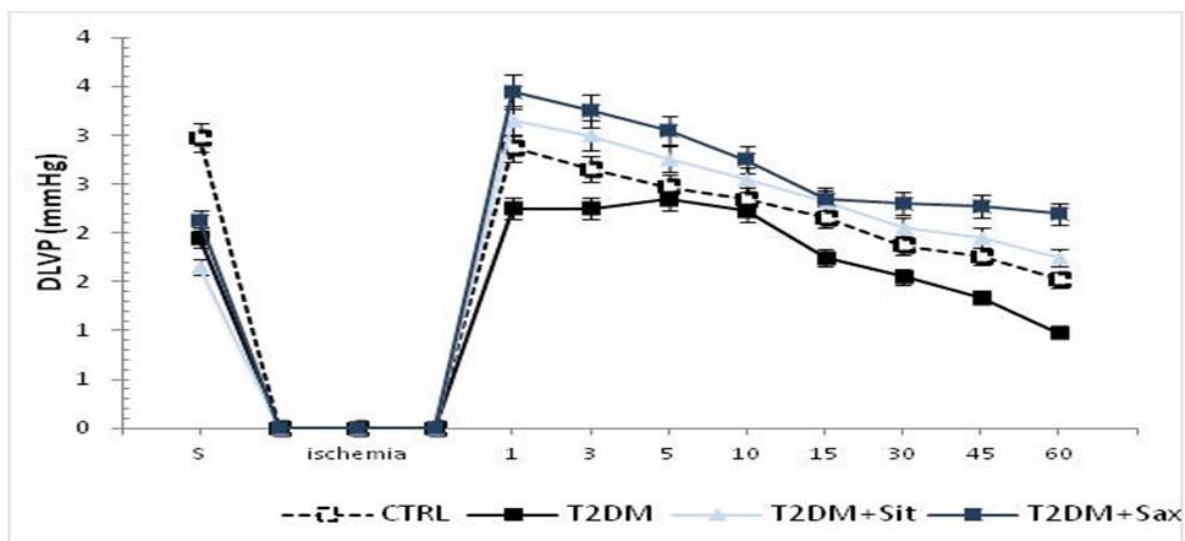


Рисунок 16. Влияние ингибиторов ДПП-4: ситаглиптина и саксаглиптина на диастолическое давление жидкости в левом желудочке (DLVP в mmHg).

Обозначения: те же, что на рисунке 13.

Динамика показателей частоты сердечных сокращений (рисунок 17) была сходной у животных всех групп до 15 минуты периода реперфузии. Затем она

снижалась у крыс контрольной группы и с СД2, а на 60-й минуте реперфузии была ниже, чем в точках стабилизации.

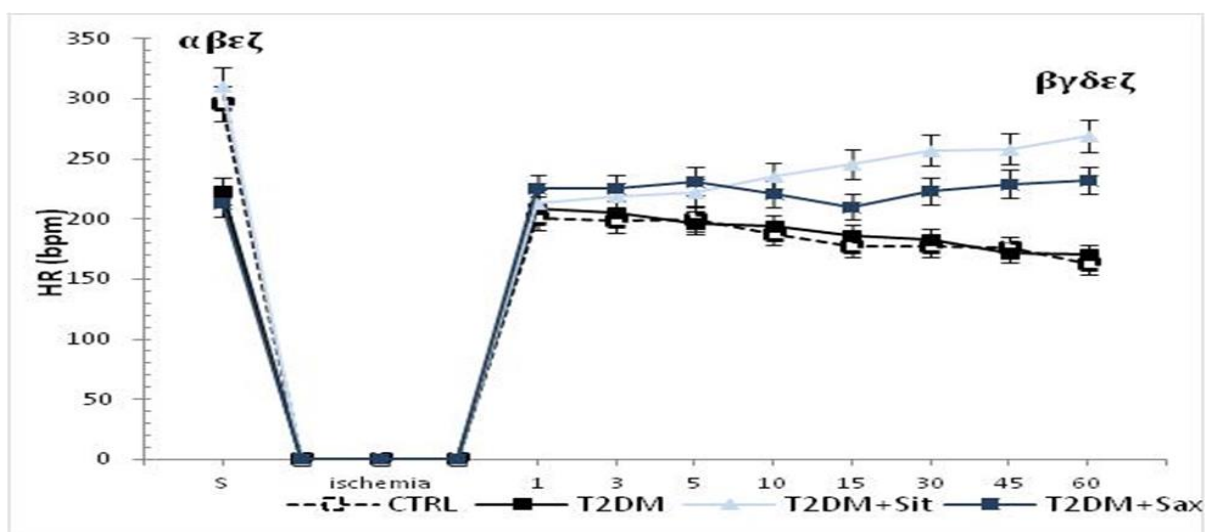


Рисунок 17. Влияние ингибиторов ДПП-4: ситаглиптина и саксаглиптина на частоту сердечных сокращений (HR, уд/мин, bpm).

Обозначения: те же, что на рисунке 13.

На 60-й минуте периода реперфузии, как свидетельствуют данные рис.17, у крыс с применением ингибиторов ДПП-4 частота сокращений сердца была статистически значимо выше, чем в группах контроля и крыс с СД2.

Данные о величине коронарного протока перфузата приведены на рисунке 18.

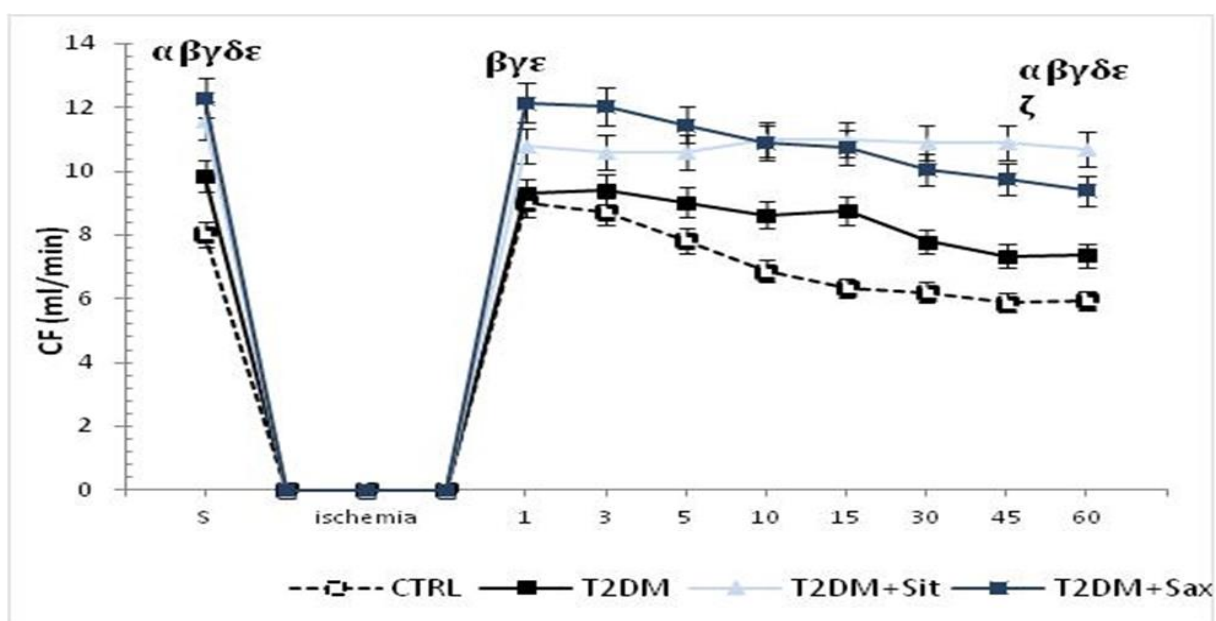


Рисунок 18. Влияние ингибиторов ДПП-4 на коронарный проток (CF) в мл/мин (ml/min).

Обозначения: те же, что на рисунке 13.

Показатели протока перфузата (раствора КХ) менялись близким образом с таковыми для систолического и диастолического давлений в левом желудочке сердца.

Видно, что на первой минуте периода реперфузии наблюдалось увеличение протока перфузата у крыс всех групп до уровней, близких к точке их стабилизации в исходе.

После 10 минуты реперфузии величина коронарного протока была выше у крыс всех групп по сравнению с контрольной, а после 30 минуты - значительно большей в группе животных с использованием ситаглиптина по сравнению с применением саксаглиптина.

Заключение. Приведенные выше фактические данные свидетельствуют о том, что предварительное применение в течение 3-х недель ингибиторов ДПП-4: и ситаглиптина и саксаглиптина оказывают существенное кардиопротективное действие. Аргументом этому служат данные о восстановлении показателей, характеризующих состояние сократительной функции миокарда левого желудочка в период его 60-минутной реперфузии после 30 минут его гипоперфузии.

Анализ показателей сократительной функции сердца выявил также, что между группами животных, получавших различные препараты (саксаглиптин и ситаглиптин), нет существенных различий. Каждый из них статистически значительно приводит к улучшению сократительной функции миокарда левого желудочка сердца при его 60-минутной реперфузии раствором КХ после тридцати минут гипоперфузии.

Применение ингибиторов ДПП-4 при реперфузии миокарда после его 30-минутной гипоперфузии у животных с СД2 обеспечивает поддержание показателей сократительной функции миокарда в диапазоне фоновых величин (в точках их стабилизации), в отличие от контрольной группы крыс, у которых

в период реперфузии коронарных сосудов наблюдалось снижение указанных показателей.

Важно, что сведения о влиянии саксаглиптина на функции сердца до настоящей работы отсутствовали, в то время как с другими препаратами этой группы проведен ряд исследований. Был обнаружен факт снижения степени повреждения сердечной мышцы после ишемическо-реперфузионного повреждения сердца, которому предшествовало двухнедельное введение животным ситаглиптин [142]. Это проявлялось снижением степени высвобождения реперфузируемым миокардом ЛДГ и СК-МВ в общий кровоток. Допускают, что кардиопротективное действие ситаглиптина может быть связано со снижением степени липопероксидного повреждения миокарда в период его реперфузии.

В целом, полученные данные позволяет рекомендовать к исследованию в клинике возможность применения ситаглиптина и саксаглипина для снижения степени альтерации сердца как при СД2, так и в условиях гипо- и реперфузии миокарда при нем.

3.3. Влияние ингибиторов ДПП-4: саксаглиптина и ситаглиптина у крыс с индуцированным СД2 на содержание в венозной крови липидов с про- и антиатерогенным свойствами *in vivo*.

3.3.1. Влияние ингибиторов ДПП-4: саксаглиптина и ситаглиптина на содержание липидов в венозной крови крыс с сахарным диабетом 2-го типа *in vivo*

Результаты влияния саксаглиптина и ситаглиптина на содержание общего холестерина в венозной крови крыс с СД2 представлены на рисунке 19.

Из рисунка 19 видно, что уровень общего холестерина в крови ($3,79 \pm 0,35$ ммоль/л) до применения препаратов ДПП-4 (саксаглиптина и ситаглиптин) у крыс с сахарным диабетом 2-го типа был достоверно: в 1,8 раза выше, чем в контроле ($2,10 \pm 0,20$ ммоль/л; $p < 0,05$).

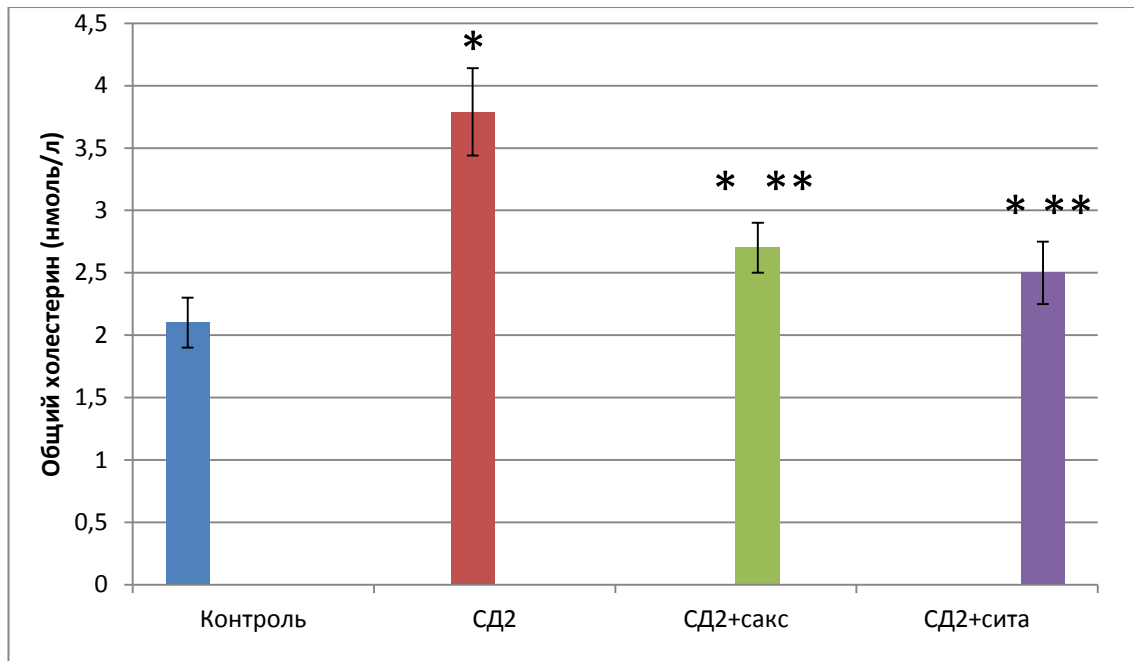


Рисунок 19. Влияние саксаглиптина и ситаглиптина на содержание общего холестерина в венозной крови крыс с СД2.

Обозначения те же, что на рисунке 1.

После применения в течение трех недель саксаглиптина содержание общего холестерина в крови животных значительно снизилось: в 1,4 раза ($2,70 \pm 0,20$ ммоль/л; $p < 0,05$), а под влиянием ситаглиптина - в 1,5 раза ($2,52 \pm 0,25$ ммоль/л; $p < 0,05$).

Таким образом, оба препарата достоверно снижали у животных с сахарным диабетом уровень общего холестерина в крови.

Результаты влияния саксаглиптина и ситаглиптина на уровень триглицеридов в крови крыс с СД2 представлены на рисунке 20.

Как видно из данных на рисунке 20, содержание триглицеридов в крови у крыс с сахарным диабетом 2-го типа ($1,90 \pm 0,20$ ммоль/л) до применения препаратов из группы ингибиторов ДПП-4 (саксаглиптина и ситаглиптина) было статистически достоверно: в 2,3 раза выше, чем в контроле ($0,83 \pm 0,08$; $p < 0,05$).

После трехнедельного введения животным саксаглиптина уровень общего холестерина в крови животных снизился в 1,9 раза ($0,98 \pm 0,10$ ммоль/л; $p < 0,05$), а в условиях-применения ситаглиптина - в 1,4 раза ($1,35 \pm 0,12$ ммоль/л; $p < 0,05$).

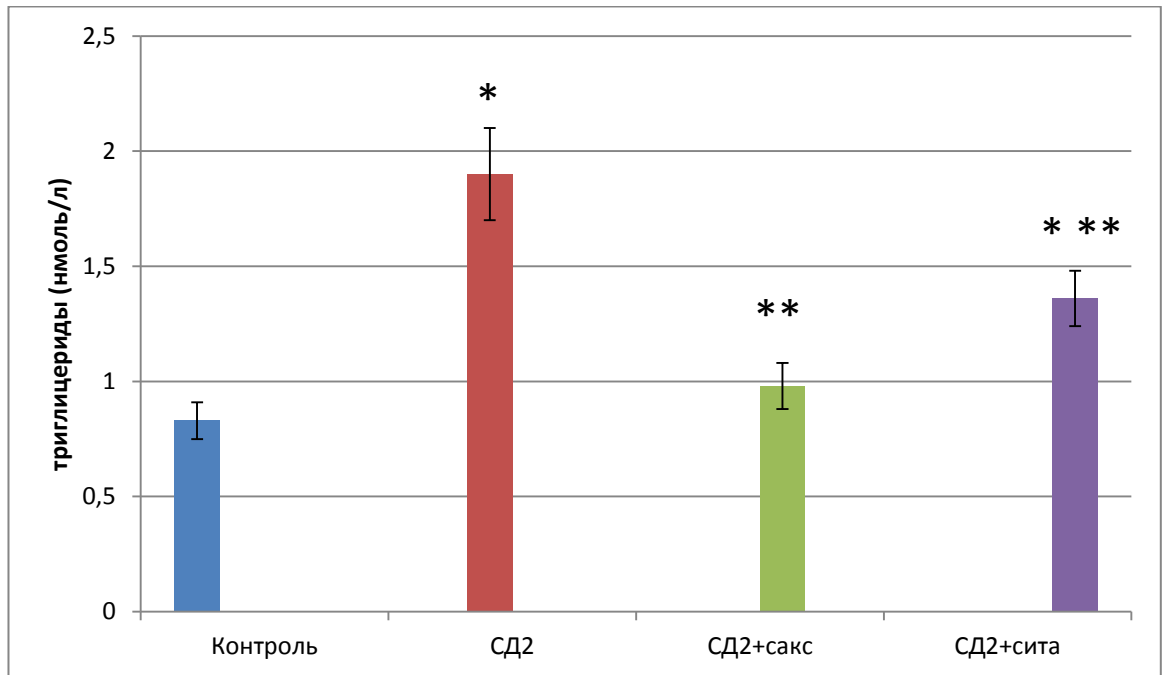


Рисунок 20. Влияние саксаглиптина и ситаглиптина на содержание триглицеридов в венозной крови крыс с СД2.

Обозначения те же, что на рисунке 1.

Таким образом, оба лекарственных препарата достоверно снижали в крови животных с СД2 уровень не только холестерина, но и триглицеридов.

Результаты влияния саксаглиптина и ситаглиптина на содержание антиатерогенных липопротеинов высокой плотности (ЛВП) в венозной крови крыс с СД2 представлены на рисунке 21.

Видно, что содержание антиатерогенных ЛВП в крови крыс с сахарным диабетом 2-го типа ($0,65 \pm 0,05$ ммоль/л) до применения препаратов ДПП-4 (саксаглиптина и ситаглиптина) было существенно: в 1,9 раза ниже, чем в контроле ($1,21 \pm 0,22$; $p < 0,05$). После 3-х недельного применения и саксаглиптина и ситаглиптина уровень ЛВП у животных с СД2, хотя статистически и недостоверно, но закономерно повышался в 1,1 раза ($p > 0,05$).

Таким образом, оба лекарственных препарата способствовали меньшей степени снижения уровня антиатерогенных ЛВП в крови животных с сахарным диабетом 2-го типа.

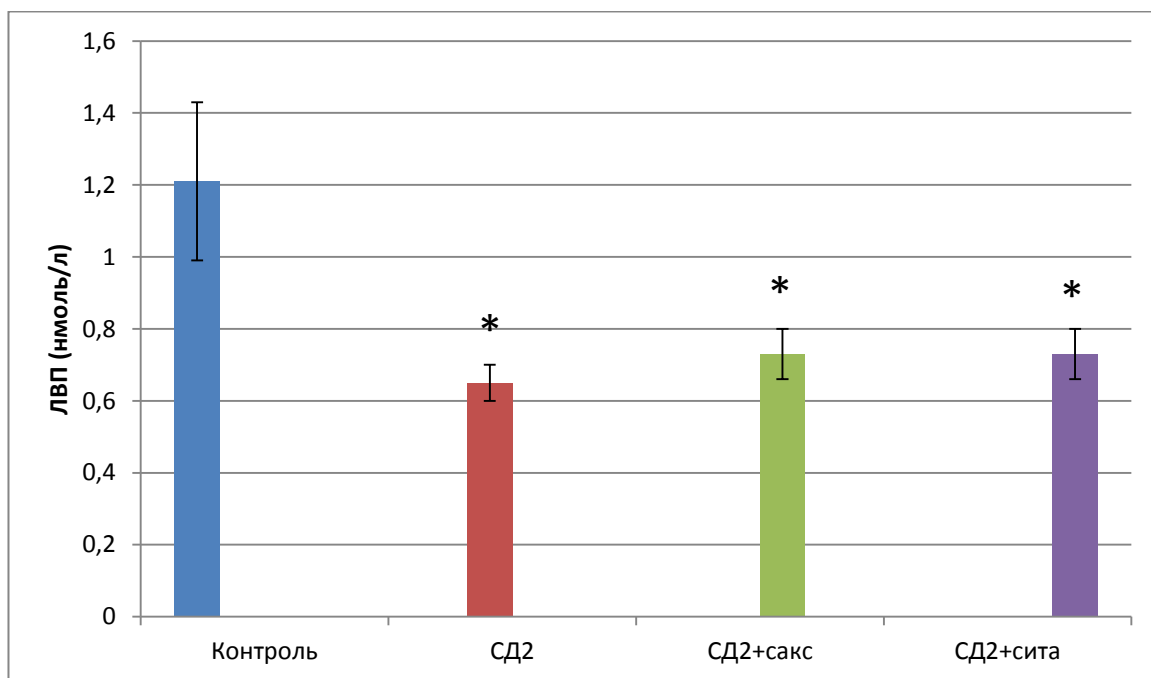


Рисунок 21. Влияние саксаглиптина и ситаглиптина на содержание антиатерогенных ЛВП в венозной крови крыс с СД2.

Обозначения те же, что на рисунке 1.

Результаты влияния саксаглиптина и ситаглиптина на уровень проатерогенных липопротеинов низкой плотности (ЛНП) в венозной крови крыс с СД2 представлены на рисунке 22.

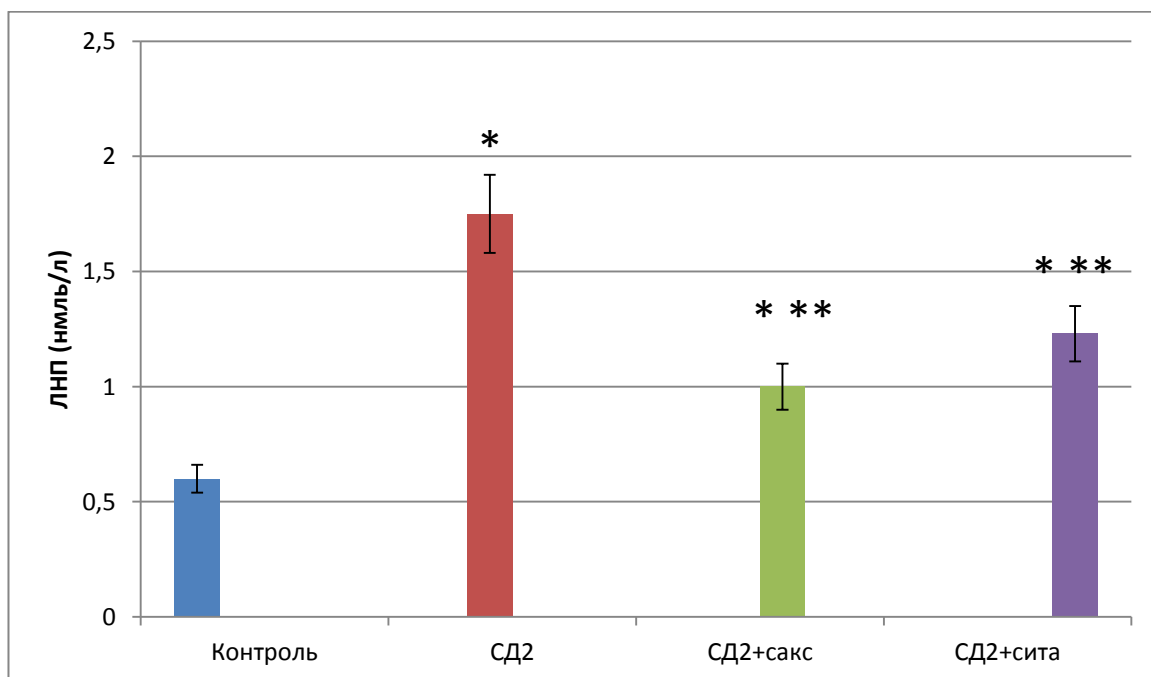


Рисунок 22. Влияние саксаглиптина и ситаглиптина на уровень проатерогенных ЛНП венозной крови крыс с СД2.

Обозначения те же, что на рисунке 1.

Как следует из данных рис.22, у крыс с сахарным диабетом 2-го типа до применения препаратов ДПП-4 уровень проатерогенных ЛНП в венозной крови ($1,75 \pm 0,17$ ммоль/л) был статистически значимо: в 2,9 раза выше, чем в контроле ($0,60 \pm 0,06$; $p < 0,05$).

После 3-х недельного введения животным с сахарным диабетом 2-го типа ДПП-4 содержание ЛНП в крови существенно снизилось: в 1,8 раза ($1,00 \pm 0,10$ ммоль/л; $p < 0,05$) при использовании саксаглиптина и в 1,4 раза ($1,23 \pm 0,12$ ммоль/л; $p < 0,05$) – ситаглиптина.

Таким образом, оба лекарственных препарата статистически достоверно снижали уровень проатерогенных ЛНП в крови у крыс с СД2 ($p < 0,05$).

Закключение. Результаты данного фрагмента работы показали, что ингибиторы ДПП-4 (и саксаглиптин и ситаглиптин) вызывают статистически достоверное снижение содержания в крови проатерогенных веществ: триглицеридов низкой плотности, при одновременной тенденции к повышению уровня антиатерогенных липопротеинов высокой плотности у крыс с сахарным диабетом 2-го типа по сравнению с животными с сахарным диабетом, которым указанные препараты не вводили.

Следовательно, оптимизация липидного профиля у животных с СД2 при применении у них саксаглиптина и ситаглиптина в условиях нашего исследования способствует уменьшению выраженности и масштаба процесса атерогенеза. В связи с этим, есть основания рекомендовать указанные препараты к исследованию возможности их апробации в клинике при СД2.

Известно, что у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа имеется прямая патогенетическая связь между развитием его осложнений и измененным липидным профилем. Полагают, что оптимизация липидного профиля при СД2 способствует уменьшению выраженности и масштаба процесса атерогенеза, включая образование атеросклеротических бляшек [58].

Monami и его коллеги показали, подобно приведенным выше нашим исследованиям, что препараты из группы ингибиторов ДПП-4 способствуют снижению в крови уровня атерогенных липидов при с сахарном диабете 2-го типа. В связи с этим, есть основания отдать предпочтение подходу лечения пациентов с СД2 именно препаратами ДПП-4 в сравнении со средствами из группы производных сульфонилмочевины [74].

Учитывая сведения о том, что оксидативный стресс – ключевое звено патогенеза многих форм патологии, в том числе и СД2, на следующем этапе работы была поставлена задача изучить действие ингибиторов ДПП-4: саксаглиптина, ситаглиптина и валдаглиптина на уровень в миокарде крыс с СД2 факторов, инициирующих липопероксидный процесс.

3.4. Влияние ингибиторов ДПП-4: саксаглиптина, ситаглиптина и валдаглиптина на содержание прооксидантных факторов в миокарде и в перфузате изолированного сердца крыс с СД2.

Оксидативный стресс – ключевое звено патогенеза многих заболеваний. Именно поэтому одной из основных целей исследований в медицине является выяснение наличия признаков стресса и поиск методов его профилактики и устранения.

Результаты влияния саксаглиптина, ситаглиптина и валдаглиптина на уровень показателей оксидативного стресса представлены на рисунках 23-26.

Содержание супероксидного в миокарде анион радикала кислорода у крыс с СД2 представлено на рисунке 23.

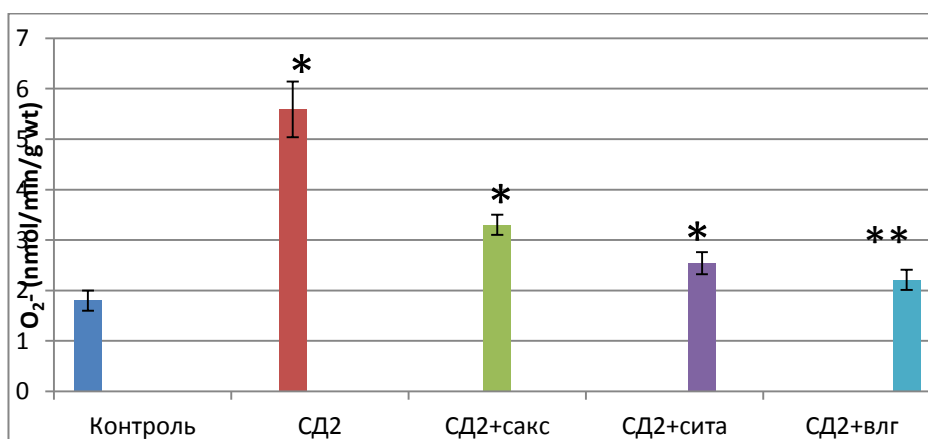


Рисунок 23. Влияние саксаглиптина, ситаглиптина и валдаглиптина на содержание O_2^- в ткани миокарда у крыс с СД2.

Обозначения: СД2+влг: животные с СД2, получавшие валдаглиптин.

Остальные обозначения те же, что на рисунке 1.

Данные рис.23 свидетельствуют о том, что у крыс с сахарным диабетом 2-го типа до введения ингибиторов ППД-4: саксаглиптина, ситаглиптина и валдаглиптина содержание супероксидного анион радикала O_2^- в ткани миокарда ($5,59 \pm 0,55$ nmol/min/gwt) было существенно: в 3,1 раза выше, чем в контроле ($1,80 \pm 0,20$ nmol/min/gwt; $p < 0,05$).

Этот факт свидетельствует о том, что одним из ключевых патогенетических звеньев моделируемого в нашем исследовании СД2, помимо гипергликемии, является избыточная генерация супероксидного анион радикала кислорода.

Доказано, что именно этот радикал инициирует чрезмерную активацию липопероксидного процесса. Сам супероксидный анион радикал кислорода и свободные радикалы других веществ (прежде всего – липидов) оказывают прямой цитотоксический эффект, а также приводят к образованию избытка липопероксидных соединений, альтерирующих мембраны и ферменты клеток, вызывая их необратимое повреждение.

После применения саксаглиптина уровень радикала O_2^- снизился статистически значимо в сравнении с животными с сахарным диабетом 2-го типа: в 1,7 раза ($3,30 \pm 0,20$ nmol/min/gwt; $p < 0,05$), после использования ситаглиптина еще в большей мере: в 2,2 раза ($2,54 \pm 0,22$ nmol/min/gwt; $p < 0,05$) и максимально после введения валдаглиптина: в 2,5 раза ($2,21 \pm 0,20$ nmol/min/gwt; $p < 0,05$).

Таким образом, все три ингибитора ДПП-4 статистически достоверно снижали уровень инициатора липопероксидного процесса: супероксидного анион радикала кислорода в ткани миокарда у животных с СД2 (по сравнению с крысами с СД2, но без применения ДПП-4), оказывая тем самым антиоксидантный эффект.

При этом, нами выявлены различная выраженность эффектов у разных ингибиторов ДПП-4: наибольшее снижение уровня супероксидного анион радикала кислорода наблюдалось в группе крыс, предварительно получавшей вилдаглитин, в то время как саксаглиптин показал наименьшее влияние на этот показатель. Хотя все три препарата понижали содержание супероксидного анион радикала кислорода в миокарде, ни один из них не уменьшал эти значения до уровня у здоровых животных.

Содержание в ткани миокарда у животных с СД2 еще одного вещества с прооксидантным действием - H_2O_2 , представлено на рисунке 24.

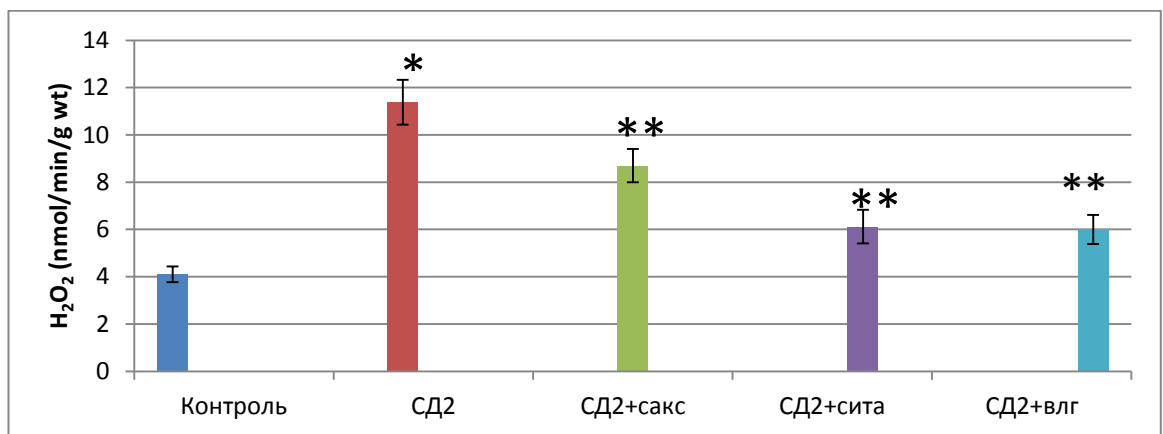


Рисунок 24. Влияние саксаглиптина, ситаглиптина и валдаглиптина на содержание H_2O_2 в ткани миокарда крыс с СД2.

Обозначения: те же, что на рисунке 23.

Как видно, у крыс с сахарным диабетом 2-го типа до применения ингибиторов ДПП-4 содержание H_2O_2 в ткани миокарда ($11,38 \pm 0,95$ nmol/min/gwt; рис.20) было статистически значимо: в 2,8 раза выше, чем в контроле у интактных животных ($4,10 \pm 0,33$ nmol/min/gwt; $p < 0,05$).

После использования саксаглиптина уровень H_2O_2 в миокарде снизился статистически достоверно: в 1,3 раза ($8,70 \pm 0,70$ nmol/min/gwt; $p < 0,05$), после ситаглиптина - в 1,9 раза ($6,12 \pm 0,71$ nmol/min/gwt; $p < 0,05$), после введения валдаглиптина также в 1,9 раза ($6,00 \pm 0,61$ nmol/min/gwt; $p < 0,05$).

Таким образом, все три препарата статистически достоверно снижали содержание H_2O_2 в ткани миокарда у животных с СД2 в сравнении с нелечеными крысами с сахарным диабетом 2-го типа.

Выявлено также существенное различие в эффектах саксаглиптина в сравнении с ситаглиптином и валдаглиптином.

Содержание TBARS в ткани миокарда крыс с СД2 представлено на рисунке 25.

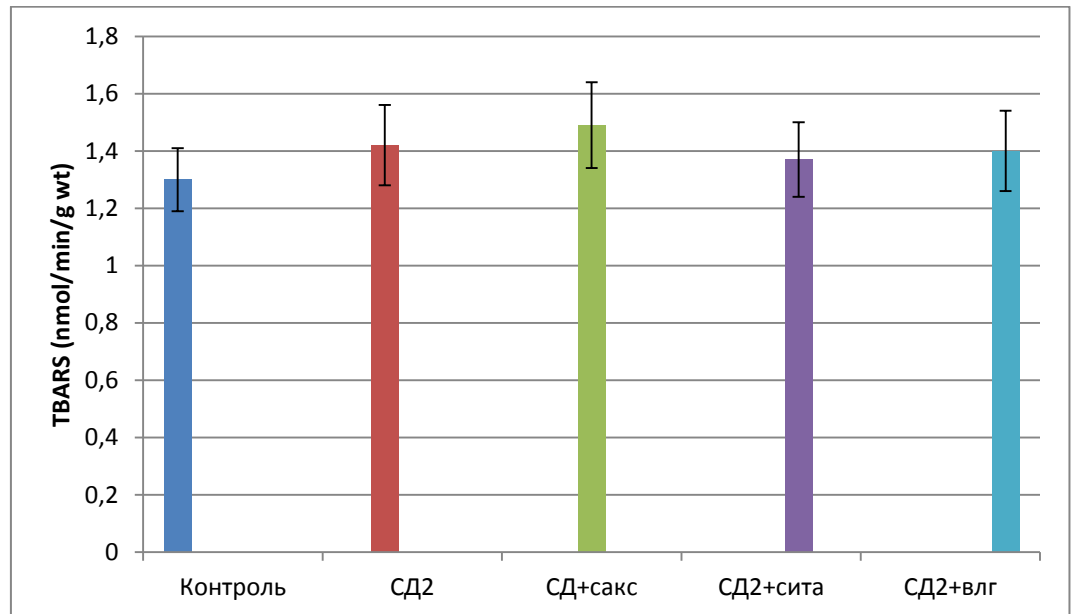


Рисунок 25. Влияние саксаглиптина, ситаглиптина и валдаглиптина на содержание TBARS в ткани миокарда крыс с СД2.

Обозначения те же, что на рисунке 23.

Видно, что у крыс с сахарным диабетом 2-го типа до применения ингибиторов ДПП-4 уровень вторичного продукта липопероксидного процесса: TBARS в ткани миокарда ($1,42 \pm 0,14$ nmol/min/gwt; рис.21) был статистически недостоверно выше контрольного ($1,30 \pm 0,11$ nmol/min/gwt; $p > 0,05$).

После 3-х недельного раздельного применения саксаглиптина, ситаглиптина и валдаглиптина содержание TBARS в ткани миокарда оставалось в пределах нормального диапазона ($1,49 \pm 0,15$ nmol/min/gwt, $1,37 \pm 0,13$ nmol/min/gwt и $1,40 \pm 0,14$ nmol/min/gwt, $p > 0,05$).

Таким образом, уровень TBARS в ткани миокарда крыс с сахарным диабетом 2-го типа как до, так и после применения ингибиторов ДПП-4 был повышенным, но существенно не отличался от контрольного. По-видимому, трехнедельного периода моделирования СД2 было еще недостаточно для

«наработки» вторичного продукта липопероксидации, выявляемого в реакциях TBARS.

Содержание NO_2^- в ткани миокарда представлено на рисунке 26.

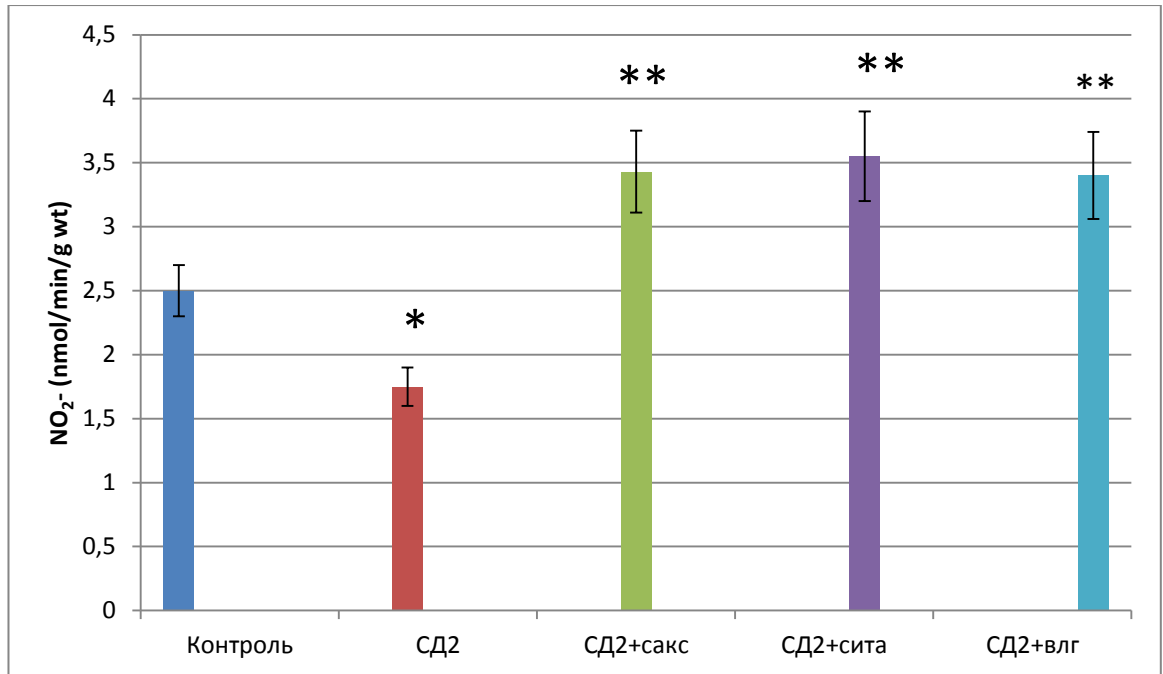


Рисунок 26. Влияние саксаглиптина, ситаглиптина и валдаглиптина на содержание NO_2^- в ткани миокарда крыс с СД2.

Обозначения те же, что на рисунке 23.

Видно, что у крыс с сахарным диабетом 2-го типа уровень NO_2^- в ткани миокарда ($1,75 \pm 0,15$ nmol/min/gwt; рис.22) существенно: в 1,4 раза снизился в сравнении с интактными животными контрольной группы ($2,50 \pm 0,20$ nmol/min/gwt; $p < 0,05$).

В условиях применения ингибиторов ДПП-4 содержание NO_2^- в миокарде увеличивалось статистически достоверно в сравнении как с контрольными, так и крысами с сахарным диабетом. После применения саксаглиптина и ситаглиптина уровень NO_2^- возрос в 2,0 раза ($3,43 \pm 0,32$ nmol/min/gwt; $p < 0,05$ и $3,55 \pm 0,35$ nmol/min/gwt; $p < 0,05$, соответственно), а после валдаглиптина - в 1,9 раза ($3,40 \pm 0,34$ nmol/min/gwt; $p < 0,05$).

Обсуждая приведенные выше результаты исследования, важно, что оксид азота и его метаболиты, способны как к про-, так и к антиоксидантному

действию. Так, при взаимодействии оксида азота с супероксидным анион радикалом кислорода образуются токсичные вещества, включая пероксинитрит. Он денатурирует молекулы белков, фосфолипидов мембран, повреждает клетки эндотелия, оказывает проагрегантное действие [110]. С другой стороны, оксид азота потенцирует действие антиоксидантных факторов, повышая активность антиоксидантных ферментов и обеспечивая, тем самым - подавление липопероксидных реакций. Кроме того, оксид азота обладает антиагрегантным и вазодилатирующим действием. Такие его эффекты могут быть инициированы и у животных с сахарным диабетом 2-го типа.

Учитывая, что ингибиторы ДПП-4 в целом, оказывают антидиабетическое и кардиопротективное действие, вполне возможно допускать, что в условиях нашего исследования они потенцируют действие антиоксидантных, антиагрегантных и вазодилатирующих факторов миокарда.

В целом, в миокарде крыс с сахарным диабетом 2-го типа существенно увеличивалось содержание инициаторов процесса липопероксидации: O_2^- и H_2O_2 . Это свидетельствует о том, что у животных в процессе развития СД2 создаются условия для интенсификации свободнорадикальных процессов.

Ингибиторы ДПП-4: саксаглиптина и ситаглиптина статистически достоверно снижали в миокарде уровни прооксидантных факторов: O_2^- и H_2O_2 . Одновременно с этим, содержание NO_2^- в нем повышалось практически до нормы и выше нее под влиянием всех трех применявшихся нами ингибиторов ДПП-4. Это дает основания допускать реализацию, в условиях их использования при сахарном диабете 2-го типа как антиоксидантного, так и антиагрегантного и сосудорасширяющего действия повышенного уровня NO_2^- .

Далее нами были исследованы эффекты ингибиторов ДПП-4: саксаглиптина и ситаглиптина в отношении содержания прооксидантных факторов в перфузате коронарных вен изолированного сердца крыс с сахарным диабетом 2-го типа при гипоперфузии и последующей реперфузии миокарда.

Влияние ингибиторов ДПП-4: саксаглиптина и ситаглиптина на показатели липопероксидного процесса в перфузате коронарных вен при гипоперфузии и последующей реперфузии изолированного сердца крыс с сахарным диабетом 2-го типа

Как было показано выше, мониторинг показателей липопероксидного повреждения мембран кардиомиоцитов (TBARS), а также прооксидантов (монооксида азота, супероксидного аниона радикала кислорода и перекиси водорода) в оттекающей по коронарным венам сердца крови выявил факт влияния препаратов из группы ингибиторов ДПП-4: саксаглиптина и ситаглиптина на процесс липопероксидации в миокарде при его 30-минутной гипоперфузии и последующей реперфузии в течение часа *ex vivo*. Это позволило ответить на вопрос: опосредованы ли изменения кардиодинамических показателей у животных с СД2 повреждением миокарда продуктами ПОЛ миокарда или являются результатом действия других патогенных факторов. Очевидно, что при активации ПОЛ в миокарде могут инициироваться и адаптивные механизмы сохранения структур и поддержания сократительной функции миокарда. Однако, если эти механизмы недостаточны, то это чревато избыточной активацией процессов апоптоза и некроза кардиоцитов.

Ниже приведены результаты исследований состояния липопероксидного процесса при гипоперфузии и последующей реперфузии изолированного сердца крыс раствором КХ, а также влияния на этот процесс ингибиторов ДПП-4: саксаглиптина и ситаглиптина.

Показатели состояния липопероксидного процесса у животных контрольной группы представлены в таблице 5.

Таблица 5. Показатели состояния липопероксидного процесса в перфузате коронарных вен изолированного сердца крыс контрольной группы.

Показатели липопероксидного процесса				
Точки записи показателей	TBARS (нмоль/мл)	NO ₂ ⁻ (нмоль/мл)	O ₂ ⁻ (нмоль/мл)	H ₂ O ₂ (нмоль/мл)
Стабилизация 1 60	12.75 ± 0.56	73.62 ± 3.61	35.40 ± 1.24	47.72 ± 2.85
	22.95 ± 1.55 *	74.42 ± 3.37	36.22 ± 1.28	48.52 ± 2.80
	16.39 ± 1.34 *#	46.51 ± 2.60*#	27.86 ± 1.04 *#	46.89 ± 2.57

Обозначения: те же, что в таблице 1.

Как видно из таблице 5 у крыс контрольной группы уровень TBARS в перфузирующей жидкости, оттекающей по коронарным венам сердца, через минуту от начала реперфузии миокарда после его 30-минутной гипоперфузии увеличился статистически достоверно: в 1,8 раза ($p < 0,05$), а через 60 минут снизился по сравнению с ним в 1,4 раза ($p < 0,05$).

Содержание NO₂⁻ в перфузате через одну минуту от начала реперфузии ранее гипоперфузируемого в течении 30 мин миокарда практически не изменился, а через 60 минут оно уменьшилось значительно: в 1,6 раза ($p < 0,05$) и стало достоверно ниже исходной точки в 1,6 раза ($p < 0,05$).

Уровень супероксидного анион радикала кислорода в перфузате через 1 минуту от начала реперфузии миокарда после его 30-минутной гипоперфузии практически не изменился, но через 60 минут значимо уменьшился: в 1,3 раза ($p < 0,05$) и стал ниже исходной точки стабилизации в 1,3 раза ($p < 0,05$).

Содержание H₂O₂ в перфузате как через 1 минуту, так и через 60 минут от начала периода реперфузии практически не менялось.

Таким образом, через 1 минуту от начала периода реперфузии миокарда после его получасовой гипоперфузии в перфузате увеличивалось только содержание TBARS. Через 60 минут реперфузии миокарда уменьшалось содержания как TBARS, так NO₂⁻ и O₂⁻.

Показатели липопероксидного процесса у животных с сахарным диабетом 2-го типа приведены в таблице .6.

Таблица 6. Показатели состояния липопероксидного процесса в перфузате коронарных вен изолированного сердца крыс с СД2.

Точки записи показателей	Показатели липопероксидного процесса			
	TBARS (нмоль/мл)	NO ₂ ⁻ (нмоль/мл)	O ₂ ⁻ (нмоль/мл)	H ₂ O ₂ (нмоль/мл)
Стабилизация 1 мин 60 мин	20.43 ± 1.06	98.58 ± 3.51	50.74 ± 2.34	33.65 ± 2.08
	30.26 ± 1.82*	91.16 ± 3.82*	43.21 ± 2.31	39.89 ± 2.12
	27.55 ± 1.14*#	88.61 ± 3.91*	43.53 ± 2.21	36.96 ± 1.98

Обозначения: те же, что в таблице 1.

Как следует из данных таблице 6, у животных с сахарным диабетом 2-го типа содержание TBARS в перфузирующей жидкости, оттекающей из коронарных вен сердца через минуту от начала реперфузии миокарда после 30 мин его гипоперфузии, увеличилось значительно: в 1,5 раза ($p < 0,05$) в сравнении с исходным, а через 60 минут реперфузии оно, хотя и снизилось в 1,1 раза ($p < 0,05$), но оставалось статистически достоверно выше, чем по окончании периода гипоперфузии.

Уровень NO₂⁻ в перфузате через минуту от начала реперфузии миокарда после его получасовой гипоперфузии достоверно уменьшился в 1,1 раза ($p < 0,05$), к 60 минут реперфузии также несколько снизился и был статистически значимо ниже в сравнении с исходной точкой стабилизации ($p < 0,05$).

Содержание супероксидного анион радикала кислорода в перфузате через одну минуту от начала реперфузии миокарда после его 30-минутной гипоперфузии уменьшилось в 1,2 раза ($p > 0,05$) и далее оставалось на этом сниженном уровне.

Уровень H₂O₂ через минуту от начала реперфузии миокарда после его гипоперфузии в течение 30 минут увеличился в 1,2 раза ($p > 0,05$), а через 60 минут от начала реперфузии снизился в 1,1 раза ($p > 0,05$) в сравнении с исходной точкой.

Таким образом, через 1 минуту от начала реперфузии миокарда после 30 мин его гипоперфузии в нем увеличивался только показатель TBARS.

Через 60 минут от начала реперфузии миокарда наблюдалось снижение содержания в перфузате TBARS и NO_2^- .

Показатели состояния липопероксидного процесса у животных с сахарным диабетом 2-го типа, предварительно получавших в течение 3-х недель ситаглиптин, приведены в таблице 7.

Таблица 7. Показатели состояния липопероксидного процесса в перфузате коронарных вен изолированного сердца крыс с СД2, предварительно получавших ситаглиптин.

Точки записи показателей	Показатели липопероксидного процесса			
	TBARS (нмоль/мл)	NO_2^- (нмоль/мл)	O_2^- (нмоль/мл)	H_2O_2 (нмоль/мл)
Стабилизация	8.26 ± 2.61	113.20 ± 6.17	22.56 ± 0.94	31.91 ± 1.58
1 мин	9.40 ± 2.16	$156.74 \pm 7.27^*$	24.45 ± 1.18	32.49 ± 1.23
60 мин	7.22 ± 2.54	$120.43 \pm 6.41^\#$	$12.24 \pm 0.79^{*\#}$	31.61 ± 1.22

Обозначения: те же, что в таблице 1.

У животных с СД2, которым предварительно вводили ситаглиптин, уровень TBARS в перфузате через минуту от начала реперфузии ранее гипоперфузируемого 30 мин миокарда увеличился статистически незначимо в сравнении с исходным, а через 60 минут от начала реперфузии снизился в 1,3 раза ($p > 0,05$) ниже его.

Содержание NO_2^- через минуту от начала реперфузии увеличилось достоверно: в 1,4 раза ($p < 0,05$) по сравнению с исходным, а через 60 минут от начала реперфузии снизилось в 1,3 ($p < 0,05$).

Уровень супероксидного анион радикала кислорода через 1 минуту от начала реперфузии миокарда после его 30-минутной гипоперфузии несколько увеличился ($p > 0,05$), однако через 60 минут от начала реперфузии достоверно упал в 2,0 раза ($p < 0,05$).

Содержание H_2O_2 в перфузирующей жидкости во всех исследуемых точках практически не менялось.

Таким образом, в перфузате миокарда у животных с СД2, которым предварительно вводили ситаглиптин, через минуту от начала реперфузии увеличивалось содержание только NO_2^- . Через 60 минут от начала реперфузии снижались уровни O_2^- и NO_2^- .

Показатели оксидативного стресса у животных с сахарным диабетом 2-го типа, получавших саксаглиптин представлены в таблице 8.

Таблица 8. Показатели состояния липопероксидного процесса в перфузате коронарных вен изолированного сердца крыс с СД2, предварительно получавших саксаглиптин.

Точки записи показателей	Показатели липопероксидного процесса			
	TBARS (нмоль/мл)	NO_2^- (нмоль/мл)	O_2^- (нмоль/мл)	H_2O_2 (нмоль/мл)
Исходная	8.86 ± 2.65	118.74 ± 6.19	22.11 ± 1.11	32.51 ± 1.96
1 мин	7.34 ± 3.23	$144.53 \pm 7.28^*$	22.32 ± 1.16	$37.82 \pm 1.87^*$
60 мин	9.49 ± 3.49	128.67 ± 5.66	19.74 ± 1.08	$30.72 \pm 1.65^\#$

Обозначения: те же, что в таблице 1.

Как видно, у животных с СД2 после предварительного трехнедельного введения саксаглиптина, уровень TBARS через одну минуту от начала периода реперфузии миокарда левого желудочка после 30 минут его гипоперфузии статистически недостоверно снижался в сравнении с исходной точкой стабилизации, а через 60 минут реперфузии повышался и был недостоверно выше, чем в исходной точке.

Содержание NO_2^- через минуту от начала реперфузии достоверно увеличилось: в 1,2 раза ($p < 0,05$), а через 60 минут снизилось и было недостоверно выше исходной точки в 1,1 ($p > 0,05$).

Уровень супероксидного анион радикала кислорода через минуту и через 60 минут от начала реперфузии миокарда после 30 минут его гипоперфузии менялся статистически незначимо.

Содержание H_2O_2 через минуту от начала периода реперфузии увеличилось в сравнении с исходной точкой в 1,2 раза ($p < 0,05$), но через 60 минут снизилось в 1,2 ($p < 0,05$) и был достоверно ниже ее.

Таким образом, у животных с СД2, получавших саксаглиптин, через минуту от начала реперфузии миокарда после его 30-минутной гипоперфузии в нем достоверно увеличивалось содержание NO_2^- и H_2O_2 . Через 60 минут от начала реперфузии эти показатели падали ниже исходной точки, причем содержание H_2O_2 в перфузате было статистически ниже, чем на первой минуте периода реперфузии.

В целом, исследование влияния ингибиторов ДПП-4: саксаглиптина и ситаглиптина на показатели липопероксидного процесса после 30 мин гипоперфузии и последующей реперфузии в течение 60 мин миокарда левого желудочка изолированного сердца интактных крыс и животных с СД2 раствором Кребса-Хензelayта выявило наличие у указанных препаратов антиоксидантного и, как следствие - кардиопротективного действия.

Раздельное трехнедельное предварительное введение животным саксаглиптина и ситаглиптина значительно снижало в ткани миокарда интактных животных и крыс с СД2 содержание прооксидантов (O_2^- и H_2O_2) как при гипоперфузии, так и при реперфузии миокарда.

Сравнительная характеристика показателей липопероксидного процесса в перфузирующей жидкости изолированного сердца крыс с СД2, получавших саксаглиптин или саксаглиптин при гипоперфузии и последующей реперфузии миокарда представлена на рисунке 27.

Значения индекса перекисного окисления липидов (TBARS) в реперфузируемом миокарде были значительно ниже у крыс, которым скормливали ингибиторы ДПП-4 в отличие от животных с СД2 без их применения.

Пониженные уровни нитритов были характерны для всех групп животных кроме крыс с СД2. При этом, ситаглиптин обеспечивал наибольшее **их** снижение по сравнению с другими группами как в начале, так и при завершении периода 60-минутной реперфузии.

Содержание перекиси водорода в миокарде как в начале, так и в конце периода реперфузии было статистически значимо ниже у крыс всех групп в сравнении с контрольной.

Содержание супероксидного анион радикала кислорода на первой и последней минутах периода реперфузии у крыс с СД2 были выше, чем в контроле группы животных, а у крыс с СД2, получавших ингибиторы ДПП-4 - статистически значимо выше, чем при СД2 без использования препаратов.

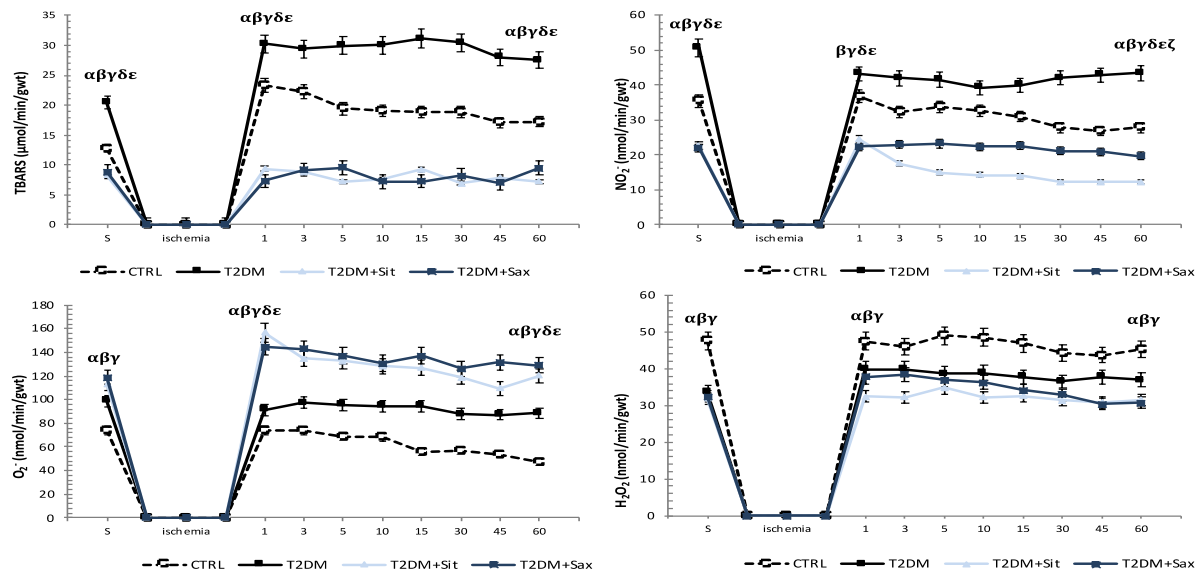


Рисунок 27. Влияние ингибиторов ДПП-4 на содержание в миокарде супероксидного анион радикала ($O_2^{\cdot-}$) в нмоль/мин/гр веса (nmol/min/gwt), перекисиводорода (H_2O_2) в нмоль/мин/гр веса (nmol/min/gwt), показателя перекисного окисления липидов (TBARS) в нмоль/мин/гр веса (nmol/min/gwt), содержания нитритов (NO_2) в (nmol/min/gwt).

Обозначения: CTRL – контрольные крысы; T2DM – крысы с СД2; Sit – крысы с СД2, получавшие в течение 3-х недель ситаглиптин; Sax – крысы с СД2, получавшие в течение 3-х недель саксаглиптин.

Сравнения: α: контрольные крысы/крысы с СД2; β: контроль/СД2+саксаглиптин; γ: контроль/СД2+ситаглиптин; δ: СД2/СД2+саксаглиптин; ε: СД2/СД2+ситаглиптин; ζ: СД2+саксаглиптин/СД2+ситаглиптин.

Заключение. Исследование влияния ингибиторов ДПП-4: саксаглиптина и ситаглиптина на показатели липопероксидного процесса при гипоперфузии и последующей реперфузии изолированного сердца intactных крыс и животных с СД2 раствором КХ выявило наличие у указанных препаратов антиоксидантного действия.

Раздельное трехнедельное предварительное введение животным саксаглиптина и ситаглиптина значительно снижало в ткани миокарда интактных животных и крыс с СД2 содержание прооксидантов (O_2^- и H_2O_2) как при гипоперфузии, так и при реперфузии миокарда.

Введение животным ингибиторов ДПП-4: саксаглиптина и, особенно, ситаглиптина, обеспечивало повышение активности антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы и каталазы, а также содержания глутатиона.

На следующем этапе работы были изучены эффекты применения у животных ингибиторов ДПП-4 в отношении активности антиоксидантных факторов крови: ферментов супероксиддисмутазы и каталазы, а также содержания глутатиона.

3.5. Влияние ингибиторов ДПП-4: саксаглиптина, ситаглиптина и валдаглиптина на активность антиоксидантных факторов крови крыс с индуцированным СД2.

Активность СОД в лизате эритроцитов крови животных представлена на рисунке 28.

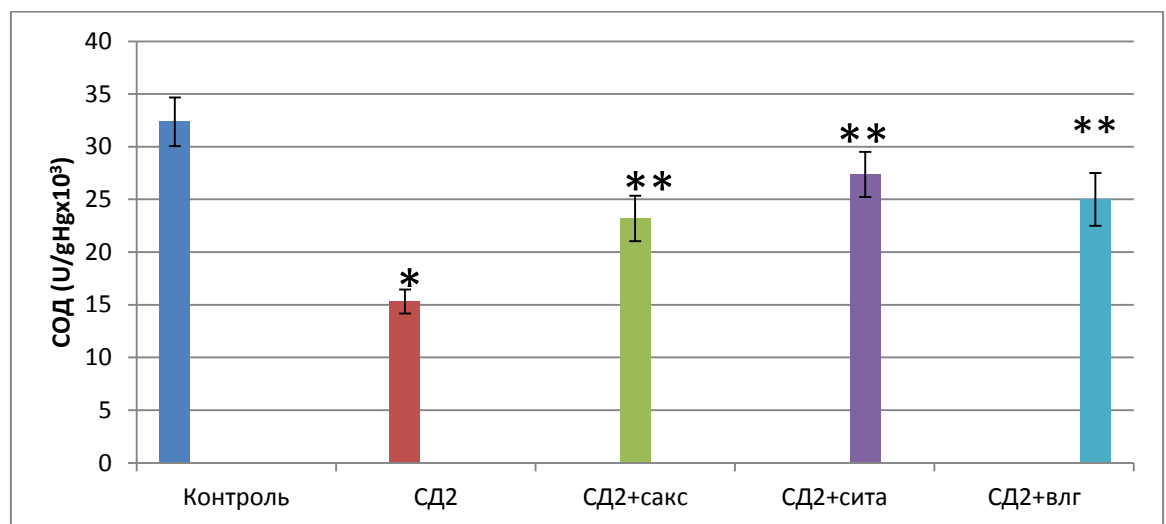


Рисунок 28. Влияние саксаглиптина, ситаглиптина и валдаглиптина на активность СОД в лизате эритроцитов крови животных с СД2;

Обозначения: СД2+влг: животные с СД2, получавшие валдаглиптин.

Остальные обозначения те же, что на рисунке 23.

Данные рисунка 28 свидетельствуют о том, что у крыс с сахарным диабетом 2-го типа до применения ингибиторов ДПП-4 активность СОД в

лизате эритроцитов крови ($15,32 \pm 1,14 \text{ U/gHg} \times 10^3$) была статистически значимо: в 2,1 раза ниже, чем в контроле ($32,36 \pm 2,32 \text{ U/gHg} \times 10^3$; $p < 0,05$). После 3-х недельного введения животным саксаглиптина активность СОД достоверно возросла в 1,5 раза ($23,19 \pm 2,17 \text{ U/gHg} \times 10^3$; $p < 0,05$), ситаглиптина - в 1,8 раза ($27,37 \pm 2,13 \text{ U/gHg} \times 10^3$; $p < 0,05$), валдаглиптина - в 1,6 раза ($25,00 \pm 2,50 \text{ U/gHg} \times 10^3$; $p < 0,05$).

Таким образом, все три препарата статистически достоверно увеличивали активность СОД в крови животных с сахарным диабетом 2-го типа, хотя значения активности СОД в этих группах животных были ниже, чем в контрольной группе. При сравнении эффектов ингибиторов ДПП-4, обнаружено, что применение ситаглиптина приводило к наибольшему увеличению активности СОД.

Следовательно, повышение активности супероксиддисмутазы крови в условиях предварительного применения ингибиторов ДПП-4 (как саксаглиптина, так и ситаглиптина) у крыс с СД2, является важным фактором подавления процесса генерации супероксидного анион радикала кислорода.

Активность каталазы в лизате эритроцитов крови животных представлена на рисунке 29.

Как следует из данных рисунка 29, у крыс с сахарным диабетом 2-го типа до применения ингибиторов ДПП-4 уровень активности каталазы крови ($1,62 \pm 0,14 \text{ U/gHg} \times 10^3$) был статистически достоверно: в 2,4 раза ниже, чем в контроле ($3,90 \pm 0,31 \text{ U/gHg} \times 10^3$; $p < 0,05$).

После применения саксаглиптина уровень СОД у животных достоверно увеличился: в 1,4 раза ($2,29 \pm 0,25 \text{ U/gHg} \times 10^3$; $p < 0,05$), после ситаглиптина в 1,9 раза ($3,07 \pm 1,28 \text{ U/gHg} \times 10^3$; $p < 0,05$) и валдаглиптина в 1,4 раза ($2,30 \pm 0,25 \text{ U/gHg} \times 10^3$; $p < 0,05$).

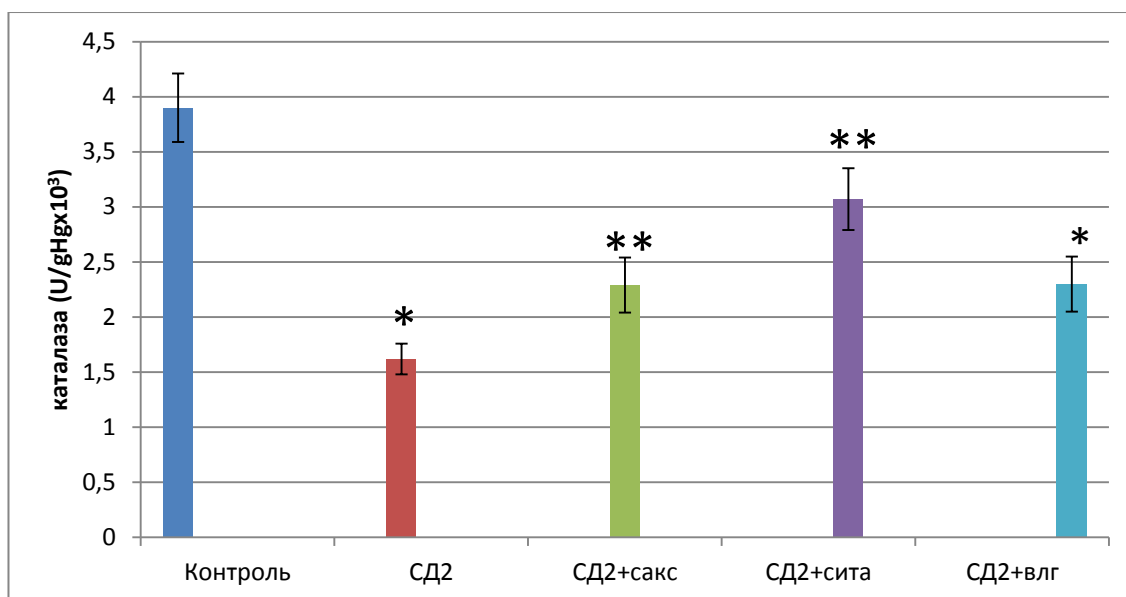


Рисунок 29. Влияние саксаглиптина, ситаглиптина и валдаглиптина на активность каталазы в лизате эритроцитов крови животных с СД2.

Обозначения: СД2+влг: животные с СД2, получавшие вилдаглиптин.

Остальные обозначения те же, что на рисунке 23.

Таким образом, в условиях применения всех трёх препаратов статистически значимо повышалась активность каталазы в лизате эритроцитов крови животных с сахарным диабетом 2-го типа (в большей степени - ситаглиптина по сравнению с саксаглиптином и валдаглиптином; $p < 0,05$).

Содержание глутатиона в крови представлено на рисунке 30.

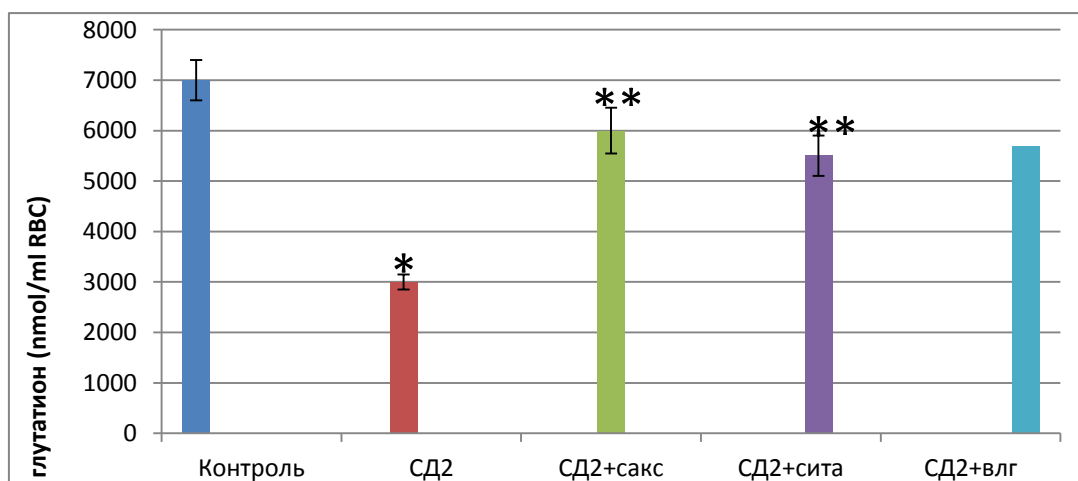


Рисунок 30. Влияние саксаглиптина, ситаглиптина и валдаглиптина на содержание восстановленного глутатиона в лизате эритроцитов крови животных с СД2.

Обозначения: СД2+влг: животные с СД2, получавшие вилдаглиптин.

Остальные обозначения те же, что на рисунке 23.

Видно, что у крыс с сахарным диабетом 2-го типа до применения ингибиторов ДПП-4 содержание глутатиона в лизате эритроцитов крови (3000 ± 150 nmol/mlRBC) было достоверно: в 2,3 раза ниже, чем в контроле (7000 ± 400 nmol/mlRBC; $p < 0,05$).

После предварительного 3-х недельного применения саксаглиптина уровень глутатиона увеличился статистически достоверно: в 2,0 раза (6000 ± 455 nmol/mlRBC; $p < 0,05$), ситаглиптина - в 1,8 раза (5500 ± 400 nmol/mlRBC; $p < 0,05$), валдаглиптина - в 1,9 раза (5700 ± 400 nmol/mlRBC; $p < 0,05$).

Таким образом, у животных с сахарным диабетом 2-го типа выявлено снижение в лизате эритроцитов крови эффективности исследованных нами факторов антиоксидантной защиты.

Профилактическое применение ингибиторов ДПП-4 у крыс с сахарным диабетом 2-го типа обеспечивало закономерное увеличение уровней активности СОД, каталазы и содержания глутатиона в крови, то есть - восстановление эффективности системы антиоксидантных факторов организма. При этом, более выраженным этот феномен был у животных с СД2, получавших ситаглиптин.

Заключение. В целом, этот фрагмент работы показал, что в ткани миокарда крыс с сахарным диабетом 2-го типа существенно повышены уровни прооксидантов: супероксидного анион радикала кислорода и H_2O_2 , являющихся инициаторами липопероксидного процесса.

Выявлено также, что у крыс с сахарным диабетом наблюдается значительное снижение активности антиоксидантного фермента: СОД и одновременно - существенное повышение уровня перекиси водорода, обладающей высокой прооксидантной активностью. Это сочетается с закономерной избыточной инициацией окислительного стресса у животных с СД2.

В дополнение к снижению активности СОД в крови крыс с сахарным диабетом 2-го типа понижена активность каталазы, фермента, представляющего вторую линию антиоксидантной защиты за счет

преобразования H_2O_2 в воду и молекулярный кислород. В связи со снижением активности СОД и последующим накоплением избытка супероксидного анион радикала кислорода создаются условия для его взаимодействия с окисью азота с образованием еще более токсичного пероксинитрита [110].

Наши фактические данные подтверждают этот факт, поскольку у крыс с СД2 зарегистрированы более низкие уровни нитритов. Это дает основания косвенно допускать возможность образования молекулы монооксида азота, обладающей вазодилатирующим действием. Сниженные уровни $\text{NO}^\cdot$ в сочетании с повышенными уровнями $\text{O}_2^\cdot$, подтверждают допущение о том, что при сахарном диабете 2-го типа образуются еще более токсичные молекулы пероксинитрита. Известно, что увеличение генерации АФК и снижение уровня NO приводит к активации ПОЛ [110].

Вместе с тем, наше исследование не выявило статистически значимого увеличения показателя TBARS (ТБКПВ). Возможным объяснением этого факта может быть недостаточно длительная продолжительность индуцированного СД2 (семь недель) до взятия образца. Вполне вероятно, что бо́льшая длительность и прогрессирование сахарного диабета могло бы приводить к увеличению этого показателя.

Все использованные нами ингибиторы ДПП-4: ситаглиптин, саксаглиптин и вилдаглиптин оказывали существенное влияние на уровень и активность в миокарде прооксидантных и антиоксидантных факторов у животных с сахарным диабетом 2-го типа. Наряду с этим, отмечены и различия в их эффектах по отдельным параметрам. Из всех трех препаратов этой группы вилдаглиптин оказывал наиболее выраженное воздействие на процесс генерации АФК. Трехнедельного внутрибрюшинного применения вилдаглиптина у крыс с СД2 было достаточно для получения статистически значимого снижения уровней прооксидантных агентов. Этот эффект можно объяснить активацией первой и второй антиоксидантных линий защиты организма, то есть увеличением активности как СОД, так и КАТ, что и наблюдается у животных с сахарным диабетом. Два других использованных

нами препарата показали статистически значимое снижение в миокарде уровня АФК и увеличение активности СОД и КАТ в лизате эритроцитов крови.

Помимо влияния на ферменты с антиоксидантной активностью, все применяемые нами ингибиторы ДПП-4 способствовали увеличению содержания глутатиона, также обладающего антиоксидантным свойством. При этом, ситаглиптин обеспечивал наиболее выраженный эффект по активации факторов системы антиоксидантной защиты. Такой эффект ситаглиптина может быть связан с тем, что он принадлежит к группе непептидомиметиков. Эти вещества, как известно, создают нековалентные связи с каталитическим доменом ферментов ДПП-4, что приводит к значительному и очень быстрому их ингибированию.

ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом, результаты работы показали, что ингибиторы ДПП-4: саксаглиптин, ситаглиптин и вилдаглиптин обеспечивают кардиопротективный эффект при гипо- и последующей реперфузии миокарда левого желудочка сердца раствором КХ как у интактных крыс, так и у животных с СД-2, индуцированным стрептозотоцином.

С учетом результатов настоящего исследования можно допустить, что уменьшение и/или предотвращение массивного окислительного стресса и повреждения миокарда под воздействием ингибиторов ДПП-4 при СД2 имеет существенное значение для сохранения сократительной функции сердца, что подтверждается данными о состоянии у этих животных показателей кардиодинамики.

В дополнение к имеющимся представлениям о механизме кардиопротекторного действия ДПП-4, опосредованного ингибированием процесса чрезмерной генерации АФК в сердце, описанным в литературе, возможны и другие, с помощью которых реализуются эффекты лекарственных средств из группы ДПП-4. Так, описан механизм, независимый от ГЛП-1Р, реализуемый через продукт разложения ГЛП-1. У мышей ГЛП-1Р +/- ГЛП-1 ограничивает размер инфаркта миокарда и приводит к выживанию

кардиомиоцитов после их ишемическо - реперфузионного повреждения в результате активации сигнальных путей ПИЗ К и МАПК1/2. Это указывает на существование различных рецепторов, которые могут связывать расщепленную форму ГЛП-1 [64].

Важно, что препараты группы ДПП-4 являются эффективными оральными антигипергликемическими средствами, а также обладают существенным кардиопротективным действием у животных с СД-2. Это подразумевает, что в будущем, препараты из группы ингибиторов ДПП-4, после дополнительных исследований сигнальных путей реализации их действия, могут послужить эффективным средством фармакологического preconditionирования сердца у пациентов, страдающих сахарным диабетом.

ВЫВОДЫ.

1. Предварительное трехнедельное раздельное введение per os крысам с индуцированным сахарным диабетом 2-го типа ингибиторов дипептидилпептидазы-4 ситаглиптина и саксаглипина снижает степень выраженности диабета, что проявляется сохранением способности синтеза, под действием как ситаглиптина, так и саксаглипина, инсулина β -клетками поджелудочной железы, а также уменьшением уровня глюкозы плазмы крови натощак. Это позволяет рекомендовать применение указанных ингибиторов дипептидилпептидазы-4 для патогенетической терапии сахарного диабета.

2. Применение ингибиторов ДПП-4: ситаглиптина и саксаглипина обеспечивает у крыс с индуцированным сахарным диабетом 2-го типа существенный кардиопротективный эффект. Об этом свидетельствуют сохранение исходной толщины межжелудочковой перегородки левого желудочка сердца, снижение диастолического артериального давления, а также – меньшая степень уменьшения, под влиянием ситаглиптина и саксаглипина, показателей сократительной функции миокарда, частоты сердечных сокращений и коронарного протока раствора Кребса-Хенселейта, как при гипо-, так и при реперфузионном повреждении миокарда. Этот факт является основанием для рекомендации применения указанных ингибиторов ДПП-4 для снижения степени альтерации сердца как при сахарном диабете 2-го типа, так при гипо- и реперфузии миокарда.

3. Введение ингибиторов ДПП-4: саксаглиптина и ситаглиптина обеспечивает существенное антиатерогенное действие у животных с сахарным диабетом 2-го типа. Об этом свидетельствует значимое снижение уровня в их крови проатерогенных факторов: холестерина и триглицеридов низкой плотности, в сравнении с крысами без применения саксаглиптина и ситаглиптина.

4. Применение ингибиторов ДПП-4: саксаглиптина, ситаглиптина и вальдаглиптина значительно снижает в ткани миокарда животных с сахарным диабетом 2-го типа уровни прооксидантных факторов (O_2^- и H_2O_2),

инициирующих липопероксидные реакции, продукты которых оказывают цитотоксическое действие на кардиомиоциты, что свидетельствует о наличии у указанных препаратов кардиопротективного антиоксидантного эффекта.

5. Трехнедельное введение животным *per os* ингибиторов ДПП-4: саксаглиптина и, особенно, ситаглиптина, а также валдаглиптина, обеспечивает существенное повышение активности антиоксидантных факторов крови: супероксиддисмутазы и каталазы, а также содержания глутатиона. Это аргументирует рекомендацию по применению указанных ингибиторов ДПП-4 с целью снижения степени альтерации сердца как при сахарном диабете 2-го типа, так и при гипо- и реперфузии миокарда у них.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аметов А. С. Сахарный диабет 2 типа. Проблемы и решения. Т. 2 : учеб. пособие / А. С. Аметов. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2015. – 352 с. – ISBN 978-5-9704-3279-2.
2. Аметов А. С. Сахарный диабет 2 типа. Проблемы и решения. Т. 5 : учеб. пособие. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2016. – 288 с. – ISBN 978-5-9704-3624-0.
3. Дедов И. И. Осложнения сахарного диабета. Лечение и профилактика / И. И. Дедов, М. В. Шестакова. – Москва : МИА, 2017. – 744 с. – ISBN 978-5-9986-0300-6.
4. Дедов И. И. Сахарный диабет типа 1. Реалии и перспективы / И. И. Дедов, М. В. Шестакова. – Москва : МИА, 2016. – 504 с. – ISBN 978-5-9986-0245-0.
5. Дедов И. И. Сахарный диабет типа 2. От теории к практике / И. И. Дедов. – Москва : МИА, 2016. – 576 с. – ISBN 978-5-9986-0248-1.
6. Дедов И. И. Сахарный диабет. Многообразие клинических форм / И. И. Дедов, М. В. Шестакова. – Москва : МИА, 2016. – 224 с. – ISBN 978-5-9986-0250-4.
7. Дедов И. И. Сахарный диабет: диагностика, лечение, профилактика / И. И. Дедов, М. В. Шестакова. – Москва : МИА, 2011. – 808 с. – ISBN 978-5-9986-0061-6.
8. Дедов И. И. Эпидемиология сахарного диабета в Российской Федерации: клинико-статистический анализ по данным Федерального регистра сахарного диабета / И. И. Дедов, М. В. Шестакова, О. К. Викулова // Сахарный диабет. – 2017. – № 1. – С. 13–41.
9. Есина Е. Ю. Профилактика сердечно-сосудистых заболеваний на основе междисциплинарного подхода / Е. Ю. Есина, В. В. Лютов, В. Н. Цыган // Боткинские чтения Всероссийский терапевтический конгресс с международным участием. – Санкт-Петербург, 2019. – С. 90–91.

10. Зилов А. В. Школа фармаколога: сахарный диабет 2 типа / А. В. Зилов // Российские аптеки. – 2011. – № 5. – С. 30–35.
11. Мухамеджанов Э. К. Сахарный диабет 2 типа: новые стороны патогенеза заболевания / Э. К. Мухамеджанов, О. В. Есырев // Сахарный диабет. – 2013. – № 4. – С. 49–51.
12. Панова Е. И. Сахарный диабет 2 типа и прогностически неблагоприятные факторы / Е. И. Панова, К. Г. Корнева // Клиническая медицина. – 2010. – № 6. – С. 43–47.
13. Патофизиология. Клиническая патофизиология: учеб. в 2 т. Т. 1. Патофизиология / В. Н. Цыган, А. В. Дергунов, П. Ф. Литвицкий [и др.]. – Санкт-Петербург: ГЭОТАР-Медиа, 2018. – 624 с. – ISBN 978-5-9704-2201-4.
14. Сахарный диабет 2 типа и множественные хронические заболевания / Н. С. Асфандиярова, О. В. Дашкевич, Н. В. Дорошина [и др.] // Сахарный диабет. – 2018. – № 6. – С. 455–461.
15. Сахарный диабет в Российской Федерации: распространенность, заболеваемость, смертность, параметры углеводного обмена и структура сахароснижающей терапии по данным федерального регистра сахарного диабета, статус 2017 г. / И. И. Дедов, М. В. Шестакова, О. К. Викулова [и др.] // Сахарный диабет. – 2018. – № 3. – С. 144–159.
16. The advantages of normocalcemic continuous warm cardioplegia over low calcemic cardioplegia in myocardial protection / Y. Nakamura, N. Taremoto, H. Kuroda // Surgery Today. – 1999. – Vol. 29. – P. 884–889.
17. Цыган В. Н. Патофизиология обмена веществ : учеб. пособие / В. Н. Цыган. – Санкт-Петербург : СпецЛит, 2013. – 335 с. – ISBN 978-5-299-00565-3.
18. Шестакова М. В. Возможна ли длительная ремиссия или излечение сахарного 2-го типа в XXI веке? / М. В. Шестакова, И. А. Складник, И. И. Дедов // Терапевтический архив. – 2017. – № 10. – С. 4–11.

19. Шестакова М. В. Сахарный диабет типа 2: легко ли предупредить и можно ли вылечить? / М. В. Шестакова, О. Ю. Сухарева // *Consilium medicum*. – 2012. – № 12. – С. 5–9.
20. A new rat model of type 2 diabetes: The fat-fed, streptozotocin-treated rat / M. J. Reed, K. Meszaros, L. J. Entes [et al.] // *Metabolism*. – 2000. – Vol. 49. – P. 1390–1394.
21. A novel component of the metabolic syndrome: the oxidative stress / E. Hopps, D. Noto, G. Caimi [et al.] // *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*. – 2010. – Vol. 20 (1). – P. 72–7.
22. A redox-based mechanism for cardioprotection induced by ischemic preconditioning in perfused rat heart / W. Chen, S. Gabel, C. Steenbergen [et al.] // *Circulation Research*. – 1995. – Vol. 77 (2). – P. 424–429.
23. A systematic assessment of cardiovascular outcomes in the saxagliptin drug development program for type 2 diabetes / R. Frederich, J. H. Alexander, F. T. Fiedorek [et al.] // *Postgraduate medicine*. – 2010. – Vol. 122(3). – P. 16–27.
24. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus / K. Nowotny, T. Jung, A. Höhn [et al.] // *Biomolecules*. – 2015. – Vol. 5 (1). – P. 194–222.
25. Aebi H. Catalase in vitro / H. Aebi // *Methods in Enzymology*. – 1984. – Vol. 105. – P. 121–126.
26. Ahrén B. Vildagliptin: an inhibitor of dipeptidyl peptidase-4 with antidiabetic properties / B. Ahrén // *Expert opinion on investigational drugs*. – 2006. – Vol. 15 (4). – P. 431–442.
27. Analysis of nitrate, nitrite and [15 N] nitrate in biological fluids / L. C. Green, D. A. Wagner, J. Glogowski [et al.] // *Analytical Biochemistry*. – 1982. – Vol. 26. – P. 131–138.
28. Asmat U. Diabetes mellitus and oxidative stress-A concise review / U. Asmat, K. Abad, K. Ismail // *Saudi Pharmaceutical Journal*. – 2016. – Vol. 24 (5). – P. 547–553.

29. Association between echocardiographic structural parameters and body weight in Wistar rats / S. A. Oliveira-Junior, P. F. Martinez [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8 (16). – P. 26100–26105.
30. Auclair C. Nitroblue tetrazolium reduction / C. Auclair, E. Voisin // *Handbook of methods for oxygen radical research* / R. A. Greenvald. – Boca Raton : CRC Press, 1985. – P 123–132. – ISBN 978-13-158-9382-2
31. Avogaro A. Dipeptidyl-peptidase 4 inhibition: linking metabolic control to cardiovascular protection / A. Avogaro, S. de Kreutzenberg, G. Fadini // *Current Pharmaceutical Design*. – 2014. – Vol. 20 (14). – P. 2387–2394.
32. Baines C. P. The mitochondrial permeability transition pore and ischemia-reperfusion injury / C. P. Baines // *Basic research in cardiology*. – 2009. – Vol. 104 (2). – P. 181–188.
33. Baines C. P. The molecular composition of the mitochondrial permeability transition pore / C. P. Baines // *Journal of molecular and cellular cardiology*. – 2009. – Vol. 46 (6). – P. 850–857.
34. Beutler E. Improved method for the determination of blood. Glutathione / E. Beutler, O. Duron, B. M. Kelly // *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. – 1963. – Vol. 61. – P. 882–888.
35. Beutler E. Superoxide dismutase // *Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods* / E. Beutler. – Orlando : Grune & Stratton, 1984. – P. 83–85. – ISBN 0808908618.
36. Bollon A. P. Recombinant DNA products: Insulin, interferon and growth hormone / A. P. Bollon. – Boca Raton : CRC Press, 2017. – ISBN 978-13-510762-58.
37. Brand M. D. Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling / M. D. Brand // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2016. – Vol. 100. – P. 14–31.
38. Brondum E. Functional abnormalities in isolated arteries from Goto-Kakizaki and streptozotocin-treated diabetic rat models / E. Brondum, H. Nilsson, C. Aalkjaer // *Hormone and Metabolic Research*. – 2005. – Vol. 37. – P. 56–60.

39. Carden D. L. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury / D. L. Carden, D. N. Granger // *The Journal of pathology*. – 2000. – Vol. 190 (3). – P. 255–266.
40. Cardioprotective effect of dipeptidyl peptidase-4 inhibitor during ischemia–reperfusion injury / K. Chinda, S. Palee, S. Surinkaew // *International journal of cardiology*. – 2013. – Vol. 167 (2). – P. 451–457.
41. Cell biology of ischemia/reperfusion injury / T. Kalogeris, C. P. Baines, M. Krenz [et al.] // *International review of cell and molecular biology*. – 2012. – Vol. 298. – P. 229–317.
42. Chambers D. J. Cardioplegia and cardiac surgery: pharmacological arrest and cardioprotection during global ischemia and reperfusion / D. J. Chambers, H. B. Fallouh // *Pharmacology & Therapeutics*. – 2010. – Vol. 127 (1). – P. 41–52.
43. Chong Y. S. Myocardial protection during prolonged ischaemic cardiac arrest: experimental evaluation of three crystalloid cardioplegic solutions / Y. S. Chong, D. S. Cottier, J. B. Gavin // *The Journal of Cardiovascular Surgery*. – 1994. – Vol. 35 (1). – P. 35–44.
44. Chong Y. S. Protective effects of oxygenated St. Thomas' Hospital cardioplegic solution during ischaemic cardiac arrest: improved function, metabolism and ultrastructure / Y. S. Chong, D. S. Cottier, S. G. Edgar // *The Journal of Cardiovascular Surgery*. – 1993. – Vol. 34 (5). – P. 423–433.
45. Classification and diagnosis of diabetes / American Diabetes Association // *Diabetes care*. – 2017. – Vol. 40 (1). – P. 11–24.
46. Collard C. D. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury / C. D. Collard, S. Gelman // *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*. – 2001. – Vol. 94 (6). – P. 1133–1138.
47. Combination of Sitagliptin and Insulin against Type 2 Diabetes Mellitus with Neuropathy in Rats: Neuroprotection and Role of Oxidative and Inflammation Stress / M. E. Kelany, T. M. Hakami, A. H. Omar [et al.] // *Pharmacology*. – 2016. – Vol. 98 (5–6). – P. 242–250.

48. Combination of Vildagliptin and Pioglitazone in Experimental Type 2 Diabetes in Male Rats / R. Refaat, A. Sakr, M. Salama [et al.] // *Drug Development Research*. – 2016. – Vol. 77 (6). – P. 300–309.
49. Cooley D. A. Ischemic myocardial contracture ("stone heart"). A complication of cardiac surgery / D. A. Cooley, GJ. Jr. Reul, D. C. Wukasch // *Israel journal of medical sciences*. – 1975. – Vol. 11. – P. 203–210.
50. Croall D. E. The calpains: modular designs and functional diversity / D. E. Croall, K. Ersfeld // *Genome biology*. – 2007. – Vol. 8 (6). – P. 218.
51. Deacon C. F. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in the treatment of type 2 diabetes: a comparative review / C. F. Deacon // *Diabetes, Obesity and Metabolism*. – 2011. – Vol. 13. – P. 7–18.
52. Deacon C. F. Dipeptidyl peptidase- 4 inhibitors in the treatment of type 2 diabetes: a comparative review / C. F. Deacon // *Diabetes, Obesity and Metabolism*. – 2011. – Vol. 13 (1). – P. 7–18.
53. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus / A. Petersmann, M. Nauck, D. Müller-Wieland [et al.] // *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*. – 2018. – Vol. 126 (07). – P. 406–410.
54. Demuth H. U. Type 2 diabetes-therapy with dipeptidyl peptidase IV inhibitors / H. U. Demuth, C. H. McIntosh, R. A. Pederson // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics*. – 2005. – Vol. 1751 (1). – P. 33–44.
55. 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. – Vol. 1822 (4). – P. 537–545.
56. Di Bonito P. Diastolic dysfunction in patients with non insulin dependent diabetes mellitus of short duration / P. Di Bonito, S. Cuomo, N. Moio // *Diabet Med*. – 1996. – Vol. 13. – P. 321–324.

57. Di Lisa F. Mitochondria and ischemia-reperfusion injury of the heart: fixing a hole / F. Di Lisa, P. Bernardi // *Cardiovascular research*. – 2006. – Vol. 70 (2). – P. 191–199.

58. Diabetes Dyslipidemia / J. D. Schofield, Y. Liu, P. Rao-Balakrishna [et al.] // *Diabetes Therapy*. – 2016. – Vol. 7 (2). – P. 203–219.

59. Diabetes, other risk factors, and 12 year cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial / J. Slamler, O. Vaccaro, J. D. Neaton [et al.] // *Diabetes Care*. – 1993. – Vol. 16. – P. 434–444.

60. Different effects of specific phosphodiesterase inhibitors on oxidative stress during coronary autoregulation in isolated rat heart / V. Lj. Jakovljević, V. M. Mujović, S. S. Novokmet [et al.] // *Advances in Recent Cardiovascular Research* / A. Varro, A. Vegh [et al.]. – Bologna : Monduzzi Editore, 2002. – P. 101–106.

61. 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. – Vol. 47 (1). – P. 68–73.

62. Dipeptidyl peptidase IV inhibitors: how do they work as new antidiabetic agents? // C. H. McIntosh, H. U. Demuth, J. A. Pospisilik [et al.] // *Regulatory peptides*. – 2005. – Vol. 128 (2). – P. 159–165.

63. Dipeptidyl peptidase-4 inhibition in patients with type 2 diabetes treated with saxagliptin, sitagliptin, or vildagliptin / D. A. Tatosian, Y. Guo, A. K. Schaeffer [et al.] // *Diabetes Therapy*. – 2013. – Vol. 4 (2). – P. 431–442.

64. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor reduces infarct size and preserves cardiac function via mitochondrial protection in ischaemia–reperfusion rat heart / K. Chinda, J. Sanit, S. Chattipakorn, N. Chattipakorn // *Diabetes and Vascular Disease Research*. – 2014. – Vol. 11 (2). – P. 75–83.

65. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and GLP-1 reduce myocardial infarct size in a glucose-dependent manner / D. J. Hausenloy, H. J. Whittington, A. M. Wynne [et al.] // *Cardiovascular diabetology*. – 2013. – Vol. 12 (1). – P. 154.

66. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and GLP-1 reduce myocardial infarct size in a glucose-dependent manner / D. J. Hausenloy, H. J. Whittington, A. M. Wynne [et al.] // *Cardiovasc Diabetology*. – 2013. – Vol. 12. – P. 154.

67. Downey J. M. Signaling pathways in ischemic preconditioning / J. M. Downey, A. M. Davis, M. V. Cohen // *Heart failure reviews*. – 2007. – Vol. 12 (3–4). – P. 181–188.

68. Drucker D. J. Enhancing incretin action for the treatment of type 2 diabetes / D. J. Drucker // *Diabetes care*. – 2003. – Vol. 26 (10). – P. 2929–2940.

69. Duvnjak L. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors improve arterial stiffness, blood pressure, lipid profile and inflammation parameters in patients with type 2 diabetes mellitus / L. Duvnjak, K. Blaslov // *Diabetology & Metabolic Syndrome*. – 2016. – Vol. 22. – P. 8–26.

70. Echocardiographic assessment of cardiac structure and function in rats / L. Brown, A. Fenning, V. Chan [et al.] // *Heart, lung and Circulation*. – 2002. – Vol. 11 (3). – P. 167–173.

71. Effect of dipeptidyl peptidase 4 inhibition on arterial blood pressure is context dependent / E. K. Jackson, Z. Mi, S. P. Tofovic [et al.] // *Hypertension*. – 2015. – Vol. 65 (1). – P. 238–249.

72. Effects of circuit miniaturization in reducing inflammatory response to infant cardiopulmonary bypass by elimination of allogeneic blood products / E. Hickey, T. Karamlou, J. You [et al.] // *The Annals of Thoracic Surgery*. – 2006. – Vol. 81 (6). – P. S2367–S2372.

73. Effects of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors on beta-cell function and insulin resistance in type 2 diabetes: meta-analysis of randomized controlled trials / X. Lyu, X. Zhu, B. Zhao [et al.] // *Scientific Reports*. – 2017. – March, 21. – Vol. 7. – P. 44865.

74. Effects on lipid profile of dipeptidyl peptidase 4 inhibitors, pioglitazone, acarbose, and sulfonylureas: meta-analysis of placebo-controlled trials / M. Monami, V. Vitale, M. L. Ambrosio [et al.] // *Advances in Therapy*. – 2012. – Vol. 29 (9). – P. 736–746.

75. El-Kashef D. H. Sitagliptin ameliorates thioacetamide-induced acute liver injury via modulating TLR4/NF-KB signaling pathway in mice / D. H. El-Kashef, M. S. Serrya // *Life Sciences*. – 2019. – Vol. 228. – P. 266–273.

76. Enhanced myocardial protection in cardiac donation after circulatory death using Intralipid(®) postconditioning in a porcine model / E. Lucchinetti, P. H. Lou, S. Hatami [et al.] // *The Canadian Journal of Anesthesia*. – 2019. – Vol. 66 (6). – P. 672–685.

77. Evaluation of pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters following single dose of sitagliptin in healthy Indian males / G. V. Sangle, M. Patil, N. J. Deshmukh [et al.] // *European journal of clinical pharmacology*. – 2018. – Vol. 74 (5). – P. 561–569.

78. Frasier C. R. Exercise-induced cardiac preconditioning: how exercise protects your achy-breaky heart / C. R. Frasier, R. L. Moore, D. A. Brown // *Journal of Applied Physiology*. – 2011. – Vol. 111 (3). – P. 905–915.

79. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease / M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol [et al.] // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. – 2007. – Vol. 39 (1). – P. 44–84.

80. Free radicals and cardioplegia: organic anti-oxidants as additives to the St Thomas' Hospital cardioplegic solution / D. J. Chambers, G. Astras, A. Takahashi [et al.] // *Cardiovascular Research*. – 1989. – Vol. 23 (4). – P. 351–358.

81. Ganote C. E. Adenosine and preconditioning in the rat heart / C. E. Ganote, S. C. Armstrong // *Cardiovascular research*. – 2000. – Vol. 45 (1). – P. 134–140.

82. Glucose patterns during an oral glucose tolerance test and associations with future diabetes, cardiovascular disease and all-cause mortality rate / A. Hulman, D. Vistisen, C. Glümer [et al.] // *Diabetologia*. – 2018. – Vol. 61 (1). – P. 101–107.

83. Green B. D. Dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) inhibitors: a newly emerging drug class for the treatment of type 2 diabetes / B. D. Green, P. R. Flatt,

C. J. Bailey // Diabetes and vascular disease research. – 2006. – Vol. 3 (3). – P. 159–165.

84. Grundy S. M. Metabolic syndrome update / S. M. Grundy // Trends in cardiovascular medicine. – 2016. – Vol. 26 (4). – P. 364–373.

85. Gupta V. Choosing a gliptin / V. Gupta, S. Kalra // Indian Journal of Endocrinology and Metabolism. – 2011. – Vol. 15. – P. 298–308.

86. Guyton A. C. Textbook of Medical Physiology / A. C. Guyton, E. John. – 11th ed. – Philadelphia : Elsevier Inc., 2006. – ISBN 978-14-5577-005-2.

87. Hamanaka R. B. Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes / R. B. Hamanaka, N. S. Chandel // Trends in Biochemical Sciences. – 2010. – Vol. 35 (9). – P. 505–513.

88. Hausenloy D. J. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target / D. J. Hausenloy, D. M. Yellon // The Journal of clinical investigation. – 2013. – Vol. 123 (1). – P. 92–100.

89. Hausenloy D. J. Survival kinases in ischemic preconditioning and postconditioning / D. J. Hausenloy, D. M. Yellon // Cardiovascular research. – 2006. – Vol. 70 (2). – P. 240–253.

90. Headrick J. P. Adenosine receptors and reperfusion injury of the heart / J. P. Headrick, R. D. Lasley // Adenosine Receptors in Health and Disease. – 2009. – P. 189–214.

91. Helal M. G. Nephroprotective effect of saxagliptin against gentamicin-induced nephrotoxicity, emphasis on anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-apoptic effects / M. G. Helal, M. M. Zaki, E. Said // Life Sciences. – 2018. – Vol. 208. – P. 64–71.

92. Hollander P. A. Type 2 diabetes comorbidities and treatment challenges: rationale for DPP-4 inhibitors / P. A. Hollander, P. Kushner // Postgraduate medicine. – 2010. – Vol. 122 (3). – P. 71–80.

93. Hutchins G. M. Pathology of the stone heart syndrome. Massive myocardial contraction band necrosis and widely patent coronary arteries / G. M.

Hutchins, K. J. Silverman // *The American Journal of Pathology*. – 1979. – Vol. 95 (3). – P. 745–752.

94. Hyperbaric oxygen protects against myocardial reperfusion injury via the inhibition of inflammation and the modulation of autophagy / C. Chen, W. Chen, Y. Li [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8 (67). – P. 111522–111534.

95. Hyperkalaemia: a complication of warm heart surgery / Y. J. Kao, T. Mian, S. Kleinman [et al.] // *The Canadian Journal of Anesthesia*. – 1993. – Vol. 40 (1). – P. 67–70.

96. Hypertonic saline solution for modifying tissue ischemia/reperfusion injury: Porcine aortic occlusion model / B. Escobar, O. A. Guevara-Cruz, J. R. Navarro-Vargas [et al.] // *Colombian Journal of Anaesthesiology*. – 2017. – Vol. 45 (4). – P. 280–290.

97. Impairment of glutathione metabolism in erythrocytes from patients with diabetes mellitus / K. Murakami, T. Kondo, Y. Ohtsuka [et al.] // *Metabolism*. – 1989. – Vol. 38 (8). – P. 753–758.

98. 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. – Vol. 39 (1). – P. 148–156.

99. Incretin-based therapies for diabetic complications: basic mechanisms and clinical evidence / D. Kawanami, K. Matoba, K. Sango [et al.] // *International journal of molecular sciences*. – 2016. – Vol. 17 (8). – P. 1223.

100. Inhibition of Dipeptidyl Peptidase-4 Impairs Ventricular Function and Promotes Cardiac Fibrosis in High Fat-Fed Diabetic Mice / E. E. Mulvihill, E. M. Varin, J. R. Ussher [et al.] // *Diabetes*. – 2016. – Vol. 65 (3). – P. 742–754.

101. Involvement of adenosine and standardization of aqueous extract of garlic (*Allium sativum* Linn.) on cardioprotective and cardiodepressant properties in ischemic preconditioning and myocardial ischemia-reperfusion induced cardiac injury / A. K. Sharma, A. Munajjam, B. Vaishnav [et al.] // *Journal of biomedical research*. – 2012. – Vol. 26 (1). – P. 24–36.

102. Is blood cardioplegia superior to crystalloid cardioplegia? / S. Jacob, A. Kallikourdis, F. Sellke [et al.] // *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery*. – 2008. – Vol. 7 (3). – P. 491–498.
103. Is blood superior to crystalloid cardioplegia? A meta-analysis of randomized clinical trials / V. Guru, J. Omura, A. A. Alghamdi [et al.] // *Circulation*. – 2006. – Vol. 114 (1). – P. I331– I338.
104. Ischemic myocardial contraction ("stone heart"): prevention by induced hypothermia and propranolol / GJ. Jr. Reul, D. C. Wukasch, A. Romagnoli [et al.] // *The Journal of Cardiovascular Surgery*. – 1973. – Vol. 5. – P. 740–744.
105. Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion / D. Hausenloy, A. Tsang, M. Mocanu [et al.] // *American Journal of Physiology*. – 2005. – P. H971–H976.
106. K⁺ATP channel activation induces ischemic preconditioning of the endothelium in humans in vivo / M. W. Broadhead, R. K. Kharbanda, M. J. Peters [et al.] // *Circulation*. – 2004. – Vol. 110 (15). – P. 2077–2082.
107. Kerner W. Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. / W. Kerner, J. Brückel // *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*. – 2014. – Vol. 122 (07). – P. 384–386.
108. 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. – Vol. 236 (6). – P. 736–745.
109. Kilgore K. S. Reperfusion injury after myocardial infarction: the role of free radicals and the inflammatory response / K. S. Kilgore, B. R. Lucchesi // *Clinical Biochemistry*. – 1993. – Vol. 26 (5). – P. 359–370.
110. Kostić M. M. Role of nitric oxide (NO) in the regulation of coronary circulation / M. M. Kostić, M. R. Petronijević, V. L. Jakovljević // *Physiological Research*. – 1996. – Vol. 45 (4). – P. 273–278.

111. Kwong J. Q. Physiological and pathological roles of the mitochondrial permeability transition pore in the heart / J. Q. Kwong, J. D. Molkenstin // *Cell Metab.* – 2015. – Vol. 21. – P. 206–214.
112. Lauster C. D. Vildagliptin: a novel oral therapy for type 2 diabetes mellitus / C. D. Lauster, T. P. McKaveney, S. V. Muench // *American journal of health-system pharmacy.* – 2007. – Vol. 64 (12). – P. 1265–1273.
113. Leng S. H. Therapeutic effects of berberine in impaired glucose tolerance rats and its influence on insulin secretion / S. H. Leng, F. E. Lu, L. J. Xu // *Acta Pharmacologica Sinica.* – 2004. – Vol. 25 (4). – P. 496–502.
114. 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. – Vol. 263 (4). – P. H1107–H1112.
115. Long-term resveratrol administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in obese Zucker rats / L. Rivera, R. Morón, A. Zarzuelo // *Biochemical pharmacology.* – 2009. – Vol. 77 (6). – P. 1053–1063.
116. Luteolin limits infarct size and improves cardiac function after myocardium ischemia/reperfusion injury in diabetic rats / D. Sun, J. Huang, Z. Zhang [et al.] // *PloS One.* – 2012. – Vol. 7 (3). – P. e33491.
117. Martin C. L. Pinacidil opens ATP-dependent K⁺ channels in cardiac myocytes in an ATP- and temperaturedependent manner / C. L. Martin, K. Chinn // *Journal of Cardiovascular Pharmacology.* – 1990. – Vol. 15 (3). – P. 510–514.
118. Maruyama Y. Myocardial protection: efficacy of a novel magnesium-based cardioplegia (RS-C) compared to St Thomas' Hospital cardioplegic solution / Y. Maruyama, D. J. Chambers // *Interactive Cardio Vascular and Thoracic Surgery.* – 2008. – Vol. 7(5). – P. 745–749.
119. Meigs I. B. Metabolic control and prevalent cardiovascular disease in non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM): The NIDDM patient

outcomes research team / I. B. Meigs, D. E. Singer, L. M. Sullivan // *The American Journal of Medicine*. – 1997. – Vol. 102. – P. 38–47.

120. Metabolism and excretion of the dipeptidyl peptidase 4 inhibitor [14C] sitagliptin in humans / S. H. Vincent, J. R. Reed, A. J. Bergman [et al.] // *Drug metabolism and disposition*. – 2007. – Vol. 35 (4). – P. 533–538.

121. Mitochondrial uncoupling, with low concentration FCCP, induces ROS-dependent cardioprotection independent of KATP channel activation / J. P. Brennan, R. Southworth, R. A. Medina [et al.] // *Cardiovascular Research*. – 2006. – Vol. 72 (2). – P. 313–321.

122. 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. – Vol. 74 (5). – P. 1124–1136.

123. Myocardial protection against global ischemia with Krebs-Henseleit buffer-based cardioplegic solution / S. M. Minasian, M. M. Galagudza, Y. V. Dmitriev [et al.] // *Journal of Cardiothoracic Surgery*. – 2013. – Vol. 8. – P. 60.

124. Myocardial protection in adult cardiac surgery: current options and future challenges / F. Nicolini, C. Beghi, C. Muscari [et al.] // *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. – 2003. – Vol. 24 (6). – P. 986–993.

125. Myocardial protection in the acutely injured heart: hyperpolarizing versus depolarizing hypothermic cardioplegia / J. S. Lawton, P. W. Hsia, C. T. Allen [et al.] // *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. – 1997. – Vol. 113 (3). – P. 567–575.

126. Negishi K. Echocardiographic feature of diabetic cardiomyopathy: where are we now? / K. Negishi // *Cardiovascular Diagnosis and Therapy*. – 2018. – Vol. 8 (1). – P. 47–56.

127. Neumiller J. J. Dipeptidyl peptidase- 4 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes mellitus / J. J. Neumiller, L. Wood, R. K. Campbell // *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. – 2010. – Vol. 30 (5). – P. 463–484.

128. Nicholson C. K. Hydrogen sulfide and ischemia-reperfusion injury / C. K. Nicholson, J. W. Calvert // Pharmacological research. – 2010. – Vol. 62 (4). – P. 289–297.
129. Not all neonatal hearts are equally protected from ischemic damage during hypothermia / C. Wittnich, A. Maitland, W. Vincente [et al.] // The Annals of Thoracic Surgery. – 1991. – Vol. 52. – P. 1000–1004.
130. O'Donnell C. J. Genomics of cardiovascular disease / C. J. O'Donnell, E. G. Nabel // New England Journal of Medicine. – 2011. – Vol. 365 (22). – P. 2098–2109.
131. Ohkawa H. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction / H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi // Analytical Biochemistry. – 1979. – Vol. 95. – P. 351–358.
132. Oxidative stress and neutrophil activation – the two keystones of ischemia/reperfusion injury / K. A. Kaminski, T. A. Bonda, J. Korecki [et al.] // International journal of cardiology. – 2002. – Vol. 86 (1). – P. 41–59.
133. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus / E. Cersosimo, C. Triplitt, C. Solis-Herrera [et al.] // InEndotext. – 2018. – URL: <https://bit.ly/2kKdPqM> (date of access: 10.09.2019).
134. Pei Z. From the bench to the bedside: dipeptidyl peptidase IV inhibitors, a new class of oral antihyperglycemic agents / Z. Pei // Current opinion in drug discovery & development. – 2008. – Vol. 11 (4). – P. 512–532.
135. Peters J. U. 11 years of cyanopyrrolidines as DPP-IV inhibitors / J. U. Peters // Current topics in medicinal chemistry. – 2007. – Vol. 7 (6). – P. 579–595.
136. Pharmacokinetic, pharmacodynamic and clinical evaluation of saxagliptin in type 2 diabetes / f, J. Hayes, J. W. Stephens [et al.] // Expert opinion on drug metabolism & toxicology. – 2016. – Vol. 12 (4). – P. 467–473.
137. Pick E. A simple colorimetric method for the measurment of hydrogen peroxide produced by cells in culture / E. Pick, Y. Keisari // Journal of Immunological Methods. – 1980. – Vol. 38. – P. 161–170.

138. Piero M. N. Diabetes mellitus-a devastating metabolic disorder / M. N. Piero, G. M. Nzaro, J. M. Njagi // Asian journal of biomedical and pharmaceutical sciences. – 2015. – Vol. 5 (40). – P. 1.
139. Piper H. M. Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury / H. M. Piper, K. Meuter, C. Schäfer // The Annals of Thoracic Surgery. – 2003. – Vol. 75. – P. S644–S648.
140. Potassium channel openers act through an activation of ATP-sensitive K⁺ channels in guinea-pig cardiac myocytes / D. Escande, D. Thuringer, S. Le Guern [et al.] // Pflügers Archiv: European Journal of Physiology. – 1989. – Vol. 414 (6). – P. 669–675.
141. Protecting the aged heart during cardiac surgery: the potential benefits of del Nido cardioplegia / S. B. O'Blenes, C. H. Friesen, A. Ali [et al.] // The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. – 2011. – Vol. 141 (3). – P. 762–770.
142. Protective effects of sitagliptin on myocardial injury and cardiac function in an ischemia/reperfusion rat model / G. Chang, P. Zhang, L. Ye [et al.] // European journal of pharmacology. – 2013. – Vol. 718 (1–3). – P. 105–113.
143. Perez-Matute P. Reactive species and diabetes: counteracting oxidative stress to improve health / P. Perez-Matute, M. A. Zulet, J. A. Martínez // Current Opinion in Pharmacology. – 2009. – Vol. 9 (6). – P. 771–779.
144. 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. – Vol. 41 (2). – P. 256–264.
145. Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes / T. L. Vanden Hoek, L. B. Becker, Z. Shao [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 1998. – Vol. 273 (29). – P. 18092–18098.

146. Reffellmann T. The no-reflow phenomenon: a basic mechanism of myocardial ischemia and reperfusion / T. Reffellmann, R. A. Kloner // Basic research in cardiology. – 2006. – Vol. 101 (5). – 359–372.
147. Robinson L. A. Enhanced myocardial protection with high-energy phosphates in St. Thomas' Hospital cardioplegic solution. Synergism of adenosine triphosphate and creatine phosphate / L. A. Robinson, M. V. Braimbridge, D. J. Hearse // The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. – 1987. – Vol. 93 (3). – P. 415–427.
148. Robinson L. A. Lowering the calcium concentration in St. Thomas' Hospital cardioplegic solution improves protection during hypothermic ischemia / L. A. Robinson, D. L. Harwood // The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. – 1991. – Vol. 101 (2). – P. 314–325.
149. 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. – Vol. 301 (5). – P. H1723– H1741.
150. Schalkwijk C. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction / C. Schalkwijk // Clinical science. – 2005. – Vol. 109 (2). – P. 143–159.
151. Scheen A. J. Dipeptidylpeptidase-4 inhibitors (gliptins) / A. J. Scheen // Clinical pharmacokinetics. – 2010. – Vol. 49 (9). – P. 573–588.
152. Sherif I. O. Vildagliptin Attenuates Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury via the TLR4/NF- κ B Signaling Pathway / I. O. Sherif, N. H. Al-Shaalan. – DOI 10.1155/2018/3509091 // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2018. – URL: <https://bit.ly/2mclQ89> (date of access: 10.09.2019)
153. "Stone heart" in a neonate / J. C. Opie, G. Taylor, P. G. Ashmore [et al.] // The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. – 1981. – Vol. 81 (3). – P. 459–463.

154. Summary report from the consensus development conference on diagnosis of coronary heart disease in people with diabetes / American College of Cardiology and American Diabetes Association // *Diabetes Care*. – 1998. – 1. – P. 21–36.
155. The Aachen MiniHLM – a miniaturized heart-lung machine for neonates with an integrated rotary blood pump / J. Arens, H. Schnoering, M. Pfennig [et al.] // *Artif Organs*. – 2010. – Vol. 34 (9). – P. 707–713.
156. The dipeptidylpeptidase- IV inhibitors sitagliptin, vildagliptin and saxagliptin do not impair innate and adaptive immune responses / D. Anz, S. Kruger, S. Haubner [et al.] // *Diabetes, Obesity and Metabolism*. – 2014. – Vol. 16 (6). – P. 569–572.
157. The mechanism of Intralipid®-mediated cardioprotection complex IV inhibition by the active metabolite, palmitoylcarnitine, generates reactive oxygen species and activates reperfusion injury salvage kinases / P. H. Lou, E. Lucchinetti, L. Zhang [et al.] // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9(1). – P. e87205.
158. The protective effect of St. Thomas cardioplegia enriched with zacopride on the isolated rat heart / B. Wu, C. Long, F. Hei [et al.] // *Artificial Organs*. – 2013. – Vol. 37 (1). – P. E44–E50.
159. The stone heart. Development of a canine model, with ultrastructural survey and metabolic manipulation / R. G. Armstrong, W. Stanford, R. E. Cline [et al.] // *The Annals of Thoracic Surgery*. – 1973. – Vol. 16. – P. 480–491.
160. Therapeutic effect of saxagliptin in rat models of nonalcoholic fatty liver and type 2 diabetes / Y. Liu, Z. Zhang, R. Chen [et al.] // *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. – 2014. – Vol. 34 (6). – P. 862–868.
161. Thornberry N. A. Mechanism of action of inhibitors of dipeptidylpeptidase-4 (DPP-4) / N. A. Thornberry, B. Gallwitz // *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. – 2009. – Vol. 23 (4). – P. 479–486.
162. Three-year outcomes of bariatric surgery vs lifestyle intervention for type 2 diabetes mellitus treatment: a randomized clinical trial / A. P.

Courcoulas, S. H. Belle, R. H. Neiberg [et al.] // JAMA Surgery. – 2015. – Vol. 150 (10). – P. 931–940.

163. Toyokuni S. Reactive oxygen species- induced molecular damage and its application in pathology / S. Toyokuni // Pathology international. – 1999. – Vol. 49 (2). – P. 91–102.

164. Van der Veken P. Prolyl peptidases related to dipeptidyl peptidase IV: potential of specific inhibitors in drug discovery / P. Van der Veken, A. Haemers, K. Augustyns // Current topics in medicinal chemistry. – 2007. – Vol. 7 (6). – P. 621–635.

165. 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. – Vol. 40 (3). – 405–411.

166. Warm versus cold cardioplegia for heart surgery: a meta-analysis / Y. Fan, A. M. Zhang, Y. B. Xiao [et al.] // European Journal of Cardio-Thoracic Surgery. – 2010. – Vol. 37 (4). – P. 912–919.

167. 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. – Vol. 17 (2). – P. RA44.

168. Wiedeman P. E. DPP-IV Inhibition: Promising Therapy for the Treatment of Type 2 Diabetes / P. E. Wiedeman // Progress in medicinal chemistry. – 2007. – Vol. 45. – P. 63–109.

169. Woods K. L. Diabetes mellitus as a risk factor for acute myocardial infarction in Asians and Europeans / K. L. Woods, A. Samanta, A. C. Burden // British Heart Journal. – 1989. – Vol. 62 (2). – P. 118–122.

170. 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 // *British Journal of Anaesthesia*. – 2016. – Vol. 117 (2). – P. 44–62.

171. Yellon D. M. Myocardial reperfusion injury / D. M. Yellon, D. J. Hausenloy // *New England Journal of Medicine*. – 2007. – Vol. 357 (11). – P. 1121–1135.

172. Zaccardi F. Pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus: a 90-year perspective / F. Zaccardi, D. R. Webb, T. Yates [et al.] // *Postgraduate medical journal*. – 2016. – Vol. 92 (1084). – P. 63–69.

173. Zettl H. Medicinal Chemistry of Incretin Mimetics and DPP- 4 Inhibitors / H. Zettl, M. Schubert- Zsilavec, D. Steinhilber // *ChemMedChem: Chemistry Enabling Drug Discovery*. – 2010. – Vol. 5 (2). – P. 179–185.

174. Zheng Y. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications / Y. Zheng, S. H. Ley, F. B. Hu // *Nature Reviews Endocrinology*. – 2018. – Vol. 14 (2). – P. 88–98.

175. Zhong J. Dipeptidyl peptidase-4 inhibition: insights from the bench and recent clinical studies / J. Zhong, S. Kankanala, S. Rajagopalan // *Current Opinion in Lipidology*. – 2016. – Vol. 27 (5). – P. 484–492.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АД – артериальное давление

АФК – активные формы кислорода

ГИП – глюкозозависимый инсулиотропный полипептид

ГЛП-1 – глюкагоноподобный белок 1

ГПК – глюкоза плазмы крови

ГПП-1 – глюкагоноподобный пептид 1

ДПП-4 – дипептидилпептидаза 4

ИБС – ишемическая болезнь сердца

КП - коронарный поток (проток)

КХ – раствор Кребса-Хенселяйта

ЛЖ – левый желудочек

НСТ – нитросиний тетразолий

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ПТНГ – пероральный тест на нагрузку глюкозой

СД – сахарный диабет

СД2 – сахарный диабет 2-го типа

СОД – супероксиддисмутаза

СФМ – сократительная функция миокарда

ТБК – тиобарбитуровая кислота

ЧСС - частота сердечных сокращений

DLVP -диастолическое давление в левом желудочке

dp/dtmax - максимальная скорость изменения давления в полости левого желудочка

dp/dtmin– минимальная скорость изменение давления в левом желудочке

FS - фракционное укорочение

GSH – восстановленный глутатион

HSS – 7,5% гипертонический раствор

H₂O₂ – перекись водорода

IVSd- толщина стенки межжелудочковой перегородки в конце диастолы

IVSs -толщина межжелудочковой перегородки в конце систолы

LVIDd- внутренний размер ЛЖ в конце диастолы

LVIDs- внутренний диаметр ЛЖ в конце систолы

LVPVd - толщина стенки ЛЖ в конце диастолы

LVPVs - толщина задней стенки ЛЖ в конце систолы

NO—оксид азота

NO₂ – нитрит

O₂^{-•} - супероксидный анион радикал

SLVP- систолическое давление в полости левого желудочке

STH2 –кардиоплегический раствор №2

TBARS – индекс перекисного окисления липидов