

Государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«Сибирский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

*На правах рукописи*

**Егорова Маргарита Владимировна**

**РОЛЬ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В АДАПТИВНЫХ РЕАКЦИЯХ  
КАРДИОМИОЦИТОВ ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ**

**03.03.01 - физиология**

**диссертация на соискание ученой степени**

**доктора биологических наук**

**Научный консультант:**

доктор медицинский наук, профессор,  
академик РАМН, заслуженный деятель науки РФ,

**Михаил Андреевич Медведев**

**Томск - 2014**

## Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Глава 1 ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ – ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ РЕГУЛЯТОРЫ МЕТАБОЛИЗМА МИОКАРДА В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ.....	11
1.1 Метаболизм жирных кислот в сердце: ключевые процессы.....	12
1.2 Особенности энергетического метаболизма сердца в норме и при недостаточном поступлении кислорода.....	17
1.3 Роль митохондрий в клеточных механизмах адаптации к гипоксии.....	27
1.4 Влияние свободных жирных кислот на функциональное состояние митохондрий сердца.....	34
1.5 Метаболизм жирных кислот в миокарде при ишемии и сердечной недостаточности .....	46
1.6 Метаболизм жирных кислот при ожирении и сахарном диабете.....	50
1.7 Липотоксичность сердца: спорные вопросы.....	54
1.8 Модуляция метаболизма жирных кислот как терапевтический подход: за и против.....	56
1.9 Заключение.....	63
Глава 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	
2.1 Создание экспериментальных моделей.....	65
2.2 Получение изолированных кардиомиоцитов.....	71
2.3 Получение изолированных митохондрий сердца.....	76
2.4 Определение белка методом Лоури.....	77
2.5 Полярографический метод определения поглощения кислорода.....	78
2.6 Ферментативный метод определение концентрации жирных кислот....	80
2.7 Глюкозооксидазный метод определения глюкозы в крови.....	82
2.8 Метод твердофазного иммуноферментного анализа.....	84
2.9 Морфологические методы исследование структуры миокарда.....	85
2.10 Статистические методы исследования.....	87

ДИЗАЙН ИССЛЕДОВАНИЯ.....	88
Глава 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	
3.1 Сравнительный анализ структурных изменений миокарда у модельных животных.....	89
3.2 Регуляторная роль свободных жирных кислот в поддержании мембранного гомеостаза клеток сердца при экспериментальной ишемии миокарда.....	103
3.2.1 Влияние свободных жирных кислот на скорость поглощения кислорода митохондриями сердца.....	104
3.2.2 Влияние свободных жирных кислот на скорость поглощения кислорода изолированными кардиомиоцитами.....	113
3.2.3 Механизмы разобщающего действия жирных кислот как адаптивная защита сердца.....	122
3.3 Оценка эффективности аэробного и анаэробного процессов энергообразования по активности ферментов в кардиомиоцитах.....	128
3.4 Сравнительный анализ изменений показателей стресс-реакции в организме животных из разных экспериментальных групп.....	136
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	144
ВЫВОДЫ.....	150
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	153
Список публикаций по теме диссертации.....	191
Список используемых сокращений.....	198
Список иллюстративного материала.....	201
Благодарности.....	204

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность исследования.** Одной из важнейших проблем современной физиологии является исследование функциональных возможностей миокарда в условиях постоянного или длительного воздействия стрессовых факторов и изучение малоизвестных механизмов повышения устойчивости миокарда к гипоксии, так как распространенность сердечно-сосудистых заболеваний, является общемировой проблемой. Соответственно, изучение и понимание особенностей процессов адаптации миокарда к гипоксии различной этиологии (циркуляторной, тканевой, гипоксии нагрузки и др.) является чрезвычайно важной задачей не только с позиции фундаментальных представлений о процессах адаптации, но и с точки зрения прикладного значения.

По современным представлениям, работу сердца определяет сбалансированность метаболизма жирных кислот [115, 162, 223]. Основной пул жирных кислот вовлечен преимущественно в энергетические процессы и поддержание мембранного гомеостаза кардиомиоцитов, способствуя, таким образом, нормальной электрофизиологической активности мембран и сохранению сократительной активности миокарда. Однако при чрезмерном поступлении свободных жирных кислот в клетку процессы их нормального окисления нарушаются, и жирные кислоты и/или их продукты становятся инициаторами блокирования окисления глюкозы, увеличения проницаемости плазматической и митохондриальной мембран, разобщения процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях кардиомиоцитов [64, 83, 115, 223].

Жирные кислоты, как сами по себе, так и посредством изменения структуры мембранных фосфолипидов, могут принимать непосредственное участие в коррекции метаболизма кардиомиоцитов, оказывая разнонаправленное действие, в зависимости от собственной концентрации и стадий адаптивного процесса [33, 113, 129, 179, 196]. Накопление триглицеридов в миокарде, изменение интенсивности окисления жирных кислот и энергетического метаболизма в

кардиомиоцитах в современной литературе рассматриваются как возможный механизм защиты миокарда от накопления вредных продуктов обмена [115, 119, 208, 251, 264, 302, 307, 322-325]. При этом необходимо отметить, что большинство известных данных о механизмах прямого действия насыщенных и ненасыщенных жирных кислот на митохондриальные процессы получено в экспериментах с митохондриями, выделенными из сердца интактных или геномодифицированных крыс и мышей.

Повышение содержания свободных жирных кислот в крови и увеличение их поступления в клетки миокарда может быть вызвано усилением липолиза в адипоцитах из-за стимулирующего действия стрессорных гормонов и/или уменьшения действия инсулина на жировую ткань, как это наблюдается при сахарном диабете (СД). Нарушение транспорта глюкозы, неспособность митохондрий окислить весь объём поступающих жирных кислот, накопление недоокисленных метаболитов жирных кислот – все это приводит к тому, что, последствия СД для сердечной мышцы даже в условиях её адекватного снабжения кислородом напоминают метаболические нарушения при тяжёлой форме ишемии миокарда [3, 64, 223]. Обобщающим звеном нарушения функциональной активности миокарда является развивающаяся тканевая гипоксия, а термином «метаболическая ишемия» миокарда стали обозначать комплекс изменений метаболизма кардиомиоцитов, вызванных (или осложненных) СД [3, 64].

Сходство метаболических нарушений в кардиомиоцитах вследствие увеличения циркулирующих свободных жирных кислот при самых разных патологических состояниях (ожирение, СД 1 и 2 типов, ИБС, ХСН) привела в свое время к идее о коррекции липидного обмена в этих условиях. Метаболическая терапия обогатилась целым рядом медикаментов (статины, фибраты, ингибиторы  $\beta$ -окисления жирных кислот и др.), воздействующих практически на все стадии метаболизма липидов. Однако, несмотря на высокий цитопротекторный эффект подобного рода препаратов, в современной литературе развернулась дискуссия о возможных или уже известных нежелательных последствиях вмешательства в

липидный метаболизм [141, 177, 209, 210, 217, 229, 232, 233, 239, 249, 309, 312 и др.]. Одной из причин негативных последствий при коррекции липидного метаболизма может быть вмешательство в формирование естественных компенсаторных метаболических реакций с участием жирных кислот при долгосрочной адаптации кардиомиоцитов к тканевой гипоксии, в том числе, в процессе развития ишемического и диабетического поражения миокарда. К тому же, при сопоставлении результатов многочисленных исследований метаболизма сердца пациентов с ИБС и диабетом и животных с экспериментально вызванным повреждением миокарда обнаружены противоречивые данные об изменении параметров энергетического обмена в кардиомиоцитах на разных сроках формирования ишемического и диабетического поражения миокарда и роли в этом процессе жирных кислот [223, обзор]. В экспериментальных исследованиях неоднократно наблюдалась парадоксально высокая ишемическая резистентность миокарда (*in vivo* и *in vitro*) у животных с небольшим сроком стрептозотоцин-индуцированного диабета [30, 121, 243]. Этот феномен может быть как следствием проявлением эффекта кросс-адаптации, так и особенностями регуляции метаболизма кардиомиоцитов в этих условиях.

В связи с вышесказанным является актуальной проблемой определение роли свободных жирных кислот как физиологических регуляторов компенсаторно-приспособительных изменений метаболизма миокарда в условиях хронической гипоксии.

**Цель настоящего исследования** – определение роли свободных жирных кислот в клеточных механизмах долгосрочной адаптации кардиомиоцитов крыс к тканевой гипоксии, вызванной ишемическим повреждением миокарда различной этиологии, в эксперименте.

В соответствии с поставленной целью был определён **комплекс задач**:

1. Модифицировать экспериментальную модель ишемического и диабетического повреждения миокарда *in vivo* для воспроизведения различных

вариантов прямого и опосредованного воздействия на метаболизм миокарда и их сочетания, на разных стадиях развития адаптивных реакций.

2. Изучить изменения морфологических параметров миокарда крыс при отдельных и сочетанных экспериментальных воздействиях в динамике развития адаптивных процессов.

3. Изучить изменения метаболических показателей стресс-реакции (гормонов, глюкозы, свободных жирных кислот) в сыворотке крови крыс в динамике развития адаптивных реакций при моделируемых состояниях.

4. Исследовать изменения кислородного запроса в миокарде экспериментальных животных по интенсивности дыхания изолированных кардиомиоцитов в динамике процессов адаптации, в отсутствие и в присутствии насыщенных и ненасыщенных жирных кислот.

5. Исследовать функциональное состояние митохондрий сердца экспериментальных животных по изменению скорости поглощения кислорода изолированными митохондриями в присутствии и отсутствии эндогенных и экзогенных модуляторов их функциональной активности, в динамике развития моделируемых состояний.

6. Установить взаимосвязь между изменениями рассматриваемых показателей и концентрацией свободных жирных кислот в кардиомиоцитах.

**Научная новизна.** Получены принципиально новые данные фундаментального характера о роли свободных жирных кислот в процессах адаптации кардиомиоцитов при хронической метаболической ишемии миокарда. Установлено, что насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты при хронической ишемии миокарда снижают кислородный запрос кардиомиоцитов и оказывают прямое ингибирующее влияние на процессы, приводящие к увеличению проницаемости митохондриальных мембран. Впервые проведено комплексное сравнительное исследование структурных и функциональных изменений миокарда и продемонстрированы их существенные различия при разнообразных временных модификациях сочетания прямого и опосредованного

воздействий на метаболизм миокарда. Впервые продемонстрирован эффект перекрестной адаптации при сочетании прямого и опосредованного повреждения миокарда на хронической стадии и показано кардинальное отличие в процессах адаптации при сочетании моделируемых состояний «инфаркт на фоне диабета» и «диабет на фоне инфаркта». Предложены и обоснованы механизмы участия свободных жирных кислот в приспособительных структурно-функциональных изменениях кардиомиоцитов при долгосрочной адаптации.

**Научно-практическая значимость.** Полученные в ходе исследования новые данные о роли свободных жирных кислот в формировании механизмов долговременной адаптации при сочетании стрессовых факторов имеют фундаментальное значение, дополняют и углубляют теоретические представления о механизмах адаптации и стресса. Практическую значимость имеют полученные сведения об изменении структурных и функционально-метаболических изменений миокарда при сочетании прямого и опосредованного повреждения сердца в динамике развития сочетанных состояний для определения направления и коррекции подходов к метаболической терапии комбинированных патологий. Предложенные модификации модели сочетанной патологии *in vivo* могут быть использованы для исследования и дифференцировки механизмов действия лекарственных препаратов при разных вариантах сочетания патологий. Предложенный комплексный анализ морфофункциональных показателей может стать основой для разработки метода диагностики эффективности адаптивных реакций миокарда на разных стадиях развития патологий сердца.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. В динамике развития моделируемых состояний, как при прямом («инфаркт»), так и при опосредованном («диабет») повреждении миокарда, а также при их сочетании, наблюдается нарастание метаболических и структурных нарушений в кардиомиоцитах и содержания свободных жирных кислот в сыворотке крови;



2. Метаболические и структурные изменения миокарда быстро нарастают на ранних стадиях процесса адаптации, как при прямом, так и опосредованном поражении миокарда, а при их комбинировании наблюдается торможение развития патологических процессов в миокарде, в том числе и увеличения концентрации свободных жирных кислот;

3. Проявление эффекта кросс-адаптации при комбинированных воздействиях наблюдается только в том случае, когда повторное стрессовое воздействие возникает на стадии резистентности при адаптации к первому.

4. Насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты снижают скорость потребления кислорода кардиомиоцитами и митохондриями *in vitro*, как при отдельно моделируемых воздействиях, так и их сочетании, на всех стадиях развития процессов адаптации;

5. Свободные жирные кислоты, при прямом воздействии на митохондрии сердца экспериментальных животных, оказывают ингибирующее действие на дыхание митохондрий, аналогичное влиянию эндогенных (АДФ) и экзогенных (циклоспорин А, ЭГТА, карбоксиатрактилат) супрессоров патологических процессов в митохондриях.

6. Изменения уровня циркулирующих СЖК можно рассматривать как необходимый компонент сигнальной системы в триггерном механизме процессов долгосрочной адаптации сердца, в том числе при хронической ишемии миокарда.

**Апробация работы.** Результаты проведенных исследований докладывались и обсуждались на V Сибирском физиологическом съезде с международным участием (Томск, 2005); научно-практической конференции «Современная кардиология: наука и практика» (Санкт-Петербург, 2007); первом и втором съездах кардиологов Сибирского федерального округа (Томск, 2005, 2007); научных конференциях с международным участием «Нейрогуморальные механизмы регуляции висцеральных органов и систем в норме и при патологии» (Томск, 2007, 2009); региональной научно-практической конференции «Вопросы интегративной физиологии» (Красноярск, 2007); Российском национальном

конгрессе кардиологов и конгрессе кардиологов стран СНГ «Кардиология без границ» (Санкт-Петербург, 2007); XIII Всероссийского съезде сердечно - сосудистых хирургов (Москва, 2007); XI и XII научно-практических конференциях «Актуальные проблемы медицины» (Абакан, 2008, 2011); 5-ой Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов» (Новосибирск, 2011); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Сахарный диабет, метаболический синдром и сердечно-сосудистые заболевания. Современные подходы к диагностике и лечению» (Томск, 2012); Всероссийской научной конференции «Противоречия современной кардиологии: спорные и нерешенные вопросы» (Самара, 2012); VII Сибирском съезде физиологов (Красноярск, 2012); XXI и XXII съездах Физиологического общества им. И.П. Павлова (Калуга, 2011; Волгоград, 2013).

Исследования поддержаны грантом РФФИ №07-04-01195а "Механизмы дисфункций саркоплазматического ретикулула кардиомиоцитов при диабетическом поражении миокарда человека" (2007-2009); Государственным контрактом в рамках ФНЦТП: "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 гг" по теме: "Изучение молекулярно-клеточных механизмов сердечных заболеваний, ассоциированных с диабетом и избыточным весом" (ГК № 02.527.11.0007); совместным проектом Россия – Евросоюз HEALTH-2008-4.3.3.2 №241558 «Механизмы сердечной недостаточности при сочетании диабета и ожирения» в рамках 7-ой Рамочной программы научных исследований и технологических разработок Европейского союза по направлению "SICA-HF" (Studies Investigating Co-morbidities Aggravating Heart Failure).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 42 печатные работы, из них – 18 научных статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ, 3 – в зарубежных рецензируемых журналах, цитируемых Scopus, Web of Science и Web of Knowledge, 1 монография в соавторстве, 1 патент РФ на изобретение.

## Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### СВОБОДНЫЕ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ – ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ РЕГУЛЯТОРЫ МЕТАБОЛИЗМА МИОКАРДА В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

Чрезмерное поглощение кардиомиоцитами ЖК часто связывают с неблагоприятными изменениями в сердечной функции. Предполагается, что именно увеличение образования и окисления ЖК в сердце при ишемии и диабете снижает эффективность работы сердца, приводит к нарушению синтеза АТФ, увеличению производства АФК, следствием чего является окислительный стресс и апоптоз кардиомиоцитов. Огромное количество экспериментальных и клинических исследований подтверждают эту точку зрения о негативной роли увеличения концентрации свободных ЖК в плазме крови и триглицеридов в кардиомиоцитах. Устойчивым является мнение, что увеличение окисления ЖК в сердце является непременно ухудшающим фактором при патологиях сердца, вызванных нарушением коронарного кровообращения разной этиологии. Серьезным аргументом в пользу этого представления является улучшение качества жизни кардиобольных, получающих препараты, снижающие интенсивность липидного метаболизма.

Несмотря на мощный арсенал современной медицины, смертность от сердечно-сосудистых заболеваний в последнее десятилетие упорно занимает 1 место (по данным Роскомстата, официальный сайт [www.gks.ru](http://www.gks.ru)). С физиологической точки зрения организм является сложной саморегулирующейся системой, и здесь главной является приставка «само». Ничего случайного в изменении интенсивности любого процесса нет, а соответственно, логично предположить, что оно направлено на попытку сохранения метаболизма больного органа, компенсацию нарушенной функции. Вмешательство в естественный ход событий может быть оправдано только с позиции временного, до устранения патологической причины, а при невозможности такового требует жесточайшего

контроля. Как будет показано ниже, вмешательство в метаболизм ЖК может препятствовать включению естественных компенсаторно-приспособительных реакций и приводить к тяжелым последствиям.

### **1.1 Метаболизм жирных кислот в сердце: ключевые процессы**

Высокие энергетические запросы сердца обусловлены поддержанием сократительной функции, базально-обменных процессов и ионного гомеостаза, что требует постоянной выработки АТФ на высокой скорости. Низкое содержание АТФ в сердце (5 мкмоль/г сырого веса) обусловлено высокой скоростью его гидролиза (~30 мкмоль/г сырого веса/мин, в состоянии покоя), поэтому в нормальных условиях полное исчерпание и восстановление пула АТФ происходит примерно каждые 10 с [254]. В сердце взрослого организма основным источником АТФ является окислительное фосфорилирование в митохондриях. Для поддержания достаточного уровня АТФ миокард использует любые доступные субстраты при их наличии (глюкозу, лактат, кетоновые тела, аминокислоты), но в нормальных условиях сердце получает 50-70% энергии АТФ в процессе  $\beta$ -окисления ЖК [314].

Вклад  $\beta$ -окисления ЖК в общий окислительный энергетический метаболизм сердца весьма динамичен, а интенсивность использования ЖК зависит от источника, концентрации и типа ЖК, а также наличия конкурирующих энергетических субстратов [281]. Интенсивность  $\beta$ -окисления ЖК определяется рядом процессов, в том числе, 1) поглощения ЖК сердцем, 2) наличия других энергетических субстратов, 3) поступления кислорода к сердцу, 4) транспорта ЖК в митохондрии и 5) состояния и функциональной активности митохондрий [135, 138, 314]. Регулирование  $\beta$ -окисления ЖК происходит на всех уровнях метаболического пути, в том числе на уровне липопротеинлипазы (ЛПЛ), транспорта ЖК в кардиомиоциты (КМЦ), этерификации и поглощения КоА митохондриями и собственно процесса  $\beta$ -окисления в митохондриях, который, в

свою очередь, зависит от активности цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) и электрон-транспортной цепи (ЭТЦ).

ЖК поступают в сердце в виде комплекса СЖК с альбумином или высвобождаются из триглицеридов (ТГ), содержащихся в хиломикронах или липопротеинах очень низкой плотности (ЛПОНП) [337]. Нормальные концентрации циркулирующих СЖК составляют диапазон от 0,2 до 0,6 ммоль/л [314]. Тем не менее, эти уровни могут значительно варьироваться до 2 ммоль/л и более во время сильных стрессов, при ишемии миокарда и неконтролируемом диабете [223]. Хроническое или острое увеличение циркулирующих СЖК оказывает существенное влияние на темпы поглощения и  $\beta$ -окисления ЖК, так как артериальная концентрация ЖК является основным фактором, определяющим интенсивность этих процессов в сердце [335].

Лабильные ТГ являются основным источником эндогенных СЖК в миокарде [115]. Исследования в тканях сердца крыс иллюстрируют относительную важность эндогенного распада ТГ для энергетического метаболизма миокарда. На долю ЖК из эндогенных ТГ приходится от 36% расхода энергии при перфузии сердца с глюкозой в качестве единственного субстрата, снижаясь до ~11% при добавлении в перфузат экзогенного пальмитата [281]. Интрамиокардиальная деградация ТГ ускоряется при адренергической стимуляции, а синтез увеличивается с повышением концентрации в плазме СЖК [206]. Плазменная концентрация СЖК является основным регулятором содержания ТГ в сердце: у здоровых людей показано 70%-ное возрастание содержания ТГ в сердце при кратковременном ограничении в пище, с увеличением до 260% при голодании, соответствуя повышению в плазме концентрации СЖК [170].

Транспорт СЖК в кардиомиоциты происходит как путем пассивной диффузии, так и опосредованно, с помощью белков-транспортеров, включая FAT/CD36 и FATP 1/6 [156, 294, 317, 337]. Первоначально считалось, что большая часть СЖК за счет своих липофильных свойств поступает в кардиомиоциты

путем пассивной диффузии и флип-флоп транспортом, как показано на изолированных клетках [225, 294]. Однако исследования, проведенные на изолированном сердце, поддерживают концепцию рецептор-опосредованного транспорта ЖК с помощью белков-переносчиков: FABPpm связывает и концентрирует ЖК как для пассивной диффузии, так и для транспорта, опосредованного FAT/CD36 или FATP 1/6 [294]. Наиболее важная роль в перемещении ЖК через плазматическую мембрану кардиомиоцитов принадлежит FAT/CD36 [166, 226]. Исследования с ингибированием [226] или удалением [201] FAT/CD36 показали, что 50-60% ЖК поступает в сердце через FAT/CD36-опосредованный транспорт. В отличие от FATP или FABPpm, FAT/CD36 может перемещаться между внутриклеточными органеллами и плазматической мембраной [226]. Инсулин и сокращение сердца стимулируют перемещение FAT/CD36 к мембране, тем самым облегчая поглощение ЖК [226]. При этом увеличение ЖК стимулирует деградацию FAT/CD36, что может быть механизмом ингибирования поглощения ЖК по механизму обратной связи.

В цитоплазме ацил-КоА-синтетаза преобразует ЖК в длинноцепочечные эфиры ацил – КоА, которые затем могут быть использованы для синтеза целого ряда внутриклеточных липидных интермедиатов или переданы с карнитином в митохондрии. Поглощение ЖК в митохондриях осуществляется посредством карнитинпальмитоилтрансферазы 1 (КПТ1), катализирующей превращение длинноцепочечных ацил-КоА в ацилкарнитин, который затем перемещается в митохондрии. Ключевым механизмом регуляции деятельности КПТ1 является аллостерическое торможение этого фермента малонил-КоА. Концентрация малонил-КоА в сердце зависит от баланса между его синтезом из ацетил-КоА, при помощи ацетил-КоА-карбоксилазы (АКК) [282], и его деградацией, при помощи малонил-КоА-декарбоксилазы (МКД) [138, 285, 337], а активность АКК находится в обратной зависимости от  $\beta$ -окисления ЖК в сердце [282].

Первоначально считалось, что в клетках млекопитающих МКД находится только в митохондриях [125], но МКД также обнаружена в цитоплазме и

пероксисомах [197, 288]. В ряде исследований показано, что увеличение  $\beta$ -окисления ЖК связано с повышенной активностью МКД, в том числе при диабете, ишемии и голодании [158, 202]. Нужно отметить, что в изолированном работающем сердце крысы и сердце человека окисление ненасыщенных жирных кислот происходит с такой же скоростью, что и окисление насыщенных ЖК [281].

Метаболизм длинноцепочечных ацил-КоА в митохондриях происходит путем  $\beta$ -окисления, с последовательным участием ацил-КоА-дегидрогеназы, еноил-КоА-гидратазы, L-3-гидроксиацил-КоА-дегидрогеназы, и 3-кетацил-КоА-тиолазы (3-КАТ) [293]. Каждый из 4 ферментов  $\beta$ -окисления ЖК ингибируется механизмом по типу обратной связи продуктами ферментативной реакции, особое значение имеет ингибирование 3-КАТ по накоплению ацетил-КоА в периоды низкого метаболического спроса, когда снижение активности ЦТК и ЭТЦ приводит к накоплению ацетил-КоА, ФАДН<sub>2</sub> и НАДН.

В хорошо перфузируемом сердце ~ 50-70% ацетил-КоА образуется при  $\beta$ -окислении ЖК и 30-50% приходится на окисление пирувата [314], преобразование которого происходит по трем путям: в лактат, декарбоксилированием - в ацетил КоА, и карбоксилированием - в оксалоацетат или малат. Декарбоксилирование пирувата является ключевым необратимым шагом в окислении углеводов и катализируется пируватегидрогеназой (ПДГ) [259], мультиферментным комплексом, расположенным в митохондриях. Повышение циркулирующих СЖК и внутриклеточное накопление длинноцепочечных ЖК, как, например, при диабете, приводит к усилению ингибирования ПДГ и уменьшению окисления пирувата [223]. При снижении концентрации СЖК в плазме или прямом торможении  $\beta$ -окисления ЖК окисление пирувата повышается [314]. Высокий уровень  $\beta$ -окисления ЖК может также ингибировать изоформы 1 и 2 фосфофруктокиназы (и, следовательно, гликолиз) через увеличение концентрации цитозольного цитрата. Это "глюкозо-жирнокислотный цикл" получил название "цикл Рэндла" [223]. Максимальная скорость окисления пирувата определяется степенью фосфорилирования ПДГ,

однако фактический поток определяется концентрацией субстратов и их продуктами в митохондриях [259].

Важную роль в сердце выполняет АМФ-активируемая протеинкиназа (АМФ-ПК) как в регулировании  $\beta$ -окисления ЖК [285], так и поглощения глюкозы и гликолиза [185, 186, 213, 279]. АМФ-ПК действует как "датчик топлива", увеличивая  $\beta$ -окисление ЖК в периоды повышенного спроса на энергию, или уменьшая его в периоды низкого спроса, вследствие усиления или уменьшения ингибирующего действия на активность АКК и, соответственно, уровня малонил-КоА. АМФ-ПК реагирует на метаболический стресс, распад клеточного АТФ, повышение АМФ или увеличение соотношения креатин/фосфокреатин (Кр/фКр) [171, 172, 137]. Показано, что активность АМФ-ПК в сердце также может быть независима от уровня адениннуклеотидов [95]. Например, инсулин подавляет активность АМФ-ПК в сердце при неизменных соотношениях АМФ/АТФ и Кр/фКр [147].

ЖК и/или липидные метаболиты, такие, как эйкозаноиды и лейкотриены могут быть лигандами для PPARs [180]. PPARs являются членами суперсемейства ядерных лиганд-активированных рецепторов. Одним из основных транскрипционных регуляторов метаболизма ЖК в сердечной мышце является PPAR $\alpha$ . Избыточная экспрессия PPAR $\alpha$  в сердце приводит к заметному увеличению поглощения и  $\beta$ -окисления ЖК из-за повышенной экспрессии ферментов, участвующих в этих процессах [145]: в поглощении ЖК (FAT/CD36, FATP1), этерификации цитозольных ЖК (FABP, FACS и др.), метаболизме малонил-КоА (МКД), поглощении ЖК в митохондриях (КПТ1), окислении глюкозы (киназа пируватдегидрогеназы),  $\beta$ -окислении ЖК (ацил-КоА-дегидрогеназа, 3-КАТ), митохондриальном разобщении (митохондриальные тиоэстеразы, разобщающие белки семейства UCP) [180, 341]. PPAR $\beta/\delta$  присутствует в высоких концентрациях в сердце и участвует в транскрипционном контроле многих из тех же ферментов, что и PPAR $\alpha$ . Гиперэкспрессия PPAR $\beta/\delta$  приводит к повышенной экспрессии генов, вовлеченных в  $\beta$ -окисление ЖК,



которая не сопровождается накоплением липидов или сердечной дисфункцией у мышей [117]. При этом наблюдается повышенный уровень усвоения и окисления глюкозы в кардиомиоцитах, в противоположность гиперэкспрессии PPAR $\alpha$  [117]. До недавнего времени считали, что PPAR $\gamma$ , третья изоформа PPAR, не оказывает прямого воздействия на сердце из-за очень низкого уровня экспрессии в сердце. PPAR $\gamma$  сильно выражен в жировой ткани, и его активация может резко понизить уровень циркулирующих ЖК [230, 341]. Однако гиперэкспрессия PPAR $\gamma$  в сердце вызывает эффект, подобно гиперэкспрессии PPAR $\beta$  [313].

В нормальном сердце около 75% жирных кислот окисляются немедленно [223], соответственно, снижение  $\beta$ -окисления может способствовать развитию липид-вызванных сердечно-сосудистой патологий. Хорошо известно, что ЖК могут преобразовываться в сложные липиды, такие как ТГ, диацилглицерол, и церамиды, и накопление этих интермедиатов является одним из факторов, способствующих развитию резистентности к инсулину, сердечной дисфункции и сердечной недостаточности [240, 263, 318]. Теоретически, увеличение  $\beta$ -окисления ЖК может уменьшить риск липотоксичности. Тем не менее, роль снижения  $\beta$ -окисления ЖК в содействии липид-вызванных патологий сердца является спорным вопросом [12, 222, 340].

## **1.2 Особенности энергетического метаболизма сердца в норме и при недостаточном поступлении кислорода**

Сокращение и расслабление миокарда обеспечивается координированной деятельностью трех основных функциональных систем кардиомиоцитов - сократительного аппарата, системы ионного транспорта и системы энергообеспечения. Выполнение механической работы в регулярно повторяющихся циклах сокращения является главной функцией сердечной мышцы. Эта специфическая функция миокарда отражается как в особенностях строения его клеток, так и в характере внутриклеточных метаболических

процессов. В кардиомиоцитах около 34% от его объема занимают митохондрии, 48% - миофибриллы, 1,5% - саркоплазматический ретикулум (СПР) и Т-система, 16,5% - другие компоненты клетки. Среди метаболических реакций одно из центральных мест занимают процессы снабжения сократительного аппарата энергией [73].

Устойчивая и длительная работа сердца невозможна без постоянного притока кислорода. Сердце является одним из наиболее интенсивно работающих органов и поглощает около 10% всего кислорода, потребляемого организмом, хотя относительный вес сердца составляет всего около 0,5% веса тела. Таким образом, миокард – высокооксигенируемая ткань, 90% энергетических потребностей которой удовлетворяется за счет дыхания митохондрий. Митохондрии расположены непосредственно под сарколеммой и между миофиламентами кардиомиоцитов таким образом, что существует постоянное расстояние для диффузии органических молекул между митохондриями и миофиламентами [338]. В систолу реализуется более 90% окислительной способности миокарда, и, следовательно, в сердце продукция энергии практически не превышает ее утилизацию [236]. Это точное равновесие между потреблением кислорода и работой сердца наблюдается как *in vivo*, так и *in vitro*, и проявляется постоянством общей клеточной концентрацией АТФ и креатинфосфата (КФ), поэтому должен существовать путь энергетической сигнализации для обеспечения строгого соответствия между потреблением кислорода и утилизацией энергии. Одним из кандидатов на роль фактора, объединяющего аэробный метаболизм и сердечную работу, является кальций. Кальций определяет функциональную активность как миозина и АТФазы СПР, так и основных дегидрогеназ и АТФ-синтетазы в митохондриях [104]. Тем не менее, предположение, что окислительное фосфорилирование и сокращение одновременно регулируются  $Ca^{2+}$  не совсем верно, так как параллельное повышение нагрузки на сердце и потребления кислорода с увеличением длины

мышечных волокон (закон Франка-Старлинга) наблюдается при постоянном внутриклеточном содержании кальция [306].

Реакции, вовлеченные в продукцию и утилизацию АТФ, не происходят случайно, а включены в структурные и функциональные элементы. Показано, что в кардиомиоцитах гликолитические ферменты организованы в надмолекулярные комплексы и связаны с внутриклеточными структурами, такими как миофиламенты и СПР, где они участвуют в локальной продукции энергии, которая наиболее доступна для использования ионными насосами и другими мембранными структурами [333]. Присутствие транспортных систем для высокоэнергетических фосфатов – это другой необходимый фактор кооперации энергетического метаболизма миокарда и поперечнополосатых мышц. Креатинкиназная и аденилаткиназная системы в мышечных клетках выступают в качестве энергетических челноков [109]. В ходе активного окислительного фосфорилирования, АТФ из матрикса посредством АТФ/АДФ-антипортера переносится в межмембранное пространство, где вступает в трансферазную реакцию, катализируемую митохондриальной креатинкиназой, с образованием креатинфосфата и АДФ. АДФ снова используется в процессе окислительного фосфорилирования и продолжает стимулировать дыхание. Это функциональная связь между АТФ-азными и креатинкиназной системами эффективно контролирует локальное отношение АТФ/АДФ, что термодинамически и кинетически способствует продукции энергии в митохондриях (низкое отношение АТФ/АДФ) и потреблению энергии в цитозоле (высокое отношение АТФ/АДФ). Эти участки связаны через реакции (близкие к равновесным), катализируемые креатинкиназами в цитозоле, в результате чего практически мгновенно фосфорная группа транспортируется к АТФазе, а метаболический сигнал - в митохондрии [140]. Математическое моделирование показало существования локальных пулов адениловых нуклеотидов, взаимосвязанных через внутриклеточный транспорт энергии с креатинкиназами [192].

Относительно недавно было показано, что клеточная архитектура участвует в энергетической регуляции. Само наличие энергетических связей между митохондриями и потребляющими энергию органеллами [193] объясняет, что локальное образование АДФ более эффективно стимулирует митохондриальное дыхание, чем образование АДФ во всем объеме клетки. В мышечных клетках митохондрии с соседними АДФ-продуцирующими системами в миофибриллах и СПР рассматриваются как функциональные единицы, представляющие основу структурной организации энергетического метаболизма в кардиомиоцитах [286].

Нормально функционирующее сердце использует для энергетических целей различные субстраты, в выборе которых сердце весьма лабильно. Выбор субстрата зависит от его концентрации в крови, а также от интенсивности деятельности сердца. В обычном режиме деятельности сердца при достаточном снабжении кислородом кардиомиоциты предпочитают использовать ЖК, обеспечивая выработку от 60 до 90% всего АТФ в миокарде, но при увеличенной функциональной нагрузке, когда требуется ускорить процесс синтеза АТФ, используется глюкоза [223]. В последнее время подчеркивается роль в обмене миокарда триацилглицеридов. Даже при высокой концентрации глюкозы окислительный обмен на 20% осуществляется за счет ЖК, среди которых основным источником энергии считаются олеиновая и пальмитиновая. При недостатке кислорода предпочтительнее более экономичное анаэробное расщепление глюкозы, так как в плане кислородных затрат ЖК не самый выгодный субстрат. Усиленное окисление ЖК и преобладание его над окислением глюкозы приводит в случае недостаточного поступления кислорода к усугублению кислородного голодания [223].

Метаболизм глюкозы представляет собой важный источник энергии и осуществляется по двум основным метаболическим путям - гликолизу и окислительному декарбоксилированию. Гликолиз является первым этапом метаболизма глюкозы, который не требует присутствия кислорода для

образования АТФ. За счет гликолиза образуется 5-10% общего количества АТФ, 20-30% энергии обеспечивают лактат. Миокард свободно утилизирует из крови молочную кислоту и пируват. Свободные ЖК при голодании и натошак становятся основным источником энергии. Такую лабильность в выборе энергетического субстрата следует рассматривать как проявление адаптации миокарда к различным условиям функционирования. Несмотря на взаимное подавление процессов окисления конкурирующего субстрата, наилучшее функционирование сердца наблюдается при окислении ЖК и глюкозы одновременно [320].

В тех случаях, когда сердце систематически испытывает повышенную потребность в кислороде, в миокарде наступают структурные изменения и масса сердца, в целом, увеличивается. Такие приспособительные процессы наблюдаются, например, у спортсменов, и масса сердца может достигать у них 500 г (при норме 200-300 г). Это происходит, главным образом, за счет гипертрофии кардиомиоцитов. Увеличение размеров сердца приводит, по закону Лапласа, к повышению напряжения стенок желудочков и, следовательно, к потреблению большего количества кислорода. Считается, что основным стимулятором роста кардиомиоцитов служит их кратковременное кислородное голодание. Гипертрофия миокарда не может развиваться бесконечно, так как при ней ухудшается снабжение клеток кислородом. При увеличении массы сердца до критического значения, равного примерно 500 г у взрослого мужчины, увеличивается как масса мышечной ткани, приходящейся на один капилляр, так и количество капилляров, однако прекапиллярные сосуды при этом изменяются незначительно. В результате уровень поступления кислорода к клеткам сердца снижается. В патологических условиях масса сердца может становиться больше критической и наступает кислородное голодание многих участков миокарда и нарушение нормальной структуры сердца - патологическая гипертрофия сердца с дилатацией его полостей [73].

При нарушении кровоснабжения подавление активности ПДГ происходит за счет того, что уменьшается транспорт электронов в дыхательной цепи митохондрий вследствие нехватки кислорода, а снижение скорости оборота промежуточных продуктов ЦТК приводит к увеличению отношения КоА / КоА-SH и также к ингибированию ПДГ. Параллельно увеличивается скорость окисления ЖК. В результате процессы окисления глюкозы значительно подавляются, катаболизм глюкозы сопровождается накоплением протонов, а отношение потребления кислорода к величине его поступления кислорода возрастает, работа сердца становится менее эргономичной [36, 223].

Возникновение в сердечной мышце гипоксических зон и, как следствие, недостаточность продукции АТФ митохондриями, приводит к нарушениям энергозависимых процессов: функционирования сократительного аппарата и ионотранспортирующих систем. Снижение содержания АТФ при гипоксии способствует активации эндогенных фосфолипаз, распаду и потере мембранных фосфолипидов, увеличению текучести мембран и их селективной проницаемости [49, 50].

Биологическая смерть клеток при тканевой гипоксии или аноксии обусловлена повреждением мембран митохондрий [144, 181] и включает в себя следующую последовательность событий:

0 - 5 мин аноксии: снижение уровня АТФ в клетке в 2 – 4 раза, несмотря на активацию гликолиза;

5 - 15 мин: появление  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме клетки. Активация гидролитических ферментов, в том числе фосфолипазы  $\text{A}_2$  митохондрий;

15 - 30 мин: гидролиз митохондриальных фосфолипидов и нарушение барьерных свойств митохондриальной мембраны. Реоксигенация ткани на этой стадии приводит к активному набуханию митохондрий, разобщению в них процессов окисления и фосфорилирования, а способность накапливать ионы  $\text{Ca}^{2+}$  снижена;

30 - 60 мин: частичное восстановление функций митохондрий, временное повышение сопряженности окисления и фосфорилирования, способности накапливать кальций. Механизм компенсаторных процессов, приводящих к временному улучшению функций митохондрий, неизвестен, но, по-видимому, связан с функцией клетки в целом, так как в изолированных митохондриях восстановления функций не наблюдается;

60 - 90 мин: необратимое повреждение митохондрий, полная гибель клеток (цит. по [62]).

Таким образом, поддержание энергетического гомеостаза в кардиомиоцитах требует адекватной поставки кислорода и субстратов для митохондрий, соотношения КФ/АТФ, транспорта энергии из митохондрий к местам ее использования, локальной регуляции соотношения АТФ/АДФ вблизи от АТФ-азы, а также эффективной обратной связи от участков утилизации энергии в клетке. Нарушение энергетики в последнее время стали предлагать как единый механизм для объяснения дисфункций миокарда при гипертрофических кардиомиопатиях [99].

Обычно считается, что при гипертрофии главным энергетическим источником миокарда вместо  $\beta$ -окисления ЖК становится гликолиз, то есть миокард возвращается к окислению эмбриональных субстратов. Увеличение количества ферментов гликолиза и усиление гликолиза наблюдается при гипертрофии. Поскольку процесс ремоделирования прогрессирует к стадии декомпенсации, метаболическая адаптация становится недостаточной со снижением мощности окисления глюкозы. У человека при сердечной недостаточности инактивированы транспортеры глюкозы GLUT-1 и GLUT-4 и мРНК мышечной гликогенсинтазы [272]. Отсутствие GLUT-4 индуцирует гипертрофию [93], в то время как повышенная экспрессия GLUT-1 нормализует отношения КФ/АТФ и оказывает протективное действие в отношении развития сердечной недостаточности при перегрузке давлением [216]. Хотя точные механизмы полностью не понятны, данные факты указывают на важную роль

энергетического метаболизма в патофизиологии сердечной недостаточности [320].

Хроническая сердечная недостаточность ассоциирована с морфологическими изменениями в митохондриях, такими как повышение, их количества, уменьшение размеров и нарушение структурной целостности. Повреждение митохондрий положительно коррелирует с показателями тяжести сердечной недостаточности, такими как содержание в плазме норадреналина, конечным диастолическим давлением в левом желудочке и ударным объемом [280]. Нарушение потребления кислорода и притупление митохондриальной регуляции акцепторами фосфата (АМФ, АДФ и креатин) способствуют снижению энергопродукции в митохондриях при сердечной недостаточности [299]. При врожденной сердечной недостаточности значительно снижено содержание креатина, переносчика креатина, КФ и АТФ [106]. Точные клеточные механизмы, которые ведут к снижению уровня высокоэнергетических фосфатов и ставят под угрозу перенос энергии и сократительную способность миокарда, до конца не ясны. Важно, что они сопровождаются повышением концентрации АДФ и, как следствие, снижением фосфорилирующего потенциала.

В дополнение к снижению продукции энергии при сердечной недостаточности так же нарушается ее транспорт и утилизация. Длительное генерализованное повреждение креатинкиназных систем является маркером сердечной недостаточности [140]. Резкое снижение содержания митохондриальной креатинкиназы предложено считать маркером перехода компенсаторной гипертрофии в сердечную недостаточность [332, 344]. Нарушение работы креатинкиназных систем предполагает генерализованное снижение интеграции между цитозольными сигналами и митохондриями, а так же ухудшение энергетической сигнализации, что, в конечном счете, приводит к неспособности поврежденного миокарда адаптировать продукцию энергии к её утилизации, равно, как и использовать свои сократительные резервы. Более того, снижение содержания сердечной митохондриальной креатинкиназы может



привести к спонтанному открытию митохондриальных пор, что способствует апоптозу клеток при сердечной недостаточности [130].

Транспорт энергии так же может осуществляться аденилаткиназой и ферментами гликолиза, и эти два пути могут быть признаны адаптивными механизмами поддержания поставленной под угрозу при сердечной недостаточности энергетике в сердце. Однако при сердечной недостаточности уменьшается общий компенсаторный потенциал этих систем [140].

В настоящее время ничего не известно о существовании непосредственных перекрестных энергетических связей между митохондриями и внутриклеточными органеллами, потребляющими энергию при сердечной недостаточности [193]. Однако эти органеллы связаны с помощью сети цитоскелета, для которой показано глубокое повреждение при сердечной недостаточности [107]. Сердечная недостаточность так же сопровождается нарушением АТФ-зависимых процессов, таких как функционирование кардиопротекторных калиевых каналов, экспрессия генов и сигнальные системы [140].

Биологическая смерть клеток сердца при гипоксическом повреждении обусловлена, как хорошо известно, нарушением структуры мембран митохондрий [77, 78]. Одной из активируемых при тканевой гипоксии внутриклеточных систем является система фосфолипаз [62]. Внутриклеточные фосфолипазы обеспечивают процесс поддержания мембранного гомеостаза при различных нарушениях метаболизма кардиомиоцитов, осуществляя реакции деацилирования/реацилирования [162]. В ответ на изменение концентрации и соотношения ЖК происходит реорганизация липидного состава мембраны с целью создания оптимальных условий для сохранения функциональной активности внутриклеточных органелл и клетки в целом [162]. Однако мембранный гомеостаз кардиомиоцитов может нарушаться при некоторых патологических состояниях, сопровождающихся чрезмерной активацией фосфолипаз, вследствие накопления ЖК или их производных в тканях сердца, в частности при ишемии миокарда и сахарном диабете [162, 223, 338]. Увеличение содержания ЖК и лизоформ

фосфолипидов в результате гидролиза приводит к разобщению транспорта электронов и окислительного фосфорилирования, что связано с увеличением проницаемости мембран для белков. Активация кальций-зависимой фосфолипазы  $A_2$  в митохондриях приводит к их повреждению, набуханию, снижению кальций-аккумулирующей способности митохондрий, а также уменьшению соотношения ионов калия и натрия в них с 3,7 до 2,5 [26]. Повышение активности фосфолипазы  $A_2$  и процессов перекисного окисления мембранных липидов представляет собой основу для первичной и вторичной дестабилизации структурно-функциональной организации клеточных мембран [35].

Одной из основных причин нарушения поступления кислорода в клетки миокарда является атеросклеротическое повреждение коронарных сосудов. В атерогенезе принимает важное участие липопротеинассоциированная фосфолипаза  $A_2$ . Ее роль состоит в гидролизе окисленных ЛПНП, что приводит к образованию побочных провоспалительных, проатерогенных продуктов – лизофосфотидилхолина и окисленных неэстерифицированных ЖК. Лизофосфотидилхолин играет ключевую роль в атерогенезе. Он действует как хемоаттрактант для моноцитов, ухудшает эндотелиальную функцию, вызывает смерть клеток путем нарушения целостности плазматических мембран и индуцирует апоптоз в клетках гладкой мускулатуры и макрофагов [27]. Уровень липопротеинассоциированной фосфолипазы  $A_2$  повышен в атеросклеротических бляшках, кроме того она интенсивно экспрессируется в макрофагах, находящихся в фиброзной капсуле в месте разрыва.

Гидролиз фосфолипидов, инициированный фосфолипазами  $A_2$  и  $C$ , обуславливает модификацию физико-химических свойств поверхностей частиц ЛПНП. Подобная липолитическая модификация изменяет, в частности, конформацию аполипопротеина В-100 на поверхности ЛПНП, что приводит к ассоциации этих частиц, а значит к увеличению их среднего размера. С увеличением размера частиц ЛПНП увеличивается их атерогенный потенциал –

укрупненные частицы способны более эффективно накапливать внутриклеточный холестерин [2, 57, 162].

Определение уровня активности липопротеинассоциированной фосфолипазы  $A_2$  наряду с другими маркерами воспаления может использоваться для выявления лиц с высоким риском развития сердечно-сосудистых заболеваний, так как доказана повышенная вероятность возникновения острого коронарного синдрома, сердечной недостаточности, ишемии, инфаркта миокарда, инсульта при увеличении содержания липопротеинассоциированной фосфолипазы  $A_2$  в крови [26].

Повышение содержания и активности фосфолипаз наблюдается также при заболеваниях суставов, сепсисе, перитоните, травмах, инфекциях, при лейкозах, при опухолях различной локализации, при патологии почек, при развитии дисбаланса между коагуляцией и фибринолизом, воспалении печени и тонкой кишки, нарушении проводимости нервной системы и при многих других заболеваниях [22, обзор].

Таким образом, наряду с другими клеточными дефектами, изменение липидного состава клеточных и внутриклеточных мембран и генерализованный спад метаболических потоков через ферментные системы, включая механизмы энергетического транспорта, являются важными факторами развития сердечной недостаточности.

### **1.3 Роль митохондрий в клеточных механизмах адаптации к гипоксии**

Нарушение кислородного гомеостаза является основой множества патологических состояний, и является неспецифическим звеном патогенеза [51, 80, 296, 297]. Признаки угнетения наиболее значимых энергозависимых функционально-метаболических процессов проявляются при снижении внутриклеточного содержания АТФ на 10-20%, а при падении уровня АТФ на 30% наблюдается их полное подавление [49].

Адаптация к гипоксии представляет собой сложную реакцию, реализуемую на всех уровнях, от системного до клеточно-молекулярного, в которой можно выделить две стадии, срочную и отсроченную [51]:

1) Стадия *индукции адаптации* - период генерализованного ответа на раздражитель, включающий специфический и неспецифические механизмы. При неспецифической стресс-реакции происходит мобилизация регуляторных центров дыхательной и сердечно-сосудистой систем, транспорта кислорода, а также внутриклеточных механизмов, связанных с синтезом энергии. Мобилизация специфических для гипоксии компенсаторных реакций, которые сопровождаются экспрессией мРНК, белков и генов, обеспечивает формирование срочной защитной реакции организма.

2) Стадия *формирования геном-зависимых реакций долгосрочной адаптации*, которая начинается с момента первого гипоксического воздействия и характеризуется, увеличением резистентности организма к гипоксии. В зависимости от силы первичного воздействия в этот период активируются множественные соподчиненные сигнальные системы, составляющие основу для формирования отсроченных геном-зависимых защитных эффектов долгосрочной адаптации. При длительном гипоксическом воздействии на организм кислородный гомеостаз переходит на новый уровень регуляции. На этом этапе наблюдается снижение вентиляции и температуры тела, увеличение концентрации и сродства гемоглобина к кислороду, изменение кинетических свойств ферментов окислительного метаболизма, ремоделирование сосудов, увеличение гликолиза и многое другое.

Исследования действия разных режимов гипоксических тренировок на формирование срочной резистентности организма, проведенные сотрудниками лаборатории Лукьяновой Л.Д., привели к установлению принципиально новых аспектов в механизме адаптации к гипоксии [51]:

1. Срочная резистентность к гипоксии достигает максимальных значений в первые 30 минут любого гипоксического воздействия. Степень ее выраженности прямо зависит от тяжести гипоксического воздействия.

2. Индукция срочной резистентности происходит быстрее при применении безынтервальных форм гипоксии сравнительно с интервальными.

3. Фактором, определяющим формирование срочной резистентности, является гипоксический период, а не период реоксигенации; более того, оксигенированные интервалы ослабляют реакцию организма на гипоксию.

4. Динамика формирования неспецифической резистентности организма при применении разных режимов курсовой гипокситерапии носит фазный характер, зависящий от типа гипоксического воздействия.

При изучении механизмов адаптации к гипоксии в последние годы пристальное внимание уделяется исследованию роли специфического белкового фактора, индуцируемого при гипоксии – HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor) [46, 69, 295-297, 316].

HIF-1 представляет собой гетеродимерный редокс-чувствительный белок, состоящий из двух субъединиц: кислородочувствительной субъединицы HIF-1 $\alpha$  и субъединицы HIF-1 $\beta$ . В нормоксических условиях содержание HIF-1 $\alpha$  поддерживается на низком уровне [69, 79, 227]. При гипоксии создаются предпосылки для стабилизации и аккумуляции HIF-1 $\alpha$ , индукции транскрипционных процессов, транслокации HIF-1 $\alpha$  в ядро, его гетеродимеризации с HIF-1 $\beta$  с образованием транскрипционного активного комплекса (HRE), экспрессией HIF-1-зависимых генов-мишеней и синтезом защитных адаптивных белков. Активность HIF-1 $\alpha$  регулируется путем гипоксической трансдукции сигнала, который основан на кислородзависимой посттрансляционной модификации; установлена экспоненциальная зависимость содержания HIF-1 $\alpha$  от концентрации кислорода [69, 316]. Экспрессия HIF-1 $\alpha$  при гипоксии происходит во всех тканях, при любых гипоксических режимах.

Кислородный гомеостаз напрямую связан с работой сложной регуляторной системы, локализованной в митохондриях. Функциональный статус митохондрий в клетке, отличающий их от других органелл, определяется тремя главными особенностями их структурно-морфологической организации:

- 1) Наличием ферментов дыхательной цепи, предназначенных для аэробного синтеза энергии;
- 2) Наличием собственного генома, что обеспечивает митохондриям преимущество в скорости обновления функционально наиболее значимых белков ферментов дыхательной цепи;
- 3) Наличием мобильности (способности митохондрий к подвижности: делению, слиянию, перемещению в клетке), что дает им возможность концентрироваться вблизи энергопотребляющих структур.

Около структур с высокими энергетическими запросами митохондрии формируют митохондриально – эндоплазматическую сеть. Образование такого митохондриального ретикулума способствует диффузии энергетических метаболитов через систему метаболических каналов к различным участкам клетки, а также поддержанию стабильных значений мембранного потенциала [50]. С сигнальной функцией митохондрий связаны такие процессы, как рост, старение, реакция на температуру, апоптоз, секреция инсулина в  $\beta$ -клетках, формирование адаптивных реакций. Митохондрии играют роль регуляторов и координаторов работы внутриклеточных  $Ca^{2+}$ -зависимых сигнальных путей. Существует система регуляторного взаимодействия между митохондриями и эндоплазматическим ретикуломом, а также с рецепторами внешней мембраны, каскадом PI3K, eNOS, гуанилилциклазой, протеинкиназой G (PKG) и работой митоK<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналов [49, 50]. Интермедиаты цикла Кребса сукцинат и  $\alpha$ -кетоглутарат, помимо их участия в электротранспортной функции митохондриальной дыхательной цепи, являются специфическими лигандами двух рецепторов, относящихся к семейству G-белок-сопряженных рецепторов, соответственно GPR91 и GPR99 [173]. Имеются экспериментальные

доказательства, что через сукцинат-зависимый GPR91 и GPR99 рецепторы может осуществляться метаболическая связь окислительных процессов в митохондриях с адренергической и холинергической системами [43, 89, 173,198]. Показано, что стимуляция физиологических функций адреналином включает избирательную активацию сукцинатдегидрогеназы, а сукцинат, в свою очередь, является сигнальной молекулой, стимулирующей выделение адреналина и норадреналина. Аналогичная взаимосвязь обнаружена между  $\alpha$ -кетоглутаратом и ацетилхолином [89, 198].

Таким образом, митохондрии функционируют как активные сигнальные органеллы и играют ключевую роль в важнейших регуляторных физиологических процессах, в том числе, в формировании приспособительных реакций организма на ранней стадии гипоксического воздействия [50].

Традиционно считалось, что нарушение синтеза энергии при гипоксии является результатом инактивации цитохромоксидазы - кислород-зависимого фермента терминального участка митохондриальной дыхательной цепи. Однако нарушения энергетического обмена начинаются гораздо раньше, чем достигается критическая концентрация кислорода, приводящая к снижению его потребления, то есть задолго до уменьшения активности цитохромоксидазы [49].

Лукьяновой Л.Д. с коллегами была выдвинута концепция, получившая впоследствии полное экспериментальное подтверждение, согласно которой причиной снижения синтеза энергии при гипоксии являются изменения активности митохондриальных ферментов не на терминальном, а на субстратном участке дыхательной цепи [52]. В гипоксических условиях происходит регуляторное репрограммирование работы дыхательной цепи: обратимое подавление электротранспортной функции комплекса I – основного пути образования энергии в нормоксических условиях, и срочная компенсаторная активация митохондриального комплекса II. Этот процесс направлен на использование энергетически более эффективного в условиях гипоксии сукцинатоксидазного пути окисления субстратов, благодаря чему

предупреждаются или ослабляются нарушения синтеза АТФ, устраняется характерный для гипоксии ацидоз, и, как следствие, увеличивается резистентность организма к дефициту кислорода. При гипоксии происходит активация сукцинатдегидрогеназы и увеличение вклада сукцинатоксидазного окисления в клеточное дыхание, которое может достигать 70-80% [49, 50]. Активация при гипоксии сукцинатоксидазного окисления рассматривается как эволюционно сформировавшийся регуляторный и компенсаторный механизм, который реализуется в условиях дефицита кислорода в большинстве тканей (мозг, миокард, печень, почки, лимфоциты).

Регуляция работы дыхательной цепи в условиях гипоксии связана с активностью HIF-1 $\alpha$  [69, 79, 80]. В нормоксических условиях реакции, осуществляющие деградацию HIF-1 $\alpha$ , обеспечиваются субстратами, необходимыми для их активации, в том числе аспаратом и  $\alpha$ -кетоглутаратом [295]. Последний окисляется в реакциях субстратного фосфорилирования и в НАД-зависимых реакциях, катализируемых митохондриальным комплексом I. Вовлечение в нормоксических условиях  $\alpha$ -кетоглутарата в реакции деградации HIF-1 $\alpha$  сопряжено с образованием в цитозоле сукцината - ингибитора этих реакций, что обеспечивает поддержание фонового уровня HIF-1 $\alpha$ . При гипоксии происходит усиление образования сукцината в аминотрансферазных реакциях, активация сукцинатдегидрогеназы и сукцинатоксидазного окисления [51]. Благодаря этому создаются условия для экспрессии HIF-1-зависимых генов-мишеней и синтеза защитных адаптивных белков в ответ на гипоксию

Таким образом, важным механизмом срочной адаптации к гипоксии является двустороннее регуляторное взаимодействие субстратного участка дыхательной цепи и экспрессии белкового фактора HIF-1 $\alpha$ . Переключение при гипоксии метаболических потоков в дыхательной цепи на окисление сукцината обеспечивает аккумуляцию HIF-1 $\alpha$ , а сукцинатзависимая аккумуляция HIF-1 $\alpha$ , в



свою очередь, усиливает ингибирование комплекса I и создает условия для поддержания сукцинатоксидазного окисления и аккумуляции HIF-1 $\alpha$ .

При длительном действии гипоксии происходит постепенная утрата значимости сукцинатоксидазного окисления при одновременном восстановлении электротранспортной функции НАД-зависимого пути окисления за счет появления новых изоформ фермента с кинетическими свойствами, которые обеспечивают ему более высокую эффективность окисления субстратов в условиях высокой восстановленности пула пиридиннуклеотидов, характерной для гипоксии.

В условиях длительной адаптации к гипоксии кислородный гомеостаз тесно связан с транскрипционной экспрессией индуцируемых гипоксией генов позднего действия, необходимых для формирования адаптивных признаков. Ключевая роль в этом процессе также отводится HIF-1: идентифицировано около 100 генов-мишеней HIF-1 $\alpha$ , участвующих в долгосрочной адаптации к гипоксии [69, 79, 295-297].

Таким образом, митохондрии играют ведущую роль в процессе адаптации к гипоксии, обеспечивая реализацию важнейших аспектов системного ответа: 1) компенсаторного, ответственного за формирование срочных реакций адаптации, с изменением кинетических свойств ферментов и путей окисления энергетических субстратов; 2) транскрипционного, обеспечивающего HIF-1-зависимую экспрессию генов, ответственных за формирование долгосрочных механизмов адаптации организма к низким значениям  $pO_2$ ; 3) рецепторного, связанного с участием митохондрий в системе межклеточной сигнализации [51].

## **1.4 Влияние свободных жирных кислот на функциональное состояние митохондрий сердца**

Основной пул ЖК преимущественно вовлечен в окислительные энергетические процессы и поддержание мембранного гомеостаза кардиомиоцитов, способствуя, таким образом, нормальной электрофизиологической активности мембран и сохранению сократительной активности миокарда. Однако при чрезмерном поступлении СЖК в клетку, гипоксии, различных патологиях сердца процессы нормального окисления ЖК нарушаются и ЖК и/или их продукты становятся инициаторами разобщения окисления и фосфорилирования в митохондриях кардиомиоцитов, блокирования окисления глюкозы, набухания и нарушения структуры митохондрий [162, 223]. Такое действие ЖК может быть обусловлено разными процессами: а) собственно метаболизмом ЖК в матриксе митохондрий (образование недоокисленных продуктов, липоперекисей и др.); б) ионофорным действием ЖК [301]; в) протонофорным действием ЖК [58]; г) ЖК-индуцированным открытием неспецифической кальций-зависимой поры в мембране митохондрий [334].

### **1.4.1 Механизмы разобщающего действия жирных кислот**

Суть механизма разобщающего действия длинноцепочечных ЖК заключается в том, что при их участии происходит рассеивание трансмембранного потенциала митохондрий. ЖК выступают в качестве протонофоров: путем облегченной диффузии происходит перенос анионов ЖК из матрикса митохондрий в межмембранное пространство, где происходит их протонирование и возврат в митохондрии простой диффузией через фосфолипидную мембрану. Транспортировка анионов ЖК происходит при участии различных белков семейства UCP, АДФ/АТФ-антипортера и аспаратат/глутаматный переносчика [41, 58]. Таким образом, СЖК переносят

протоны в матрикс митохондрий в обход АТФ-синтетазы, тем самым разобщая процессы окисления и фосфорилирования. Показано, что в отсутствие ионов кальция приблизительно 80% разобщающего действия ЖК обусловлено участием двух переносчиков, АДФ/АТФ- и аспартат/глутаматного анипортеров [74].

Дыхательная цепь отвечает на снижение  $\Delta\mu_{\text{H}^+}$  при добавке протонофора так же, как и на снижение  $\Delta\mu_{\text{H}^+}$  за счет синтеза АТФ. В обоих случаях скорость выброса протонов (и дыхания) растет до тех пор, пока не уравнивает скорость их входа. В результате устанавливается такая величина  $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ , при которой скорости двух  $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ -зависимых процессов входа протонов и дыхания – совпадают [60]. Скорость дыхания не возрастает бесконечно при повышении концентрации протонофора, так как достигается состояние, когда скорость определяется кинетическими особенностями дыхательной цепи. Дыхание при этом становится неконтролируемым, то есть оно не зависит более от степени отклонения от термодинамического равновесия. В связи с этим важно различать условия, когда отсутствует дыхательный контроль ( $\Delta\mu_{\text{H}^+}$  от 0 до 170 мВ), и условия, когда митохондрии полностью дезэнергизованы ( $\Delta\mu_{\text{H}^+}=0$ ) [18].

Синтез АТФ в митохондриях путем окислительного фосфорилирования зависит от поддержания электрохимического градиента протонов через внутреннюю мембрану митохондрий, порожденного перемещением протонов из матрицы в межмембранное пространство комплексами I, III и IV ЭТЦ [176, 194]. Перемещение протонов в матрикс митохондрий через протонный канал АТФ-азы – движущая сила для генерации АТФ [194]. Разобщающие белки (uncoupling protein, UCP) представляют собой семейство митохондриальных транспортных белков, которые обеспечивают альтернативный путь для перемещения протонов из межмембранного пространства в митохондриальный матрикс, не связанный с синтезом АТФ. UCP минимизируют генерацию активных форм кислорода (АФК) митохондриального происхождения и выражены в тканях с высокой способностью к  $\beta$ -окислению, таких как бурый жир, скелетные мышцы и сердце [277]. С увеличением  $\beta$ -окисления ЖК повышается поставка восстановительных

эквивалентов и генерация АФК, таких как супероксид-анион ( $O_2^{\cdot-}$ ), комплексами I или III в ЭТЦ [111, 219].  $O_2^{\cdot-}$  может активировать УСР через образование липидных продуктов перекисного окисления [241], что приводит к разобщению окислительного фосфорилирования, и тем самым снижает генерацию  $O_2^{\cdot-}$ , защищая клетки от чрезмерного образования АФК (хотя такой эффект сопровождается снижением синтеза АТФ). Было предположено, что дополнительная роль УСР заключается в экспорте анионов ЖК из митохондрий и избавления матрикса от потенциально вредных молекул [197, 310].

Также показано, что при окислительном стрессе возможно образование разобщающих комплексов с общим пулом ЖК между мембранными транспортными белками митохондрий, как, например, высокомолекулярных агрегатов АДФ/АТФ– и аспартат/глутаматного антипортеров вследствие окисления SH-групп данных белков [74, 75]. В таком случае ЖК приобретают способность перемещаться от одного переносчика к другому, компенсируя выключение из разобщения какого-либо из антипортеров [75].

В присутствии кальция в разобщающем действии ЖК особую роль играет образование неспецифической поры в мембране митохондрий сердца.

#### **1.4.2 Неспецифические поры митохондрий: роль в митохондриальной дисфункции**

Доминирующая роль митохондрий в продукции АТФ, реализации процессов программируемой гибели клеток, генерации АФК и депонировании ионов кальция предопределяет участие нарушений митохондриальных функций в развитии многих патологических процессов [84].

Согласно хемиосмотической гипотезе Митчелла, АТФ синтезируется при окислительном фосфорилировании в матриксе митохондрий. ЭТЦ катализирует окисление субстратов кислородом и перенос пары электронов к протонным насосам для формирования электрохимического градиента на внутренней

мембране митохондрий. АТФ синтезируется  $F_0F_1$ -АТФ-синтазой, использующей свободную энергию, высвобождаемую при обратном поступлении протонов из межмембранного пространства в матрикс митохондрий [60, 90]. Таким образом, сохранение протонного градиента является жизненно необходимым для клетки [238].

Дизрегуляция кальциевого гомеостаза играет важнейшую роль в клеточном повреждении [211]. Показано, что увеличение концентрации этих ионов в цитоплазме способствует индукции высвобождения танатогенных факторов из митохондрий, инициирует процессы липолиза в мембранах органелл и нарушает функционирование дыхательных комплексов. Установлено, что ионы кальция активируют белки, способствующие формированию митохондриальных каналов: *Vax* и *Vid*, за счет активизации кальпаинов, а также *Vad* и *Vik*, посредством активации кальцинейрина [84]. Перемещение избыточного количества ионов кальция в матрикс митохондрий может привести к открытию неспецифической поры повышенной проницаемости, МРТР [84, 169].

Известно, что митохондрии являются одним из основных источников АФК. В процессе одноэлектронного восстановления кислорода в комплексах I и III дыхательной цепи образуется побочный продукт – супероксидный анион-радикал, из которого в результате как ферментативных, так и неферментативных реакций могут образоваться пероксид водорода, гидроксильный радикал и другие АФК [41]. В функционально полноценных митохондриях действие митохондриальной антиоксидантной системы (включающей глутатион, тиоредоксин-2, глутатион-пероксидазу, фосфолипид-гидропероксид-глутатион-пероксидазу и Mn-супер-оксиддисмутазу) предотвращает повреждение митохондриальных структур АФК. При нарушении переноса электронов между компонентами дыхательной цепи, генерация митохондриями супероксидного анион-радикала существенно усиливается. Одним из последствий окислительного стресса в митохондриях является окисление тиоловых групп мембранных белков,

приводящее к формированию белковых агрегатов с высокой молекулярной массой [75].

Считается, что избыточный уровень АФК может также способствовать уменьшению сократительной активности кардиомиоцитов и кальциевой чувствительности миофиламентов, вследствие нарушения в миокарде ионообменных процессов, возникающих в результате повреждения клеточных мембран и ионных каналов [84].

Известно, что митохондрии играют центральную роль в реализации всех трех типов программируемой гибели клеток: апоптоза, аутофагии и некрозоподобного типа. В межмембранном пространстве митохондрий локализованы белки, принимающие участие в реализации программируемой гибели клеток после высвобождения их в цитоплазму [84]. Среди таких белков есть неактивные предшественники каспаз (прокаспаза -2, -3, -9) – ферментов, принимающих непосредственное участие в реализации танатогенной программы, ингибиторы белков, блокирующих апоптоз (Smac/DIABLO, Omni/HtrA2) и непосредственные индукторы программы клеточной гибели: цитохром С, активирующий каспазы, эндонуклеаза G и AIF, инициирующие клеточную гибель по независящему от каспаз механизму.

Механизмы выхода проапоптотических белков из митохондрий являются предметом активных дискуссий. На сегодняшний день одним из основных механизмов этого процесса признается формирование митохондриальных апоптотических пор и митохондриальных пор повышенной проницаемости, МРТР.

#### **1.4.2.1 Современные представления о порах повышенной проницаемости**

Жидкокристаллическая природа биологических мембран подразумевает существование в нем дефектов, связанных с дестабилизацией структуры, развитие которых приводит к формированию гидрофобной поры, эволюционирующей в

гидрофильную сквозную пору. Поры могут затекать, что приводит к стабилизации мембраны, либо увеличиваться с превышением критического размера, что, в конечном счете, обуславливает разрыв пленки [7].

В 70-х годах прошлого столетия было обнаружено, что олеат в присутствии ионов кальция может индуцировать во внутренней мембране митохондрий неспецифическую пору для низкомолекулярных веществ [58]. Более поздние исследования показали возможность формирования разных состояний поры в физиологических и нефизиологических условиях [250]. На сегодняшний день обсуждаются два механизма образования митохондриальных пор: классической циклоспорин А (циклоспорин А) - чувствительной поры (МРТР) и циклоспорин А-нечувствительной кальций/пальмитат - активируемой поры.

В случае образования циклоспорин А-нечувствительной поры возникновение неспецифической проводимости связывают с образованием комплекса жирной кислоты (в частности, пальмитата) и ионов кальция на внутренней поверхности мембраны митохондрий [16-18, 65]. Было показано, что пальмитат-индуцируемая пора короткоживущая и способна самопроизвольно закрываться. При этом со временем происходит восстановление мембранного потенциала на внутренней мембране митохондрий практически до исходного уровня. Пальмитат-активируемая пора нечувствительна к циклоспорину А и атрактилозиду – модуляторам классической поры. Однако было показано, что сильным ингибитором пальмитат-индуцируемой поры выступают ионы магния. Это может быть связано с ингибированием кальциевого унипортера или с экранированием отрицательного поверхностного заряда мембраны, что, в свою очередь, препятствует связыванию пальмитиновой кислоты с ионами кальция [16]. Изучение данной поры начато сравнительно недавно, поэтому остается еще много невыясненных вопросов: ее значение, компоненты, модуляторы.

Формирование циклоспорин А-чувствительной поры (МРТР) связывают с достижением критической концентрации ионов кальция в митохондриях, окислительным стрессом, повышенным уровнем неорганического фосфата ( $P_i$ ) и

истощением уровня адениловых нуклеотидов [100, 161, 168, 169, 187, 188]. Митохондриальные поры чувствительны к редокс-потенциалу, ионам кальция, мембранному потенциалу, адениловым нуклеотидам,  $P_i$  и рН. Считается, что ингибиторами пор являются адениловые нуклеотиды (АДФ/АТФ) и сниженное значение рН [238].

МРТР проницаемы для воды, ионов и любых веществ с молекулярный массой менее 1,5 кДа. Таким образом, открытие пор индуцирует вход молекул с низким молекулярным весом в матрикс митохондрий, приводя к выравниванию их концентрации по обе стороны внутренней мембраны. Однако митохондриальные белки остаются в матриксе и повышают коллоидно-осмотическое давление, что сопровождается набуханием матрикса. Поскольку площадь поверхности внутренней мембраны за счет крист намного больше, чем внешней, то последняя может разрываться, в то время как целостность внутренней мембраны относительно не меняется [87]. Разрыв внешней мембраны может быть ассоциирован с высвобождением проапоптотических белков в цитоплазму, что в свою очередь может запускать апоптоз [65, 168, 188]. В то же время доказано, что митохондриально-индуцированный апоптоз может запускаться по механизму, независящему от формирования МРТР, вследствие высвобождения проапоптотических белков из межмембранного пространства. Это может быть связано со способностью проапоптотического белка Вах взаимодействовать с другим проапоптотическим белком Bid с формированием канала во внешней мембране митохондрий и тем самым способствовать высвобождению цитохрома С [188].

МРТР могут быть мишенью для различных фармакологических агентов, препятствующих открытию МРТР, как непосредственным взаимодействием с компонентами поры, так и за счет понижения уровня индукторов МРТР, таких как АФК, ионы кальция и рН [188].

Прямым действием обладают циклоспорин А, санглиферин А, АДФ, бонгкрековая кислота, двухвалентные катионы (магний, марганец, стронций,



барий) и протоны. В качестве активаторов МРТР выступают АФК, ионы кальция, высокая концентрация  $P_i$ , истощение пула адениновых нуклеотидов, атрактилозид [160, 161, 168, 188].

Открытие пор приводит к тому, что мембрана становится свободно проницаемой для протонов. Это разобщает процессы окислительного фосфорилирования таким образом, что АТФ-синтаза начинает работать в реверсивном режиме и активность гидролиза АТФ становится больше, чем его синтез. При этом внутриклеточные запасы АТФ быстро истощаются, что приводит к нарушению ионного и метаболического гомеостаза и активации таких ферментов, как фосфолипазы, нуклеазы и протеазы, что приведет необратимым повреждениям в клетке, заканчивающимся некрозом [168].

#### 1.4.2.2 Компоненты классической циклоспорин А – чувствительной митохондриальной поры

Несмотря на обширные исследования, точный молекулярный состав МРТР остается до конца неизученным. Недавно были общепризнаны три молекулы, как ключевые структурные компоненты митохондриальной поры (рис. 1.4.2-1).

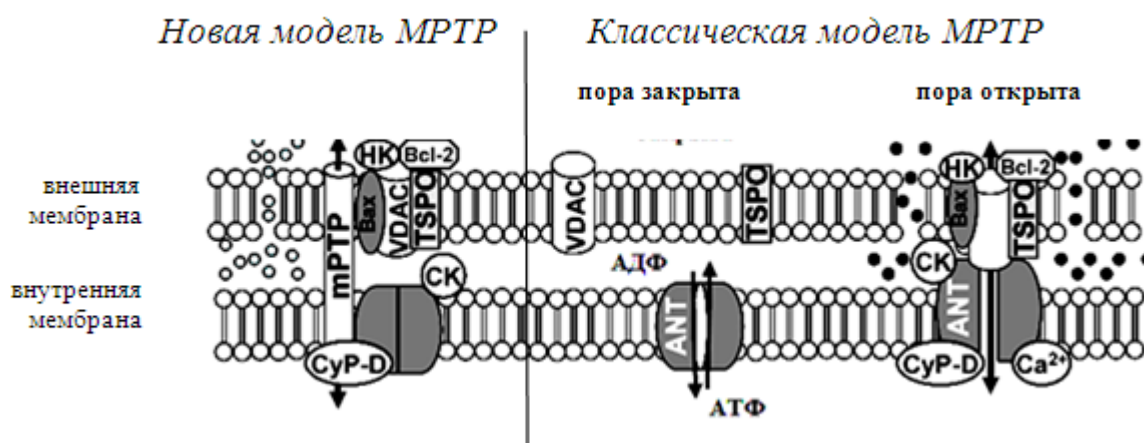


Рисунок 1.4.2-1 Компоненты митохондриальной поры

МРТР – митохондриальная пора повышенной проницаемости; НК – гексокиназа; Вах – проапоптотический белок Вах; VDAC – потенциал-зависимый анионный канал; Bcl-2 – проапоптотический белок Bcl-2; TSPO – периферический бензодиазепиновый рецептор; СК – креатинкиназа; CyP-D – циклофилин Д; ANT – транслоказа адениловых нуклеотидов.

Это транслоказа адениловых нуклеотидов во внутренней мембране, циклофиллин D в матриксе и потенциал зависимый анионный канал (VDAC) внешней мембраны митохондрий [103, 168, 169, 211, 238].

Регуляторную роль в формировании МРТР исполняют такие белки, как периферический бензодиазепиновый рецептор, креатинкиназа, гексокиназа и белки семейства Vcl-2. В настоящее время большинство современных исследований подвергают сомнению значение VDAC как основного компонента митохондриальной поры, а аденилаттранслоказу рассматривают скорее как регулятор, нежели структурный компонент поры. Совсем недавно появились доказательства в пользу переносчика  $P_i$  ( $P_iC$ ), как возможного ключевого структурного компонента МРТР [188].

*Транслоказа адениловых нуклеотидов.* Аденилаттранслоказа (АНТ) осуществляет перенос АТФ и АДФ через внутреннюю мембрану митохондрий. Найдены две гомологичные изоформы АНТ1 и АНТ2, присутствующие у мышей, и третья изоформа АНТ3 - у человека.

Аденилаттранслоказа взаимодействует с CyP-D (вторым компонентом МРТР) в контактных сайтах между внутренней и внешней митохондриальными мембранами, способствуя формированию поры [103,167]. Модель функционирования АНТ предполагает существование переносчика в двух конформационных состояниях, отличающихся ориентацией единственного нуклеотидсвязывающего центра. В состоянии “с” конформации этот центр доступен со стороны цитоплазмы, а в состоянии “m” конформации – со стороны матрикса [60]. Кальций-индуцируемое набухание митохондрий может быть ингибировано бонгкрековой кислотой и АДФ [160, 161] за счет снижения их чувствительности к ионам кальция [188] и стабилизации переносчика в “m” конформации. В то же время карбоксиатрактинат (кАтр) – высокоспецифичный конкурентный ингибитор АНТ – стабилизирует “с” конформацию, усиливая набухание митохондрий [160, 161].

Несмотря на множество данных, подтверждающих роль аденилаттранслоказы как ключевой молекулы МРТР, исследования с АНТ-нокаутными мышами показали, что ее участие не всегда необходимо для формирования поры. На митохондриях, изолированных из печени животных с дефицитом АНТ1 и АНТ2, продемонстрировано циклоспорин-чувствительное открытие поры, хотя этот процесс требовал более высоких концентраций ионов кальция, чем дикий тип митохондрий [188].

*Циклофиллин Д.* СуР-D является митохондриальной изоформой закодированного в ядре циклофиллина с молекулярным весом 18 кДа [188]. Этот протеин митохондриального матрикса является членом семейства цис-транс пептидилпролил-изомераз [211], которые катализируют ротацию пролина в связанном пептиде, индуцируя конформационные изменения в белке-мишени. Хотя физиологическая роль СуР-D остается неизвестной, его патологическая роль в качестве компонента МРТР общепризнана [103]. Открытие МРТР является следствием взаимодействия СуР-D с транслоказой адениновых нуклеотидов, как показано на рис. 1.4.2-2.

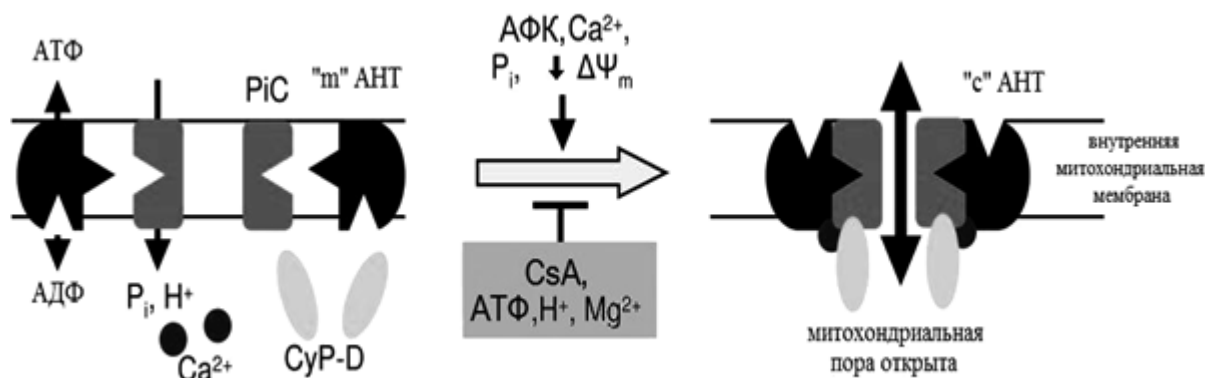


Рисунок 1.4.2-2 Предполагаемый механизм открытия МРТР

“m” АНТ – состояние “m” конформации адениловой транслоказы; “c” АНТ – состояние “c” конформации адениловой транслоказы; СуР-D – циклофиллин Д; CsA – циклоспорин А; P<sub>i</sub>C – переносчик неорганического фосфата; P<sub>i</sub> – неорганический фосфат; ΔΨ<sub>m</sub> – снижение разности электрохимического потенциала на внутренней мембране митохондрий.

“С” конформации АНТ придается большое значение для доступа СуР-D к остатку пролина (про-61), который обращен в матрикс, то есть этот остаток скрыт

в “m” конформации. Известно, что ионы кальция в матриксе могут связываться с транслоказой с формированием “с” конформации [160, 161]. Таким образом, в присутствии ионов кальция и в отсутствие связывания адениновых нуклеотидов с переносчиком, пептидилпролил-изомераза связывает пролин в 61-м положении и способствует стабилизации конформационных изменений транслоказы, что, в свою очередь, приводит к формированию МРТР [160, 161, 168]. Важным доказательством вовлечения СуР-D в формирование МРТР являются исследования с митохондриями СуР-D-нокаутных мышей, которые демонстрировали низкую чувствительность к ионам кальция, задержку открытия МРТР и нечувствительность пор к циклоспорино А [188].

*Потенциал-зависимый анионный канал.* VDAC семейство представлено тремя изоформами VDAC1, 2 и 3. Известно, что VDAC облегчает транспорт АТФ/АДФ через внешнюю мембрану митохондрий [103]. Изначально предполагалось, что VDAC является необходимым компонентом мегаканала МРТР, так как электрофизиологические свойства МРТР подобны свойствам VDAC. При этом комплекс VDAC-АНТ-СуР-D ведет себя подобно МРТР, является кальций-зависимым каналом и чувствителен к циклоспорино А [188]. Дополнительным доказательством стали исследования, демонстрирующие предотвращение кальций-индуцированного открытия МРТР в митохондриях за счет действия VDAC1-связывающих убихиноновых аналогов, таких как UQ<sub>0</sub> и Ro 68-3400 [188]. Однако позднее было показано, что эти препараты могут ингибировать открытие пор в VDAC<sup>-/-</sup> митохондриях. К тому же, в протеолипосомах был реконструирован митохондриальный канал, подобный поре, в отсутствие VDAC, а митохондрии, дефицитные по VDAC1, все еще проявляют чувствительность к циклоспорино А [103]. При дефиците всех трех изоформ VDAC митохондрии демонстрируют такую же степень открытия МРТР, как и нормальные митохондрии [188]. Таким образом, вопрос об участии VDAC как необходимого компонента МРТР остается открытым.

*Переносчик неорганического фосфата.* Роль переносчика фосфата  $P_iC$  в формировании митохондриальной поры недавно была продемонстрирована в исследованиях, показывающих, что  $CyP-D$  связывается с  $P_iC$  в  $CsA$ -чувствительном месте и это взаимодействие увеличивается за счет окислительного стресса [188].

Митохондриальный фосфатный переносчик посредством метода белковой инженерии был идентифицирован как  $CyP-D$ -связывающий белок [212]. Показано, что агенты, индуцирующие неспецифическую митохондриальную проницаемость, усиливают взаимодействие между  $P_iC$  и  $CyP-D$ , а блокирующие эту проницаемость компоненты редуцируют данное взаимодействие. Важно, что агенты, которые способны ингибировать активность митохондриального транспорта  $P_i$ , также блокируют МРТР в изолированных митохондриях. Все вышесказанное приводит к предположению, что  $P_iC$  является компонентом МРТР [103].

В тех случаях, когда сердце систематически испытывает повышенную потребность в кислороде, в миокарде наступают структурные изменения и масса сердца, в целом, увеличивается, главным образом, за счет гипертрофии отдельных кардиомиоцитов. В патологических условиях масса сердца может становиться больше критической и наступает кислородное голодание многих участков миокарда, гибель части кардиомиоцитов и нарушение нормальной структуры сердца. Патологическая гипертрофия структурно-сохранившегося миокарда и фиброз на месте гибели отдельных клеток сопровождаются постепенным ослаблением силы сокращений с прогрессированием сердечной недостаточности, ассоциированной со снижением энергетического метаболизма, нарушением транспорта ионов кальция, генерацией АФК, которые вместе могут способствовать открытию МРТР [3, 8,84, 85, 103, 253, 254, 278]. Однако вопрос о функциональном назначении МРТР остается открытым: или это один из защитных механизмов, направленных на поддержание жизнедеятельности страдающей клетки, или это один из этапов запуска программируемой гибели.

## 1.5 Метаболизм жирных кислот в миокарде при ишемии и сердечной недостаточности

Ишемия миокарда возникает при нарушении коронарного кровотока, и, как следствие, снабжение кислородом сердечной мышцы является недостаточным для удовлетворения потребности сердца. Последствия ишемии миокарда зависят от характера и тяжести ишемического эпизода и последующего восстановления кровотока (реперфузии). В нормальном сердце энергетический обмен и функция сердца находятся в идеальном соответствии, однако ишемия вызывает нарушение баланса между окислением ЖК и глюкозы. При ишемии увеличивается уровень катехоламинов, что приводит к увеличению циркулирующих СЖК в плазме крови из-за усиления липолиза в жировой ткани, подавления секреции инсулина поджелудочной железой и периферической чувствительности к инсулину [274]. Увеличение концентрации циркулирующих СЖК во время и после ишемии, таким образом, увеличивает доставку ЖК в миокард, что, в свою очередь, может изменять утилизацию ЖК. Основным источником окислительного метаболизма в этих условиях является  $\beta$ -окисление ЖК [149, 220] без относительно существенного увеличения окисления углеводов [258]. Хотя гликолиз может предоставить ограниченное количество АТФ при ишемии, однако приводит к накоплению лактата и  $H^+$  [274], которые могут еще больше усугубить ионные нарушения, вызванные ишемией. Соответственно, гликолитический АТФ при ишемии расходуется в большей мере на восстановление ионного гомеостаза.

Известно, что при тотальной ишемии происходит накопление восстановительных эквивалентов в форме НАДН и ФАДН<sub>2</sub>. Ферменты  $\beta$ -окисления ЖК, ацил-КоА-дегидрогеназа и 3-гидроксиацил-КоА-дегидрогеназа, чувствительны к окислительно-восстановительному состоянию матрикса (соотношению НАД<sup>+</sup>/НАДН и ФАД/ФАДН<sub>2</sub>). Ингибирование  $\beta$ -окисления ЖК вследствие накопления восстановительных эквивалентов может привести к накоплению производных ЖК в клетке: ацилкарнитина - в митохондриях и

цитозоле, ацил-КоА – преимущественно в митохондриях [183]. Накопление эфиров ацилкарнитина и ацил-КоА способствует разрушению митохондриальных крист, что в конечном итоге может нарушить функции митохондрий [190].

Изменения в субклеточном контроле  $\beta$ -окисления ЖК также способствуют изменениям их метаболизма в миокарде при ишемии [329]. Ишемия миокарда сопровождается быстрой активацией АМФ-ПК и последующим фосфорилированием и торможением АКК [202, 203]. Эти изменения в сочетании с относительным увеличением активности МКД приводят к уменьшению содержания в миокарде малонил-КоА при ишемии [314]. Уменьшение содержания малонил-КоА снимает торможение КПТ1, что позволяет увеличить  $\beta$ -окисление ЖК вследствие увеличения входа ЖК в митохондрии. Эти эффекты способствуют вкладу  $\beta$ -окисления ЖК в производство АТФ при ишемии миокарда [149]. Таким образом, во время реперфузии, темпы  $\beta$ -окисления ЖК быстро восстанавливаются до преишемического уровня, в то время как сократительная функция остается сниженной [235]. Восстановление  $\beta$ -окисления ЖК за счет окисления глюкозы способствует разобщению метаболизма глюкозы, так как гликолиз преобладает над окислением пирувата, что усугубляет внутриклеточный ацидоз и уменьшает восстановление сердечной деятельности, несмотря на восстановление коронарного кровотока [218].

Количество молекул АТФ при потреблении одного атома кислорода ЭТЦ при окислительном фосфорилировании варьируется в зависимости от энергетического субстрата, используемого для генерации восстановительных эквивалентов (НАДН и ФАДН<sub>2</sub>) в митохондриях [176]. Для сравнения, полное окисление 1 молекулы пальмитата генерирует 105 молекул АТФ и потребляет 46 атомов кислорода, в то время как полное окисление 1 молекулы глюкозы генерирует 38 молекул АТФ и потребляет 12 атомов кислорода. Поэтому использование ЖК в качестве субстрата энергетически более выгодно в плане выработки АТФ, но это требует большего потребления кислорода, чем

использование глюкозы. Соответственно, пальмитат является менее "кислород-эффективным" энергетическим субстратом для синтеза АТФ.

Заметное уменьшение выработки АТФ при ишемии приводит к ингибированию  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы, которая имеет решающее значение в регулировании мембранного потенциала покоя [108]. Нарушение функции  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы приводит к внутриклеточной  $\text{Na}^+$ -перегрузке клетки. Нормализация внеклеточного рН в постишемический период создает большой градиент рН, содействуя  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  - обмену через плазматическую мембрану, и это еще больше усугубляет внутриклеточную перегрузку  $\text{Na}^+$ . Это, в свою очередь, способствует  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  обмену [102] и развитию событий, связанных с избытком внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ , таких как контрактура, митохондриальная дисфункция, активация  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых протеаз, и, как кульминации, гибели кардиомиоцитов. На сегодняшний день хорошо известно, что нарушение деятельности саркоплазматической  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы, перегрузка кардиомиоцитов ионами  $\text{Ca}^{2+}$  и снижение чувствительности сократительных белков к  $\text{Ca}^{2+}$  является главным определяющим фактором патофизиологии ишемической и постишемической сократительной дисфункции.

Сердечная недостаточность оказывает серьезное воздействие на метаболизм ЖК через системный и сердечно-специфические механизмы [314]. Показано, что скорость поглощения и окисления СЖК в кардиомиоцитах была снижена у пациентов с дилатационной кардиомиопатией; при этом артериальная концентрация СЖК не отличалась от контрольной группы [244]. Поглощение СЖК отрицательно коррелирует с расширением камеры ЛЖ, а низкая скорость поглощения и  $\beta$ -окисления СЖК сохранялась во время и после острой стрессовой стимуляции [244]. У пациентов с неишемической идиопатической дилатационной кардиомиопатией (с гипертрофией ЛЖ и ФВ ЛЖ - 27%) поглощение и  $\beta$ -окисление ЖК были снижены на ~ 40%, а усвоение глюкозы увеличено в два раза в сравнении с контрольной группой [126]. При этом не наблюдалось различий в показателях артериального давления, уровня СЖК и инсулина в плазме,



коронарном кровотоке и потреблении кислорода миокардом, в сравнении со здоровыми добровольцами [126]. В целом клинические данные показывают, что при отсутствии значительного увеличения концентрации СЖК в плазме, наблюдается значительное снижение скорости  $\beta$ -окисления ЖК при развитой сердечной недостаточности как в абсолютном выражении, так и в соответствии с потреблением кислорода миокардом.

Результаты, полученные на моделях сердечной недостаточности у животных, поддерживают концепцию снижения  $\beta$ -окисления ЖК при сердечной недостаточности. Исследования с использованием модели сердечной недостаточности у собак с тахикардией показали прогрессивное снижение поглощения и окисления ЖК [248, 270]. С другой стороны, на собаках с сердечной недостаточностью умеренной тяжести, вызванной микроэмболизацией коронарных сосудов, показано нормальное окисление СЖК и глюкозы [119], несмотря на серьезные нарушения в функциональной активности митохондрий [275]. У крыс с хронической коронароокклюзией показано, что через два месяца после инфаркта, при явной дисфункции ЛЖ, наблюдалось нормальное потребление кислорода и окисление пальмитата миокардом [273]. Однако через 6 месяцев после инфаркта показано снижение окисления пальмитата в сердце крыс [174]. Аналогичное снижение окисления СЖК наблюдали у животных с гипертрофией ЛЖ и сократительной дисфункцией, вызванными пережатием аорты, перегрузкой ЛЖ объемом или хронической спонтанной гипертензией [223]. Таким образом, при сердечной недостаточности у модельных животных наблюдается снижение темпов окисления ЖК.

В большинстве литературных источников поддерживается концепция, что основные дефекты в митохондриях сердца при сердечной недостаточности связаны с аппаратом дыхания и окислительного фосфорилирования, ЭТЦ [245, 314]. Известно, что митохондрии сердца при развитой сердечной недостаточности характеризуются более низкой способностью к дыханию и окислительному фосфорилированию [245, 314]. При исследовании функции митохондрий сердца

собак с индуцированной ишемической сердечной недостаточностью обнаружено уменьшение АДФ-стимулированного дыхания на 40 - 50% [275]. Это уменьшение было примерно одинаковым при использовании в качестве субстратов пальмитил КоА, пальмитилкарнитина, глутамата, пирувата, или сукцината в сочетании с ротеноном [275]. Хотя это свидетельствует о дефектах окислительного фосфорилирования на уровне ЭТЦ, показано, что активность отдельных комплексов ЭТЦ и ферментов ЦТК при этом сохранялась нормальной [119, 275]. Содержание суперкомплекса, включающего комплексы I, III и IV [132, 345, 346], при этом снижалось. Предполагается, что митохондриальный дефект при сердечной недостаточности заключен в надмолекулярной сборке, а не в отдельных компонентах ЭТЦ [153, 275]. Пока неизвестно, как и какие агенты влияют на сборку и функции ЭТЦ при сердечной недостаточности.

### **1.6 Метаболизм жирных кислот при ожирении и сахарном диабете**

При ожирении и сахарном диабете увеличивается интрамиокардиальный пул ТГ, вследствие повышения циркулирующих СЖК и ТГ, увеличения поглощения ЖК и интрамиокардиальной синтеза ТГ [223]. Несмотря на накопление ТГ в диабетическом сердце, эти запасы могут быть быстро мобилизованы, независимо от уровня СЖК [251]. При перфузии диабетического сердца крысы без экзогенных ЖК окисление глюкозы обеспечивает менее 20% от общей потребности сердца в АТФ [283]. При стрептозотоциновом диабете у крыс сердце почти полностью зависит от  $\beta$ -окисления ЖК как источника ацетил-КоА в ЦТК при перфузии с глюкозой и пальмитатом [285].

Сердечная гиперэкспрессия PPAR $\alpha$ , приводящая к изменениям, подобным возникающим при сахарном диабете 2 типа, резко повышала  $\beta$ -окисление ЖК с последующим снижением потребления и окисления глюкозы [145]. При моделировании диабета 1 типа также показано значительное усиление  $\beta$ -окисления ЖК [195]. Кроме того показано, что у больных с диабетом 1 типа и

диабетом 2 типа с ожирением наблюдается повышенное поглощение и окисление ЖК [175, 264, 265]. Эти данные свидетельствуют о преобладании  $\beta$ -окисления ЖК при ожирении и инсулинрезистентности, но не о нарушении  $\beta$ -окисления ЖК.

Существуют обширные данные, что резистентность к инсулину, наблюдаемая при сахарном диабете, метаболическом синдроме, ожирении, или малоподвижном образе жизни, как правило, сопровождается увеличением циркулирующих СЖК, ТГ, глюкозы и инсулина. С другой стороны, появляется все больше доказательств того, что при диабете 2 типа и гиперинсулинемии чувствительность к инсулину в сердце человека мало меняется или не меняется совсем, сравнительно с контролем, независимо от уровня СЖК [223]. Аналогичные результаты были получены на генетически модифицированных мышцах с диабетом 2 типа [164, 165], поддерживая тем самым общую концепцию, что при диабете 2 типа реакция на инсулин в сердце относительно сохранена [234]. Это отличает сердечную мышцу от скелетных мышц и жировой ткани, в которых наблюдается инсулинрезистентность при повышенной концентрации глюкозы и СЖК в плазме крови.

При ожирении и сахарном диабете увеличение концентрации циркулирующих СЖК играет важную роль в регуляции метаболизма ЖК из-за увеличения поступления субстратов. ЖК могут напрямую изменять экспрессию ферментов метаболизма ЖК, так как ЖК и их производные могут служить в качестве эндогенных лигандов ядерных рецепторов PPAR семейства, PPAR $\alpha$  и его коактиватора PGC-1 [146, 180, 230, 341], что особенно важно в сердце [116, 242]. Активация ЖК этих ядерных рецепторов повышает окислительную способность сердца [154, 155].

Ранние метаболические изменения при ожирении и диабете происходят независимо от изменений в PPAR $\alpha$ /PGC-1 [94, 97], но при хроническом переизбытке и ожирении повышается активность PPAR $\alpha$ /PGC-1, в результате чего происходит увеличение мРНК белков, которые контролируют  $\beta$ -окисление ЖК [94, 116, 145]. У стрептозотоцин-диабетических крыс активация PPAR $\alpha$  была

связана с длительным увеличением липидов в плазме крови [97]. Ряд исследований показал большую выраженность генов-мишеней PPAR $\alpha$ , PGC-1 при диабете 1 и 2 типов [133, 145]. Показано, что гиперэкспрессия PPAR $\alpha$  в сердце у мышей ускоряет  $\beta$ -окисление ЖК и ухудшает способность использовать глюкозу, как при диабете [133, 145].

Изменениями в PPAR $\alpha$  и PGC-1 можно частично объяснить подавление метаболизма глюкозы при ожирении и сахарном диабете. Гиперэкспрессия PPAR $\alpha$  значительно снижает мРНК и экспрессию белка-транспортера глюкозы (GLUT4) [145]. Кроме того, у PPAR $\alpha$ -нулевых мышей не наблюдалось снижения уровня GLUT4 и поглощения глюкозы, подобных снижению у мышей дикого типа при увеличении по разным причинам концентрации циркулирующих СЖК [257]. У мышей с гиперэкспрессией PPAR $\alpha$  снижалась скорость окисления глюкозы в сердце [178], в то время как мыши, лишённые PPAR $\alpha$ , увеличивали темпы окисления глюкозы [287].

Изменения в малонил-КоА-опосредованной регуляции КПП1 и транспорта ЖК в митохондриии играют важную роль в ускорении  $\beta$ -окисления ЖК при ожирении и сахарном диабете. Сердце при стрептозотоциновом диабете у крыс почти полностью зависит от  $\beta$ -окисления ЖК как источника ацетил-КоА в ЦТК при перфузии с глюкозой и пальмитатом [285]. При этом наблюдалось увеличение активности МКД в диабетической группе [285]. Показано увеличение уровня мРНК МКД в сердце при снижении уровня малонил-КоА в сердце при стрептозотоциновом диабете животных [223]. Так как МКД является ферментом, ответственным за деградацию малонил-КоА в сердце, можно предположить, что снижение уровня малонил-КоА и торможения КПП1 вносят вклад в ускорение  $\beta$ -окисления ЖК у больных сахарным диабетом.

Предварительные данные показывают, что МКД также играет роль в увеличении  $\beta$ -окисления ЖК при ожирении, поскольку у мышей с диет-индуцированным ожирением наблюдается увеличение  $\beta$ -окисления ЖК, связанное с повышенной экспрессией МКД [148, 222]. Показана высокая

активность МКД в сердце при сахарном диабете, истощении или высокожировой диете, обусловленная увеличением СЖК вследствие повышенной экспрессии МКД [223].

При ожирении и сахарном диабете происходит увеличение потребления кислорода и снижение эффективности работы сердца, наблюдаемое у животных [112, 116] и людей [264, 265] из-за затрат на окисление ЖК. Хотя подобное снижение эффективности работы сердца наблюдается в ряде исследований, с другой стороны, некоторые исследования демонстрируют нормальную эффективность работы сердца у тучных животных с гипергликемией, несмотря на увеличение  $\beta$ -окисления ЖК [308, 328]. Предполагается, что ускоренное окисление ЖК и/или кетоновых тел и, реципрокно, снижение окисления глюкозы, приводят к снижению функции сердца у больных диабетом 1 типа. Интересно, что преодоление вызванного ЖК торможения окисления глюкозы с помощью прямой стимуляции ПДГ восстанавливает сократительную активность сердца у крыс со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом [247].

Возможным механизмом увеличения потребления кислорода и снижения эффективности работы сердца при ожирении и сахарном диабете может быть увеличение потребности в АТФ для неконтрактильных целей. В ряде моделей ожирения и диабета обнаружена митохондриальная дисфункция, как компенсаторный механизм на определенном этапе развитии патологии [302, 323-325]. Ожирение и сахарный диабет сопровождается увеличением потребления кислорода и  $\beta$ -окисления ЖК в сердце, и при этом наблюдается разобщение в митохондриях, о чем свидетельствует снижение P/O и увеличение протонной утечки [112, 133]. Возможный механизм разобщения окисления и фосфорилирования в митохондриях представляет собой увеличение активности и/или количества разобщающих белков, в частности UCP3, в сердцах животных с ожирением и диабетом [112, 116, 242]. В дополнение к этому, было показано участие адениннуклеотидтранслоказы (АНТ) в индуцированном ЖК разобщении в митохондриях: АНТ1, основная изоформа АНТ во взрослом сердце, участвует в

транспорте анионов ЖК из митохондрий в цитозоль [58]. В дополнение к митохондриальному разобщению, кислород также может быть использован для других неконтрактивных процессов, таких как этерификация ЖК и генерация АФК. Митохондриальная дисфункция при ожирении и сахарном диабете частично может быть объяснена увеличением производства АФК и последующим окислительным стрессом [112, 215, 302]. Снижение эффективности работы сердца может происходить вследствие усиления циркулирования ЖК между матриксом митохондрий и цитозолем и затратами АТФ на цитозольные и митохондриальные реакции в кардиомиоцитах при стрептозотоциновом диабете и высокожировой диете [223].

### **1.7 Липотоксичность сердца: спорные вопросы**

Накопление в миокарде липидных метаболитов (ТГ и церамидов) при ожирении и диабете связано с сердечной патологией, которая проявляется увеличением апоптоза кардиомиоцитов, фиброзом миокарда, увеличением камер ЛЖ, сократительной дисфункцией и нарушением диастолического наполнения. Это общее явление наблюдали на нескольких генетических моделях мышей и крыс, и оно получило общепризнанное название "липотоксичность сердца" [12]. Спорным является вопрос о причине накопления липидных метаболитов в сердце при ожирении и сахарном диабете 2 типа: является ли это следствием чрезмерного поступления ЖК или же нарушения окисления имеющихся ЖК [142, 222]. Предполагается, что именно снижение темпов  $\beta$ -окисления ЖК играет важную роль в накоплении липидных метаболитов в сердце.

Было высказано предположение, что снижение экспрессии PPAR $\alpha$  и ферментов  $\beta$ -окисления ЖК является причиной интрамиокардиального накопления липидов и способствует сердечной дисфункции, что иногда наблюдается при ожирении и диабете [122, 123]. Высокожировая диета приводила к значительному увеличению массы тела и накоплению ТГ и церамидов в

миокарде крыс с установленной инфаркт-индуцированной сердечной недостаточностью, но при этом не наблюдалось отрицательного влияния на объем камеры, массу и давление в ЛЖ [237]. Эти данные не позволяют утверждать, что липидные накопления в сердце наносят большой ущерб при сердечной недостаточности.

При исследования сердца при ожирении / инсулинрезистентности у человека и грызунов в большинстве случаев не наблюдали снижения  $\beta$ -окисления ЖК [223]. Важно также отметить, что у мышей с диет-индуцированным ожирением не наблюдали какой-либо сердечной дисфункции, несмотря на серьезное накопление длинноцепочечных ацил-КоА [322]. Ингибирование КПП1 на фоне высокожировой диеты у крыс вызывало более значительное повышение уровня ТГ, чем при просто высокожировой диете, однако и это не приводило к развитию гипертрофии сердца или его дисфункции [252].

Отдельного внимания требует рассмотрение роли жировой ткани, которую ранее считали пассивным резервуаром энергии. На сегодняшний день доказано, что жировая ткань является эндокринным органом, способным отслеживать изменения в энергетическом метаболизме в целом организме и отдельных органах [326]. Жировая ткань синтезирует и выделяет ряд гормонов, таких как лептин, адипонектин, сывороточный ретинол-связывающий белок-4, резистин и визфатин, а также провоспалительные цитокины, включая интерлейкин (IL)-6 и фактор некроза опухоли- $\alpha$  [326]. Циркулирующие концентрации лептина, сывороточного ретинол-связывающего белка-4, резистина, и визфатина положительно коррелируют с уровнем адипонектина и отрицательно – с жировой массой и накоплением жира в скелетных мышцах и/или печени и резистентностью к инсулину [152, 159, 163, 262, 298, 315].

Лептин может модулировать метаболизм жирных кислот в сердце. Обработка лептином изолированного работающего сердца крысы повышает  $\beta$ -окисление экзогенных и эндогенных ЖК и приводит к уменьшению интрамиокардиального пула ТГ [101]. Подобно лептину, адипонектин

стимулирует  $\beta$ -окисление ЖК и поглощение ЖК, увеличивая уровень FАТР1 [214, 255]. Интересно, что ограничение калорийности пищи приводит к значительному повышению уровня адипонектина [307]. Адипонектин защищает сердце при ишемии / реперфузии *in vitro* [157] и *in vivo* [304, 319], а также при развитии гипертрофии сердца [303]. Через АМФ-ПК-зависимый механизм [105] адипонектин способствует сохранению сократительной способности миокарда, ограничению зоны инфаркта и гипертрофии миокарда, улучшению коронарного кровотока, ингибированию апоптоза [157, 303, 304, 319].

Эпидемиологические исследования показывают, что тучные люди имеют снижение продолжительности жизни, более высокий риск развития сердечной недостаточности и большую смертность от сердечно-сосудистых заболеваний. Однако у пациентов с диагнозом сердечная недостаточность и ожирением парадоксально снижена смертность в сравнении с худыми пациентами [127, 207, 208]. Также показано, что кахексия является положительным прогностическим фактором смертности при сердечной недостаточности, и потеря веса в значительной степени связана с неблагоприятным исходом [127, 314]. К тому же, не хватает убедительных доказательств того, что у тучных людей с хронически повышенным уровнем ТГ и СЖК в плазме наблюдается интрамиокардиальное накопление липидов или сердечно-сосудистая патология является липид-индуцированной [222]. Проявление липотоксичности наблюдается в основном в экспериментах на модельных животных [12]. Таким образом, требуются дальнейшие исследования, чтобы определить истинное значение накопления липидов и развития липотоксичности в сердце животных и человека.

## **1.8 Модуляция метаболизма жирных кислот как терапевтический подход: за и против**

Модуляция метаболизма энергетических субстратов миокарда, в частности, смещение от использования ЖК к использованию глюкозы в качестве



окислительного топлива для повышения сохранения механической функции и эффективности сердца, лежит в основе современной терапии при различных формах ишемической болезни сердца и сердечной недостаточности. В последнее время уделяется значительное внимание фармакологическим средствам, которые препятствуют  $\beta$ -окислению ЖК в пользу использования глюкозы в качестве энергетического субстрата [136, 139, 186, 314, 321, 323, 340]. Изменение баланса между окислением ЖК и глюкозы может быть вызвано с помощью фармакологических средств, которые действуют на разных этапах метаболизма ЖК и глюкозы. Что касается метаболизма ЖК, эффекты могут быть получены путем изменения концентрации циркулирующих субстратов, усвоения ацил-КоА в митохондриях, а также путем изменения процесса  $\beta$ -окисления ЖК, как прямо, так и косвенно, через стимулирование окисления пирувата.

*Антилипидемические средства.* Статины (симвастатин, флувастатин, розувастатин и др.) являются общепризнанными и неоспоримыми средствами для лечения и профилактики атеросклероза и связанных с ним острых и хронических заболеваний, а также хорошо переносимыми среди всех гиполипидемических средств [6, 11, 13]. Гиполипидемическое действие статинов связано со снижением уровня холестерина за счет ЛПНП [68]. В зависимости от дозы статины снижают уровень этого липопротеина на 45-55%. Важным их свойством является то, что они не только эффективно снижают уровни общего холестерина и ЛПНП, но и повышают содержание липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), обладающих выраженным анти-атеросклеротическим действием. Кроме этого, некоторые из статинов могут достаточно успешно снижать концентрацию ТГ [68]. Положительные эффекты статинов связаны не только с подавлением биосинтеза холестерина в гепатоцитах, что приводит к снижению ЛПНП, ТГ, но и наличием многочисленных плейотропных эффектов. Статины вызывают увеличение биодоступности NO, стабилизацию атеросклеротической бляшки, антитромботическое, мягкое антигипертензивное, антиаритмическое, антиоксидантное и иммуномодулирующее действия, а также улучшение

эластичности артерий и эндотелиальной функции [23, 10]. Клиническую эффективность статинов в кардиологии трудно переоценить [13, 68]. Однако хорошая переносимость и доказанная в ходе II/III фаз клинических испытаний безопасность статинов внезапно была подвержена сомнению после серии смертельных исходов вследствие рабдомиолиза и почечной недостаточности при применении церивастатина, послужившего причиной его снятия с рынка в 2001 г. [9]. Рабдомиолиз, некроз скелетных мышц, обусловлен лизисом клеток поперечно-полосатых мышц, сопровождающийся уменьшением объема циркулирующей крови, снижением почечного кровотока, острой почечной недостаточностью, шоком. Наибольшее число статиновых рабдомиолизом относилось к церивастатину, наименьшее – на флувастатин и ловастатин. Видно также, что возраст играет предрасполагающую роль в развитии рабдомиолиза: у лиц в возрасте до 50 лет включительно это осложнение наблюдалось в среднем у 7,7% больных, подавляющее большинство осложнений наблюдалось у лиц среднего (51%) и пожилого (17,4%) возраста. Рабдомиолиз является крайне опасным осложнением: более половины больных (53,6%) нуждалось в госпитализации независимо от вида статина, вызвавшего рабдомиолиз (при аторвастатине – 45,1%); 7,8% больных с рабдомиолизом погибли. Несколько большая частота смертей (10,9%) при развившемся рабдомиолизе наблюдалась при лечении ловастатином [9]. Помимо рабдомиолиза, могут наблюдаться и другие побочные реакции: миозит (особенно у больных с высокой температурой тела), повышение активности печеночных ферментов, кожная сыпь, бессонница, периферическая нейропатия, аллергические реакции (волчаночноподобные симптомы, возникающие при применении препарата более 6 месяцев) [6]. Не так давно появились данные об опасности резкого прекращения приема статинов у больных с явлениями острого атеротромбоза (мозговой инсульт, острый коронарный синдром) [141]. У больных острым коронарным синдромом внезапное прекращение приема статинов достоверно повышает риск смерти и развития тромботических осложнений, в то время как у больных стабильной

стенокардией прекращение приема этих лекарственных средств не сопровождается повышением риска нежелательных событий. У больных острым ишемическим инсультом внезапное прекращение приема статинов связано с более высоким риском развития ранних неврологических осложнений и неблагоприятным прогнозом [141].

Для борьбы с дислипидемиями самостоятельно, или в комбинации со статинами, используются фибраты, производные фиброевой кислоты [34]. В клинической практике используется клофибрат, гемфиброзил, безафибрат, ципрофибрат и фенофибрат. Механизм действия фибратов связывают с изменением активности липопротеинлипазы и, таким образом, липолиза. Кроме того, под действием фибратов происходит активация транспортных белков переноса ЖК в печень и ацил-КоА-синтетазы, что увеличивает окисление липидов [34]. Считают, что фибраты увеличивают сродство ЛПНП к соответствующим рецепторам, в результате чего процесс захвата и утилизации ЛПНП ускоряется. Фибраты могут увеличивать экспрессию и активность экстракардиальных FACS [292], что может способствовать увеличению связывания ЖК цитозольными белками в печени и почках и сердце [261]. Кроме того, они повышают экспрессию ферментов  $\beta$ -окисления ЖК в печени [124]. В совокупности, эти эффекты усиливают экстракардиальное  $\beta$ -окисление ЖК и снижают концентрацию циркулирующих СЖК, тем самым снижая поступление и  $\beta$ -окисление ЖК в сердце. Экспериментальные исследования показали кардиопротекторные эффекты фибратов, в частности, сокращение размера зоны инфаркта [330] и улучшение постишемического восстановления сердечной функции [267]. Все эти эффекты связывают со стимуляцией PPAR $\alpha$  и, соответственно, активацией многочисленных генов, ответственных за обмен липидов. Однако фибраты в сочетании со статинами увеличивают опасность проявления побочных эффектов, таких как рабдомиолиз.

*Тиазолидиндионы.* Тиазолидиндионы (росиглитазон, пиоглитазон и др.), группа противодиабетических препаратов, являются синтетическими агонистами

PPAR- $\gamma$ , а соответственно, могут влиять на ингибирование или повышения экспрессии значительного количества генов, включая участвующих в контроле углеводного и жирового обмена, микроциркуляции, свертывающей системы и воспалительного ответа организма. В результате увеличивается активность транспортеров глюкозы, липопротеинлипазы и других ферментов, активируется липогенез в жировых клетках, уменьшается поступление свободных жирных кислот в другие ткани, снижается возможность развития инсулинрезистентности в мышцах и печени [4, 5]. Экспериментальные исследования показывают, что снижение тиазолидиндионами концентрации циркулирующих ТГ и СЖК в плазме [343] содействует поглощению глюкозы и лактата из крови и окислению глюкозы [308, 343]. Эти изменения в поступлении энергетических субстратов и обмена веществ в миокарде улучшают постишемическое восстановление функции сердца [343]. Несмотря на способность тиазолидиндионов побуждать эти потенциально полезные изменения в метаболизме миокарда, их использование в клинической практике может быть не совсем желателен: тиазолидиндионы создают эффект увеличения задержки жидкости и периферических отеков из-за их сосудорасширяющего эффекта у пациентов с диабетической сердечной недостаточностью [217]. Использование тиазолидиндионов увеличивает риск инфаркта миокарда и смерти у больных сахарным диабетом 2 типа [217, 249]. Механизмы, лежащие в основе повышения риска развития инфаркта миокарда при использовании тиазолидиндионов, остаются неизвестными, однако, это может быть связано с неблагоприятными изменениями в профиле циркулирующих липопротеинов, в частности, увеличения концентрации ЛПНП, а также повышения внутрисосудистого объема и потребления кислорода [249]. Тиазолидиндионы препятствуют отложению липидов в нежировых тканях и, таким образом, могут способствовать ожирению за счет увеличения поглощения липидов в жировой ткани. Кроме того, агонисты PPAR $\gamma$  могут уменьшить экспрессию фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), экспрессию рецепторов VEGF 1 и 2, а также ингибировать VEGF-индуцированный ангиогенез [339].

Насколько выражены эти эффекты в коронарном кровообращении, неизвестно, тем не менее, вполне возможно уменьшение образования коллатеральных сосудов в условиях ИБС, что может способствовать увеличению риска развития инфаркта миокарда. Обнаружены различия в клинических исходах при применении различных тиазолидиндионов и осознается необходимость контроля над показателями обмена свободных радикалов при применении данной группы лекарственных средств [5].

*Ингибиторы поглощения и окисления жирных кислот в митохондриях.* Фармакологические препараты, которые ингибируют КПП1, а, соответственно, и поглощение ЖК митохондриями, такие как этоксомир, пергекселин и ранолазин, могут оказывать антиишемический эффект с помощью модуляции метаболизма ЖК. Экспериментальные исследования показывают, что антиишемический эффект этих соединений связан с увеличением окисления глюкозы в миокарде за счет подавления  $\beta$ -окисления ЖК [223].

В экспериментальных моделях ишемии и реперфузии этоксомир улучшал восстановление функции желудочка после ишемии [223]. Этот кардиопротекторный эффект также проявляется в постишемическом диабетическом сердце. Защитный эффект этоксомира в постишемического период сопровождается усилением темпов окисления глюкозы и увеличением производства и использования АТФ для сокращения сердца путем стимуляции ПДГ в сердце [223]. Однако недавнее исследование по влиянию этоксомира на восстановление окисления глюкозы (ERGO) было досрочно остановлено [177]. Не было обнаружено какого-либо значительного улучшения в группе, получающей этоксомир по сравнению с плацебо, а у части пациентов с сердечной недостаточностью ФК NYHA II-III установлены повышенные уровни печеночных трансаминаз [177].

Пергекселин используют в качестве антиишемического средства при лечении стенокардии [98], однако его применение было ограничено из-за обнаруженных неблагоприятных эффектов, включая такие как печеночная

токсичность (стеатоз и некроз) и периферическая нейропатия [209, 210]. Возможно, что это связано с и накоплением фосфолипидов, вторичным процессом по отношению к торможению КПТ1 [98].

Триметазидин является частичным ингибитором  $\beta$ -окисления ЖК, который конкурентно ингибирует 3-КАТ, терминальный фермент  $\beta$ -окисления ЖК. Триметазидин клинически используется при антиангинальной терапии в более чем в 90 странах мира [260]. Триметазидин, препятствуя  $\beta$ -окислению ЖК, увеличивает окисление глюкозы [221] и ослабляет гликолиз, что снижает производство  $H^+$  и ацидоз. Ингибирование гликолиза в сочетании с увеличением окисления глюкозы и частичным торможением  $\beta$ -окисления ЖК может ограничивать стимулированное ишемией нарушение ионного гомеостаза в миокарде. В частности, показано, что улучшение метаболизма глюкозы снижает внутриклеточный ацидоз, а также  $Na^+$  и  $Ca^{2+}$  перегрузку при ишемии и последующей реперфузии и улучшает постишемическое восстановление функции сердца. Триметазидин снижает ишемическое повреждение кардиомиоцитов за счет поддержания  $Ca^{2+}$ -гомеостаза: уменьшает  $Ca^{2+}$  ток, предотвращает увеличение  $[Ca^{2+}]_i$ , и сохраняет активность  $Ca^{2+}$ -АТФазы саркоплазматического ретикулума, что защищает клетку от  $Ca^{2+}$  перегрузки [223].

Эффекты триметазида в экспериментальных исследованиях могут быть экстраполированы на клинические условия, где препарат эффективен при лечении стенокардии, инфаркта миокарда и сердечной недостаточности. Частичное торможение  $\beta$ -окисления ЖК через обратимое конкурентное ингибирование 3-КАТ, ослабляет по крайней мере частично, некоторые последствия различных форм ишемической болезни сердца. Однако длительная терапия триметазидином может приводить к хореиформным нарушениям и лекарственному паркинсонизму [229, 232, 309, 312]. Следует отметить, что триметазидин не мешает накоплению СЖК и их недоокисленных продуктов в митохондриях.

Справедливые опасения высказаны в работе [233], посвященной терапии ранолозином и триметазидином при стенокардии напряжения. Автор строит

простую логическую цепочку: эти препараты подавляют окисление ЖК не только в сердечной мышце, таким образом, уровень СЖК в плазме будет расти постепенно, но неуклонно. Увеличение СЖК приведет к увеличению тканевого уровня липидов и метаболитов, таких как ацил-КоА, ТГ, диацилглицерол, церамиды. В печени при снижении окисления жирных кислот можно ожидать увеличение секреции ТГ и аполипопротеина В, что способствует развитию атеросклероза и эндотелиальной дисфункции. Эти эффекты могут быть усилены при более длительных сроках лечения. Таким образом, указанные препараты первоначально могут помочь предотвратить боль и (возможно) аритмии путем содействия обеспечению адекватного уровня АТФ в миокарде при стенокардии напряжения, но эта выгода может быть только временной, и за счет обострения синдрома инсулинрезистентности, со всеми рисками патогенных изменений. В конечном счете, резюмирует автор, анитангинальная польза будет потеряна - но у пациента будет ожирение и инсулинорезистентность.

### **1.9 Заключение**

В арсенале современной кардиологии существует целый ряд препаратов, направленных на липидный метаболизм, так как повышение уровня циркулирующих ЖК, интрамиокардиальное накопление ТГ и преобладание  $\beta$ -окисления ЖК над окислением глюкозы являются одной из важнейших причин нарушения функции кардиомиоцитов при ишемическом и диабетическом повреждении миокарда. По этой причине метаболическая терапия включает в себя регуляцию синтеза холестерина и соотношения ЛПНП/ЛПВП, снижение интенсивности метаболизма ЖК путем торможения их поглощения и  $\beta$ -окисления в митохондриях сердца. Однако, как следует из вышеизложенного, несмотря на несомненно высокое цитопротекторное действие подобного рода препаратов, имеются данные, ставящие под сомнение эффективность такого подхода. Так, сердце при диабете почти полностью зависит от  $\beta$ -окисления ЖК [283, 285], а

окисление глюкозы обеспечивает <20% от общей потребности сердца в АТФ [322, 324], что увеличивает роль ЖК как субстрата окисления. В клинических и экспериментальных исследованиях при разных формах сердечной недостаточности в большинстве случаев показано значительное снижение  $\beta$ -окисления ЖК, а следствием именно этого является накопление липидных метаболитов и дисфункция сердца. Ингибирование  $\beta$ -окисления ЖК может способствовать развитию инсулинрезистентности, атеросклероза и эндотелиальной дисфункции [233]. Длительное вмешательство в липидный метаболизм приводит к тяжелым последствиям: гепатотоксичности и периферической нейропатии (этоксомир, пергекселин, статины) [177, 210], хореiformным нарушениям и лекарственному паркинсонизму (триметазидин) [229, 232, 309, 312]; рабдомиолизу и острой почечной недостаточности (статины) [9]. Торможение окисления ЖК ограничивает способность сердца реагировать на длительный стресс [239], возможно, за счет нарушения компенсаторных процессов с участием ЖК. Секреция адипонектина жировой тканью эпикарда [182] защищает сердце при ишемии / реперфузии и гипертрофии сердца [157, 303, 304, 319]. ТГ сохраняют ЖК до возможности их эффективного окисления [115], а ЖК-стимулированное увеличение синтеза липинов повышает чувствительность клеток к инсулину [266]. ЖК-стимулированное повышение активности липопротеинлипазы, может увеличивать поглощение и  $\beta$ -окисление ЖК в митохондриях диабетического сердца [268, 269, 271]. Таким образом, все вышеперечисленное является свидетельством важной роли ЖК как активаторов альтернативных метаболических процессов, направленных на сохранение и поддержание сердца в патологических условиях.



## Глава 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Создание экспериментальных моделей

С целью исследовать и показать неспецифичность ответной реакции миокарда на патологическое воздействие, нами были выбраны две разные известные модели повреждения сердца. «Механическая» ишемия была вызвана окклюзией левой нисходящей коронарной артерии. Моделированием стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета создавали «метаболическую ишемию» - такое определение диабетического поражения миокарда получило из-за того, что нарушения метаболизма при диабете очень похожи на последствия ишемического поражения миокарда [3]. Несмотря на изначально разные причины, в конечном счете, в обеих ситуациях патологические последствия связывают с накоплением и нарушением метаболизма жирных кислот [3, 115, 223].

Исследования проведены на половозрелых крысах-самцах (250-300 г) линии Вистар. Были сформированы следующие экспериментальные группы (рис. 2.1-1, табл. 2.1-1):

I группа - контроль - интактные животные;

II группа - животные после моделирования инфаркта;

III группа - животные с индуцированным сахарным диабетом;

IV группа – постинфарктные животные со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом;

V группа – животные, у которых после индукции сахарного диабета вызывали инфаркт миокарда.

Для исключения из исследования крыс с низкой устойчивостью к гипоксии [49], животных брали в исследование не ранее, чем через 2 недели после моделирования патологии.

В процессе всего экспериментального исследования крысы находились в стандартных условиях вивария, при достаточном объеме воды и пищи и

ежедневной смене подстилочного материала, под постоянным контролем состояния животных. Все эксперименты на животных проводились в строгом соответствии положениям Федерального Закона «О защите животных от жестокого обращения» (1997 г.), Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (ЕЭС, Страсбург, 1985 г.), приказу Министерства здравоохранения СССР № 755 "Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных" (1977 г.), приказу Министерства здравоохранения РФ № 267 «Правила лабораторной практики в Российской Федерации» (2003 г.).

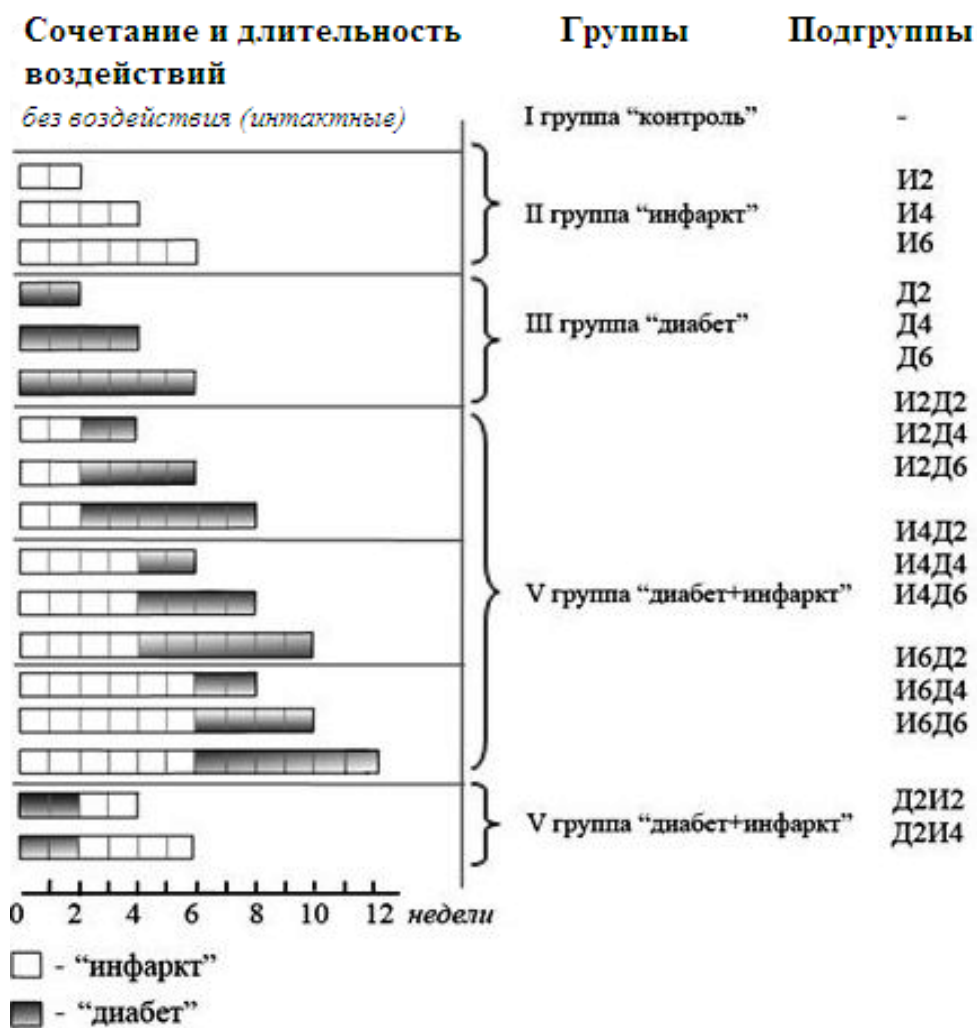


Рисунок 2.1-1 Вариации длительности и сочетаний прямого («инфаркт») и опосредованного («диабет») экспериментальных воздействий: обозначение групп и подгрупп в них

Таблица 2.1-1

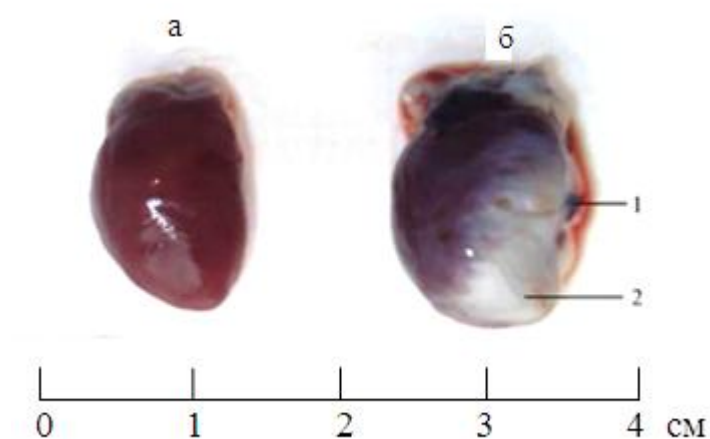
Обозначения экспериментальных групп и подгрупп,  
количество животных в группах

Обозначение подгрупп в группах	Срок от моделирования первой патологии, до моделирования второй патологии, недели	Срок от моделирования второй патологии до забоя, недели,	Общая длительность патологии, недели	Число животных в группе (n)
<b>I группа - интактные животные (контроль)</b>				
-	-	-	-	20
<b>II группа – инфаркт (И2-И6):</b>				
И2	2	-	2	20
И4	4	-	4	20
И6	6	-	6	20
<b>III группа – диабет (Д2-Д6):</b>				
Д2	2	-	2	20
Д4	4	-	4	20
Д6	6	-	6	20
<b>IV группа - инфаркт+диабет (И2-6+Д2-6):</b>				
И2Д2	2	2	4	20
И2Д4	2	4	6	20
И2Д6	2	6	8	20
И4Д2	4	2	6	20
И4Д4	4	4	8	20
И4Д6	4	6	10	20
И6Д2	6	2	8	20
И6Д4	6	4	10	20
И6Д6	6	6	12	20
<b>V группа - диабет+инфаркт (Д2+И2-4):</b>				
Д2И2	2	2	4	10
Д2И4	2	4	6	10

### 2.1.1 Моделирование прямого повреждения сердца

Моделирование прямого повреждения сердца проводили вызванным инфарктом миокарда, вследствие перевязки левой коронарной артерии [42]. Под эфирным рауш-наркозом рассекали кожу и подкожную жировую клетчатку, ткани отделяли по фасции, грудные и межреберные мышцы разъединяли вдоль хода волокон. После вскрытия грудной клетки сердце выводили в операционную рану,

левую коронарную артерию в верхней трети перевязывали лигатурой. После операции рану послойно ушивали, предварительно удалив воздух из грудной полости.

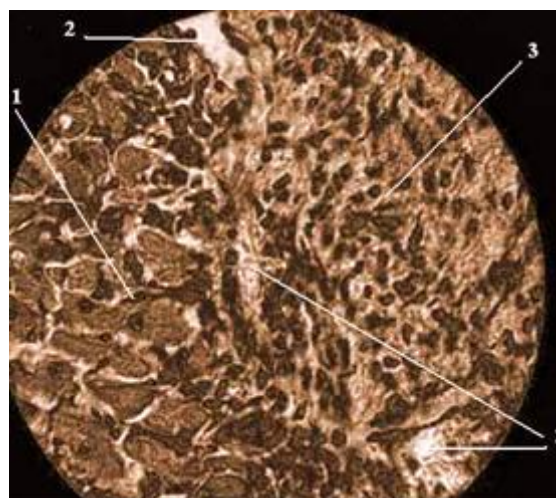


*Рисунок 2.1.1-1 Типичный вид интактного сердца крысы и сердца после коронароокклюзии*

а – сердце контрольного животного; б – сердце животного через 40 суток после коронароокклюзии; 1 – место наложения лигатуры; 2 – зона рубца.

*Рисунок 2.1.1-2 Поперечный срез левого желудочка крысы, через 6 недель после экспериментальной коронароокклюзии*

Увеличение -  $\times 200$ ; 1 – структурно сохранившийся миокард; 2 – рубцовая ткань; 3 – участок миокарда с измененной структурой.



Через 40 суток после наложения лигатуры развивался постинфарктный кардиосклероз (рис. 2.1.1-1 и 2.1.1-2). Развитие постинфарктных изменений верифицировали морфологически, гипертрофию миокарда определяли по соотношению массы сердца к массе тела ( $M_c/M_t$ ) и массы левого желудочка к массе сердца ( $M_{лж}/M_c$ ) [1, 14, 15]. Выживаемость животных через 40-45 суток после коронароокклюзии составляла около 70-75%. При этом нужно отметить, что основная смертность животных наблюдалась в первую неделю после

операции, в дальнейшем возникали единичные случаи гибели животных. Зона некроза левого желудочка составляла, в среднем, около 12% от общей массы левого желудочка (табл. 2.1.1-1).

Таблица 2.1.1-1

Весовые показатели животных на 40-е сутки после экспериментальной коронароокклюзии миокарда крысы ( $M \pm m$ )

Показатель, г	Контроль	Коронароокклюзия
Вес тела	287 ± 23,1	237 ± 3,1
Вес сердца	0,96 ± 0,05	1,45 ± 0,02*
Вес левого желудочка	0,62 ± 0,04	0,96 ± 0,01*
Вес поврежденного участка	0	0,11 ± 0,01*

*Примечание.* \* -  $p < 0,05$  в сравнении с контрольным показателем.

### 2.1.2 Моделирование опосредованного поражения миокарда

Опосредованное повреждение миокарда вызывали индукцией сахарного диабета однократным введением стрептозотоцина («Sigma», США) в дозе 60 мг/кг внутрибрюшинно, разведенного 0,01 моль/л цитратным буфером (pH 4,5) [30]. Верификацию стрептозотин-индуцированного диабета осуществляли по увеличению концентрации глюкозы в крови крыс в 3-4,5 раза, снижению массы тела, развитию полиурии и полидипсии. Изменения в структуре миокарда определяли морфологическими методами.

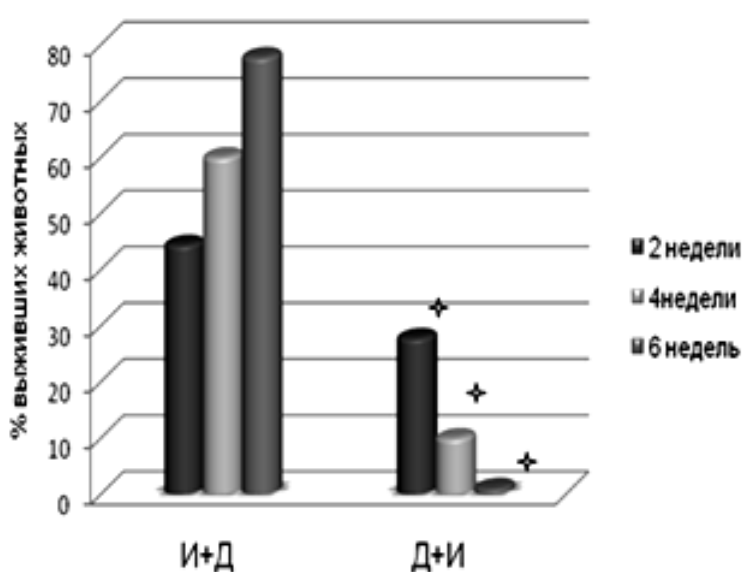
### 2.1.3 Моделирование комбинированного воздействия

Модель комбинированного воздействия была разработана на основе известных технологий моделирования инфаркта миокарда и стрептозотин-индуцированного диабета [14]. Главной задачей, помимо исследования в

контрольной группе и группах прямого или опосредованного поражения миокарда, являлось исследование экспериментальной модели комбинированного воздействия в двух модификациях: а) предшествование прямого воздействия («инфаркт») опосредованному («диабет»), б) предшествование опосредованного воздействия («диабет») прямому («инфаркт»). Изучение материала предполагало исследование в следующих точках:

1. Через 2, 4 и 6 недель после коронароокклюзии животным вводили стрептозотцин и исследовали материал через 2, 4 и 6 недель после моделирования диабета. Таким образом, сформировали 9 подгрупп IV экспериментальной группы (табл. 2.1-1).

2. Аналогичным образом, была сделана попытка сформировать еще 9 подгрупп V экспериментальной группы, в которых введение стрептозотцина предшествует коронароокклюзии. Однако по причине высокой смертности животных в этой экспериментальной модели удалось получить только две подгруппы животных (табл. 2.1-1). Выживаемость отдельных животных в других подгруппах была статистически не значима (рис. 2.1.3-1).



*Рисунок 2.1.3-1. Динамика выживаемости крыс в группах комбинированного воздействия.*

Примечание: 2, 4, 6 недель – срок первой патологии, на котором производили моделирование второй патологии; И+Д - IV группа; Д+И – V группа; + -  $p < 0,05$  в сравнении с соответствующей подгруппой в IV группе

## 2.2 Получение изолированных кардиомиоцитов

Изолированные кардиомиоциты являются во многом идеальным объектом исследования молекулярных механизмов функциональной активности кардиомиоцитов. Сложный ансамбль молекулярно-клеточных событий, обуславливающих согласованное протекание физиологических процессов в кардиомиоцитах, опосредуется через большое количество биологических медиаторов, соответствующие им рецепторы и сигнальные трансдукторные пути. Изолированные кардиомиоциты обладают тем преимуществом, что свободны от влияния биологически активных веществ (в норме имеющихся в плазме и межклеточной жидкости), находятся в контролируемом спокойном состоянии, когда на их функциональную активность не оказывают влияние другие типы клеток. Все это позволяет более уверенно идентифицировать механизмы действия тех или иных модуляторов функциональной активности клеток в норме и при патологии.

Выделение кардиомиоцитов требует соблюдения достаточно жестких условий, таких как температура, ионный состав среды хранения, pH, содержания кислорода в среде и т.д. Для получения качественных и жизнеспособных кардиомиоцитов исследователи включают в стандартный солевой раствор множество дополнительных компонентов, таких как различные аминокислоты, антибиотики, витамины, АТФ, ЭГТА и т.п. Все это приводит к появлению многочисленных модификаций метода получения изолированных кардиомиоцитов. На основании проведенного обширного анализа литературных данных и апробации известных методов была разработана собственная методика получения изолированных кардиомиоцитов (патент РФ на изобретение № 2279145 от 27.06.06).

Кардиомиоциты выделяли из сердца взрослой крысы. Для выделения применяли реактивы фирмы Sigma (растворы готовили на деионизованной воде). После декапитации крысы сердце немедленно извлекали и помещали в ледяную

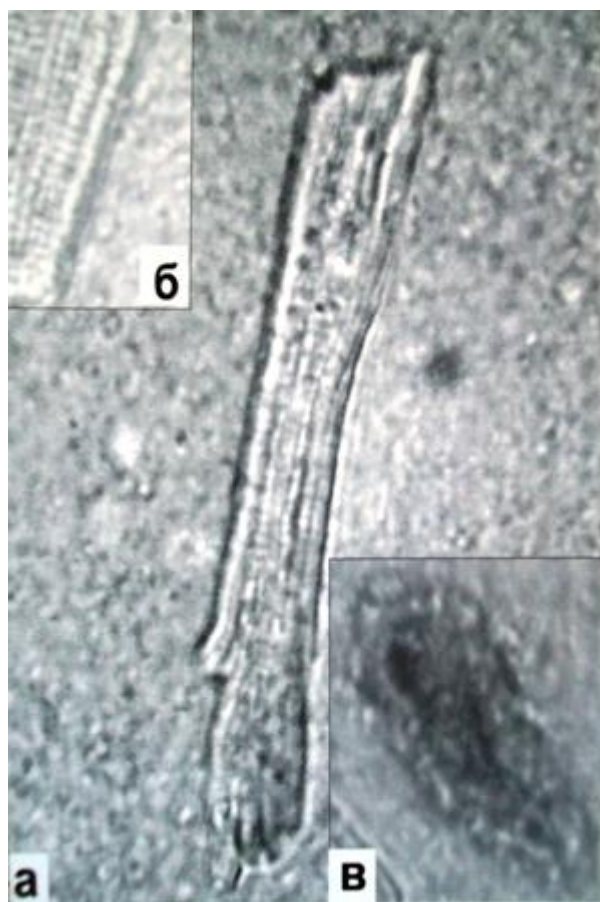
среду выделения (Кребс-Хенселейт буфер, рН 7,4). Затем сердце помещали в перфузионную камеру и канюлировали через аорту. Последующие 5-10 минут сердце отмывали от крови Кребс-Хенселейт буфером, содержащим (в мМ): 118 NaCl, 4,7 KCl, 1,25  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,3  $\text{MgSO}_4$ , 10 глюкозу, 1,2  $\text{CaCl}_2$ , 10 HEPES, рН 7,4.

В течение всей процедуры выделения буфер насыщали чистым кислородом и поддерживали температуру  $35^\circ\text{C}$ . Через сердце буфер прокачивали перистальтическим насосом со скоростью 4 мл/мин. После отмывания от крови сердце 5 минут перфузировали Кребс-Хенселейт буфером, не содержащим ионы кальция. Затем, в течение 20 минут - Кребс-Хенселейт буфером с низким содержанием кальция (0,25 мМ) и ферментов: коллагеназы (0,2 мг/мл) и проназы (0,1 мг/мл), рН 7,4. Еще 20 минут сердце обрабатывали буфером, содержащим только проназу (0,1 мг/мл), рН 7,4. Далее сердце отмывали от ферментов, продолжая перфузию низкокальциевым буфером (рН 7,4) в течение 10 минут. Отмытое сердце снимали с канюли и помещали в 10 мл Кребс-Хенселейт буфера с концентрацией кальция 0,25-1 мМ. Удалив крупные сосуды, сердце разрезали на кусочки  $1-2 \text{ мм}^3$  и осторожно ресуспендировали с помощью большой автоматической пипетки в течение 1 минуты. В случае неполного разделения для удаления оставшихся кусочков суспензию процеживали через двойной слой марли.

Для хранения клеток использовали Кребс-Хенселейт буфер комнатной температуры с концентрацией кальция 1 мМ, рН 7,4. Для увеличения продолжительности жизни клеток, в течение эксперимента суспензию с кардиомиоцитами хранили при температуре  $+4 - +8^\circ\text{C}$ .

Подсчет жизнеспособных клеток проводили в гемоцитометре, используя для окраски поврежденных клеток 0,4% трипановый синий. Клетки просматривали в световом микроскопе “Биолан-1” (Россия) и фотографировали цифровым фотоаппаратом Hitachi (Япония).





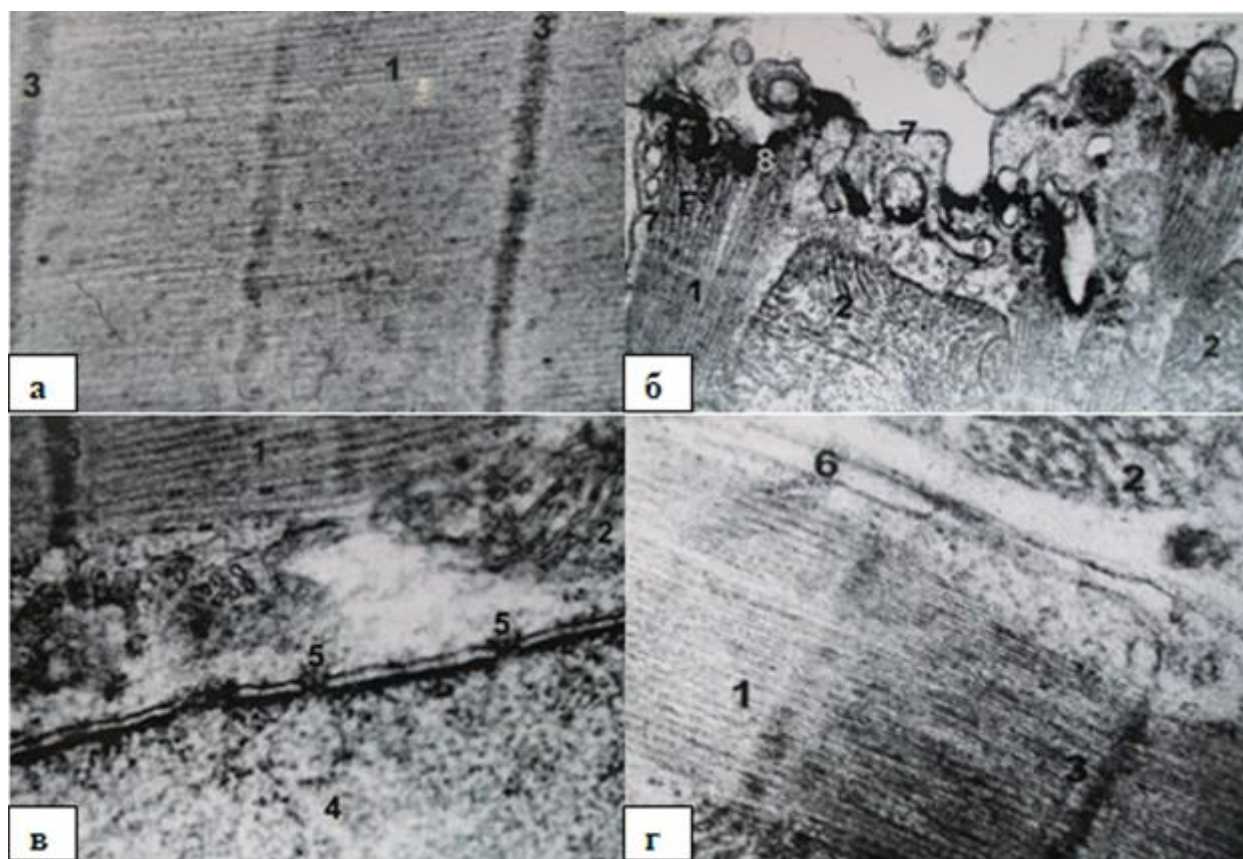
*Рисунок 2.2-1 Изолированный кардиомиоцит взрослой крысы в среде хранения с 0,4% трипановым синим*

а – нормальный кардиомиоцит, x1000;  
 б – участок нормального кардиомиоцита, x1500;  
 в – погибший кардиомиоцит, заполненный красителем, x1500

Для исследования морфологии клеток при помощи электронного микроскопа свежевыделенные клетки осаждали при 50g в течение 5 минут. Осадок фиксировали 2.5% глютаровым альдегидом в 0.1 М растворе какодилата натрия (рН 7,4) при 4°C. После фиксации клетки дважды отмывали в какодилатным буфером (рН 7,4), затем фиксировали в 1% растворе четырехокси осмия с последующим двукратным отмыванием какодилатным буфером. Полученный материал дегидратировали в этиловых спиртах восходящей концентрации. Препараты заливали в арадилат. Ультратонкие срезы толщиной 30-60 нм готовили на ультратоме “Ultratom 111” (Швеция), наносили на сетки с формваровым покрытием и контрастировали 2% уранил-ацетатом и цитратом свинца. Полученные препараты просматривали в электронном микроскопе “JEM-100CX11” (“JEOL”, Япония) с апертурной диафрагмой 25-30 мкм при ускоряющем напряжении 80 кВ. Использование предлагаемого способа позволяет получать 10-12 млн. изолированных кардиомиоцитов из одного сердца. Процент

жизнеспособных клеток составлял 70-80%. Клетки имели классическую цилиндрическую форму, хорошо выраженную поперечно-полосатую исчерченность и неровные концы в области вставочных дисков (рис. 2.2.-1.).

Размеры клеток варьировались от 10 до 25 мкм в ширину и от 50 до 120 мкм в длину. На электронных микрофотографиях хорошо просматривалась типичная структурная организация кардиомиоцита (рис.2.2-2).



*Рисунок 2.2-2 Продольный срез изолированного кардиомиоцита*

а – участок миофибриллы, х32500; б – область вставочных дисков, х26500; участок ядра с ядерными порами, х53300; участок миофибриллы с прилегающим саркоплазматическим ретикулом и митохондриями, х53800.

1 – миофибриллы; 2 – митохондрии; 3 – Z-полоска; 4 – ядро; 5 – поры в ядерной мембране; 6 – саркоплазматический ретикулум; 7 – сарколемма; 8 – место прикрепления миофибрилл.

Сарколемма, митохондрии, саркоплазматический ретикулум (СПР) и миофибриллы имели характерный вид; наблюдались упорядоченная организация

саркомеров и хорошо выраженные Z-полоски, четкое расположение миофиламентов (рис.2.2-2, а).

Кардиомиоциты имели ядро овальной формы, расположенное почти по центру клетки, на его мембране хорошо различаются нормально расположенные ядерные поры (рис. 2.2-2, в). В области вставочных дисков мембрана имеет неоднородную структуру (рис. 2.2-2, б). Миофибриллы разделены СПР и митохондриями (рис. 2.2-2, г), достаточно плотно упакованы и занимают практически все внутриклеточное пространство.

Полученные результаты свидетельствовали о нормальной структуре выделенных клеток и позволили использовать предложенный метод для мягкого разделения ткани сердца на отдельные кардиомиоциты.

Скорость потребления кислорода кардиомиоцитами исследовали полярографическим методом (раздел 2.5), используя в качестве среды инкубации Кребс-Хенселейт буфер (118 мМ NaCl, 4,7 мМ KCl, 1,25 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,3 мМ  $\text{MgSO}_4$ , 10 мМ глюкоза, 2 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 10 мМ HEPES, pH 7,4).

### **2.3 Получение изолированных митохондрий сердца**

Функциональная активность органов и согласованное протекание физиологических процессов в клетках обусловлено, в первую очередь, многочисленными процессами, протекающими в митохондриях. Митохондрии являются главным местом энергопродукции в клетках. Мутации генов ядерного и митохондриального геномов (под контролем которых одновременно находятся белки дыхательной цепи) приводят к нарушению процесса окислительного фосфорилирования и, как следствие, ухудшению энергетического метаболизма, что служит «благоприятным» фоном для возникновения различных патологических состояний. Митохондрии, полученные из сердечной мышцы, имеют некоторые преимущества перед митохондриями других тканей: они

остаются стабильными, сохраняя способность к окислению и фосфорилированию в течение недели при температуре хранения - 4°C [256].

Для работы использовали свежее выделенное, неповрежденное сердце, которое немедленно помещали в ледяной раствор 0.9% KCl (около 50 мл) и тщательно отмывали от крови. Отмытое сердце очищали от жира, соединительной ткани, вырезали сосуды, из внутренних полостей удаляли сгустки крови, и еще раз отмывали ткань. Мышцу взвешивали, и измельчали ножницами до почти гомогенного состояния в чашке Петри, стоящей на льду. Измельченную мышцу переносили в охлажденный стеклянный гомогенизатор с тефлоновым пестиком (гомогенизатор Поттера-Эльвегейма) и добавляли (из расчета 10 мл среды на 1 грамм ткани) сахарозную среду выделения (0.3 М сахараза, 10 мМ ЭДТА, 10 мМ HEPES, pH 7.4). Ткань в течение одной минуты гомогенизировали до получения однородной массы. Гомогенат центрифугировали в течение 10 мин при 600 g, затем аккуратно отбирали супернатант и центрифугировали его 15 мин при 11000 g. Полученный плотный осадок митохондрий ресуспендировали в 2 мл сахарозной среды (250 мМ сахараза, pH 7,4) до гомогенного состояния (концентрация белка 40-60 мг/мл) и хранили на льду. Все этапы выделения митохондрий проводили при температуре 0-2°C, без замораживания в процессе выделения. Для приготовления растворов использовали воду высокой чистоты (деионизованную).

Скорость поглощения кислорода исследовали в сахарозной среде инкубации (250 мМ сахараза, 10 мМ KCl, 5 мМ  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 5 мМ сукцинат, 1 мМ ЭДТА, 1,2 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 5 мМ HEPES, pH 7,4) полярографическим методом (раздел 2.5) и рассчитывали в нмоль кислорода в мин на мг митохондриального белка. Состояние полученных митохондрий оценивали по скорости поглощения кислорода митохондриями в среде инкубации при свободном окислении субстрата (свободное дыхание) и в присутствии АДФ (фосфорилирующее дыхание).

*Концентрации используемых добавок при внесении в среду инкубации:*

- АДФ - 200 мкмоль/л;
- Арахидоновая кислота (C<sub>19</sub>H<sub>31</sub>COOH, полиненасыщенная жирная кислота) - 20 мкмоль/л;
- A23187 (Ca<sup>2+</sup>-ионофор) – 0,2 мкг/мл (в комбинации с 1 ммоль/л ЭГТА, хелатором Ca<sup>2+</sup>);
- Бромфенацилбромид (ингибитор фосфолипазы A<sub>2</sub>) – 15 мкмоль/л;
- Карбоксиатрактилат (ингибитор АТФ/АДФ-антипортера в митохондриях) – 2 мкмоль/л;
- Мелитин (активатор фосфолипазы A<sub>2</sub>) – 0,5 мкг/мл;
- Олигомицин (ингибитор протонного канала АТФ-синтетазы в митохондриях) – 2 мкг/мл;
- Пальмитиновая кислота (C<sub>15</sub>H<sub>31</sub>COOH, насыщенная жирная кислота) – 20 мкмоль/л;
- Ротенон (ингибитор комплекса I дыхательной цепи митохондрий) – 5 ммоль/л;
- Циклоспорин А (ингибитор неспецифической поры МРТР в митохондриях) – 2 мкг/мл.

Измерения проводили в термостатируемой ячейке объемом 1 мл при температуре 37°C и постоянном перемешивании при помощи магнитной мешалки. Реакцию начинали добавлением суспензии митохондрий (0,5 - 1 мг белка). Концентрацию белка в пробе определяли методом Лоури (раздел 2.4).

## **2.4 Определения белка методом Лоури**

*Принцип метода:*

Белки - высокомолекулярные биополимеры, структурным элементами которых являются аминокислоты. Физико-химические и физические свойства

белков определяются качественным или количественным составом аминокислот. Метод Лоури основан на образовании окрашенных продуктов ароматических аминокислот с реактивом Фолина в сочетании с биуретовой реакцией на пептидные связи [224]. Использовался коммерческий набор фирмы «Sigma» (США).

*Реактивы:*

1. Стандартный раствор белка, содержащий 0,25 мг/мл альбумина.
2. Биуретовый реактив.
3. Реактив Фолина-Чокальтеу.

*Ход работы:*

50-100 мкл суспензии митохондрий предварительно смешивали с 1 мл 1 М NaOH и кипятили 10-15 минут, до достижения прозрачности. Доводили полученный раствор до 10 мл дистиллированной водой. На определение отбирали 250 мкл раствора, смешивали с 2 мл биуретового реактива и оставляли при комнатной температуре на 10 мин. Затем добавляли 0,1 мл реактива Фолина-Чокальтеу, содержимое пробирки перемешивали и через 30 мин колориметрировали при 750 нм. Содержание белка рассчитывали по калибровочному графику.

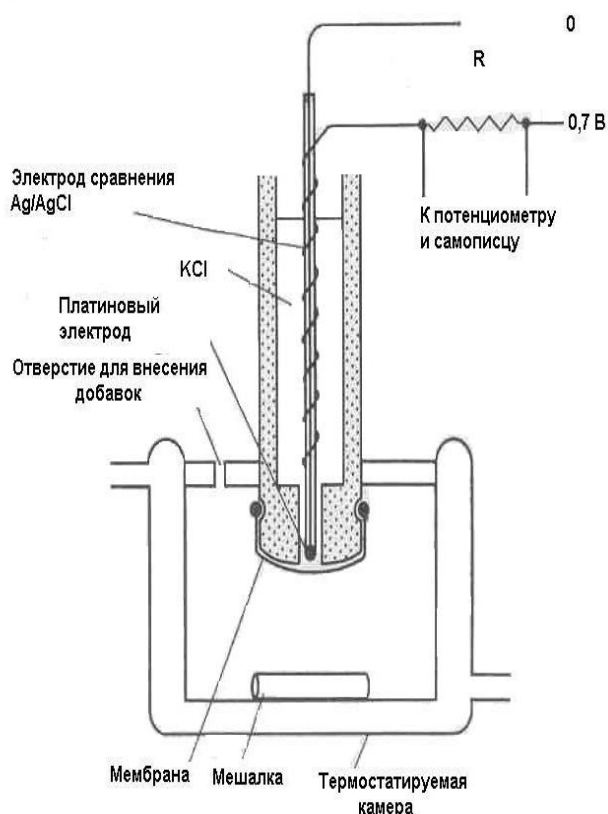
## **2.5 Полярографический метод определения поглощения кислорода**

*Принцип метода:*

Регистрация силы тока, протекающего в цепи электродов, погруженных в исследуемый раствор, в зависимости от величины приложенной к ним разности потенциалов. При определенной разности потенциалов возникает концентрационная поляризация рабочего электрода (катод), благодаря чему на поверхности рабочего электрода происходит восстановление неорганических соединений, в частности кислорода [60]. Наиболее часто в этом методе применяют электрод Кларка (рис. 2.5-1), в котором рабочая поверхность платины

отделена тонкой тefлоновой мембраной от реакционной среды. Растворённый кислород диффундирует из реакционной смеси через мембрану в насыщенный раствор KCl. В качестве рабочего электрода использована платиновая проволока около 0,5 мм. В качестве неполяризующегося обратимого электрода (электрод сравнения) применяют насыщенный хлорсеребряный электрод.

Внесение митохондрий в инкубационную смесь приводит к небольшому всплеску дыхания, которое затем устанавливается на низком уровне – состояние 4. Дыхание в состоянии 4 происходит потому, что внутренняя мембрана митохондрий не абсолютно не проницаема для протонов. Они могут проходить через мембрану даже в отсутствие синтеза АТФ. Одним из факторов, определяющих утечку протонов в состоянии 4, является циклический перенос  $\text{Ca}^{2+}$  через мембрану [60].



*Рисунок 2.5-1 Схематическое изображение устройства электрода Кларка и термостатируемой ячейки для измерения скорости поглощения кислорода*

Фактором, который в действительности контролирует скорость дыхания, является степень отклонения системы от равновесия между редокс-потенциалом

пары в протонпереносящем участке цепи и величиной  $\Delta\mu\text{H}^+$ . В состоянии 4 дыхание автоматически регулируется таким образом, что выброс протонов дыхательной цепью точно уравнивает их утечку через мембрану. Если в какой-то момент скорость выхода протонов превысит скорость их входа, то возрастет  $\Delta\mu\text{H}^+$ , уменьшится отклонение от равновесия между дыхательной цепью и  $\Delta\mu\text{H}^+$ , а в результате понизится протонный ток и стационарное состояние восстановится [60].

Дыхательный контроль (ДК) – это параметр, который позволяет оценить интактность митохондриального препарата. ДК по Чансу и Уильямсу определяется как отношение скорости дыхания при максимальном синтезе АТФ (то есть в присутствии АДФ) или в присутствии протонофора к скорости дыхания в отсутствие синтеза АТФ или протонофора, то есть:  $\text{ДК} = V_3/V_4$  [60]. Его величина варьирует от 3 до 15 в разных препаратах митохондрий. Он является смешанной функцией: уровень дыхания в состоянии 4 определяется протонной проводимостью мембраны, а скорость дыхания в состоянии 3 лимитируется различными процессами: транспортом субстратов, активностью дегидрогеназ, дыхательной цепью, синтезом АТФ или переносом адениновых нуклеотидов.

Для определения скорости поглощения кислорода использовали АКПМ-02 (Альфа БАССЕНС, Россия) - многофункциональный, универсальный анализатор кислорода в комплекте с амперометрическими сенсорами.

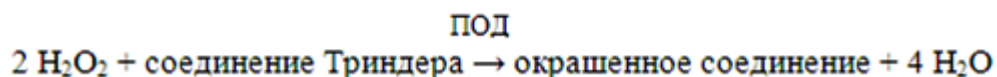
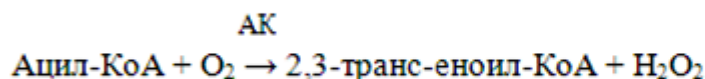
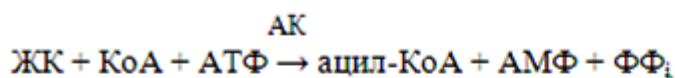
## **2.6 Ферментативный метод определение концентрации жирных кислот**

*Принцип метода:*

Неэтерифицированные ЖК и коэнзим А (КоА) взаимодействуют в присутствии ацил-коэнзим-А-синтетазы (АКС) с образованием ацилированного КоА, который окисляется под действием ацил-коэнзим-А-оксидазы (АКО) с выделением пероксида водорода. В присутствии пероксидазы (ПОД) пероксид



водорода реагирует с соединением Триндера с образованием окрашенного продукта.



Интенсивность красного окрашивания, измеренная при 546 нм, прямо пропорциональна концентрации неэтерифицированных ЖК в образце. В работе использовался коммерческий набор для определения свободных жирных кислот NEFA FS фирмы «Diasys» (Германия):

*Реагент 1.* Goods буфер (рН 7,0) – 50 ммоль/л, КоА – 0,4 г/л, АТФ – 2 ммоль/л, АКС - 0,4 кЕ/л, MgCl<sub>2</sub> – 2 ммоль/л, связывающий компонент Триндера, детергенты, стабилизаторы;

*Реагент 2.* Goods буфер (рН 7,0) – 50 ммоль/л, АКО – 30 кЕ/л, ПОД – 45 кЕ/л, связывающий компонент Триндера, детергенты, стабилизаторы;

*Стандарт ЖК* – 1 ммоль/л.

*Ход работы:*

К 20 мкл исследуемого образца добавляли 1 мл *Реагента 1* и инкубировали 5 мин при 370С. Параллельно готовили холостую и стандартную пробы, в которые вместо исследуемого образца добавляли 20 мкл дистиллированной воды и 20 мкл стандарта, соответственно. После инкубации измеряли оптическую плотность (А1) образца и стандартной пробы против холостой пробы при 546 нм и длине оптического пути в 1 см. Затем в каждую пробирку добавляли по 250 мкл *Реагента 2* и инкубировали в течение 10 мин при 370С. Интенсивность образующейся окраски (А2) измеряли в течение 20 мин после инкубации на спектрофотометре при длине волны 546 нм и длине

оптического пути в 1 см против холостой пробы. Содержание ЖК рассчитывали по формуле:

$$\text{ЖК [ммоль/л]} = \Delta A \text{ образца} * \text{концентр. стандарта} / \Delta A \text{ станд. пробы,}$$

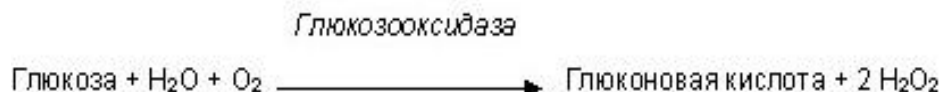
где  $\Delta A = A_2 - A_1$ .

Содержание ЖК определяли в суспензии митохондрий, гомогенате миокарда и сыворотке плазмы крови крыс, выражали в нмоль/мг белка.

## 2.7 Глюкозооксидазный метод определения глюкозы в крови

*Принцип метода:*

В настоящее время широкое распространение получили методы определения глюкозы в крови, основанные на использовании фермента глюкозооксидазы. В основе метода лежит следующая реакция:



Глюкозооксидаза катализирует перенос двух водородных атомов с первого углеродного атома глюкозы на кислород, растворенный в жидком реагенте. При этом в ходе реакции образуется в эквимольных количествах перекись водорода, то есть концентрация образовавшейся перекиси водорода точно равна определяемой концентрации глюкозы.

Молекулы перекиси водорода под действием фермента пероксидазы расщепляются с образованием активной формы кислорода – супероксид анион-радикала  $-\text{O}_2^-$ , который в свою очередь окисляет хромоген, что приводит к значительному изменению спектра поглощения хромогена



Интенсивность изменения окраски определяется фотометрически. Для быстрого и точного измерения уровня глюкозы в цельной крови и сыворотке крови использовали глюкометр One Touch Ultra Easy (LifeScan, США). Тест-полоска One Touch содержит все необходимые химические компоненты для двухэтапного глюкозооксидазного метода, включая ферменты глюкозооксидазу и пероксидазу, которые сорбированы на уникальную пористую гидрофильную мембрану. Результатом реакции является образование окрашенного комплекса. Интенсивность развившейся окраски регистрируется отражательным минифотометром. Используемый метод линеен до 30 ммоль/л глюкозы.

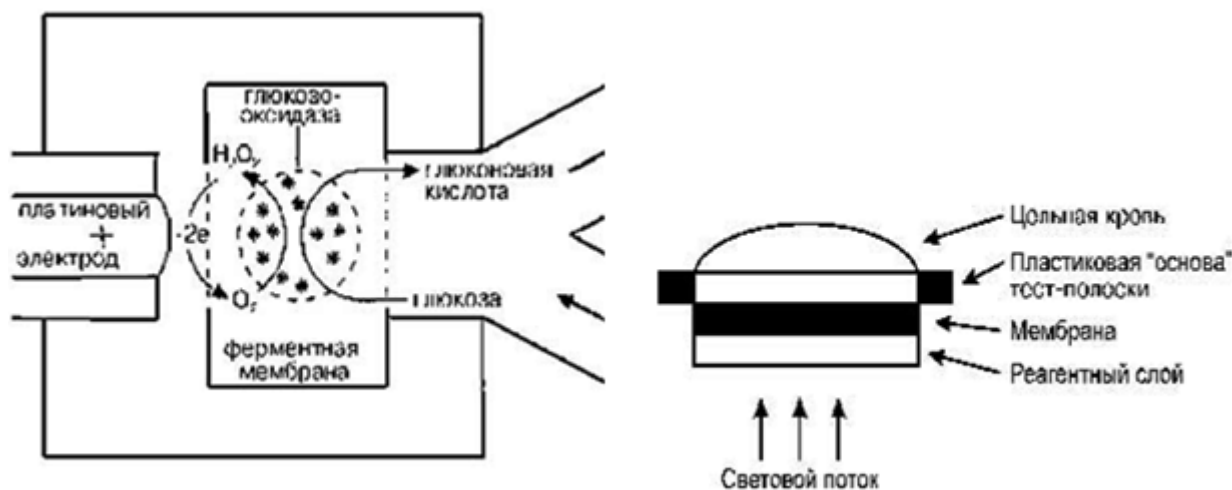
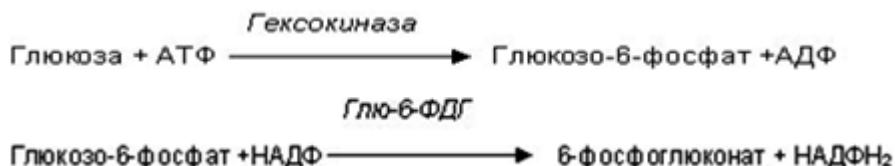


Рисунок 2.7-1 Принцип работы глюкометра и конструкция тест-полоски

Специалистами Эндокринологического научного центра РАМН был проведен сравнительный анализ двух методов измерения уровня глюкозы в крови. Результаты, полученные на глюкометре One Touch, сопоставлялись с данными, полученными на биохимическом анализаторе Spectrum II (Abbott Laboratories, США), реализующем гексокиназный метод определения глюкозы. Гексокиназный метод состоит из двух последовательных реакций:



Гексокиназный метод считается референтным для определения глюкозы, он линеен до 50 ммоль/л. В исследовании проведен сравнительный анализ результатов по 190 пробам крови от 95 пациентов. Коэффициент корреляции результатов составил 0,98641. Коэффициент вариации в нормальном и патологическом диапазонах на глюкометре One Touch не превысил 2,5%. (<http://unimedao.ru/articles/6826/9672/item/146>).

## 2.8 Метод твердофазного иммуноферментного анализа

### *Принцип метода:*

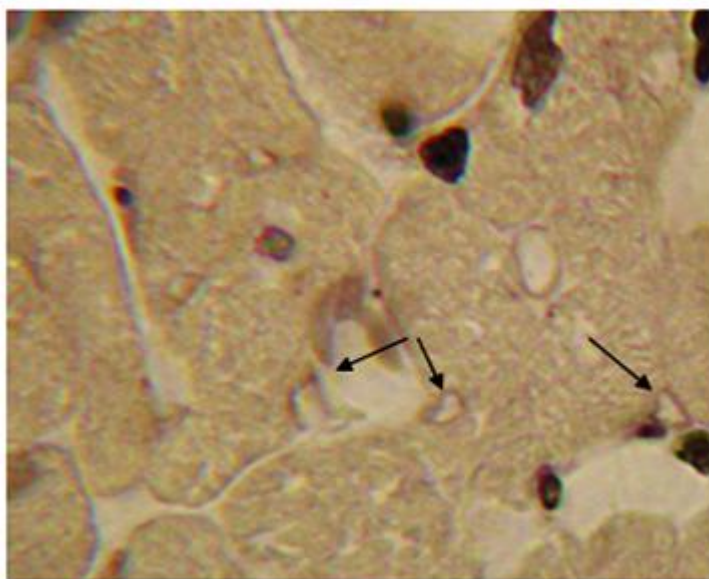
Твердофазный иммуноферментный анализ основан на применении антител (антигенов), фиксированных на нерастворимых носителях. В качестве носителей обычно используются полистироловые микропанели. В твердофазном ИФА используют как пероксидазные, так и щелочно-фосфатазные конъюгаты. Для исследования большого числа образцов с помощью твердофазного ИФА используются: полистироловые микропанели с плоским дном, автоматические пипетки с переменным или постоянным объемом от 50 до 200 мкл, автоматическое промывочное устройство и считывающее устройство.

Все используемые тесты «Миоглобин – ИФА», «АКТГ – ИФА», «Инсулин – ИФА», «Кортизол-ИФА» и «Vcl-2 – ИФА» основаны на методе твердофазного одностадийного иммуноферментного анализа “сэндвич”-типа.

Оценку исследуемых показателей в сыворотке крови проводили с помощью стандартных наборов для иммуноферментного анализа в строгом соответствии с инструкциями производителей. Использовали следующие коммерческие наборы: производства Biomerica, США (АКТГ), ХЕМА, Россия (кортизол), Cusabio Biotech, Китай (миоглобин, инсулин), Usen Life Science, США (Vcl-2). Измерения показателей проводили на спектрофотометре планшетного формата Multiskan FC(Thermo Scientific, США). Измерения оптической плотности проводили при длине волны 450 нм.

## 2.9 Морфологические методы исследования структуры миокарда

Для морфологического исследования у животных II, IV и V групп использовали фрагменты сохранного миокарда левого желудочка, примыкающего к рубцовой зоне. У животных I и III групп образцы брали из анатомически сопоставимых участков. Образцы фиксировали в 10% нейтральном формалине. Осуществляли стандартную гистологическую проводку в спиртах и заливку материала в парафин. Готовили серийные срезы толщиной 4-5 мкм, которые окрашивали гематоксилин-эозином и пикрофуксином по методу Ван Гизона. При исследовании кардиомиоцитов оценивали в баллах от 0 до 4 наличие и выраженность миоцитолиза, миоцитолизиса и глыбчатого распада. Для оценки состояния васкуляризации миокарда использовалась окраска полученных срезов с помощью метенамина-серебра (набор реагентов P.A.S.M.): в каждом срезе в 10 выбранных случайным способом полях зрения подсчитывалось количество капилляров при увеличении  $\times 100$  с вычислением среднего арифметического значения (рис. 2.9-1).



*Рисунок 2.9-1 Капилляры в миокарде левого желудочка крысы*

Просветы капилляров указаны стрелками; окраска метенамин-серебром,  $\times 1000$ .

Для гистоэнзимологического исследования в криостате TP-OM-5-01 из замороженного миокарда левого желудочка крыс готовили срезы толщиной 10

мкм. На срезах проводили гистохимические реакции по выявлению активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и щелочной фосфатазы (ЩФ) [48]. Количественную оценку активности ферментов производили на микроскопе ЛЮМАМ-ИЗ (Россия) в проходящем свете с длиной волны 546 нм, в зондах площадью 0,5 мкм<sup>2</sup> (СДГ и ЛДГ) и 0,1 мкм<sup>2</sup> (ЩФ).

Параллельно, из вышеуказанных участков миокарда, проводили забор материала для электронной микроскопии. Образцы фиксировали сначала 2,5% глютаровым альдегидом, а затем в 1% растворе четырехоксида осмия. Полученный материал дегидратировали в этиловых спиртах восходящей концентрации и заливали в арадилат. Ультратонкие срезы толщиной 30-60 нм готовили на ультратоме «Ultratom 111» (Швеция). Полученные срезы наносили на сетки с формваровым покрытием и контрастировали 2% уранилацетатом и цитратом свинца.

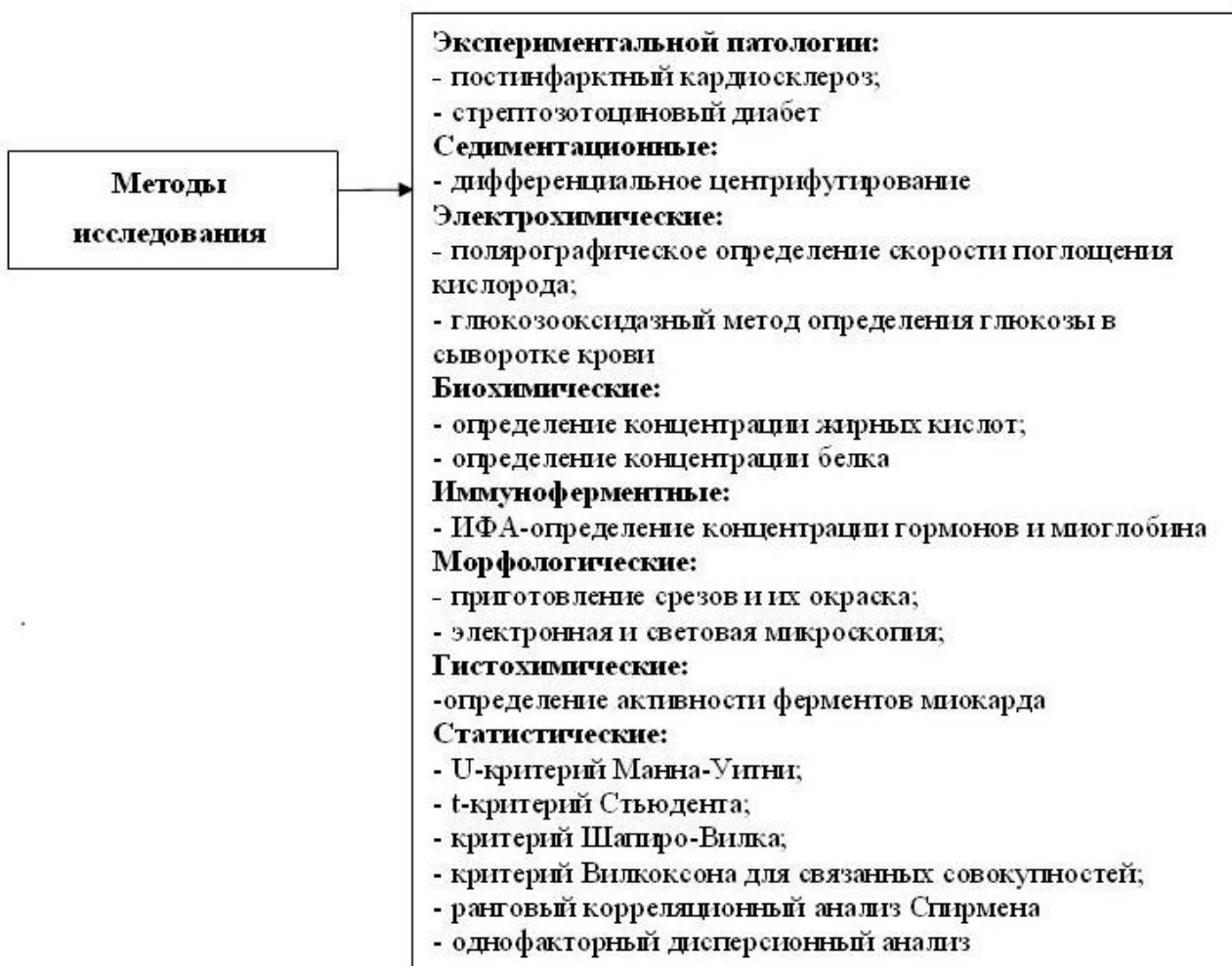
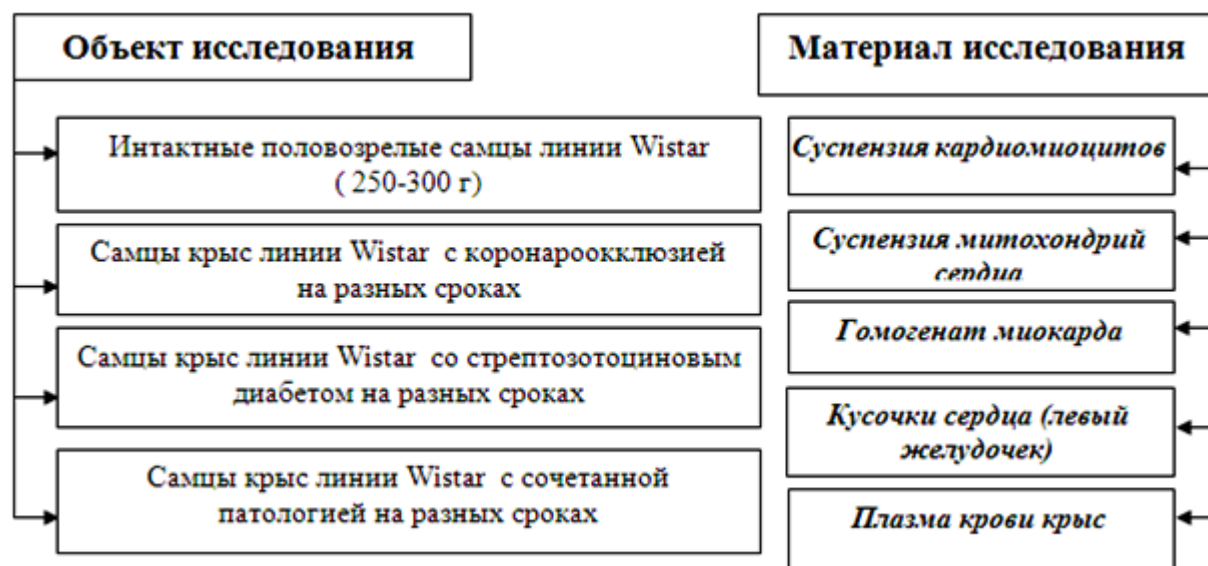
Микроскопическое исследование срезов на светооптическом уровне выполняли, используя бинокулярный микроскоп «Axiolab A1» («Carl Zeiss», Германия). Оценивали следующие гистологические параметры: наличие и выраженность периваскулярного фиброза, диффузного и мелкоочагового фиброза и мононуклеарной инфильтрации стромы миокарда. При исследовании кардиомиоцитов оценивали наличие и выраженность миоцитолита, миоцитолитоза и глыбчатого распада. Методом трансмиссионной электронной микроскопии исследовали кардиомиоциты для выявления изменений в ультраструктуре митохондрий и миофибрилл. Полученные препараты просматривали в электронном микроскопе «JEM-100CX11» («JEOL», Япония) с апертурной диафрагмой 25-30 мкм при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Исследования по структуре миокарда проводились опытными специалистами патологоанатомического отделения ФГБУ «НИИ кардиологии» СО РАМН и кафедры морфологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России.

## 2.10 Статистические методы исследования

При оценке полученных данных использовали методы статистического анализа и проверки статистических гипотез [24]. Для каждой выборки вычисляли средневывборочные характеристики: среднее арифметическое ( $M$ ), среднее квадратичное отклонение ( $SD$ ), ошибку средней ( $m$ ) или рассчитывали медиану ( $Me$ ), первый и третий квартили ( $Q1;Q3$ ) (указано в подписях к таблицам). Проверку нормальности распределения количественных показателей проводили с использованием критерия Шапиро-Вилка. При соответствии нормальному закону распределения признака в исследуемых выборках проверку гипотезы о равенстве средних выборочных величин проводили с использованием  $t$ -критерия Стьюдента. В случае отсутствия согласия данных с нормальным распределением для оценки различий между зависимыми выборками применяли непараметрический критерий Вилкоксона. Для оценки достоверности различий независимых выборок использовали ранговый критерий Манна-Уитни. При статистической обработке полученных данных проводили корреляционный анализ с использованием критерия Спирмена и применяли однофакторный дисперсионный анализ. Различия считались достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$  [24]. Статистическая обработка проводилась с помощью пакета прикладных программ STATISTICA 6.0.

## ДИЗАЙН ИССЛЕДОВАНИЯ





## Глава 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1 Сравнительный анализ структурных изменений миокарда у модельных животных

Изучение адаптивных реакций миокарда в настоящем исследовании предполагает рассмотрение структурно-метаболических изменений миокарда в динамике развития адаптивных реакций при разной последовательности и временном сочетании моделируемых воздействиях (раздел 2.1.5). Такое исследование представляется обоснованным с той точки зрения, что эффективность адаптивных процессов при прямом воздействии на миокард может ограничиваться локальными процессами в сердце, в то время как поражение миокарда при диабете, опосредованное сложным ансамблем функционально-метаболических изменений на уровне целого организма, предполагает доминирование центральных механизмов адаптации. Другими словами, не исключена возможность включения разных механизмов адаптации при развитии отдельных и сочетанных моделируемых состояний. В этом плане структурно-метаболические изменения при отдельных вмешательствах служат скорее своего рода контролем для сравнения с процессами, протекающими при комбинированном поражении миокарда.

Моделирование патологий неизбежно сопровождалось гибелью животных (разделы 2.1.1 - 2.1.3), примерно одинаковой в первые дни после воздействия при отдельных и сочетанных состояниях. Однако затем было обнаружено, что среди выживших животных при отдельных патологиях в дальнейшем наблюдались лишь единичные случаи гибели крыс на всем протяжении исследования. При комбинированном воздействии наблюдалась иная картина: вариант «диабет+инфаркт» характеризовался более агрессивным течением в сравнении с сочетанием «инфаркт+диабет» (раздел 2.1.3). Как видно из гистограммы (рис. 2.1.3-1), максимальная выживаемость животных с исходным диабетом была ниже

минимальной у животных с обратной последовательностью комбинирования воздействий. С увеличением срока диабета, на фоне которого производилась коронароокклюзия, выживаемость в V группе «диабет+инфаркт» резко снижалась. У животных в IV группе, с исходным инфарктом, выживаемость, напротив, повышалась с увеличением срока перед моделированием диабета (рис. 2.1-2).

При этом нужно отметить, что уровень глюкозы в сыворотке крови сохранялся примерно на одинаково высоком уровне во всех экспериментальных группах с диабетом (табл. 3.1-1). Таким образом, очевидно, что разная выживаемость в обеих сериях обусловлена не столько гипергликемией, сколько способностью организма противостоять патологическому состоянию. Эти наблюдения привели к предположению, что такая реакция на разную последовательность сочетания патологий обусловлена разными адаптационными механизмами при прямом и опосредованном поражении сердца. Резкое нарушение кровоснабжения и инфаркт миокарда может предполагать активацию специфических для данного органа защитных реакций. Возможно, острая ишемия миокарда вследствие коронароокклюзии запускает в сердце генерализованную реакцию долгосрочной адаптации, процессы которой разворачиваются за определенный временной период и достигают максимальной мощности к стадии сформированного постинфарктного кардиосклероза. Напротив, постепенное нарастание метаболических изменений в кардиомиоцитах при развитии диабета приводит к хорошо известной в физиологии реакции привыкания (аккомодации), то есть отсутствию реакции на медленно нарастающий по силе раздражитель. Здесь нужно отметить, что, как будет показано в этом и последующем разделах, дальнейшие исследования подтвердили справедливость высказанного предположения.

Хроническая гипергликемия сопровождалась истощением животных в группе «диабет»: в среднем крысы теряли в весе от 30 до 50% по отношению к контрольным животным (табл. 3.1-1).

Таблица 3.1-1

Уровень глюкозы в крови, масса тела и показатели гипертрофии миокарда у животных в экспериментальных группах (Me (Q1;Q3))

подгруппы	глюкоза, ммоль/л	масса тела, г	масса сердца/масса тела, мг/г	масса ЛЖ/масса сердца, мг/мг
<b>I группа – «контроль»</b>				
-	7,4 (7,3;7,75)	272 (251; 345)	3,3 (3,1;3,4)	0,54 (0,52;0,57)
<b>II группа – «инфаркт»</b>				
И2	7,7 (6,9;8,5)	287 (275;298) &	4,5 (4,3;4,9)*#&	0,60 (0,58;0,61)*
И4	7,9 (7,9;7,9)	300 (298;318) &	5,3 (4,4;5,5)*	0,62 (0,61;0,63)*
И6	8,9 (8,4;10,7)	314 (310;315)*&	5,7 (4,9;6,4)*	0,63 (0,60;0,65)*
<b>III группа – «диабет»</b>				
Д2	23,1 (23,0;25,1)*	172 (171;180)*#	2,9 (2,7;2,9)#&	0,60 (0,58;0,63)
Д4	30,0 (27,4;31,7)*	187 (179;236)*#	3,1 (2,7;3,2)#	0,60 (0,59;0,63)*
Д6	29,4 (29,0;32,5)*	184 (183;206)*#	3,4 (3,3;3,6)#	0,57 (0,56;0,60)#
<b>IV группа – «инфаркт+диабет»</b>				
И2Д2	33,3 (28,4;33,3)*	283 (258;296)*#&	3,2 (3,0;3,3)#&	0,57 (0,56;0,58)#
И2Д4	30,1 (19,2;31,2)*	294 (274;300)&	3,6 (3,5;3,8)*#	0,60 (0,57;0,62)#
И2Д6	27,4 (24,1;31,2)*	234 (184;296)#	4,2 (3,8;4,4)*#	0,60 (0,58;0,63)*
И4Д2	27,4 (26,3;29,4)*	224 (218;228)*#	3,2 (3,1;3,4)#	0,57 (0,56;0,60)#
И4Д4	31,5 (30,5;33,3)*	257 (223;272)*#&	3,3 (3,0;3,3)#	0,57 (0,55;0,61)#
И4Д6	33,3 (33,3;33,3)*	222 (206;252)*#	4,3 (4,0;5,4)*#&	0,59 (0,56;0,60)#
И6Д2	32,5 (29,2;33,3)*	207 (184;209)*#	3,2 (3,1;3,2)#	0,57 (0,55;0,58)#
И6Д4	26,9 (26,2;29,4)*	206 (179;218)*#	4,3 (3,7;4,9)*#&	0,57 (0,56;0,59)#
И6Д6	33,1 (30,3;33,2)*	215 (207;222)#	4,3 (3,8;4,7)*#&	0,63 (0,58;0,67)*
<b>V группа «диабет+инфаркт»</b>				
Д2И2	31,5 (30,3;33,2)*	210 (200;226)*#	3,7 (3,5;3,8)*#	0,63(0,61;0,66)*&
Д2И4	28,0 (27,3;28,5)*	207 (189;220)*#	3,7 (3,4;3,9)*#	0,62(0,61;0,64)*&

Примечание. \* -  $p < 0,05$  в сравнении с контролем; # -  $p < 0,05$  в сравнении с соответствующим показателем в подгруппе И6; & -  $p < 0,05$  в сравнении с соответствующим показателем в подгруппе Д6.

В группах комбинированного воздействия также наблюдалось истощение животных, однако снижение массы тела было менее выражено как в сравнении с животными в контрольной, так и в III группе, независимо от последовательности и сроков моделируемых состояний (табл. 3.1-1). Наименьшая потеря веса наблюдается в IV группе, хотя и прослеживается тенденция к истощению во времени (табл. 3.1.-1).

Гипертрофию миокарда определяли по соотношению масса сердца/масса тела и масса ЛЖ/масса сердца. Как видно из таблицы 3.1-1, выраженная гипертрофия миокарда наблюдается во II группе, на стадии морфологически сформированного постинфарктного кардиосклероза (подгруппа Иб). В III группе признаков гипертрофии миокарда выявлено не было. В группах комбинированного воздействия на всех сроках наблюдается менее выраженная гипертрофия миокарда, как в IV, так и в V группах (табл. 3.1-1). Развивающаяся гипертрофия миокарда, несомненно, имеет положительное значение, поскольку позволяет сохранить функцию органа, несмотря на заболевание – хорошо известная в клинике стадия компенсации. При дальнейшем развитии патологического процесса в органе возникают дистрофические изменения, происходит ослабление функции и, в конечном счете, когда адаптационные механизмы исчерпаны, наступает стадия декомпенсации и гибели организма.

Для ответа на вопрос, насколько серьезными являются структурные изменения миокарда у модельных животных, было проведено морфологическое исследование в группах с длительностью патологии не менее 6 недель (табл. 3.1.-2), на светооптическом (рис. 3.1.-1, 3.1-2) и электронномикроскопическом (рис. 3.1-3, 3.1.-4) уровнях.

Типичный вид миокарда крыс контрольной группы и модельных животных представлен на рис. 3.1-1. Показано, что по сравнению с контрольными животными, для миокарда крыс II и III экспериментальных групп характерны разобщенность, частичная фрагментация и неупорядоченность расположения мышечных волокон.

Таблица 3.1-2

Морфологические показатели миокарда левого желудочка сердца крыс разных экспериментальных групп (M±SD)

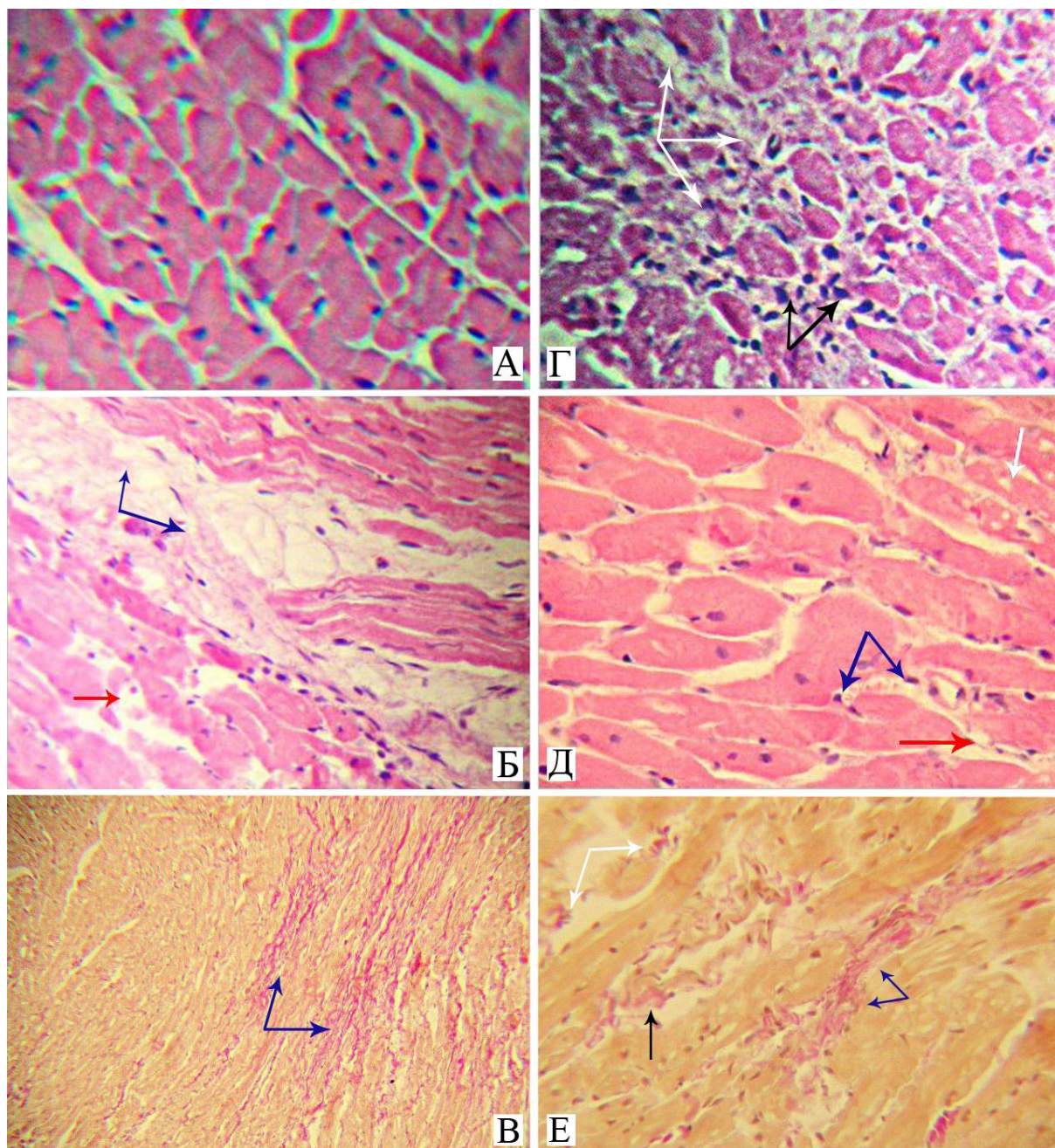
I группа Контроль	II группа П6	III группа Д6	IV группа			V группа Д2П4	Сравнение в группах
			П4Д2	П4Д4	П4Д6		
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	
<b>Диффузный фиброз стромы миокарда (баллы)</b>							
0	1,0±0,3	0,8±0,2	0,4±0,2	0,4±0,2	0,2±0,1	0,6±0,2	1-2 p=0,01 1-3 p=0,02 2-6 p=0,02 <b>p&lt;0,05</b>
<b>Мелкоочаговый фиброз стромы миокарда (баллы)</b>							
0	1,2±0,4	1,0±0,6	0,4±0,2	1,0±0,3	0,4±0,2	0,2±0,1	1-2 p=0,05 1-3,5 p=0,03 2-7 p=0,03 <b>p&lt;0,05</b>
<b>Периваскулярный фиброз (баллы)</b>							
0,6±0,4	0,6±0,3	0,8±0,3	0,8±0,2	0,6±0,2	0,8±0,2	0,8±0,2	-
<b>Миоцитоллиз (баллы)</b>							
0,4±0,2	1,6±0,2	1,2±0,4	1,0±0,1	1,0±0,1	0,8±0,2	1,0±0,1	1-2,3 p<0,01 1-4,5 p<0,05 2-4,5 p<0,05 2-3,6,7 p<0,01 <b>p&lt;0,05</b>
<b>Миоцитоллизис (баллы)</b>							
0	1,2±0,2	0,6±0,3	0,4±0,2	0,4±0,2	0±0	0±0	1-2,3,5 p<0,01 2-(3-7) p<0,01 3-6,7 p<0,05 5-6,7 p=0,01 <b>p&lt;0,05</b>
<b>Глыбчатый распад кардиомиоцитов (баллы)</b>							
0,4±0,2	1,4±0,2	1,2±0,2	0±0	0±0	0±0	0±0	1-2,3 p<0,01 2-4,5,6,7 p<0,01 3-4,5,6,7 p<0,01 <b>p&lt;0,05</b>
<b>Инфильтрация стромы миокарда (баллы)</b>							
0,2±0,1	1,8±0,48	1,0±0,01	0,4±0,22	0,4±0,22	0,4±0,2	0,6±0,24	1-2 <0,01 2-3 p=0,05 2-4,6,7 p<0,01 3-6 p=0,02 4-5 p=0,02 5-6 p<0,01 5-7 p=0,02 <b>p&lt;0,05</b>

Таблица 3.1-2 (продолжение)

I группа Контроль	II группа П6	III группа Д6	IV группа			V группа Д2П4	Сравнение в группах
			П4Д2	П4Д4	П4Д6		
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	
Количество лимфоцитов в 1 поле зрения, х400							
15,6±1,6	23,6±2,2	21,7±1,0	16,6±3,1	19,7±1,6	17,4±1,5	18,9±1,1	1-2, 3 p<0,01 1-5 p<0,05 2-(4-7) p<0,01 3-6,7 p<0,01 3-7 p=0,04 4-5 p=0,02 <b>p&lt;0,05</b>
Количество фибробластов в 1 поле зрения, х400							
10,2±0,8	17,0±3,6	15,6±2,5	14,0±3,5	14,3±3,3	12,2±3,0	11,86±1,8	1-(2-5) p<0,05 2-6,7 p<0,01 3-7 p=0,01 5-7 p=0,04 <b>p&lt;0,05</b>
Количество капилляров в 1см <sup>2</sup> миокарда							
5300 ± 888	10174 ±185	13130 ±1235	11044 ±697	11739 ±407	11304 ±555	12870 ±500	1-2 p<0,01 1-(3-7) p<0,01 2-3 p<0,01 2-7 p<0,01 3-4 p=0,02 3-6 p<0,05 4-7 p<0,05 <b>p&lt;0,05</b>

В клетках определяются дегенеративные изменения: глыбчатый распад цитоплазмы миоцитов, миоцитоллиз, миоцитоллизис. У интактных животных признаки миоцитоллизиса зафиксированы не были, наблюдались слабо выраженные признаки миоцитоллиза и глыбчатого распада. Во II и III группах была отмечена наибольшая степень выраженности миоцитоллиза и миоцитоллизиса.

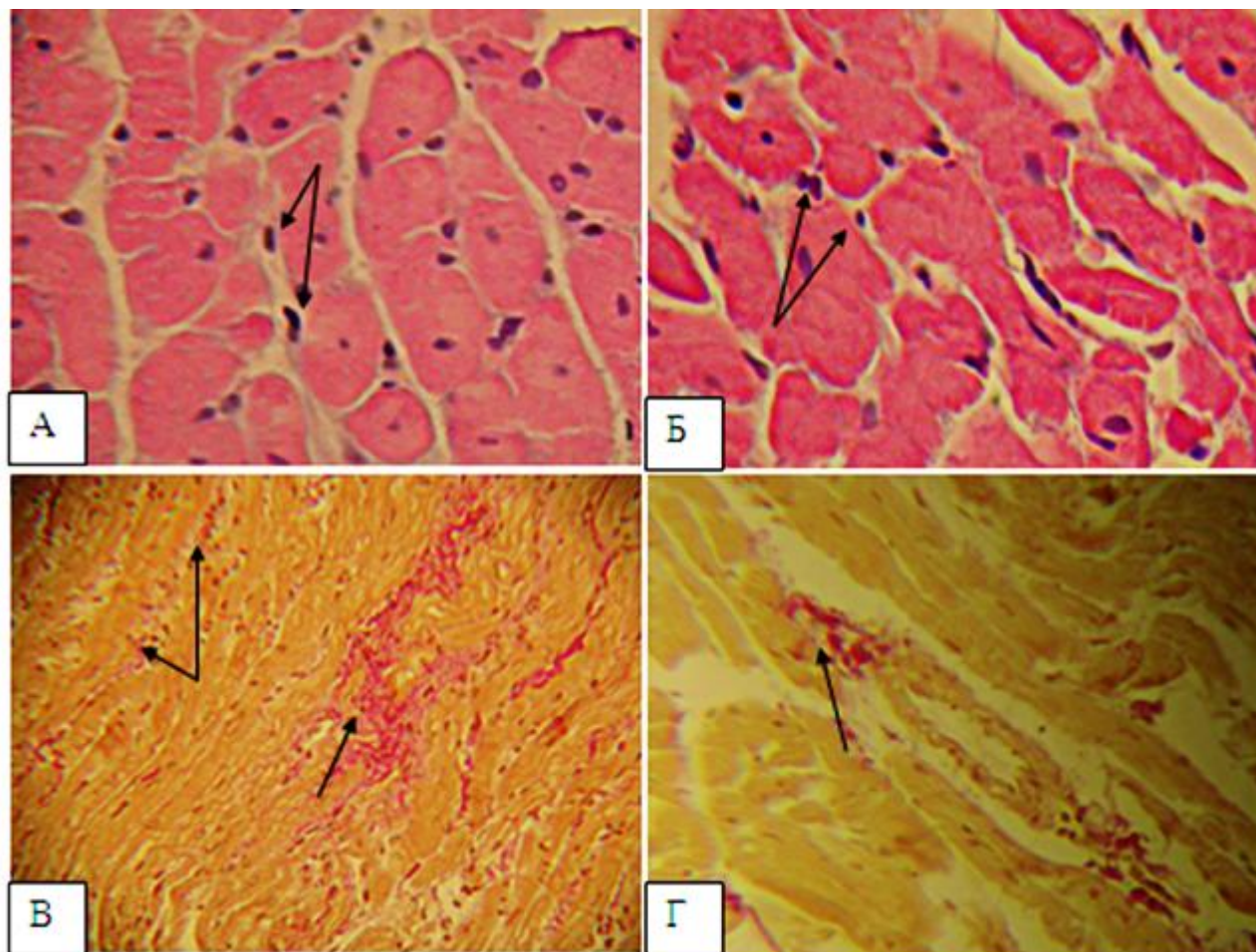
В группах комбинированного воздействия эти показатели были выражены гораздо меньше, чем во II или III группах (табл. 3.1.-2). При комбинированном воздействии в миокарде отмечалось более упорядоченное и компактное расположение пучков мышечных волокон (рис. 3.1-2). При этом межклеточные пространства были расширены за счет тонких прослоек интерстициальной ткани, представленных тонкими, извилистыми коллагеновыми волокнами и фибробластами (рис. 3.1-2, А).



*Рисунок 3.1-1 Структура миокарда левого желудочка контрольного (А), постинфарктного (Б, В, Г) и диабетического (Д, Е) сердца крысы*

- А. I группа, интактный миокард (гематоксилин-эозин, x400);  
 Б. II группа, диффузный фиброз стромы миокарда (синие стрелки), миоцитоллиз мышечных волокон (красная стрелка) (гематоксилин-эозин, x200);  
 В. II группа, диффузный фиброз стромы миокарда (синие стрелки) (пикрофуксин, x100);  
 Г. II группа, мелкоочаговый фиброз стромы миокарда (белые стрелки), мононуклеарная инфильтрация (черные стрелки) (гематоксилин-эозин, x200);  
 Д. III группа, слабо выраженная мононуклеарная инфильтрация стромы миокарда (синие стрелки), вакуолизация цитоплазмы кардиомиоцитов (белая стрелка), миоцитоллиз мышечных волокон (красная стрелка) (гематоксилин-эозин, x 400);  
 Е. III группа, диффузный (белые стрелки) и мелкоочаговый (синие стрелки) фиброз стромы миокарда, периваскулярный фиброз (черная стрелка) (пикрофуксин, x400).





*Рисунок 3.1-2 Структура миокарда левого желудочка при комбинированном воздействии, в IV (А, В) и V (Б, Г) группах*

А. IV группа «инфаркт+диабет», слабо выраженная мононуклеарная инфильтрация стромы миокарда, отсутствие выраженности дегенеративных изменений кардиомиоцитов (гематоксилин-эозин, x400);

Б. V группа «диабет+инфаркт», слабо выраженные мононуклеарная инфильтрация стромы миокарда и миоцитоллиз мышечных волокон (гематоксилин-эозин, x400);

В. IV группа, слабо выраженный диффузный и мелкоочаговый фиброз стромы миокарда (пикрофуксин, x100);

Г. V группа, слабо выраженный периваскулярный фиброз (пикрофуксин, x200).



Диффузный и мелкоочаговый фиброз стромы миокарда, а также периваскулярный фиброз в миокарде крыс в группах комбинированного воздействия были выражены слабо (рис. 3.1-2, Б-В; табл. 3.1-2) и регистрировались лишь в половине случаев. Мононуклеарная инфильтрация стромы миокарда также была обнаружена лишь в половине случаев наблюдения, и характеризовалась более слабой выраженностью, чем во II и III группах (рис. 3.1-2; табл. 3.1-2).

В обеих группах комбинированного воздействия, IV и V, в миокарде крыс не было обнаружено признаков глыбчатого распада миоцитов (табл. 3.1-2). Во II и III группах отмечались признаки полиморфизма ядер, утрата кардиомиоцитами поперечной исчерченности и матовость цитоплазмы (рис. 3.1-1, Б-Е). В условиях комбинированного воздействия, в IV и V группах, дегенеративные изменения кардиомиоцитов характеризуются меньшей степенью выраженности (рис. 3.1-2; табл. 3.1-2).

Выявленные различия в морфологических параметрах сердца при разных моделируемых состояниях и их сочетании могут быть обусловлены тем, что компенсаторно-приспособительные процессы в миокарде при развитии патологических процессов сочетают деструктивные изменения с регенераторными реакциями [59, 67]. Возможно, что наблюдаемые структурные различия обусловлены разной активностью процессов ангиогенеза и, соответственно, интенсивностью кровообращения миокарда. Для проверки этого предположения было проведено исследование васкуляризации левого желудочка путем подсчета количества капилляров в  $1 \text{ см}^2$  миокарда (табл. 3.1-2).

Наименьшее количество капилляров обнаружено у животных контрольной группы, наибольшее – в III и V группах (табл. 3.1-2). Во II и IV группах увеличение количества капилляров было несколько меньше, однако и в этих случаях данный показатель почти в два раза превышал контрольные значения (табл. 3.1-2).

Таким образом, как прямое, так и опосредованное воздействие на миокард модельных животных действительно инициирует статистически значимое усиление васкуляризации миокарда. При комбинированном воздействии в IV и V группах плотность микроциркуляторного русла в миокарде выше, чем во II группе. Можно предположить, что улучшение васкуляризации миокарда во II и III группах развивается за счет активации разных эндогенных механизмов. Возможно, что во II группе менее выраженная васкуляризация миокарда обусловлена локальным повреждением сосудистого русла, вызванного перевязкой коронарной артерии, и, соответственно, формированием коллатералей в обход поврежденного участка [82, 151]. Для диабета 1 типа характерны выраженные мультиорганные микроангиопатии [91], что обеспечивает включение центральных механизмов ангиогенеза и максимально выраженную реакцию в III группе. Косвенным подтверждением этого предположения является тот факт, что в группах комбинированного воздействия, при сочетании в любой последовательности, не наблюдается усиления ангиогенеза в сравнении с III группой, но при этом плотность капилляров выше, чем во II группе (табл. 3.1-2).

Капиллярная сеть играет ключевую роль в транспорте кислорода и энергетических субстратов в кардиомиоциты. Функциональную состоятельность мышечных клеток, в особенности кардиомиоцитов, определяет, в первую очередь, их энергетическое обеспечение. Соответственно, обнаруженные структурные изменения отражают перестройку метаболического аппарата клетки. Общеизвестно, что основным поставщиком энергии в клетке являются митохондрии. Соответственно, изменения в структуре митохондрий, межмитохондриальных связей, плотности контакта с миофибриллами могут быть как следствием, так и определяющим фактором в формировании адаптивного ответа при отдельных и сочетанных патологиях.

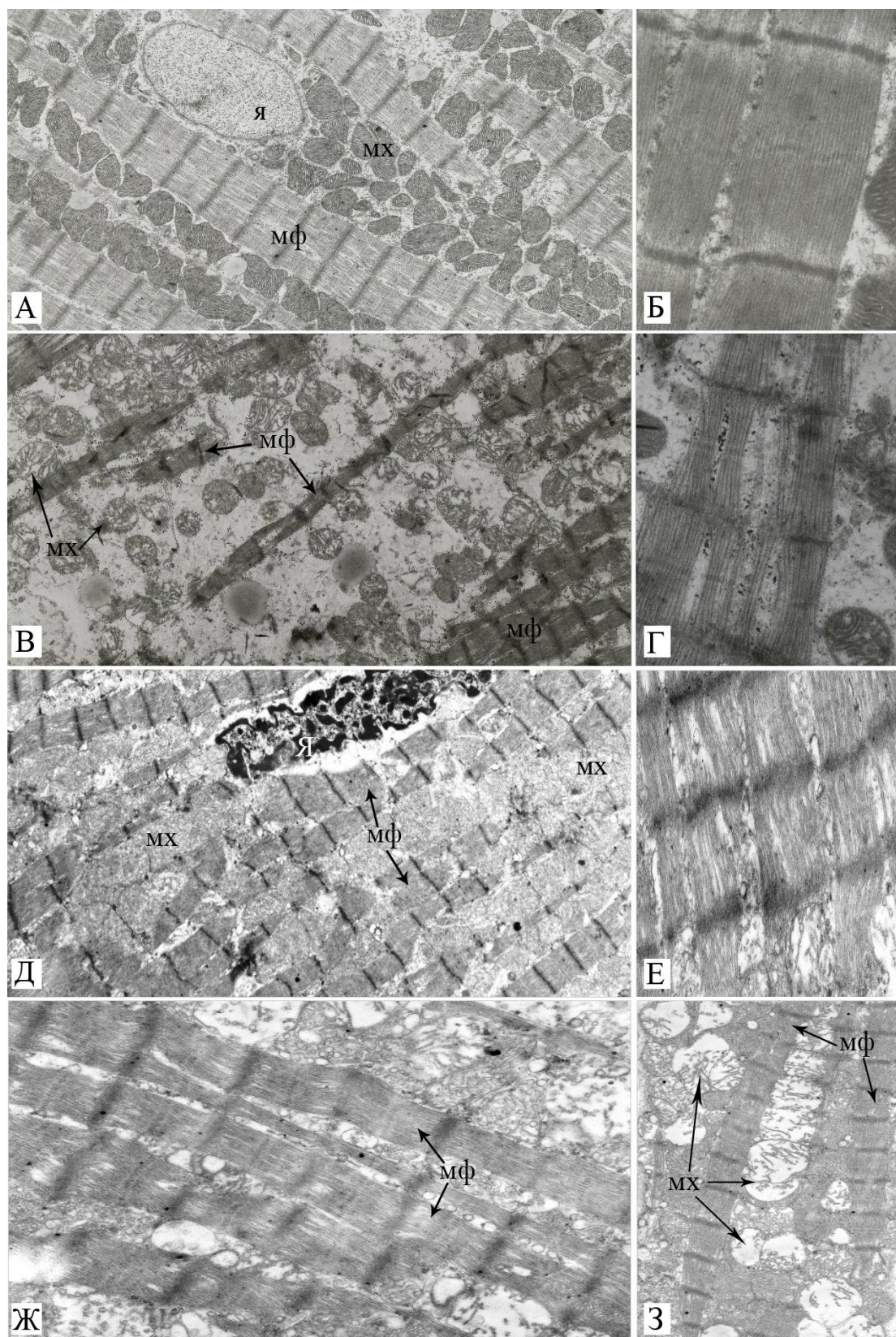
Для определения интенсивности и отличий деструктивных изменений в митохондриальном и сократительном аппарате кардиомиоцитов модельных

животны на ультраструктурном уровне было проведено электронно-микроскопическое исследование (рис. 3.1-3).

При исследовании структуры кардиомиоцитов в группах II и III наблюдались типичные дегенеративные изменения митохондрий [59, 67, 78]: набухание органелл, просветление, вымывание и гомогенизация митохондриального матрикса, деструкция крист (рис. 3.1-3, В, Д).

Обращает на себя внимание выраженная разобщенность в расположении митохондрий, как между собой, так и их контакта с миофибриллами, во II группе (рис. 3, В); в III группе, напротив, наблюдалась «гомогенизация» массы митохондрий: визуально трудно четко выделить границы органелл (рис. 3.1-3, Д). Помимо нарушений в структуре митохондрий, присутствуют нарушения в сократительном аппарате кардиомиоцитов: смещение, «расплетание», неправильная ориентация, разрывы и фрагментация миофибрилл (рис. 3.1-3, В-Е). Более выраженная деградация миофибрилл наблюдается во II группе: часто встречаются хаотично расположенные тонкие волокна, с выраженными просветами, разделенные на отдельные «пучки» (рис. 3.1-3, Б, В). В III группе миофибриллы расположены сравнительно более упорядоченно (рис. 3.1-3, В), однако и в этом случае наблюдается их выраженное «расплетание» (рис. 3.1-3, Г). Согласно существующим представлениям, подобные изменения характерны для миокарда при повышенной функциональной нагрузке, и могут свидетельствовать не только о деградации, но и о гиперфункции клеточных органелл, в том числе и митохондриального аппарата [59, 67]. Однако наблюдаемые различия в изменениях структуры митохондрий и миофибрилл свидетельствуют о качественно разных реакциях миокарда на прямое (II группа) и опосредованное (III группа) повреждение миокарда.

Изучение ультраструктуры кардиомиоцитов IV группы выявило некоторое отличие в выраженности деструктивных изменений митохондрий и миофибрилл в сравнении с монопатологиями (рис. 3.1-3, Ж, З).



*Рисунок 3.1-3 Структура кардиомиоцитов миокарда крыс в I (А, Б), II (В, Г), III (Д, Е) и IV (Ж, З) группах*

Увеличение: А, В, Д, З -  $\times 1000$ ; Ж -  $\times 1500$ ; Б -  $\times 5000$ ; Г -  $\times 4000$ ; Е -  $\times 3000$ .  
Сокращения: Я- ядро, МХ – митохондрии, МФ – миофибриллы.

При моделировании комбинированного воздействия в кардиомиоцитах наблюдалось сравнительно упорядоченное расположение миофибрилл, с правильной поперечной исчерченностью и относительно плотной упаковкой миофиламентов (рис. 3, Ж, З).

Большинство митохондрий имело просветленный матрикс, нарушенную пространственную ориентацию крист; часто встречаются крупные митохондрии с разрушенными кристами. Важно отметить, что в большинстве случаев митохондрии располагались цепочкой между миофибриллами, образуя с ними тесный контакт, как это характерно для интактных кардиомиоцитов (рис. 3.1-3, З).

Считается, что подобные изменения митохондриального аппарата в кардиомиоцитах (гетерогенность ультраструктуры и популяции митохондрий, сохранение системы «митохондриального ретикулума»), могут являться проявлением эндогенных механизмов выживания клетки при длительной гипоксии миокарда [78]. Предполагается, что в условиях хронической гипоксии одновременно происходит запуск двух разнонаправленных процессов [77, 78]:

1) митоптоза, направленного на выбраковку митохондрий с нарушенной функциональной активностью, а также митохондрий, ставших лишними для клеток в условиях недостатка кислорода;

2) образования новых митохондрий, направленного на сохранение хотя бы части органеллы в условиях тяжелого стрессорного воздействия.

Можно предположить, что при комбинированном воздействии выявленные изменения в структуре митохондрий свидетельствуют о запуске подобных процессов.

Таким образом, проведенное исследование показало, что при рассматриваемых экспериментальных условиях, при моделировании как прямого, так и опосредованного поражения сердца, в миокарде наблюдаются сходные структурные изменения. Однако при комбинированном воздействии структурные нарушения миокарда на аналогичных сроках оказываются менее выраженными,



что, видимо, и определяет повышенную сопротивляемость миокарда животных и сохранение инотропной функции миокарда в этих условиях.

Полученные данные по изменению рассмотренных морфометрических и структурных параметров не позволяют самостоятельно ответить на вопрос, почему в условиях комбинированного воздействия, при сочетании «инфаркт+диабет» есть проявления адаптивной компенсации, а при обратном сочетании, «диабет+инфаркт» такой реакции не наблюдается. Очевидно, что ответ нужно искать не в структурных изменениях, а в разветвленной системе функционально-биохимических механизмов регуляции жизнедеятельности клетки.

### **3.2 Регуляторная роль свободных жирных кислот в поддержании мембранного гомеостаза клеток сердца при экспериментальной ишемии миокарда**

Как показывает обзор современной литературы, работу сердца определяет сбалансированность метаболизма ЖК. Основной пул ЖК преимущественно вовлечен в окислительные энергетические процессы и поддержание мембранного гомеостаза кардиомиоцитов, что способствует нормальной электрофизиологической активности мембран и сохранению сократительной активности миокарда.

Известно, что мембранный гомеостаз кардиомиоцитов может нарушаться при некоторых патологических состояниях, сопровождающихся накоплением ЖК или их производных в тканях сердца, в частности при ишемии миокарда и сахарном диабете. До настоящего исследования не было проведено изучения прямого влияния СЖК на клеточное дыхание и не рассматривалось накопление СЖК и его последствий на метаболизм миокарда в динамике развития процессов адаптации при моделируемых в настоящем исследовании состояниях. Значимость такого исследования определяется тем, что в настоящее время хорошо изучен только контролирующий механизм поступления СЖК в клетки, но неизвестно, каким образом может осуществляться контроль их утилизации. До сегодняшнего дня существуют только предположения о существовании таких механизмов в сердце на уровне клетки: в частности, предполагается регуляция активности ферментов продуктами метаболизма ЖК [223]. С другой стороны, на фоне основной массы экспериментальных работ, относительно редко рассматриваются процессы в миокарде при сочетании патологий в хроническом эксперименте. Исходя из этих соображений, представляется важным изучить прямое влияние СЖК на поглощение кислорода изолированными клетками и митохондриями сердца на разных стадиях процесса адаптации при прямом, опосредованном и комбинированном воздействии на миокард.

### **3.2.1 Влияние свободных жирных кислот на скорость поглощения кислорода митохондриями сердца**

При исследовании свободного окисления в митохондриях сердца обнаружено, что во всех экспериментальных группах, в сравнении с контролем, наблюдается увеличение скорости потребления кислорода, причем интенсивность потребления кислорода нарастает во времени (табл. 3.2-1). В сравнении с группами комбинированного воздействия (IV и V) более выраженный прирост скорости потребления кислорода во времени наблюдается в II и III группах, при этом в III группе этот процесс более быстрый, чем в II (табл. 3.2-1).

Такое увеличение потребления кислорода может быть обусловлено утечкой протонов через мембрану митохондрий, следствием чего является нарушение в сопряжении окисления и фосфорилирования. Действительно, сопоставление скорости дыхания при свободном окислении и в присутствии АДФ показало, что при рассматриваемых состояниях наблюдается разобщение процессов окисления и фосфорилирования во всех группах, начиная с ранних стадий, что выражается в несоответствии между увеличением скорости потребления кислорода и величиной дыхательного контроля (табл. 3.2-1). Наблюдаемое снижение дыхательного контроля свидетельствует о снижении интенсивности фосфорилирующего дыхания митохондрий, а изменения в величинах рассмотренных показателей сопровождалось параллельным увеличением содержания СЖК в сыворотке крови (табл. 3.2-1, колонка [СЖК]<sub>сыв</sub>).

Увеличение скорости свободного дыхания и содержания СЖК в сыворотке крови плавно нарастает в зависимости от длительности моделируемого состояния (табл. 3.2-1). Обращает на себя внимание тот факт, что в группах комбинированного воздействия процесс изменений в величинах изучаемых параметров замедлен в 1,5 – 2 раза. Другими словами, изменения, которые наблюдаются во II или III группе в 6 недель, в IV группе развиваются лишь к 8-12 неделям (табл. 3.2-1).



Таблица 3.2-1

Изменения скорости поглощения кислорода митохондриями сердца и концентрации свободных жирных кислот в сыворотке крови крыс ( $M \pm m$ )

Подгруппы	Скорость потребления кислорода, нмоль в мин на мг белка					[СЖК]сыв, ммоль/л
	Свободное окисление (в скобках - дыхательный контроль)	Добавки				
		Арахидо- новая кислота	Пальми- тиновая кислота	Бромфена- цилбромид		
<b>I группа – контроль</b>						
-	26,5±1,9	(3,5 ±0,05)	45,2±3,8#	48,8±2,9#	24,9 ±3,8	0,33±0,1
<b>II группа – «инфаркт»</b>						
И2	76,0±1,9*	(1,9 ±0,08*)	40,8±0,5#	38,6±4,7#	32,4±4,4#	0,38±0,08
И4	78,3±6,2*	(2,0 ±0,05)	43,0±3,5#	42,6±1,7#	41,6±3,8*#	0,49±0,01*
И6	126±3,4*	(1,9 ±0,08*)	73,4±2,6*#	64,0±2,4*#	67,3±4,1*	0,64±0,04*
<b>III группа - «диабет»</b>						
Д2	92,3±5,8	(1,8 ±0,1*)	84,8±5,4*	88,4±6,5*	83,4±6,2*	0,46±0,12*
Д4	135±1,9*	(1,9 ±0,26*)	140±3,8*	129±2,9*	118±6,7*#	0,51±0,13*
Д6	156±5,4	(1,8±0,05)	149±5,9*	153±7,2*	118±9,4*#	0,55±0,11*
<b>IV группа – «инфаркт+диабет»</b>						
И2Д2	65,4±1,5*	(2,0 ±0,05*)	27,9±1,7*#	32,1±1,5*#	45,1±3,4*#	0,31±0,15
И2Д4	138±3,4*	(2,0 ±0,14*)	75,3±2,6*#	85,7±4,3*#	70,5±6,0*#	0,47±0,11*
И2Д6	158±14,1*	(2,0 ±0,1*)	98,5±4,1*#	103±6,2*#	98,7±7,8*#	0,49±0,1*
И4Д2	78,6±5,2*	(2,2 ±0,04*)	48,9±4,4#	53,4±9,1#	53,8±3,5#	0,43±0,16*
И4Д4	91,0±3,4*	(2,5 ±0,1*)	60,7±8,7*#	65,7±9,3*#	56,6±5,4#	0,54±0,20*
И4Д6	110±4,1*	(2,0 ±0,03*)	101±7,9*	105±12,2*	59,3±5,7#	0,55±0,06*
И6Д2	87,3±4,4*	(1,9 ±0,09*)	72,4±2,9*	80,3±3,4*	65,3±4,4#	0,32±0,06
И6Д4	135±9,4*	(1,9 ±0,12*)	125±7,6*	121±6,7*	71,4±5,2#	0,43±0,18
И6Д6	167±8,2*	(1,9 ±0,14*)	129±9,8*	132±7,8*	117,5±7,2#	0,52±0,06*
<b>V группа – «диабет+инфаркт»</b>						
Д2И2	79,9±1,7*	(1,7 ±0,06*)	62,2±5,4*#	62,6±9,1*#	60,3±3,4*#	0,35±0,07
Д2И4	117±7,7*	(1,7 ±0,06*)	68,0±8,4*#	69,3±7,1*#	67,7±6,2*#	0,47±0,07*

Примечание. [СЖК]сыв – концентрация свободных жирных кислот в сыворотке крови крыс; \* - различия в столбце статистически значимы ( $p < 0,05$ ) при сравнении с соответствующим показателем в I группе; # - различия по дыханию митохондрий в каждой группе статистически значимы ( $p < 0,05$ ) при сравнении с показателем «свободное окисление» в этой группе.

Несоответствие высокой скорости потребления кислорода при окислении субстрата и показателей ДК может быть связано с протонофорным действием насыщенных и ненасыщенных СЖК. Хорошо изучено такое действие длинноцепочечных ЖК на дыхание изолированных митохондрий сердца, печени и других органов интактных животных [58, 290]. Действительно, в настоящем исследовании также наблюдается увеличение скорости потребления кислорода митохондриями сердца интактных крыс (I группа) при добавлении в среду инкубации как пальмитиновой, так и арахидоновой кислоты (табл. 3.2-1).

Выбор именно этих ЖК обусловлен несколькими причинами. Во-первых, хорошо известно, что они являются компонентами мембранных фосфолипидов. Во-вторых, имеются многочисленные свидетельства того, что причиной аккумуляции триглицеридов в клетках и окислительного повреждения митохондрий является увеличение содержания в околоклеточном пространстве пальмитиновой кислоты – основного субстрата  $\beta$ -окисления в клетке [86]. В-третьих, арахидоновая кислота, высвобождаемая из фосфолипидов при участии фосфолипазы  $A_2$ , является предшественником в синтезе повреждающих мембрану оксипинонов, а также играет важную роль в регуляции лиганд-рецепторных взаимодействий, активности ионных каналов и регуляторных ферментов [162].

Полученные результаты, свидетельствующие об усилении свободного дыхания митохондрий интактных животных в присутствии СЖК, хорошо согласуются с литературными данными. Однако в ходе предварительных исследований по изучению влияния ЖК на дыхание митохондрий сердца модельных животных, обнаружена реакция, противоположная ожидаемой: при внесении в среду инкубации СЖК происходило резкое подавление дыхания митохондрий, вплоть до полной его остановки. Данное наблюдение потребовало дополнительного изучения дозозависимости влияния ЖК на дыхание интактных и патологических митохондрий. Проведенное исследование показало стимулирующее влияние пальмитиновой и арахидоновой кислот на дыхание митохондрий сердца интактных крыс в диапазоне концентраций 15-300 мкМ, при

этом скорость потребления кислорода возрастала прямо пропорционально увеличению концентрации добавленной ЖК. На дыхание митохондрий сердца животных II-V экспериментальных групп обе кислоты оказывали ингибирующее влияние, но с разной интенсивностью, в зависимости от моделируемого состояния (подробнее в разделе 3.2.2). Именно поэтому нами была подобрана такая концентрация СЖК (20 мкМ), при которой наблюдалось достаточно выраженное стимулирование дыхания митохондрий интактных кардиомиоцитов и минимально возможное ингибирование дыхания митохондрий сердца экспериментальных животных.

Ингибирующий эффект ЖК на скорость поглощения кислорода митохондриями может быть обусловлен тем, что митохондрии сердца модельных животных уже находятся в разобщенном состоянии. Имеются единичные сведения, что СЖК в определенных условиях, в присутствии протонофоров, могут оказывать ингибирующее действие на разобщенное дыхание митохондрий сердца [129]. Исследователи предполагают, что такой эффект СЖК может быть обусловлен их прямым влиянием на ЭТЦ митохондрий [129, 291], активацией переноса протонов через комплекс I, что приводит к восстановлению окисления НАД-зависимых субстратов [129], и снижением генерации АФК [291].

Степень снижения скорости потребления кислорода при добавлении СЖК в используемых концентрациях не во всех экспериментальных группах выражена одинаково (табл. 3.2-1). Так, значительное подавление дыхания митохондрий наблюдалось в II группе, тогда как в III группе ингибирующее влияние СЖК было статистически не значимо. В сочетанных экспериментальных группах ингибирование дыхания митохондрий при добавлении СЖК было наиболее выражено на относительно ранних сроках после комбинированного воздействия (табл. 3.2-1). Таким образом, на основании полученных результатов по влиянию СЖК на дыхание митохондрий нельзя однозначно утверждать, что наблюдаемое увеличение скорости потребления кислорода обусловлено только протонофорным действием СЖК: возможны какие-то иные процессы с их участием. В

частности, это может являться следствием накопления метаболитов ЖК и ингибирования ими мембраносвязанных и внутримитохондриальных ферментов [223, 338].

Вполне вероятным является предположение, что СЖК исполняют роль модуляторов активности эндогенных фосфолипаз и этот процесс направлен на поддержание мембранных структур кардиомиоцитов при адаптации миокарда к патологическому воздействию. Одним из универсальных процессов поддержания мембранного гомеостаза при различных нарушениях метаболизма, являются реакции деацилирования/реацилирования с участием фосфолипаз. В ответ на изменение концентрации и соотношения ЖК происходит реорганизация липидного состава мембраны с целью создания оптимальных условий для сохранения функциональной активности внутриклеточных органелл и клетки в целом [162]. Повышенная активность внутриклеточных фосфолипаз может быть одним из источников ЖК в клетке: ключевым моментом в высвобождении СЖК является отклонение в процессе мембранного ремоделирования, приводящее к дисбалансу между деацилированием и реацилированием [162]. Показано, что на начальной стадии ишемии процесс аккумуляции СЖК протекает медленно, причем ЖК отщепляются исключительно от мембранных фосфолипидов [336]. На более поздних стадиях ишемии возрастает концентрация лизофосфолипидов и накопление токсичных продуктов распада ЖК, что создает условия для дополнительного повышения потребности миокарда в кислороде, не связанного с увеличением его механической работы [336].

Для проверки этого предположения, в настоящем исследовании был использован метод ингибиторного анализа с применением БФБ, ингибитора фосфолипазы  $A_2$  [118]. При добавлении в среду инкубации митохондрий сердца интактных животных БФБ не оказывал влияния на дыхание митохондрий этой группы. Однако у модельных животных добавление БФБ приводило к снижению скорости потребления кислорода митохондриями практически во всех группах (табл. 3.2-1). Сравнительный анализ изменения интенсивности свободного

окисления в ответ на добавлении СЖК и БФБ показывает, что в большинстве случаев подавление дыхания митохондрий при ингибировании фосфолипазы  $A_2$  сопоставимо с таковым в присутствии СЖК (табл. 3.2-1).

По-видимому, данное торможение активности фосфолипазы  $A_2$  СЖК и/или продуктами их метаболизма [20] осуществляется по известному механизму субстратного торможения, когда избыток субстрата приводит к утрате чувствительности воспринимающих его структур. Снижение активности фосфолипазы  $A_2$  может быть обусловлено ионофорным действием СЖК [301] и накоплением внутримитохондриального кальция. При ишемии миокарда кальций по-разному влияет на фосфолипазу  $A_2$ : начальное увеличение  $Ca^{2+}$  стимулирует ее, а высокая концентрация этого иона – ингибирует [162]. Известно несколько возможных путей регуляции активности внутриклеточных фосфолипаз  $A_2$ , при этом общий механизм регуляции сложен и до конца не изучен [20].

Выраженная реакция митохондрий на БФБ может быть свидетельством сохраненной лабильности митохондриальной фосфолипазы  $A_2$  и, косвенным образом, большей устойчивости митохондриальных мембран к повреждению на ранних стадиях развития процесса адаптации, когда происходит активное включение и использование компенсаторных механизмов. В то же время, отсутствие такой реакции на поздних стадиях патологического процесса следует рассматривать как подтверждение его необратимости.

Как уже было отмечено выше, интенсивность реакции на внесение СЖК или БФБ различается в зависимости от длительности моделируемого состояния в разных экспериментальных группах и подгруппах (табл. 3.2-1). С этой точки зрения было важно провести сравнение изменений рассматриваемых показателей по дыханию митохондрий в группах комбинированного воздействия с соответствующими показателями при отдельных воздействиях, в динамике развития процесса. Полученные результаты приведены в таблице 3.2-2, в виде отклонений в большую (+) или меньшую сторону (-) показателей в IV и V группах от сравниваемого показателя в II и III группах.

Таблица 3.2-2

Сравнение показателей дыхания митохондрий в группах комбинированного воздействия по отношению к показателям в группах отдельных патологий

Группы сочетанной патологии	II группа												III группа											
	И2				И4				И6				Д2				Д4				Д6			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
И2Д2	-	-	0	0	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
И2Д4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	0	0	0	0	-	-	-	0	-	-	-
И2Д6	+	+	+	+	+	+	+	+	0	-	-	-	+	0	0	0	0	-	-	0	0	-	-	0
И4Д2	0	0	+	+	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
И4Д4	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	0	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
И4Д6	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
И6Д2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	0	+	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
И6Д4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	0	0	-	0	-	-	-	-	-
И6Д6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	0	0	0	-	-	0
Д2И2	0	+	+	+	0	+	+	+	-	-	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Д2И4	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание. Дыхание митохондрий: 1 – при свободном окислении; 2 – при добавлении арахидоновой кислоты; 3 – при добавлении пальмитиновой кислоты; 4 – при добавлении БФБ; знак «0» – не выявлено статистически значимых отличий ( $p > 0,05$ ); знак «+» – показатель в группе комбинированного воздействия статистически значимо ( $p < 0,05$ ) выше величины соответствующего показателя во II или III группе; знак «-» – показатель в группе комбинированного воздействия статистически значимо ( $p < 0,05$ ) ниже величины соответствующего показателя во II или III группе.

В первую очередь обращает на себя внимание тот факт, что при комбинированном воздействии практически все рассмотренные показатели в большинстве случаев лучше, чем в III группе, особенно на поздних стадиях (табл. 3.2-2). Другими словами, отклонения от величин соответствующих показателей скорости поглощения кислорода митохондриями интактных животных менее выражены при сочетании патологий, чем в группе «диабет». Однако сравнение тех же параметров с показателями в группе «инфаркт» демонстрирует

противоположную ситуацию: при сочетании патологий в большинстве случаев наблюдается увеличение скорости поглощения кислорода митохондриями и уменьшение тормозного влияния ЖК и БФБ на дыхание митохондрий (табл. 3.2-2). Однако при этом необходимо учитывать тот факт, что эти изменения становятся выраженными при суммарной длительности комбинированного воздействия в 6-12 недель. Таким образом, проведенный анализ показывает, что изменения в рассматриваемых параметрах более медленно нарастают в группах сочетанных патологий в сравнении монопатологиями (табл. 3.2-1, 3.2-2).

Нужно отметить, что, судя по изменению всех рассмотренных к этому моменту показателей (дыхания митохондрий, структурных изменений миокарда, морфометрических параметров, выживаемости животных) именно сочетание «инфаркт+диабет» увеличивает устойчивость животных к патологическим воздействиям, и это, по-видимому, является классическим примером проявления перекрестной адаптации. Более слабое проявление кросс-адаптации при сочетании «диабет+инфаркт» обусловлено, скорее всего, слишком медленным нарастанием метаболических изменений в кардиомиоцитах при развитии диабета, а мультиорганное поражение организма при этой патологии приводит к раннему нарушению и срыву адаптивных процессов в случае присоединении инфаркта.

Полученные данные о том, что при рассматриваемых условиях, в группах комбинированного воздействия, наблюдается сдерживание развития нарушений на уровне метаболизма митохондрий, согласуются с некоторыми литературными данными, свидетельствующими о высокой ишемической резистентности миокарда (*in vivo* и *in vitro*) животных с экспериментально вызванным диабетом [15, 30, 121, 243].

Таким образом, на основании собственных и литературных данных, можно уверенно утверждать, что процессы адаптации при развитии ишемического повреждения миокарда тесно связаны с регуляторным влиянием СЖК на метаболизм кардиомиоцитов. Наибольшая устойчивость по всем

рассматриваемым параметрам наблюдалась в подгруппе животных И4Д2-6, т.е. в условиях уже имеющегося ремоделирования миокарда. В тех случаях, когда после коронароокклюзии проходило 6 недель (животные подгруппы - И6Д2-6) сочетание с диабетом уже не усиливало компенсаторных реакций. На ранних сроках постинфарктных изменений (И2Д2-6) компенсаторные процессы, по-видимому, не успевают развернуться в полную мощность. Соответственно, реакция миокарда обусловлена разными стадиями адаптации кардиомиоцитов к патологическому воздействию. Исходя из этого, можно предположить, что отличие влияния СЖК на дыхание митохондрий животных в экспериментальных группах в сравнении с контрольной группой обусловлено именно этим.

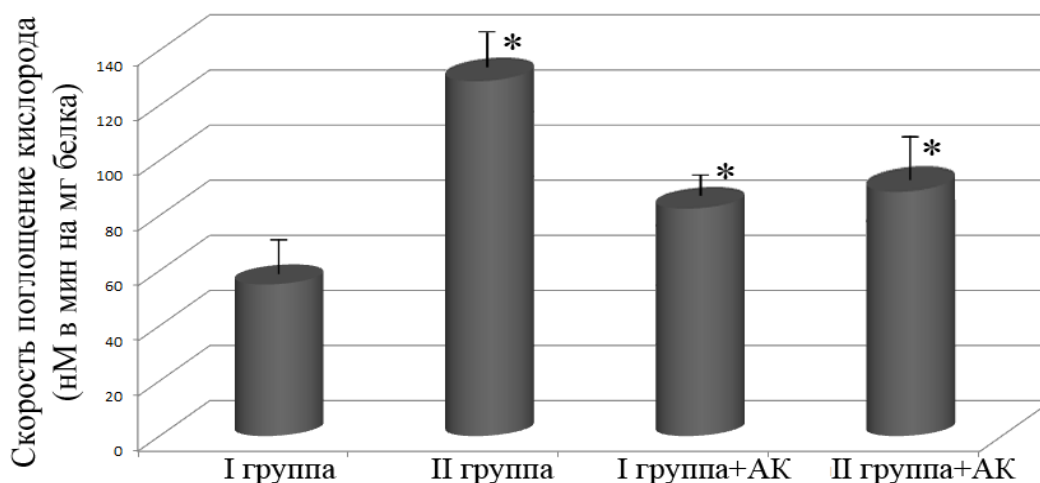
Накопление СЖК в рассматриваемых условиях, по всей видимости, сдерживает активность фосфолипазы  $A_2$ , что препятствует критическому изменению состава мембран, подвижности мембранных структур и способствует сохранению метаболизма кардиомиоцитов при развитии ишемического повреждения миокарда. Однако нельзя быть уверенным, что процессы, наблюдаемые в изолированных митохондриях, являются точным отражением процессов, происходящих в целой клетке. С этой точки зрения представляется необходимым сравнить влияние модуляторов фосфолипазы  $A_2$  на скорость поглощения кислорода кардиомиоцитами интактных и модельных животных при свободном окислении и в присутствии в среде инкубации ЖК.



### **3.2.2 Влияние свободных жирных кислот на поглощение кислорода изолированными кардиомиоцитами**

Результаты, отражающие базовые показатели дыхания кардиомиоцитов в I и II группах представлены на рисунке 3.2-1. Видно, что исходная скорость потребления кислорода кардиомиоцитами при постинфарктном кардиосклерозе значительно превышает таковую в кардиомиоцитах интактных крыс. Такой результат вполне согласуется с существующими представлениями о метаболических последствиях ишемии миокарда, когда избыток СЖК и ингибирование окисления глюкозы обуславливают увеличенную потребность миокарда в кислороде, что сопровождается нарастающим энергодефицитом [223]. Важно отметить, что при постинфарктном кардиосклерозе такая реакция является генерализованной, и существенное снижение энергетических ресурсов показано даже в неповрежденных участках сердечной мышцы [246]. Общий дефицит энергии в клетках миокарда может приводить к активации эндогенных фосфолипаз, способных выщеплять ЖК из мембранных структур клетки в первую очередь арахидоновую кислоту [331]. Действительно, скорость потребления кислорода у кардиомиоцитов, выделенных из сердца крыс с постинфарктным кардиосклерозом, оказалась сопоставима с таковой, полученной для кардиомиоцитов интактных крыс при стимуляции их дыхания арахидоновой кислотой (рис. 3.2.-1). Однако аналогичное добавление арахидоновой кислоты в среду инкубации не приводило к снижению скорости поглощения кислорода кардиомиоцитами при постинфарктном кардиосклерозе (рис.3.2-1). Этот результат можно объяснить тем, что в постинфарктных кардиомиоцитах усиление скорости потребления кислорода уже реализуется через механизм, связанный с действием арахидоновой кислоты, как следствие увеличения ее концентрации в плазме крови и/или в клетках сердца. При этом увеличение скорости потребления кислорода интактными кардиомиоцитами в присутствии арахидоновой кислоты может быть обусловлена стимуляцией фосфолипазы  $A_2$ , что, в свою очередь,

приводит к высвобождению АК из мембранных фосфолипидов и вызывает дисбаланс в процессах мембранного ремоделирования в сторону накопления лизофосфолипидов.

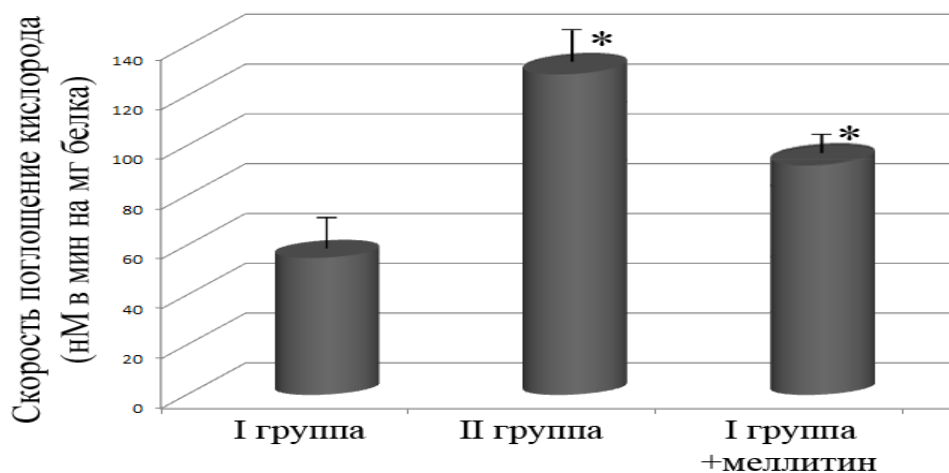


*Рисунок 3.2-1 Влияние арахидоновой кислоты на скорость поглощения кислорода кардиомиоцитами крыс в контроле и при постинфарктном кардиосклерозе*

I группа – скорость поглощения кислорода в группе «контроль»; II группа – скорость поглощения кислорода в группе «инфаркт», подгруппа Иб; АК – арахидоновая кислота; \* -  $p < 0,05$  в сравнении с показателем в I группе.

Для проверки данного предположения о взаимосвязи между усилением дыхания при добавлении арахидоновой кислоты и активацией фосфолипазы  $A_2$  было проведено сравнительное исследование скорости поглощения кислорода изолированными кардиомиоцитами с использованием активатора фосфолипазы  $A_2$ , мелитина [305], и ее ингибитора, БФБ.

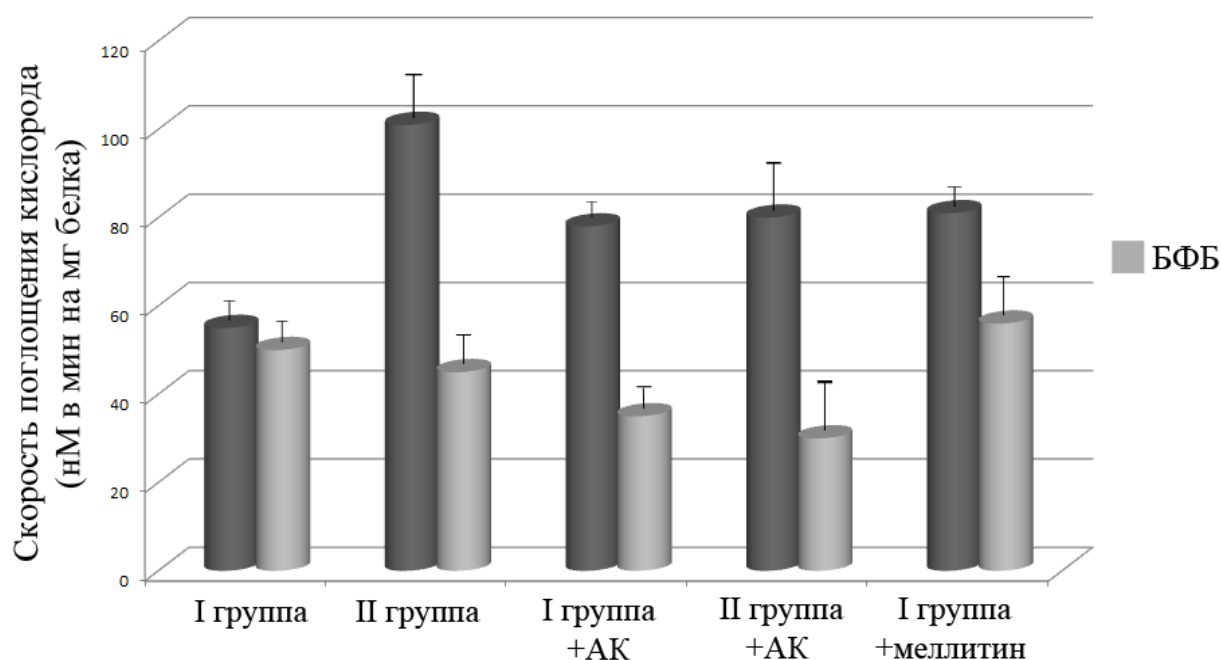
При добавлении в среду инкубации мелиттин увеличивал скорость поглощения кислорода кардиомиоцитами интактных животных, доводя значения этого показателя до уровня, равного таковому в клетках сердца постинфарктных животных (рис. 3.2-2). При сопоставлении результатов по действию арахидоновой кислоты и мелитина обнаружено, что оба вещества оказывают сходные стимулирующие эффекты на дыхание кардиомиоцитов интактных животных (рис. 3.1-1 и 3.1-2).



*Рисунок 3.2-2 Сопоставление стимулированного мелитином дыхания кардиомиоцитов интактных животных с дыханием кардиомиоцитов при постинфарктном кардиосклерозе*

I группа – скорость поглощения кислорода в группе «контроль»; II группа – скорость поглощения кислорода в группе «инфаркт», подгруппа Иб; \* -  $p < 0,05$  в сравнении с показателем в I группе.

Еще более убедительно справедливость предположения об участии фосфолипазы  $A_2$  подтверждают эксперименты с применением БФБ. Стимулированное арахидоновой кислотой или мелитином дыхание интактных кардиомиоцитов при добавлении БФБ снижалось практически до исходного уровня (рис. 3.2-3). При этом БФБ сам по себе не оказывал значительного влияния на скорость поглощения кислорода кардиомиоцитов интактных животных. При добавлении БФБ к кардиомиоцитам крыс с постинфарктным кардиосклерозом скорость поглощения кислорода снижалась до уровня интактных клеток (рис. 3.2-3). Стоит отметить, что выраженность снижения скорости поглощения кислорода изолированными кардиомиоцитами была практически одинаковой при действии БФБ как на ЖК- или мелиттин-стимулированное дыхание интактных кардиомиоцитов, так и на исходное или ЖК-стимулированное дыхание кардиомиоцитов постинфарктного сердца (рис. 3.2-3).



*Рисунок 3.2-3 Сводная гистограмма для сопоставления влияния БФБ на исходное и стимулированное дыхание кардиомиоцитов*

Примечание. I группа – скорость поглощения кислорода кардиомиоцитами крыс группы «контроль»; II группа – кардиомиоцитами группы «инфаркт», подгруппа Иб; АК – арахидоновая кислота; БФБ – бромфенацилбромид.

Таким образом, полученные нами данные по дыханию изолированных кардиомиоцитов свидетельствуют, что при экспериментальном постинфарктном кардиосклерозе для клеток миокарда характерно значительное увеличение потребности в кислороде, не связанное с их инотропной активностью, и обусловленное влиянием ЖК через модуляцию активности фосфолипазы  $A_2$ . В связи с этим, представляется интересным сравнить влияние ЖК, БФБ и мелитина на скорость потребления кислорода кардиомиоцитами в III группе и в группах комбинированного воздействия.

Для этого исследования были отобраны подгруппы на хронической стадии, то есть длительностью не менее 6 недель. Соответственно, это подгруппы Иб и Дб из II и III групп и подгруппа Д2И4 V группы. При выборе из многочисленных подгрупп IV группы критерием отбора стали результаты по дыханию митохондрий в этой группе: при рассмотрении данных в совокупности обращает

на себя внимание подгруппа И4Д2-И4Д6 (табл. 3.2-1). В этой подгруппе, при суммарной длительности 6-10 недель, наблюдаются самые низкие поглощения кислорода при свободном окислении, относительно повышенный ДК, стабильно выраженная реакция на ЖК и БФБ, в сравнении с этими же показателями в других подгруппах на тех же сроках. Таким образом, для исследования дыхания кардиомиоцитов в IV группе были выбраны: И4Д4 – как «наилучшая» и И4Д6 – как «наихудшая», из наиболее устойчивой подгруппы И4Д2-И4Д6, судя по показаниям изменения скорости поглощения кислорода митохондриями.

Результаты проведенного исследования по дыханию кардиомиоцитов в указанных группах представлены в таблице 3.2-3. Аналогично с реакцией митохондрий на добавление ЖК и БФБ в среду инкубации, наблюдалось снижение скорости поглощения кислорода кардиомиоцитами II и III групп при введении в среду инкубации БФБ, арахидоновой и пальмитиновой кислот на фоне исходно высокого потребления кислорода. При этом мелитин не оказывал стимулирующего действия на дыхание кардиомиоцитов (табл. 3.2-3). Эти данные подтверждают высказанное выше предположение о взаимосвязи процессов дыхания, повышения и модуляции жирными кислотами активности фосфолипазы  $A_2$  в кардиомиоцитах при рассматриваемых состояниях. Однако в группах комбинированного воздействия результаты оказались не столь однозначными.

Во-первых, обнаружено резкое отличие по влиянию пальмитиновой и арахидоновой кислот на дыхание кардиомиоцитов в V группе: добавление арахидоновой кислоты приводило к увеличению скорости поглощения кислорода кардиомиоцитами, тогда как добавление пальмитиновой кислоты не оказывало ни тормозного, ни стимулирующего действия (табл. 3.2-3). При этом добавление мелитина в среду инкубации оказывало значительное стимулирующее действие, а БФБ не изменял дыхания кардиомиоцитов (табл. 3.2.-3). Эти наблюдения не позволяют однозначно утверждать, что в данном случае увеличение потребления кислорода кардиомиоцитов обусловлено именно ЖК-опосредованной модуляцией активности фосфолипазы  $A_2$ .

Таблица 3.2-3

Влияние жирных кислот и модуляторов активности фосфолипазы  $A_2$  на скорость поглощения кислорода изолированными кардиомиоцитами ( $M \pm SD$ )

Подгруппы	Скорость поглощения кислорода, нмоль в мин на мг белка				
	Без добавок (СПК <sub>исх</sub> )	Добавки			
		Арахидо- новая к-та	Пальмити- новая к-та	Мелитин	Бромфена- цилбромид
I группа – контроль					
-	55,4±3,0	78,5 ±2,1#	71,1±1,9#	75,5±0,6#	49,9 ±4,0
II группа – «инфаркт»					
И6	122,3±8,5*	81,3 ±6,5#	86,5±5,8#	110,9±9,3*	42,8±4,4#
III группа – «диабет»					
Д6	144,3±12,4*	77,8±4,0#	83,8±9,2#	157±10,8*	50,3±3,7#
IV группа – «инфаркт+диабет»					
И4Д2	178,8±19,4*	50,2 ±3,5*#	63,5±1,8#	153,8±5,7*	45,0±2,3#
И4Д6	189,3±4,2*	186,6±8,8*	185,1±18,8*	212,6±54,4*#	126,3±13,0*#
V группа – «диабет+инфаркт»					
Д2И4	145,8±10,8*	245,5±14,7*	146,3±11,4*	214,0±27,7*#	136,5±14,7*

Примечание. \* -  $p < 0,05$  в сравнении с соответствующим показателем в I группе; # -  $p < 0,05$  в сравнении с показателем СПК<sub>исх</sub> в этой группе..

Во-вторых, в IV группе также обнаружена разная реакция на ЖК и модуляторы фосфолипазы  $A_2$  в двух исследуемых подгруппах: в подгруппе И4Д4 обе ЖК и БФБ оказывали ингибирующее влияние на скорость потребления кислорода кардиомиоцитами, при этом мелитин не стимулировал дыхание клеток (табл. 3.2-3). В подгруппе И4Д6, напротив, ЖК не влияли на скорость потребления кислорода кардиомиоцитами, тогда как мелитин оказывал небольшое стимулирующее, а БФБ – ингибирующее действие на дыхание клеток.

Разнообразие ответных реакций кардиомиоцитов на насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты, стимуляцию или ингибирование фосфолипазы  $A_2$  при прямом, опосредованном или комбинированном воздействиях свидетельствуют о том, что изменение активности эндогенных фосфолипаз – не

единственная мишень неэтерифицированных ЖК как модуляторов метаболизма кардиомиоцитов в динамике развития адаптивных процессов в миокарде. Однако в большинстве случаев схожие изменения в скорости потребления кислорода митохондрией и кардиомиоцитом на добавление СЖК направляют на поиск других механизмов регуляции метаболизма кардиомиоцитов с участием ЖК на митохондриальном уровне.

При сопоставлении литературных данных часто приходится сравнивать результаты, полученные как на клеточном, так и на органном уровне. Одной из проблем экстраполяции и интерпретации результатов, полученных на изолированных органах, клетках и митохондриях, являются экспериментальные условия, создаваемые искусственно и, конечно же, не в полной мере отражающие естественные условия *in situ*. В частности, для изолированных кардиомиоцитов невозможно воспроизвести условия естественной оксигенации и ее регуляции, обусловленной поступлением кислорода из крови и изменением коронарного кровотока. С этой точки зрения оказалось интересным выяснить, как степень оксигенации стандартной среды инкубации влияет на скорость потребления кислорода изолированными клетками сердца экспериментальных животных при влиянии на дыхание кардиомиоцитов исследуемых СЖК.

Учитывая высокую чувствительность к кислороду клеток сердца, в качестве среды с низким содержанием кислорода использовали среду инкубации кардиомиоцитов с концентрацией кислорода  $[O_2] \leq 8$  мг/л, а среды с высоким содержанием кислорода -  $[O_2] \geq 16$  мг/л.

На рисунке 3.2-4 представлены результаты проведенного исследования дыхания кардиомиоцитов в присутствии пальмитиновой или арахидоновой кислоты. За нулевую точку принята исходная скорость потребления кислорода клетками при низкой или высокой концентрации кислорода. Стимулирующее или ингибирующее влияние СЖК показано в виде отклонений этого показателя в положительную (активация) или отрицательную (торможение) зоны графика (рис. 3.2-4).

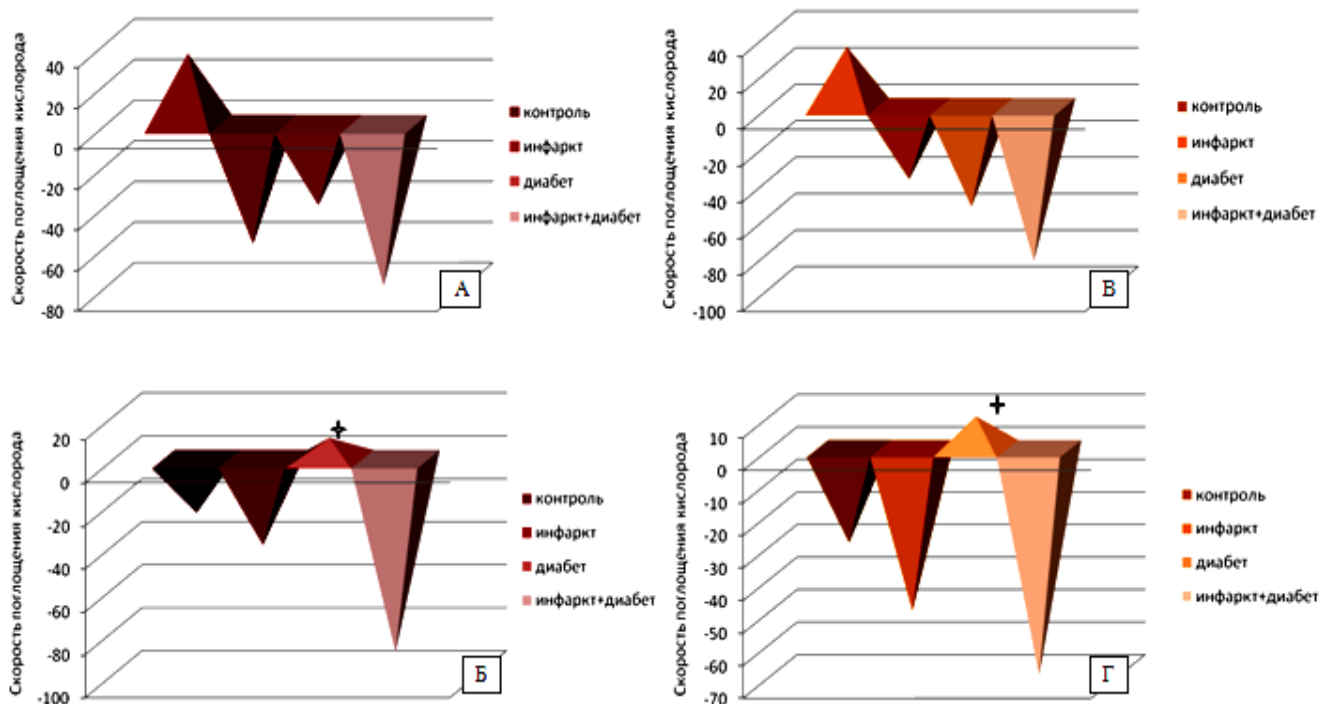


Рисунок 3.2-4 Влияние пальмитиновой (А, Б) и арахидоновой (В, Г) кислот на скорость потребления кислорода изолированными кардиомиоцитами животных разных экспериментальных групп в условиях высокой (А, В) и низкой (Б, Г) концентрации кислорода в среде инкубации

А, В – в среде инкубации  $[O_2] \geq 16$  мг/л; Б, Г – в среде инкубации  $[O_2] \leq 8$  мг/л; \* -  $p > 0,05$  в сравнении с «нулевым» показателем (во всех остальных случаях  $p < 0,05$ ). Дополнительные пояснения в тексте.

Из полученных данных следует, что направленность и интенсивность действия СЖК определяется как функциональным состоянием кардиомиоцитов, обусловленным моделируемыми воздействиями, так и содержанием кислорода во внеклеточном пространстве (рис. 3.2-4). При этом необходимо отметить, что исходная скорость дыхания кардиомиоцитов, независимо от их состояния, в равной степени снижалась в среде при низкой концентрации кислорода, что объяснимо с точки зрения ограничения скорости диффузии  $O_2$  при уменьшении его градиента. Именно поэтому исходная скорость поглощения кислорода кардиомиоцитами в данном исследовании была принята за «нулевой» показатель (рис. 3.2-4). Обнаружено, что как пальмитиновая, так и арахидоновая жирные



кислоты, стимулировали дыхание кардиомиоцитов интактных крыс только при высоком содержании кислорода в среде инкубации, при этом во всех экспериментальных группах - «инфаркт» (подгруппа И6), «диабет» (подгруппа И6) и «инфаркт+диабет» (подгруппа И4Д2) - обе СЖК оказывали ингибирующее действие (рис. 3.2-4, А, Б). В среде инкубации с низким содержанием кислорода пальмитиновая и арахидоновая кислоты снижают скорость потребления кислорода кардиомиоцитами интактных животных и животных групп «инфаркт» и «инфаркт+диабет»; при этом ингибирующее влияние СЖК было наиболее выражено в группе «инфаркт+диабет» (рис. 3.2-4, В, Г). Однако в группе «диабет» ни та, ни другая ЖК не оказывали заметного влияния на дыхание кардиомиоцитов (рис. 3.2-4, В, Г).

Обнаруженная разнонаправленность действия и кислород-зависимость влияния СЖК, как насыщенной, так и ненасыщенной, по-видимому, объясняется именно функциональным состоянием митохондрий, их способностью утилизировать кислород и использовать ЖК в качестве энергетического субстрата. Одной из главных причин изменения функций митохондрий является нарушение барьерных свойств митохондриальных мембран. Хорошо известно, что накопление токсичных промежуточных продуктов окисления липидов в сердце при недостаточном кровоснабжении миокарда и диабете может вызывать серьезные функциональные расстройства в сердце [115, 223]. Показанные эффекты СЖК могут быть обусловлены их способностью как восстанавливать структуру, так и увеличивать неспецифическую проницаемость мембран митохондрий. В многочисленных исследованиях показана взаимосвязь между увеличением концентрации СЖК и стимулированием неспецифической проницаемости митохондриальных мембран, что, в свою очередь, может приводить к разобщению окислительного фосфорилирования, энергодефициту, нарушению ионного гомеостаза в кардиомиоцитах [58, 169, 223].

### 3.3 Механизмы разобщающего действия жирных кислот как адаптивная защита сердца

Как уже было показано выше, СЖК, в зависимости условий окружающей клетки среды, могут оказывать разное по интенсивности и направленности влияние даже в кардиомиоцитах здорового сердца. Важным фактором, определяющим конкретный механизм действия ЖК, очевидно, является их вне- и внутриклеточная концентрация. При небольшом увеличении экзогенные СЖК могут оказывать ресопрягающее действие, восстанавливая перенос протонов в дыхательной цепи митохондрий и окисление НАД-зависимых субстратов; в микромолярных концентрациях СЖК вызывают «мягкое разобщение» и ингибируют процесс образования АФК, не приводя при этом к изменению проницаемости внутренней мембраны митохондрий сердца [129, 291]. Предполагается, что накопление ТГ в миокарде и изменение интенсивности окисления ЖК направлено на защиту миокарда от накопления вредных продуктов обмена и поддержание энергетического метаболизма в кардиомиоцитах при сердечной недостаточности и сахарном диабете [115, 223]. С этой точки зрения представляется важной задачей оценить вклад различных механизмов разобщения окисления и фосфорилирования в митохондриях сердца с участием СЖК при развитии процессов ишемического повреждения миокарда с позиции их защитного действия.

СЖК могут оказывать протонофорное действие при участии белков-переносчиков внутренней мембраны митохондрий: АДФ/АТФ- и аспартат/глутаматного антипортеров. В этом случае ингибитор АДФ/АТФ-антипортера, карбоксиатрактат (кАтр), и субстраты переносчиков - АДФ, аспартат и глутамат - способны подавлять разобщающее действие ЖК [39, 58, 74, 75]. В нашем исследовании АДФ в присутствии олигомицина (ингибитора протонного канала АТФазы [91]) и кАтр снижали скорость потребления кислорода митохондриями в экспериментальных группах (табл. 3.2-4).

Таблица 3.2-4

Влияние различных метаболических супрессоров на скорость поглощения кислорода митохондриями сердца экспериментальных крыс ( $M \pm m$ )

Подгруппы	Скорость поглощения кислорода, нмоль в мин на мг белка			
	Свободное окисление	Добавки		
		карбоксиатрактант	олигомицин+АДФ	циклоспорин А
I группа – контроль				
-	26,5±1,9	28,8±4,5	26,3±2,5	24,0±2,0
II группа «инфаркт»				
И2	76,0±1,9*	31,4±1,9#	44,2±4,2#	34,1±1,7#
И4	78,3±6,2*	52,5±2,9#	56,3±2,5#	39,0±2,0#
И6	126±3,4*	75,9 ±3,5#	72,5±6,3#	91,4±4,1#
III группа - «диабет»				
Д2	92,3±5,8*	89,8±3,9	33,3±3,2#	63,5±5,3#
Д4	135±3,9*	129 ±6,2	71,6±3,5#	103±9,8#
Д6	156±5,4*	129±8,3	91,1±2,7#	106±9,1#
IV группа - «инфаркт+диабет»				
И2Д2	65,4±2,5*	31,6±3,3 #	36,6±2,6#	35,6±1,6#
И2Д4	138±3,4*	83,6±3,9#	80,3±5,7#	99,2±6,4#
И2Д6	158±14,1*	135±11,9	122±9,8#	116±12,0#
И4Д2	78,6±5,2*	69,8 ±4,4	54,1±3,7#	68,8 ±5,2
И4Д4	91,0±3,4*	89,2 ±3,7	58,9±2,1#	86,3±3,9
И4Д6	110±4,1*	86,9±9,9	88,9±5,4#	114 ±2,8
И6Д2	87,3±4,4*	72,1±5,2	54,4±3,2#	61,2±4,6#
И6Д4	135±9,4*	139,4±4,3	62,4±3,2#	87,1±3,8#
И6Д6	167±8,2*	143±7,2	129±6,2#	123±6,4#
V группа - «диабет+инфаркт»				
Д2И2	79,9±1,7*	56,9±6,2#	56,2±5,2#	73,2±3,6
Д2И4	117±7,7*	72,1±7,5#	77,5±6,8#	93,6±4,7

Примечание. \* - различия в столбце «свободное окисление» статистически значимы ( $p < 0,05$ ) при сравнении с показателем в I группе; # - различия в группе статистически значимы ( $p < 0,05$ ) при сравнении с показателем «свободное окисление» в этой же группе.

Однако нужно отметить, что в III и, на отдаленных сроках развития, IV группах реакция на кАтр слабо выражена или отсутствует, а ингибирующее влияние АДФ уменьшается по мере увеличения суммарной длительности патологий (табл. 3.2-4). Эти результаты можно объяснить тем, что АДФ/АТФ- и аспартат/глутаматный антипортеры могут функционировать совместно как разобщающий комплекс с общим пулом СЖК [39, 74]. Возможно, что и в наших условиях СЖК под влиянием кАтр перемещаются к аспартат/глутаматному антипортеру, благодаря чему компенсируется выключение из разобщения АДФ/АТФ-антипортера. В пользу этого предположения свидетельствуют данные, что в присутствии глутамата снижается разобщающее действие СЖК [40].

При обсуждении в литературе физиологического значения процессов разобщения в митохондриях было высказано предположение, что протонофорная разобщающая активность СЖК зависит от интенсивности формирования АФК и это разобщение направлено на снижение их образования [39, 58, 199, 169, 291]. В присутствии антиоксидантов разобщающая активность пальмитата приблизительно на 80% подавляется АДФ и аспартатом, а в отсутствие антиоксидантов накопление АФК приводит к изменению свойств АДФ/АТФ-антипортера [39, 74]. Соответственно, сохраненная реакция на АДФ свидетельствует об активности антиоксидантных систем в митохондриях [39, 74, 75]. Таким образом, наблюдаемое нами уменьшение реакции на АДФ по мере развития рассматриваемых патологий (табл. 3.2-4) может быть следствием истощения возможностей антиоксидантных систем в кардиомиоцитах. Известно, что при хронической ишемии в клетках сердца нарушается баланс между перекисным окислением липидов и эндогенными жирорастворимыми антиоксидантами в сторону усиления ПОЛ [45].

В рамках гипотезы о защитной функции разобщения предполагается, что если системы утечки протонов с участием СЖК по рассмотренному выше механизму с участием АДФ/АТФ- и аспартат/глутамат- антипортеров оказывается недостаточно, включается более радикальный путь, ведущий к той же цели [310].

Подобным механизмом может быть формирование МРТР, пор внутренней мембраны митохондрий, образующихся в определенных специфических условиях, при накоплении свободных жирных кислот и перегрузке митохондрий ионами кальция [129, 169, 250, 310]. В нашем исследовании ингибирование МРТР циклоспорином А приводило к подавлению дыхания при при обеих монопатологиях (II и III группы) (табл. 3.2-4). В группах комбинированного воздействия ингибирующее действие циклоспорино А проявлялось не во всех группах, а именно, отсутствовала в подгруппах И4Д2-Д6 (IV группа) и Д2И2-4 (V группа) (табл. 3.2-4). Нужно отметить, что подгруппе И4Д2-6 отсутствовала реакция не только на циклоспорин А, но и на кАтр, при этом нарастание свободного дыхания было наиболее медленным в сравнении с остальными экспериментальными группами (табл. 3.2-4). Возможно, это объясняется некоторой стабилизацией морфофункциональных показателей на этих сроке комбинированного воздействия. С другой стороны, отсутствие реакции на используемые нами ингибиторы может быть объяснено включением в данных группах других механизмов разобщения. Так, например, СЖК способны формировать циклоспорин А-нечувствительные поры [16, 17, 129]. Разобщающее действие СЖК может осуществляться с с участием митохондриальных УСР-белков [169, 223, 241, 310]. Подавление дыхания при рассматриваемых состояниях, как уже показано выше, может быть обусловлено ингибированием митохондриальной фосфолипазы А<sub>2</sub> (раздел 3.2.1). Не исключено, что разнообразие ответных реакций на супрессоры дыхания в разных подгруппах обусловлено одновременным включением разных механизмов разобщения с участием СЖК, подобно тому, как это происходит в митохондриях при стабилизации параметров метаболизма в процессе выхода животных из гипометаболического состояния [96].

Важно отметить, что все перечисленные выше механизмы разобщения являются кальций-чувствительными [131]. Нарастание патологических изменений в метаболизме кардиомиоцитов большинство исследователей так или иначе

связывает с нарушением внутриклеточного обмена  $\text{Ca}^{2+}$  [131]. Сочетание ЭГТА+А23187 способствует уменьшению пула ионов кальция в митохондриях:  $\text{Ca}^{2+}$ -ионофор А23187 [120] способствует выходу кальция из митохондрий во внешнюю среду, где ЭГТА связывает  $\text{Ca}^{2+}$ , препятствуя его действию. Как видно из таблицы 3.2-4, в этих условиях наблюдается выраженное подавление свободного дыхания при всех моделируемых состояниях. При этом на дыхание митохондрий в контрольной группе ЭГТА и А23187 в используемых концентрациях не оказывали значительного влияния. На ранних стадиях развития адаптивных процессов ЭГТА+А23187 снижает дыхание практически до уровня в митохондриях контрольной группы животных (табл. 3.2-4, подгруппы И2, Д2, И2Д2). Стоит обратить внимание на тот факт, что выраженность ингибирующего влияния ЭГТА+А23187 на дыхание митохондрий во всех экспериментальных более значима, нежели действие других рассмотренных выше супрессоров дыхания, и сохраняется при отсутствии реакции на них (табл. 3.2-4, Д2-6, И4Д2-6). Другими словами, во всех случаях сохраняется чувствительность к  $\text{Ca}^{2+}$ , что в свою очередь, является свидетельством обратимости процесса разобщения в митохондриях, в том числе и с участием МРТР. При физиологических условиях МРТР функционирует в низкопроводящем состоянии, пропускает протоны, ионы калия и кальция, открывается кратковременно и закрывается при изменении рН матрикса митохондрий [19, 143, 250]. Спонтанное открытие/закрытие МРТР и  $\text{Ca}^{2+}$  - индуцированный отток  $\text{Ca}^{2+}$  из матрикса защищает митохондрии покоящихся клеток от осмотического шока и окислительного стресса [143].

Избыточное накопление кальция и насыщение  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсоров поры приводит к открытию поры в высокопроводящем состоянии, когда в матрикс начинают проникать растворенные вещества массой до 1,5 кДа, происходит выравнивание всех градиентов, набухание митохондрий, разворачивание крист, разрыв внешней мембраны и высвобождение факторов, запускающих гибель клетки по типу апоптоза или некроза [169, 241, 250].

Нужно отметить, что в экспериментальных условиях СЖК оказывают, в соответствии с их фактической концентрацией, различное влияние на энергосберегающие системы митохондрий интактных крыс [129]. Субмикромольные концентрации ЖК защищают от рН-зависимой депрессии протон-переносящую активность  $bc_1$  комплекса ЭТЦ митохондрий. В микромолярных концентрациях СЖК действуют как природные протонофоры, вызывая мягкое разобщение, которое предотвращает производство реактивного кислорода. При нагрузке  $Ca^{2+}$  действие СЖК в микромолярных концентрациях приводит к увеличению проницаемости внутренней мембраны митохондрий, набуханию матрикса, разрыву наружной мембраны и высвобождению межмембранных проапоптотических белков. В митохондриях сердца СЖК, по-видимому, вызывают  $Ca^{2+}$ -опосредованное преобразование АТФ/АДФ-антипортера из переносчика в канал. При окислительном стрессе этот  $Ca^{2+}$ /ЖК-индуцированный циклоспорин А-нечувствительный канал преобразуется в классическую пору МРТР [129].

Таким образом, по совокупности полученных нами и литературных данных можно предположить, что разобщение в митохондриях сердца при моделируемых состояниях выполняет защитную функцию и направлено на предотвращение генерации и накопления АФК. Полученные результаты позволяют уверенно утверждать, что это разобщение носит неспецифический характер и реализуется с одновременным включением как минимум двух механизмов: с участием АДФ/АТФ-антипортера и циклоспорин-чувствительной поры, МРТР. На ранних стадиях развития процессов в обеих группах комбинированного воздействия преимущественно реализуется механизм с участием АТФ/АДФ- и, возможно, аспартат/глутаматного антипортеров при постепенном включении и преобладании на поздних стадиях механизма с участием МРТР.

### 3.3 Оценка эффективности аэробного и анаэробного процессов энергообразования по активности ферментов в кардиомиоцитах\*

Непрерывная работа сердца требует больших энергетических затрат: в норме энергетические запросы сердца удовлетворяются окислением, в основном, жирных кислот, и, частично глюкозы. При кислородном же дефиците предпочтительнее окисление глюкозы, как более «кислород-эффективного» процесса, что и наблюдается при формировании сердечной недостаточности вследствие постинфарктного ремоделирования миокарда [223]. Однако при диабете, в первую очередь, в связи с нарушением инсулин-чувствительного транспорта глюкозы, основным субстратом являются ЖК. К тому же массивное проникновение ЖК в митохондрии приводит к избыточному накоплению в них ацетил-КоА, что влечёт за собой угнетения активности пируватдегидрогеназного комплекса [3, 223]. Кроме того, включение ацетил-КоА в цикл лимонной кислоты приводит к сопутствующему накоплению цитрата и ингибированию фосфофруктокиназы, что, в конечном счете, приводит к снижению количества пирувата, и основным энергетическим источником в этих условиях становятся ЖК.

Подавление гликолиза серьезно снижает резервные возможности миокарда, так как энергетическая эффективность этого процесса значительно меньше, чем эффективность окислительного фосфорилирования. Однако для целого ряда процессов, которые прямо или косвенно регулируют уровень  $Ca^{2+}$  в цитоплазме, предпочтительным источником АТФ является гликолиз. Накопление  $Ca^{2+}$  вызывает опасные последствия, в частности, избыток  $Ca^{2+}$  в митохондриях приводит к нарушению их нормального функционирования.

---

\* Этот раздел выполнен совместно с Д.С. Кондратьевой, научным сотрудником лаборатории молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики, ФГБУ «НИИ кардиологии» СО РАМН, г. Томск



На начальном этапе изменения дыхательной цепи митохондрий сопровождаются (после кратковременного усиления) резким снижением активности НАД-зависимого пути окисления [49], что приводит к активизации компенсаторных альтернативных метаболических потоков, в частности, сукцинатоксидазного пути окисления. Феномен быстрого окисления янтарной кислоты сукцинатдегидрогеназой с быстрым ресинтезом АТФ, получил название «монополизации дыхательной цепи» [44]. В механизме декомпенсации сердечной патологии важнейшую роль играет снижение активности быстрого метаболического кластера митохондрий. В большинстве случаев за этим стоит ингибирование активного центра сукцинатдегидрогеназы.

Существует гипотеза, что при адаптации к возрастающим нагрузкам происходит перестройка митохондриальной системы энергообеспечения в сердце [38], при которой наработка радикалов  $O_2$ , которая на 70% происходит в митохондриях, минимальна, а энергетический выход в виде ресинтеза АТФ – максимален, подтвержденная экспериментальными данными [71]. Такая ситуация возможна, если при фосфорилирующем дыхании митохондрий используется флавинзависимый субстрат сукцинат [44, 54, 289]. Более того, именно сукцинат способен активно окисляться в тканях при недостатке  $O_2$ , при этом совместно с пируватом они являются хорошими антиоксидантами [128, 150].

Как уже было показано (раздел 3.2.1), при обоих моделируемых состояниях наблюдается увеличение уровня СЖК в сыворотке крови, повышение скорости потребления кислорода и разобщение окислительного фосфорилирования в митохондриях сердца экспериментальных животных. Все эти показатели, как правило, на хронической стадии значительно отличались от контрольных. Поэтому представилось интересным исследование энергетического обмена кардиомиоцитов в условиях, когда резервные возможности срочной адаптации, по-видимому, уже исчерпаны. В связи с вышесказанным, представляется важным определение энергетического субстрата и оценка

эффективности двух основных энергопоставляющих процессов при развитии адаптивных процессов при моделируемых состояниях.

Многочисленными исследователями предполагается, что основным звеном патогенеза на уровне энергообразования при исследуемых патологиях является массивный вход СЖК в кардиомиоциты, с соответствующими печальными последствиями для клетки [115, 223]. Проведенное в настоящей работе исследование не показало статистически значимых различий по уровню СЖК в сыворотке крови между группами отдельных (И6, Д6) и комбинированного (И4Д2) воздействий, хотя в сравнении с контрольной сывороткой этот показатель во всех случаях был выше (табл. 3.2-1). Полученный результат хорошо согласуется с литературными данными. Однако при исследовании содержания СЖК в гомогенате миокарда контрольных и экспериментальных групп не было обнаружено различий между содержанием СЖК в кардиомиоцитах интактных и модельных животных (табл. 3.3-1).

Таблица 3.3-1

Содержание свободных жирных кислот и активность лактатдегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы и щелочной фосфатазы в миокарде крыс ( $M \pm m$ )

Группы	[СЖК], нмоль/мг белка		Активность ферментов, о.ед.		
	гомогенат	митохондрии	ЛДГ	СДГ	ЩФ
контроль	1,02±0,14	0,83±0,12	0,73±0,04	0,51±0,02	0,46±0,01*
«инфаркт» (И6)	1,19±0,14	2,86±1,15*#	0,41±0,01*	0,32±0,01*#	0,24±0,02*#
«диабет» (Д6)	1,51±0,17	5,83±1,31*^	0,37±0,03*	0,20±0,02*^	0,50±0,02^
«инфаркт+диабет» (И4Д2)	1,35±0,15	1,88±0,78*#^	0,62±0,03#^	0,78±0,05*#^	0,47±0,03

Примечание. \* -  $p < 0,01$  по отношению к контролю; # -  $p < 0,01$  в сравнении с показателями в группе «диабет»; ^ -  $p < 0,01$  в сравнении с показателями в группе «инфаркт».

Другими словами, этот результат свидетельствует о том, что контролирующий механизм поступления СЖК в клетку продолжает успешно

функционировать и при хронических состояниях. С этой точки зрения гораздо более важным представляется дальнейшая судьба СЖК в клетке.

Интересный результат показало исследование содержания СЖК непосредственно в суспензии митохондрий: наблюдалось выраженное отличие по содержанию ЖК в митохондриях животных всех групп. Наиболее высокое значение этого показателя получено в III группе: уровень ЖК более чем в 5 раз превышал контрольную величину. В митохондриях сердца животных группы «инфаркт» обнаружено трехкратное увеличение содержания жирных кислот (табл. 3.3-1). Однако в IV группе, комбинированного воздействия, этот показатель был наиболее близким к контрольному (таблица 3.3-1). Возможно, это обусловлено разными механизмами утилизации ЖК в кардиомиоцитах при разных моделируемых состояниях.

С этой точки зрения определенный интерес представляют данные корреляционного анализа связи показателей  $[ЖК]_{мх}$  с показателями ДК и скорости поглощения кислорода митохондриями при внесении в инкубационную среду ЖК (табл. 3.3-2).

Таблица 3.3-2

Взаимосвязь показателей дыхания и концентрации жирных кислот в митохондриях: ранговые корреляции Спирмена ( $p < 0,05$ )

Группы	$[СЖК]_{мх} \& ДК, г$	$[СЖК]_{мх} \& V_{АК}, г$	$[СЖК]_{мх} \& V_{ПК}, г$
II, подгруппа Иб	-0,55	-0,40	-0,38
III, подгруппа Дб	-0,03	-0,38	-0,42
IV, подгруппа И4Д2	0,33	0,63	0,70

*Примечание:  $[ЖК]_{мх}$  – концентрация ЖК в суспензии митохондрий; ДК – дыхательный контроль;  $V_{АК}$  и  $V_{ПК}$  – скорость поглощения кислорода митохондриями крыс при внесении в инкубационную среду арахидоновой и пальмитиновой кислот, соответственно.*

У крыс II группы выявлена отрицательная связь между концентрацией ЖК в митохондриях и всеми тремя исследуемыми параметрами. Эти данные

согласуются с гипотезой об угнетении ЖК дыхания митохондрий этой группы из-за их накопления в органеллах. У животных в III группе изменение величины ДК не связан с концентрацией ЖК в митохондриях. В группах комбинированного воздействия все наблюдаемые связи являются положительными (табл. 3.3-2). Повышение концентрации ЖК в митохондриях IV группы вносит значимый вклад в повышение ДК, что может свидетельствовать о восстановлении способности к окислению ЖК в группах комбинированного воздействия. Об этом же свидетельствует и положительная корреляционная связь между увеличением концентрации ЖК в матрике и окислительной способностью митохондрий при внесении ЖК в среду инкубации (табл. 3.3-2).

Окисление ЖК является кислородзатратным процессом, что повышает значимость анаэробного пути энергообразования. По результатам гистоэнзимологического исследования активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) кардиомиоцитов животных II и III групп достоверно ниже, чем у контрольных животных (табл. 3.3-1), что может свидетельствовать о снижении процесса анаэробного энергообразования. При комбинированном воздействии активность ЛДГ не имела статистически значимых различий с данным параметром в контрольной группе, что предполагает нормальное протекание процессов гликолиза в IV группе.

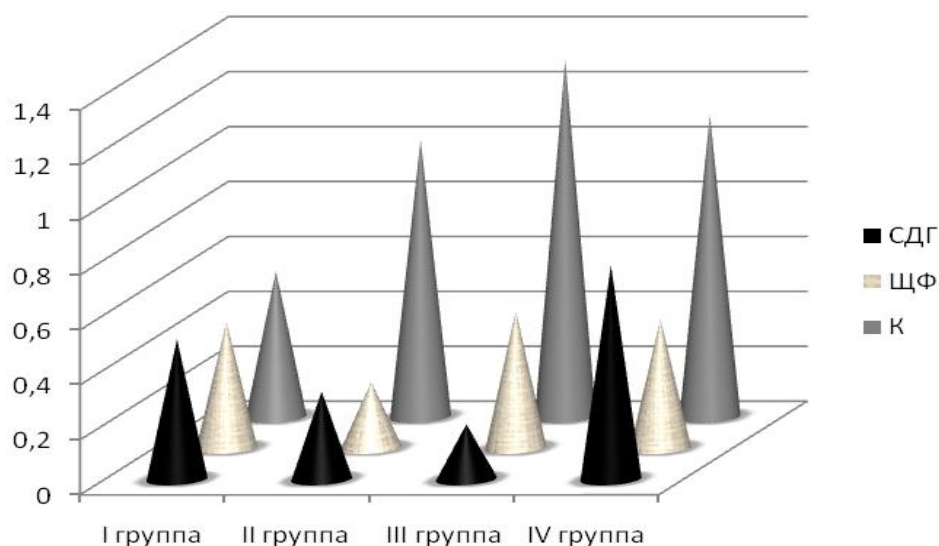
При анализе результатов по активности сукцинадегидрогеназы (СДГ) обнаружено снижение этого показателя в 1,5 раза во II группе, тогда как в III группе наблюдалось снижение активности этого фермента в 2,6 раза, в сравнении с группой «контроль» (табл. 3.3-1). Однако при сочетанных состояниях, напротив, активность СДГ в 2,5 – 3,5 раза выше не только в сравнении с монопатологиями, но и статистически значимо превышает этот показатель в контрольной группе (табл. 3.3-1).

Результаты данного исследования свидетельствуют о том, что в миокарде при развитии патологических состояний в отдельности снижается эффективность как аэробного, так и анаэробного пути энергообразования. Однако при

комбинированном воздействии интенсивность анаэробных процессов сохраняется, а активность аэробного пути образования АТФ даже повышается. С одной стороны, полученные данные могут быть обусловлены компенсаторно-адаптационной перестройкой процессов энергопродукции в митохондриях сердца, с переключением на сукцинатоксидазный путь окисления. С другой стороны, усиление аэробных процессов может быть так же связано с активацией ангиогенеза в рассматриваемых условиях, и, соответственно, с увеличением кровоснабжения миокарда и улучшением транспортной функции сосудов микроциркуляторного русла.

Для оценки состояния капиллярного звена микроциркуляторного русла часто используют такие показатели, как плотность распределения капилляров и в качестве маркера транспортной функции эндотелия активность щелочной фосфатазы (ЩФ) [25, 29, 37]. Активность ЩФ связана с трансапикалярным обменом веществ, транспортом ионов и преобразованием энергии и может отражать интенсивность обменных процессов в патологическом миокарде [37]. Действительно, как уже показано в главе 3.1, при развитии моделируемых состояний наблюдается увеличение плотности капилляров в расчете на  $1 \text{ см}^2$  миокарда. Количество капилляров в миокарде левого желудочка во всех группах (на рассматриваемом сроке патологий длительностью 6 недель) в два и более раза превышало этот показатель в контрольной группе (табл. 3.1-2). Однако исследование по активности ЩФ показало различие в состоятельности транспортной функции эндотелия капилляров при прямом, опосредованном и комбинированном воздействии (табл. 3.3-1). Так, во II группе наблюдалась низкая активность ЩФ, в то время как в III и IV группах не обнаружено отличий в величине этого показателя в сравнении с контрольным, хотя наиболее значимое увеличение количества капилляров обнаружено именно в группах с диабетом (табл. 3.1-2). Тем не менее, полученные данные по увеличению плотности капилляров в миокарде модельных животных, казалось бы, позволяют утверждать, что в усилении аэробного звена энергопродукции важным звеном

является улучшение кислородного обеспечения вследствие активации ангиогенеза. Однако сопоставление данных по активности СДГ и ЩФ показало отсутствие связи между этими двумя показателями и плотностью капилляров (рис. 3.3-1).



*Рисунок 3.3-1 Визуальное сопоставление активности сукцинатдегидрогеназы, щелочной фосфатазы и плотности капилляров в миокарде экспериментальных крыс (на основании данных из таблиц 3.1-2 и 3.3-1)*

СДГ – сукцинатдегидрогеназа; ЩФ – щелочная фосфатаза; К – количество капилляров\* $10^4$  в  $1\text{ см}^2$  миокарда.

Так, например, в III и IV группах показатели по количеству капилляров и активности ЩФ были практически одинаково высокими, но при этом активность СДГ при комбинированном воздействии была почти в 4 раза выше, чем в III группе. Наиболее низкая активность ЩФ (при высокой плотности капилляров) наблюдалась во II группе, однако активность СДГ при этом была выше, чем в III группе, хотя и не так значительно, как в контрольной группе или при комбинированном воздействии (рис. 3.3-1). Соответственно, нельзя однозначно утверждать, что изменения в интенсивности аэробного процессов энергообразования в митохондриях обусловлены только улучшением

кровоснабжения миокарда, хотя это, несомненно, вносит значительный вклад в поддержании функциональной активности сердца.

Таким образом, полученные данные подтверждают предположение, что при моделируемых состояниях в группах комбинированного воздействия кардиомиоциты имеют менее выраженное нарушение энергетического метаболизма и это, в какой-то степени, связано с адаптивной активацией СДГ. Предполагается, что именно изменение активности СДГ обеспечивает адаптацию и поддержание энергетики клетки в условиях стресса [44, 49].

### **3.4 Сравнительный анализ изменений показателей стресс-реакции в организме животных из разных экспериментальных групп**

Поскольку локальное нарушение кровоснабжения и инфаркт миокарда являются прямым вмешательством в работу сердца, это может предполагать активацию специфических для данного органа защитных реакций. Диабет вызывает опосредованное, не прямое воздействие на миокард, и нарушение метаболизма в данном случае является следствием изменений последнего на уровне всего организма. Соответственно, повышение устойчивости миокарда при сочетании патологий связано, скорее всего, с проявлениями неспецифической стресс-реакции. Такая реакция является не только предшественником адаптивного ответа, но и играет важную роль в его формировании [56, 61]. В классическом понимании общего адаптационного синдрома, стадия истинной резистентности характеризуется комплексом изменений в нейроэндокринной системе и, в частности, увеличением секреции тропных гормонов и гормонов коры надпочечников [31, 56]. Различия в реакции миокарда на отдельные и сочетанные патологии могут быть обусловлены тем, что в разных исходных условиях одни и те же стресс-факторы могут восприниматься как различные по силе или степени биологической значимости, что, в свою очередь, определяет разные по качеству стандартные адаптационные реакции организма [31]. Исходя из вышесказанного, представляется важной задачей провести сравнительный анализ и оценить выраженность стресс-реакции по изменению уровня стресс-гормонов в сыворотке крови крыс в динамике развития моделируемых состояний, а также при их сочетании.

Миоглобин обнаруживается в плазме крови при поражениях (травма, ишемия) любого типа мышц и, в частности, является клиническим маркером некроза сердечной мышцы, ассоциированным с инфарктом миокарда. При моделируемых состояниях на всех стадиях их развития обнаружено увеличение уровня сывороточного миоглобина (табл. 3.4-1).



Таблица 3.4-1

Показатели стресс-реакции при постинфарктном и диабетическом повреждении миокарда ( $M \pm m$ )

Подгруппы	Концентрация в сыворотке крови					
	Миоглобин, нг/мл	АКТГ, нг/л	Кортизол, нмоль/л	Инсулин, мкед/мл	Индекс кортизол/ инсулин	Вс1-2, нг/мл
<b>I группа – контроль</b>						
-	27±1,5	85,6±2,4	16,3±0,5	9,3±0,5	1,8±0,1	12,7±0,3
<b>II группа - «инфаркт»</b>						
И2	97±2,0*	81,9±1,9	28,1±0,6*	8,3±1,9	3,4±0,3*	-
И4	80±2,5*	76,3±1,1*	29,4±0,9*	8,7±1,9	3,3±0,5*	-
И6	87±3,6*	74,4±1,1*	29,7±1,9*	8,3±1,4	3,4±0,6*	14,1±0,2
<b>III группа – «диабет»</b>						
Д2	56±1,8*	73,5±1,0*	33,7±3,6*	1,4±0,05*	24,2±2,5*	-
Д4	55±1,6*	77,0±1,2*	33,1±1,6*	1,5±0,09*	22,0±1,7*	-
Д6	94±1,1*	80,0±2,3	30,6±0,9*	1,4±0,16*	21,6±2,3*	17,4±0,4*
<b>IV группа – «инфаркт+диабет»</b>						
И2Д2	57±1,5*	94,4±3,2*	30,6±2,4*	1,9±0,05*	15,0±2,0*	-
И2Д4	67±0,7*	98,1±2,7*	28,1±1,1*	2,0±0,08*	14,8±3,5*	-
И2Д6	115±3,9*	103,1±3,7*	32,1±2,2*	2,8±0,26*	11,9±2,6*	-
И4Д2	73±1,5*	86,1±2,0	45,9±5,0*	4,2±0,24*	10,9±0,5*	19,9±0,6*
И4Д4	81±2,9*	89,4±2,9*	45,6±1,6*	4,2±0,2*	11,0±0,2*	21,7±0,5*
И4Д6	138±2,5*	88,1±1,6*	47,5±1,2*	3,8±0,1*	12,5±0,6*	19,5±0,9*
И6Д2	91±1,8*	80,6±2,0	55,6±2,8*	2,8±0,23*	19,5±1,5*	-
И6Д4	95±1,5*	86,9±1,0	50,0±2,0*	3,7±0,3*	12,2±0,9*	-
И6Д6	118±3,1*	80,0±1,0	33,1±1,6*	2,9±0,2*	11,5±1,1*	-
<b>V группа – «диабет+инфаркт»</b>						
Д2И2	71±2,0*	75,9±4,1*	50,0±0,8*	2,4±0,3*	21,1±1,4*	-
Д2И4	125±4,8*	79,9±3,2	74,4±2,3*	3,1±0,1*	24,1±3,2*	-

Примечание. \* - результаты в столбце статистически значимо ( $p < 0,05$ ) отличаются от соответствующего показателя в группе «контроль».

Наиболее выраженные изменения наблюдаются, как и следовало ожидать, в экспериментальной группе II, «инфаркт». В III группе, «диабет», увеличение миоглобина несколько меньше на ранних стадиях, что обусловлено, по-видимому,

опосредованным поражением сердечной мышцы вследствие нарушения метаболизма на уровне всего организма, приводящим, в конечном счете, к нарушению функции и гибели кардиомиоцитов, но требующим временных затрат. Таким образом, моделирование обеих патологий является сильным стрессором, приводящим к соответствующим функционально-метаболическим изменениям в организме крыс.

В качестве классических маркеров стресса, широко используемых в экспериментальных исследованиях, используют изменение уровня АКТГ и кортизола в плазме крови. К тому же соотношение кортизол/инсулин позволяет дополнительно оценить выраженность стресс-реакции: его повышение отражает увеличение интенсивности катаболических процессов и снижение эффективности системы энергообразования [70].

При анализе показателей гормонального статуса в экспериментальных группах была выявлена только тенденция повышения уровня АКТГ в IV группе по сравнению с аналогичными показателями в V и I-III группах (табл. 3.4-1). Возможно, что резких различий в содержании АКТГ не обнаружено из-за изменчивости содержания этого гормона в плазме крови в разное время суток и/или синтез АКТГ на рассматриваемых сроках ингибирован кортизолом по известному механизму отрицательной обратной связи.

С этой точки зрения более информативным стало исследование по содержанию кортизола: уровень кортизола в плазме крови повышался во всех экспериментальных группах в сравнении с группой «контроль» (табл. 3.4-1). Этот показатель был практически в 2 раза выше при отдельных и в 3-4 раза – при сочетанных моделируемых состояниях (табл. 3.4-1). Содержание инсулина в плазме крови было сниженным во всех группах с диабетом относительно контроля, хотя величина этого показателя варьировалась в разных экспериментальных группах, и наименьшее содержание инсулина ожидаемо наблюдалось в III группе (табл. 3.4-1). При этом в группах комбинированного

воздействия снижение уровня инсулина было значительно менее выражено – в 2-3 раза ниже контрольного уровня.

Дополнительным параметром выраженности стресс-реакции при моделируемых состояниях явилось сопоставление содержания кортизола и инсулина в плазме крови по отношению друг к другу. Так, несмотря на то, что индекс кортизол/инсулин увеличен относительно контроля во всех экспериментальных группах, выявились значительные отклонения величины этого показателя при отдельных и комбинированных воздействиях (табл. 3.4-1). Наиболее высоким индекс кортизол/инсулин оказался в III и V группах, что обусловлено, в первую очередь, патологией поджелудочной железы. Однако в IV группе, при сочетании «инфаркт»+«диабет» индекс кортизол/инсулин значительно ниже, чем в III группе (табл. 3.4-1). При этом важно отметить, что при противоположной комбинации моделируемых состояний, в V группе, индекс кортизол/инсулин был сопоставим с величиной этого показателя в III группе, несмотря на значительное повышение содержания в плазме крови кортизола и инсулина (табл. 3.4-1). В совокупности, серьезные отклонения от контрольного уровня в величинах миоглобина, кортизола и индекса кортизол/инсулин свидетельствуют о более тяжелом протекании патологического процесса в V группе.

Относительное снижение уровня АКТГ во II, III и V группах, а также значительное увеличение индекса кортизол/инсулин в III и IV группах, может быть обусловлено истощением резервных свойств организма животных в указанных группах. Эти признаки являются свидетельством перехода стресс-реакции из стадии резистентности в стадию истощения [31, 56], то есть в стадию дезинтеграции регуляторных и исполнительных механизмов [53, 56, 61]. Возможно, это объясняется генерализованной реакцией организма вследствие мультиорганного поражения при диабете. Дополнительным подтверждением этому предположению являются данные по исследованию морфометрических (масса тела и сердца, степень гипертрофии миокарда) и метаболических (уровень

глюкозы и СЖК в плазме крови, скорость поглощения кислорода и разобщение окислительного фосфорилирования в митохондриях сердца) параметров при моделируемых состояниях (глава 3.2.). Патологические проявления достаточно быстро развиваются на ранних стадиях во II и III группах, а при сочетанных состояниях этот процесс замедлен в 1,5-2 раза. Сравнение же данных в группах комбинированного воздействия приводит к выводу, что предшествование диабета инфаркту вызывает ухудшение всех рассмотренных показателей и повышение смертности животных по сравнению с моделью с противоположным сочетанием моделируемых состояний.

Некоторая отсрочка фатальных проявлений в IV группе может быть обусловлена преобладанием процесса апоптоза при гибели клеток сердца, что подтверждается характерными изменениями структуры кардиомиоцита, в частности, конденсацией и фрагментацией ядра, и отсутствием проявления воспалительной реакции, характерной для некроза (глава 3.1). Усиление апоптоза, в свою очередь, может активировать противоапоптотную систему: известно, что гетеродимеризация между про- и антиапоптотными представителями семейства Bcl-2 ингибирует проапоптотные белки [76]. При исследовании содержания противоапоптотного протеина Bcl-2 в кардиомиоцитах экспериментальных животных, на хронической стадии моделируемых состояний, обнаружено повышенное содержания противоапоптотного протеина Bcl-2 относительно контрольной группы (табл. 3.5-1). В IV группе, в подгруппе И4Д4, животные которой по всем изученным в настоящем исследовании показателям демонстрируют повышенную устойчивость, наблюдается наиболее высокое содержание противоапоптотного протеина Bcl-2 (табл. 3.5-1). С одной стороны, увеличение Bcl-2 может быть свидетельством ингибирования уже развивающегося процесса апоптоза, в плане подавления активности проапоптотных белков, и именно этим можно объяснить «торможение» потери функциональной активности и гибели кардиомиоцитов при сочетании состояний. С другой стороны, вполне вероятно, что увеличение Bcl-2 направлено на предотвращение

собственно запуска митохондриально-опосредованного апоптоза: Bcl-2 препятствует открытию МРТР и высвобождению цитохрома С [200].

Меньшая выраженность стресс-реакции при комбинированном воздействии относительно монопатологий может быть обусловлена перекрестной адаптацией и включением альтернативных, как специфических, так и неспецифических, механизмов кардиопротекции. Известно, что одновременно с активацией стресс-реализующих систем происходит повышение активности сопряженных с ними стресс-лимитирующих систем, в частности, эндогенной опиоидной системы [56, 66], способной существенно влиять на функции организма именно в стадии истощения [53, 61]. Показано, что опиоидная система значительно повышает устойчивость миокарда при различных стрессовых и патологических воздействиях [72]. Эндогенные опиоиды способны оказывать кардиопротекторный эффект, как напрямую, через активацию опиоид-чувствительных рецепторов на поверхности кардиомиоцитов, так и косвенно, через модуляцию секреции инсулина и кортизола [47, 231].

С точки зрения классических представлений о стадиях адаптации (тревоги, резистентности, истощения), перекрестная адаптация при моделируемых сочетанных состояниях может быть объяснена следующим образом. Прямое воздействие на работу сердца, обусловленное коронароркклюзией одной из его главных артерий, является сильным стрессом. Процесс адаптации на ранних стадиях сопровождается активацией симпато-адреналовой и гипоталамо-гипофизарной систем, что в свою очередь приводит к мобилизации ресурсов организма и запуску компенсаторных процессов. Стадия срочной адаптации (тревоги) сменяется стадией резистентности: к этому времени уже максимально развернуты компенсаторно-приспособительные процессы, что на определенный промежуток времени обеспечивает состояние ремиссии. В дальнейшем, при исчерпании резервных возможностей, стадия тревоги переходит в стадию истощения. Исходя из этой краткой схемы, очевидно, что выраженное проявление кросс-адаптации возможно только в случае, когда повторное стрессовое

воздействие будет возникать на стадии резистентности, то есть в условиях «боевой готовности». Таким образом, становится вполне понятной разница в показателях в подгруппах IV группы. При дополнительном стрессовом воздействии на ранней стадии адаптивного процесса (подгруппы И2Д2, И2Д4, И2Д6) слабое проявление кросс-адаптации обусловлено тем, что процесс адаптации в ответ на первоначальное воздействие находится в начальной, уязвимой стадии «тревоги». На поздних сроках (подгруппы И6Д2, И6Д4, И6Д6) причиной слабого проявления перекрестной адаптации, по-видимому, является, напротив, исчерпание резервных возможностей (стадия истощения) к моменту возникновения дополнительного стрессового воздействия. И только в подгруппах И4Д2, И4Д4, И4Д6 наблюдается повышенная устойчивость к новому воздействию, что обусловлено, скорее всего, «наложением» второго раздражающего фактора на стадию резистентности к первому.

При противоположной комбинации моделируемых состояний, в V группе, когда коронароокклюзии предшествует моделирование стрептозотоцин-индуцированного диабета, отсутствие выраженного проявления кросс-адаптации обусловлено иными причинами. Поражение миокарда при диабете является процессом вторичным по отношению к нарушению метаболизма на уровне всего организма. Другими словами, дополнительное стрессовое воздействие, каким в данной группе является коронароокклюзия, возникает на фоне нарушения функций практически всех органов и систем, что характерно для эндокринных патологий в целом и диабета, обусловленного гибелью  $\beta$ -клеток поджелудочной железы, в частности. Ослабленный организм в этих условиях «генерализованной атаки» не способен обеспечить качественную реакцию на дополнительный стресс из-за невозможности формирования полноценной стадии резистентности. И, несмотря на то, что в V группе все-таки наблюдаются некоторые проявления кросс-адаптации, высокая смертность животных в этой группе полностью перечеркивает этот эффект.

Таким образом, на основании проведенного исследования, можно заключить, что при сочетании прямого и опосредованного поражения миокарда наименьшая выраженность системной стресс-реакции и проявление эффекта перекрестной адаптации наблюдается в случае, когда повторное стрессовое воздействие возникает на стадии резистентности при адаптации к первому.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты собственных исследований и литературные данные, в совокупности, показывают важное значение СЖК в регуляции метаболизма кардиомиоцитов в процессах как краткосрочной, так и долговременной адаптации, а также «выбраковки» клеток с необратимыми структурно-функциональными нарушениями путем ЖК-опосредованного механизма запуска апоптоза. Сам факт увеличения циркулирующих СЖК, как компонента неспецифической стресс-реакции, подчеркивает их ведущую роль в запуске адаптивных, компенсаторно-приспособительных реакций на клеточном уровне и уровне целого организма. ЖК оказывают разнообразное действие в зависимости от интенсивности таких процессов, как увеличение концентрации СЖК в плазме крови, транспортировки их в кардиомиоциты и утилизации в клетке (здесь и далее высказанные утверждения основаны на литературных данных, ссылки на которые приведены в соответствующих разделах главы 1). В зависимости от возможности и состоятельности соответствующих функциональных систем СЖК могут оказывать обратимое стимулирующее или ингибирующее влияние на различные метаболические процессы в кардиомиоцитах, выступая в роли своеобразного адаптера.

По совокупности данных, как собственных, так и полученных из обзора литературы последнего десятилетия (глава 1) представляется вероятным следующее развитие событий, приводящее, по мере увеличения концентрации СЖК в клетке, к включению разных защитных механизмов на клеточном уровне (рис. 3.3-2). На стадии срочной адаптации СЖК оказывают влияние преимущественно на уровне дыхательной цепи митохондрий. Ингибирование СЖК в кардиомиоцитах I и III комплексов ЭТЦ вызывает компенсаторную активацию комплекса II, что приводит к усилению образования сукцината, активации СДГ и сукцинатоксидазного пути окисления и поддержанию необходимого для нормального функционирования уровня АТФ в клетке.



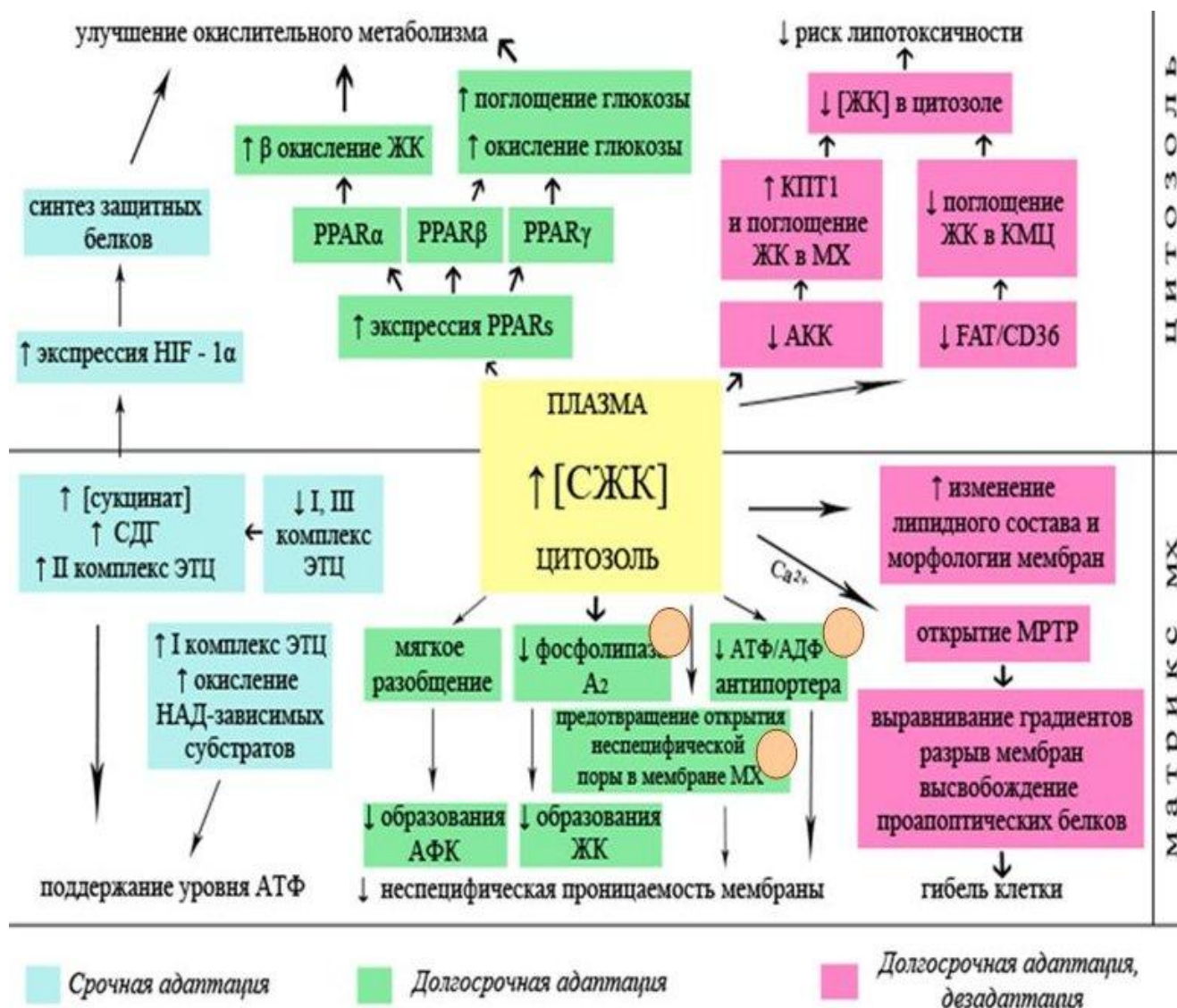


Рисунок 3.3-2 Стимуляция свободными жирными кислотами адаптивных процессов в кардиомиоцитах (собственные результаты выделены кружком)

Стрелки в цветных квадратах обозначают повышение или понижение активности (интенсивности) соответствующих ферментов (процессов); стрелки между квадратами обозначают причинно-следственные связи; все аббревиатуры расшифрованы в «Списке используемых сокращений»; дополнительные пояснения - в тексте.

Усиление образования сукцината создает предпосылки для стабилизации и аккумуляции NF-1 $\alpha$ , индукции транскрипционных процессов с экспрессией NF-1-зависимых генов-мишеней и синтезом защитных адаптивных белков.

СЖК при дальнейшем увеличении их внутриклеточной концентрации оказывают активирующее влияние на перенос протонов через комплекс I, что приводит к восстановлению окисления НАД-зависимых субстратов.

При более серьезном накоплении СЖК уже не оказывают респондирующего действия, но вызывают «мягкое» разобщение окисления и фосфорилирования посредством UCP-белков и/или АТФ/АДФ- и аспартат/глутамат- антипортеров, что снижает эффективность синтеза АТФ, но предотвращает образование и накопление АФК, тем самым защищая клетку от процессов перекисного окисления липидов, повреждения белков и ДНК. Дополнительным эффектом СЖК может быть стимуляция формирования митохондриальных пор в низкопроводящем «мерцающем» состоянии для поддержания внутриклеточного Ca<sup>2+</sup>-гомеостаза.

Избыточное накопление СЖК по механизму отрицательной обратной связи подавляет транспорт ЖК их переносчиком FAT/CD36 и ингибирует фосфолипазу A<sub>2</sub>, что способствует снижению интенсивности процессов поглощения и образования ЖК в клетке.

СЖК-опосредованное ингибирование ацетил-КоА-карбоксилазы (АКК) вызывает реципрокное увеличение активности митохондриальной карнитинпальмитоилтрансферазы 1 (КПТ1), что приводит к усилению  $\beta$ -окисления ЖК в митохондриях и снижению концентрации цитозольных ЖК, чем предотвращается или, как минимум, снижается интенсивность, образования в кардиомиоцитах потенциально опасных липидных метаболитов (церамиды, ТГ, ДАГ).

Увеличение СЖК и их метаболитов приводит к гиперэкспрессии PPARs в кардиомиоцитах, усилению транскрипции соответствующих генов-мишеней и

улучшению метаболизма глюкозы и ЖК, то есть к повышению окислительной способности сердца.

И, наконец, при дальнейшем нарастании метаболических нарушений в кардиомиоцитах и исчерпании возможностей компенсаторных реакций, чрезмерное накопление СЖК индуцирует открытие МРТР в высокопроводящем состоянии, что приводит к выравниванию ионных градиентов, набуханию митохондрий, разворачиванию митохондриальных крист, разрыву внешней мембран митохондрий, высвобождению проапоптических белков и апоптозу кардиомиоцитов.

Помимо регуляции процессов на клеточном уровне, СЖК способны регулировать метаболизм сердца опосредованно, через центральные механизмы адаптации (рис. 3.3-3).

Представляется вполне вероятным, что повышенная активность симпатoadrenalовой (САС), гипоталамо-гипофизарной (ГГС) и эндогенной опиоидной (ЭОС) систем при долгосрочной адаптации может, помимо известных механизмов, поддерживаться через СЖК-опосредованное изменение метаболизма нейронов гипоталамуса по механизму положительной обратной связи.

СЖК оказывают модулирующее влияние на метаболизм через генетический аппарат, путем усиления экспрессии HIF-1- и PPAR- зависимых генов-мишеней, что способствует улучшению доставки кислорода (эритропоэза и ангиогенеза), метаболической адаптации (транспорта глюкозы, ионного транспорта, усилению гликолитической продукции АТФ) и клеточной пролиферации.

Увеличение уровня циркулирующих СЖК приводит к стимуляции адипоцитов и увеличению синтеза лептина и адипонетина, обладающих выраженным кардиопротекторным действием. Лептин и адипонектин снижают риск липотоксичности путем повышения  $\beta$ -окисления экзогенных и эндогенных ЖК и уменьшения интрамиокардиального пула ТГ. Адипонектин, через механизм, опосредованный АМФ-активируемой протеинкиназой (АМФ-ПК), способствует сохранению сократительной способности миокарда, ограничивает

зону инфаркта и гипертрофию миокарда, улучшает коронарный кровоток и ингибирует апоптоз в кардиомиоцитах.

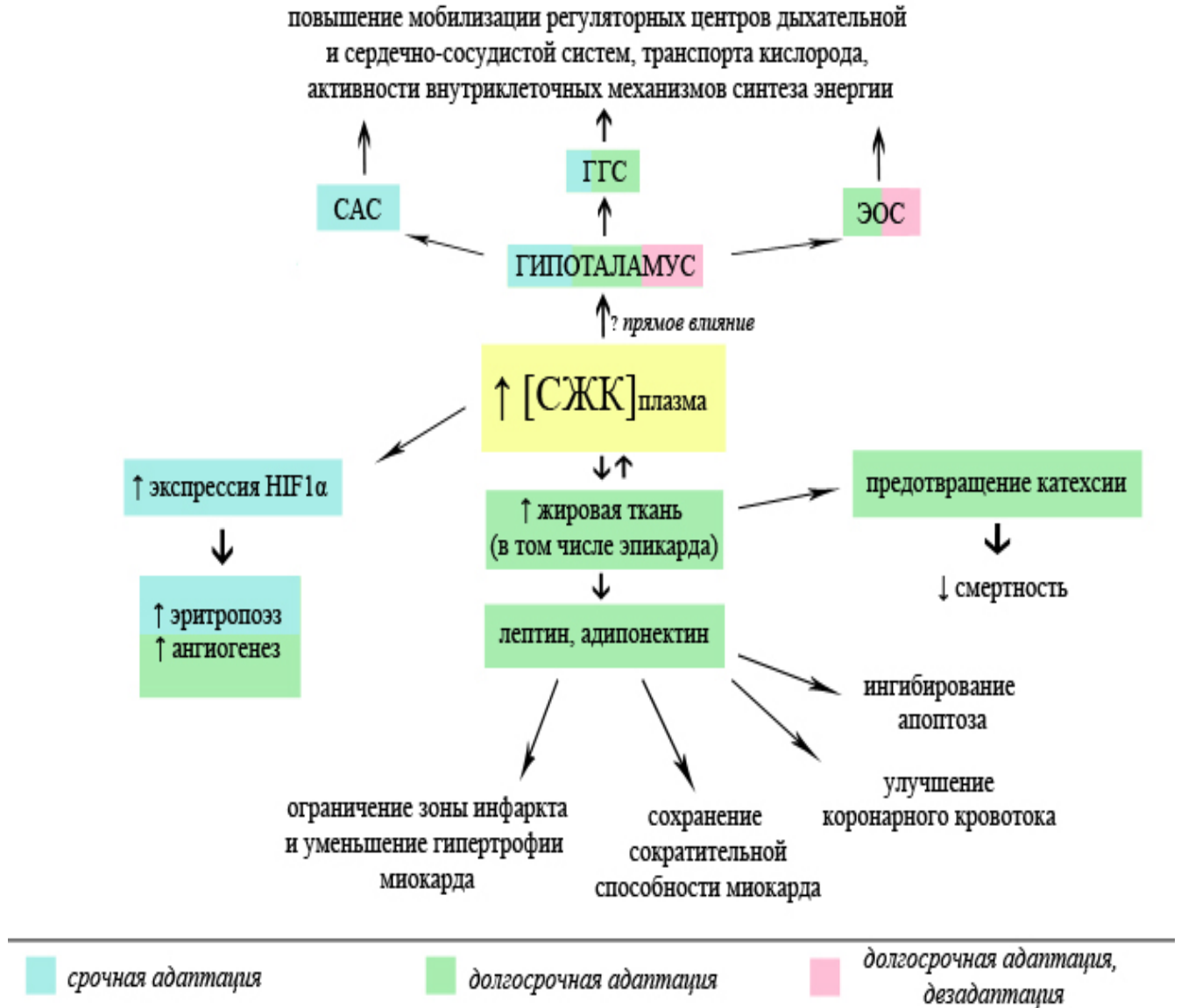


Рисунок 3.3-3 Стимуляция свободными жирными кислотами внеклеточных механизмов адаптации на системном уровне

Стрелки в цветных квадратах обозначают повышение или понижение активности (интенсивности) соответствующих ферментов (процессов); стрелки между квадратами обозначают причинно-следственные связи; все аббревиатуры расшифрованы в тексте и «Списке используемых сокращений»; дополнительные пояснения - в тексте.

Стимуляция СЖК в клетках жировой ткани гиперэкспрессии PPAR $\gamma$  снижает уровень циркулирующих ЖК. СЖК-стимулированное улучшение липидного

метаболизма предотвращает катехсию, тем самым снижая риск летального исхода.

Известные на сегодняшний день данные, несомненно, являются лишь видимой частью «айсберга» регуляторных возможностей свободных жирных кислот. Однако этого достаточно, чтобы усомниться в устоявшемся негативном представлении о патогенетической функции циркулирующих жирных кислот при длительной гипоксии. Напротив, очевидно, что увеличение уровня свободных жирных кислот в плазме крови является не столько свидетельством необратимости патологического процесса, сколько необходимым фактором мобилизации защитных ресурсов организма, и, одновременно, первым фронтом защиты, сдерживающим, по мере возможности, развитие необратимых последствий в кардиомиоцитах при краткосрочном, длительном или постоянном действии стрессовых факторов.

## ВЫВОДЫ

1. При моделировании метаболической ишемии миокарда прямым (коронароокклюзия и вызванный инфаркт миокарда) и опосредованным (стрептозотоцин-индуцированный диабет) воздействиями на сердце крыс развиваются характерные изменения морфометрических и метаболических параметров (гипертрофия сердца и левого желудочка, уменьшение массы тела и гипергликемия), усугубляющиеся в динамике развития моделируемых состояний. В группах комбинированного воздействия наблюдается меньшая выраженность указанных изменений в сравнении с группами отдельного воздействия.
2. В группах прямого и опосредованного воздействий развиваются однотипные дегенеративные изменения в структуре миокарда и ультраструктуре кардиомиоцитов крыс, сопровождающиеся усилением васкуляризации миокарда, но без соответствующего улучшения транспортной функции эндотелия капилляров. В обеих группах комбинированного воздействия изменения в структуре миокарда выражены в меньшей степени, а усиление васкуляризации миокарда сопровождается улучшением транспортной функции эндотелия капилляров.
3. Процесс формирования адаптивных реакций при моделируемых состояниях сопровождается разной выраженностью стресс-реакции в экспериментальных группах. Наименьшее проявление стресс-реакции наблюдается в группах, где прямое воздействие на сердце является основным стрессовым фактором. При развитии опосредованно вызванной тканевой гипоксии наблюдается наиболее выраженная стресс-реакция.
4. Скорость потребления кислорода кардиомиоцитами увеличивается в динамике развития всех моделируемых состояний и сопровождается

параллельным повышением концентрации свободных жирных кислот в сыворотке крови экспериментальных крыс, однако изменения этих показателей в группах комбинированного воздействия происходят в 1,5-2 раза медленнее.

5. Экзогенные свободные жирные кислоты снижают скорость потребления кислорода изолированными митохондриями сердца в группе прямого и обеих группах комбинированного воздействия, но не оказывают выраженного влияния на дыхание митохондрий в группе опосредованного воздействия. Ингибирование фосфолипазы  $A_2$  в изолированных митохондриях оказывает тормозящий эффект на скорость потребления кислорода митохондриями, аналогичный действию экзогенных жирных кислот.
6. Увеличение скорости потребления кислорода митохондриями сердца при свободном окислении не сопровождается соответствующим увеличением интенсивности фосфорилирующего дыхания: величина дыхательного контроля при всех моделируемых состояниях ниже на 30-50% относительно контроля, при этом наименьшее снижение дыхательного контроля наблюдается в группе комбинированного воздействия «инфаркт+диабет».
7. Разобщение окисления и фосфорилирования в митохондриях сердца обусловлено разными механизмами при отдельных моделируемых патологиях и их разном сочетании. В группах «инфаркт» и «диабет+инфаркт» разобщение реализуется через механизм, связанный с циркуляцией жирных кислот с участием АТФ/АДФ-антипортера. В группах «диабет» и «инфаркт+диабет» нарушение сопряжения процессов окисления и фосфорилирования опосредовано индуцированным жирными кислотами формированием неспецифических митохондриальных пор повышенной проницаемости (МРТР). При этом экзогенные свободные жирные кислоты

подавляют дыхание митохондрий, действуя подобно ингибиторам АТФ/АДФ-антипортера и МРТР.

8. Проявление эффекта кросс-адаптации и повышенная резистентность миокарда с наибольшей выраженностью наблюдаются у животных в группе комбинированного воздействия в условиях, когда прямое воздействие на сердце является фактором, запускающим процессы адаптации при сочетании патологий. Противоположное сочетание, «диабет+инфаркт» вызывает гораздо менее выраженный эффект перекрестной адаптации на уровне миокарда, с ранним истощением резервных свойств организма крыс и повышением смертности животных.
9. Увеличение концентрации циркулирующих жирных кислот является необходимым компонентом триггерного механизма процессов адаптации в условиях воздействия различных стрессовых факторов. Свободные жирные кислоты являются физиологическими модуляторами метаболических процессов в кардиомиоцитах, в том числе, при хронической ишемии миокарда, и, по-видимому, исполняют роль сигнальных молекул в активации центральных и периферических механизмов кардиопротекции.



## СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Автандилов, Г. Г. Медицинская морфометрия : руководство / Г. Г. Автандилов – М. : Медицина, 1990. – 384 с.
2. Аксенов, Д. В. Гидролиз фосфолипидов фосфолипазами A<sub>2</sub> и C нарушает конформацию аполипопротеина B – 100 на поверхности ЛПНП, снижающих их устойчивость к ассоциации / Д.В. Аксенов, А.А. Мельниченко, И. В. Супрун [и др.] // Бюлл. exper. биол. мед. – 2005. – Т. 140. - № 10. – С. 418-422.
3. Александров, А. А. Диабетическое сердце: схватка за митохондрии / А.А. Александров // Consilium medicum. - 2003. - Т. 5. - № 9. - С. 509-513.
4. Александров, А. А. Тиазолидиндионы: «герои нашего времени» / А.А. Александров, С.С. Кухаренко, М.Н. Ядрихинская [и др.] // Лечащий врач. - 2012. - № 11. - С. 55-60.
5. Александров, А. А. Тиазолидиндионы: всерьез и надолго / А.А. Александров, И.И. Чукаева, М.Н. Ядрихинская, О.А. Шацкая // Медицинский совет. – 2011. - № 11. – С. 11-12.
6. Александров, А. А. Статины и сахарный диабет: незнание — не аргумент / А.А. Александров, М.Н. Ядрихинская, С.С. Кухаренко [и др.] // Лечащий врач. - 2012. - № 7. - С. 116-121.
7. Антонов, В. Ф. Липидные поры и стабильность клеточных мембран / В.Ф. Антонов, Е.В. Шевченко // Вестник РАМН. – 1995. – № 10. – С. 48-55.
8. Арипов, М. А. Изменения метаболизма жирных кислот и углеводов при острой ишемии миокарда / М.А. Арипов, Д.Х. Камардинов, С.В. Мадоян // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2005. – № 4. – С. 95-98.
9. Аронов, Д. М. Каскад терапевтических эффектов статинов / Д.М. Аронов // Кардиология. - 2004. - № 10. - С. 85-94.

10. Аронов, Д. М. Плейотропные эффекты статинов / Д. М. Аронов // Кардиология. - 2008. - № 8. - С. 60–68.
11. Аронов, Д. М. Статины – основное лекарственное средство для реального снижения смертности от ИБС / Д. М. Аронов // Рус. мед. журнал. - 2012. - № 4. - С. 1-7.
12. Асташкин, Е. И. Липотоксические эффекты в сердце, наблюдаемые при ожирении / Е.И. Асташкин, М.Г. Глезер // Артериальная гипертензия. - 2009. - Т. 15. - № 3. - С. 335-341.
13. Атрощенко, Е. С. Статины и коронарная болезнь сердца / Е. С. Атрощенко – Минск : ООО «Белпринт», 2007. - 236 с.
14. Афанасьев, С. А. Разработка модели сочетанной патологии сердечной недостаточности и сахарного диабета 1-го типа в эксперименте / С.А. Афанасьев, Д.С. Кондратьева, С.В. Попов // Бюл. экспер. биол. мед. - 2012. - Т. 153. - № 4. - С. 523-526.
15. Афанасьев, С. А. Особенности инотропных реакций миокарда крыс на экстрасистолические воздействия при сочетанном развитии постинфарктного кардиосклероза и сахарного диабета / С.А. Афанасьев, Д.С. Кондратьева, Л.П. Цапко [и др.] // Вестник аритмологии. – 2009. - № 55. - С. 56-59.
16. Белослудцев, К. Н. Возможный механизм образования и регуляции пальмитат-индуцируемой циклоsporин А - нечувствительной митохондриальной поры / К.Н. Белослудцев, Н.В. Белослудцева, Г.Д. Миронова // Биохимия. - 2005. - Т. 70. - № 7. - С. 987-994.
17. Белослудцев, К. Н. Роль митохондриальной пальмитат /  $\text{Ca}^{2+}$  -активируемой поры в пальмитат-индуцированном апоптозе / К.Н. Белослудцев, Н.В. Белослудцева, Г.Д. Миронова // Биофизика. - 2008. - Т. 53. - С. 967-971.
18. Бережнов, А. В. Кальциевая перегрузка и гибель кардиомиоцитов в присутствии активированных производных жирных кислот. Вклад фосфолипаз / А. В. Бережнов, Е. И. Федотова, М. Н. Ненов // Биологические мембраны. – 2010. – Т. 27. – № 1. – С. 67-76.

19. Бодрова, М. Э. Циклоспорин А - чувствительное снижение трансмембранной разности электрического потенциала на внутренней мембране митохондрий печени низкими концентрациями жирных кислот и  $\text{Ca}^{2+}$  / М.Э. Бодрова, И.В. Брайловская, Г.И. Ефрон [и др.] // Биохимия. 2003. – Т. 68. – № 4. – С. 484-493.
20. Брагина, Н. А. Липидные ингибиторы фосфолипазы  $A_2$  / Н.А. Брагина, В.В. Чупин, А.Г. Булгаков, А.Н. Шальнов // Биоорганическая химия. - 1999. - Т. 25. - № 2. - С. 83-96.
21. Булгак, А. Г. Современный взгляд на проблему хронической сердечной недостаточности / А.Г. Булгак, Ю.П. Островский, Л.В. Рачок [и др.] // Кардиология в Беларуси. – 2009. - № 3. – С. 114-127.
22. Вельтищев, Ю. Е. Фосфолипазы человека в норме и при патологии / Ю.Е. Вельтищев, Э.А. Юрьева, М.А. Мусаев, Г.Ф. Шеманова // Вопр. мед. химии. – 1981. – Т. 27. - № 4. – С. 441-449.
23. Гиляревский, С.Р. Современные тенденции в лечении сердечно-сосудистых заболеваний, связанных с атеросклерозом: эффективность интенсивных режимов применения статинов / С.Р. Гиляревский // Сердце. - 2005. - Т. 4. - № 2. - С. 88-92.
24. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц – М. : Практика, 1999. – 327 с.
25. Грибань, П.А. Анализ морфологических изменений в аутодермотрансплантанте после кожной пластики / П.А. Грибань, Е.Е. Мартыненко, Т.Н. Лемешко // Фундаментальные исследования. – 2010. – № 11. – С. 37-41.
26. Губергриц, Н. Б. Патогенетическое, клиническое и диагностическое значение фосфолипазы  $A_2$  в патогенезе панкреатитов (обзор литературы) / Н. Б. Губергриц, Г.М. Лукашевич, Ю.А. Загоренко [и др.] // Клинич. лаб. диагностика. – 2000. – № 5. – С. 3-8.

27. Данковцева, Е. Н. Биомаркеры в кардиологии: липопротеин - ассоциированная фосфолипаза А<sub>2</sub> / Е. Н., Данковцева, Д. А. Затейщиков // Фарматека. – 2007. - № 15. – С. 22-28.
28. Дедов И. И. Сахарный диабет в Российской Федерации: проблемы и пути решения / И.И. Дедов // Сахарный диабет. - 1998. - № 1. - С. 7-18.
29. Дзюман, А. Н. Морфофункциональное состояние ушка правого предсердия у детей с кардиохирургической патологией после проведения модифицированной ультрафильтрации: автореф. дисс. ... канд. мед. наук : 03.00.25 / Дзюман Анна Николаевна. – Томск, 2002. – 22 с.
30. Дубилей, Т. А. Влияние ишемии / реперфузии на функцию изолированного сердца у крыс разного возраста со стрептозотоциновым сахарным диабетом / Т.А. Дубилей, Т.А. Бадова, С.А. Мигован, Ю.Е. Рушкевич // Проблемы старения и долголетия. – 2007. - Т. 16. - № 1. - С. 11-21.
31. Гаркави, Л. Х. Адаптационные реакции и резистентность организма / Л.Х. Гаркави, Е. Б. Квакина, М. А. Уколова. - Ростов-на-Дону : Ростовский ун-т, 1979. - 128 с.
32. Гора, Е. П. Экология человека : учебное пособие / Е. П. Гора. - М. : Изд-во «Дрофа», 2007. – 760 с.
33. Ипатова, О. М. Фосфоглив: механизм действия и применение в клинике / О. М. Ипатова; под ред. академика РАМН Арчакова А.И. – М. : Изд-во ГУ НИИ БМХ РАМН, 2005. – 318 с.
34. Ищук, В. А. Коррекция нарушений липидного обмена у пациентов с высоким кардиоваскулярным риском / В.А. Ищук // Укр. мед. журнал. – 2011. – Т. 84. – С. 64-65.
35. Камзеев, В. Д. Мембрано-дестабилизирующие процессы и состояние антиоксидантной защиты в эритроцитах больных рассеянным склерозом / В.Д. Камзеев, А.А. Соколова, Л.И. Рейхерт [и др.] // Казанский мед. журн. - 2005. - Т. 86. - № 5. - С. 375-379.

36. Капелько, В. И. Эволюция концепций и метаболическая основа дисфункции миокарда / В.И. Капелько // Кардиология. – 2005. – № 9. – С. 55-61.
37. Квитницкая-Рыжова, Т. Ю. Возрастные ультраструктурные и ультрацитохимические особенности гисто-гематических барьеров различных органов при экспериментальном сахарном диабете / Т.Ю. Квитницкая-Рыжова, Г.В. Хаблак, А.С. Ступина [и др.] // Проблемы старения и долголетия. – 2011. – Т. 20 – № 3. – С. 302-310.
38. Ким, Н. П. Регуляция энергетического обмена в миокарде с помощью комбинации глюкозы, лактата и сукцината : автореф. дисс. ... канд. мед. наук : 03.00.04 / Ким Надежда Петровна. - М., 1987. - 13 с.
39. Кожина, О. В. Особенности разобщающего действия жирных кислот в митохондриях печени при старении животных и при окислительном стрессе *in vitro* : автореф. дисс. ... канд. биол. наук : 03.00.04 / Кожина Ольга Владимировна. - Казань, 2007. - 25 с.
40. Кожина, О. В. Ресопрягающее действие АДФ при разобщении пальмитатом окислительного фосфорилирования в митохондриях печени / О.В. Кожина, М.П. Каратецкова, В.Н. Самарцев // Биол. мембраны. - 2006. - Т. 23. - № 3. - С. 213-218.
41. Кожина, О. В. Особенности разобщающего действия жирных кислот в митохондриях печени при окислительном стрессе / О.В. Кожина, Л.А. Степанова, В.Н. Самарцев // Биол. мембраны. – 2007. – Т. 24, № 5. – Р. 421-429.
42. Кондратьева, Д. С. Инотропная реакция миокарда крыс с постинфарктным кардиосклерозом на extrasистолические воздействия / Д.С. Кондратьева, С.А. Афанасьев, Л.П. Фалалеева, В.П. Шахов // Бюлл. exper. биол. мед. – 2005. - № 6. - С. 613-616.
43. Кондрашова, М. Н. Реципрокная регуляция дыхания и структурного состояния митохондрий гормонально-субстратной системой / М. Н.

- Кондрашова // Митохондрии, клетки и активные формы кислорода. - Пушино, 2000. - С. 71 - 74.
44. Кондрашова, М. Н. Взаимодействие процессов переаминирования и окисления карбоновых кислот при разных функциональных состояниях ткани / М.Н. Кондрашова // Биохимия. – 1991. – Т. 56. – С. 388-405.
45. Лебедев, А. В. Влияние возраста и ишемии на липопероксиды и липидорастворимые антиоксиданты сердца человека / А.В. Лебедев, С.А. Афанасьев, Е.Д. Алексеева // Бюл. exper. биол. мед. - 1995. - Т. 6. - С. 584-586.
46. Левина, А. А. Регуляция гомеостаза кислорода. Фактор, индуцированный гипоксией (НIF) и его значение в гомеостазе кислорода / А.А. Левина, А.Б. Макешова, Ю.И. Мамукова [и др.] // Педиатрия. – 2009. – Т. 87. – № 4. – С. 92-97.
47. Лишманов, Ю. Б. Роль  $\mu$ -,  $\delta$ - и  $\kappa$ -опиоидных рецепторов в формировании кардиопротекторного эффекта адаптации к хронической нормобарической гипоксии / Ю.Б. Лишманов, Н.В. Нарыжная, С.Ю. Цибульников [и др.] // Сиб. мед. журнал (Томск). – 2012. – Т. 27. - № 1. – С. 111.-114.
48. Ллойд, З. Гистохимия ферментов / З. Ллойд. – М. : Мир, 1982. – 326 с.
49. Лукьянова, Л. Д. Современные проблемы гипоксии / Л.Д. Лукьянова // Вестник РАМН. - 2000. - № 11. - С. 3-12.
50. Лукьянова, Л. Д. Сигнальная функция митохондрий при гипоксии и адаптации / Л.Д. Лукьянова // Патогенез. – 2008. - № 3. – С. 4–12.
51. Лукьянова, Л. Д. Современные проблемы адаптации к гипоксии. Сигнальные механизмы и их роль в системной регуляции / Л.Д. Лукьянова // Патол. физиол. exper. терапия. - 2011. - С. 3-19.
52. Лукьянова, Л. Д. Закономерности формирования резистентности организма при разных режимах гипоксического прекодиционирования: роль гипоксического периода и реоксигенации / Л.Д. Лукьянова, Э.Л. Германова,

- Р.А. Копаладзе // Бюлл. экспер. биол. мед. – 2009. – Т. 147. - № 4. – С. 380-384.
53. Мазуркевич, Г. С. Шок: Теория, клиника, организация противошоковой помощи / Г.С. Мазуркевич, А.И. Тюкавин, Б.И. Джурко [и др.] : под ред. Г.С. Мазуркевич, С.Ф. Багненко. - М.: Политехника, 2004. - 539 с.
54. Медведев, Ю. В. Гипоксия и свободные радикалы в развитии патологических состояний организма / Ю.В. Медведев, А.Д. Толстой. - М. : ООО "Терра - Календер и Промоушн", 2000. - 232 с.
55. Меерсон, Ф. З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца / Ф. З. Меерсон. – М. : Медицина, 1984. – с. 269.
56. Меерсон, Ф. З. Адаптация к стрессорным ситуациям и физическим нагрузкам / Ф. З. Меерсон, М.Г. Пшенникова. – М. : Медицина, 1988. – 256 с.
57. Молчанов, С. Н. Сывороточные липиды при различных стадиях и морфофункциональных типах сердечной недостаточности у больных, перенесших инфаркт миокарда / С. Н. Молчанов, С.А. Люсов, А.В., Говорин [и др.] // Рос. кардиол. журнал. – 2005. – №2 – с. 18-25.
58. Мохова, Е. Н. Участие анионных переносчиков внутренней мембраны митохондрий в разобщающем действии жирных кислот / Е.Н. Мохова Л.С. Хайлова // Биохимия. - 2005. - Т. 70. - № 2. - С. 197-202.
59. Непомнящих, Л. М. Морфометрия и стереология гипертрофии сердца / Л.М. Непомнящих, Е.Л. Лушникова, Г.И. Непомнящих. – Новосибирск : Наука, 1986. - 304 с.
60. Николс, Д. Д. Биоэнергетика. Введение в хемиосмотическую теорию / Д.Д. Николс. – М. : Мир, 1985. – 190 с.
61. Никонов В. В. Стресс: современный патофизиологический подход к лечению / В.В. Никонов. - Харьков : Консум, 2002. - 240 с.
62. Новицкий, В. В. Патофизиология : учебник / В. В. Новицкий, Е. В. Гольдберг, О. И. Уразова – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 2 т.

63. Оковитый, С. В. Клиническая фармакология иммунодепрессантов / С.В. Оковитый // Обзоры клин. фарм. лек. терапии. – 2003. – Т. 2. - № 2. – С. 2-34.
64. Оруджева, С. А. Оценка функциональных резервов сердечно–сосудистой системы у больных сахарным диабетом. Опасности анестезии и возможности анестезиологического обеспечения больных с гнойно–некротическими формами синдрома диабетической стопы / С.А. Оруджева, А.А. Звягин // Новости анестезиологии и реаниматологии. - 2006. - №3. - С.1-19.
65. Павловская, Н. С. Чувствительность дыхания и набухания митохондрий к соединениям, изменяющим проницаемость мембран / Н.С. Павловская, О.И. Грабельных, Т.П. Побежимова [и др.] // Вестник Том. гос. ун-та. Биология. – 2010. – № 3. - № 11. – С. 119-132.
66. Парин, С. Б. Роль эндогенной опиоидной системы в формировании экстремальных состояний : автореф. дисс. ... д-ра биол. наук : 03.03.01 / Парин Сергей Борисович. – М., 2010. - 50 с.
67. Пауков, В. С. Элементы теории патологии сердца / В. С. Пауков, В. А. Фролов. - М. : Медицина, 1982. - 272 с.
68. Подобед, В. М. Актуальные вопросы терапевтической практики: статины / В.М. Подобед, А.Т. Кузьменко – Минск : БелМАПО, 2011. – 23 с.
69. Портниченко, В. И. Фазовые изменения энергетического метаболизма при периодической гипоксии / В.И. Портниченко, В.И. Носарь, А.Г. Портниченко [и др.] // Фізіол. журнал. – 2012. – Т. 58. – № 4. – С. 3-12.
70. Пшенникова, М. Г. Различия в стресс-реакции и развитии адаптации к стрессу у крыс Август и Вистар / М.Г. Пшенникова, Л.Ю. Голубева, Б.А. Кузнецова [и др.] // Бюл. exper. биол. мед. - 1996. - Т. 122. - № 8. - С.156-159.
71. Розенфельд, А. С. Стресс и некоторые проблемы адаптационных перестроек при спортивных нагрузках / А.С. Розенфельд, А.И. Маевский // Теория и практика физической культуры. – 2004. - №4. – С. 39-44.



72. Сазонова, Е. Н. Роль опиоидных пептидов и полиаминов в коррекции кардиальных последствий антенатальной гипоксии / Е.Н. Сазонова, С.С. Ху, Y.J. Zhao, С.С. Тимошин // Дальневосточный медицинский журнал. - 2012. - № 4. - С. 119-123.
73. Сакс, В. А. Физиология кровообращения. Физиология сердца : руководство по физиологии / В. А. Сакс, Л. В. Розенштраух. – Л. : Наука, 1980.
74. Самарцев, В. Н. Количественная характеристика участия ADP/АТФ- и аспаргат/глутаматного антипортеров в разобщающем действии жирных кислот в митохондриях печени при условии формирования разобщающего комплекса / В.Н. Самарцев, О.В. Кожина, Л.С. Полищук // Биол. мембраны. - 2006. - Т. 23. - № 5. - С. 402–411.
75. Самарцев, В. Н. Окислительный стресс как фактор регуляции разобщающего действия жирных кислот при участии ADP/АТФ-антипортера и аспаргат/глутаматного антипортера в митохондриях печени старых крыс / В.Н. Самарцев, О.В. Кожина // Биохимия. - 2008. - Т. 73. - С. 972–980.
76. Самуилов, В. Д. Программируемая клеточная смерть / В.Д. Самуилов, А.В. Олескин, Е.М. Лагунова // Биохимия. – 2000. - Т. 65. - № 8. - С. 1029-1046.
77. Сапрунова, В. Б. Ультраструктура митохондрий в условиях окислительного стресса : автореф. дисс. ... д-ра мед. наук : 03.00.25 / Сапрунова Валерия Борисовна. – М., 2008. – 45 с.
78. Сапрунова, В. Б. Выявление цитохром с оксидазной активности в митохондриях кардиомиоцитов изолированной ткани миокарда при длительном действии гипоксии / В.Б. Сапрунова, И.М. Солодовникова Л.Е. Бакеева // Цитология. - 2008. - Т. 50. - № 3. - С. 268-274.
79. Серебровская, Т. В. Гипоксия-индуцибельный фактор: роль в патофизиологии дыхания (обзор) / Т.В. Серебровская // Украинский патофизиологический журнал. – 2005. – № 3 (прил.). – С. 77-81.

80. Серебровская, Т. В. Новая стратегия в лечении болезней: гипоксия-индуцируемый фактор / Т.В. Серебровская // Вестник международной академии наук (русская секция). – 2006. – № 1. – С. 29-31.
81. Симонян, Р. А. Разобщение митохондрий лаурилсульфатом может быть опосредовано освобождением связанных жирных кислот / Р.А. Симонян, А. В. Пустовидко, М. Ю. Высоких [и др.] // Биохимия. – 2006. – Т. 71 - № 12. – С. 1677-1682.
82. Сисакян, А. С. Влияние фактора ангиогенеза на морфофункциональное состояние миокарда у крыс при экспериментальном инфаркте миокарда / А.С. Сисакян, В.А. Оганян, А.Б. Семерджян [и др.] // Росс. кардиол. журнал. – 2008. - № 2. – С. 63-67.
83. Стаценко, М. Е. Метаболическая кардиопротекция мельдонием при ишемической болезни сердца: итоги и перспективы / М.Е. Стаценко, С.В. Туркина // Лечащий врач. - 2012. - № 7. - С. 62–65.
84. Судаков, Н. П. Механизмы участия митохондрий в развитии патологических процессов, сопровождающихся ишемией и реперфузией / Н.П. Судаков, С.Б. Никифоров, Ю.В. Константинов // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. – 2006. – Т. 51. - № 5. – С. 332-336.
85. Телкова, И. Л. Взаимосвязи между изменениями коронарного кровотока, энергетическим метаболизмом миокарда и гиперинсулинемией у больных ишемической болезнью сердца / И.Л. Телкова, А.Т. Тепляков // Кардиология. – 2005. – № 8. – С. 61-68.
86. Терешина, Е. В. Роль жирных кислот в развитии возрастного окислительного стресса. Гипотеза / Е. В. Терешина // Успехи геронтологии. - 2007. - Т. 20. - № 1. - С. 59–65.
87. Федотова, Г. Г. Митохондрии как инициаторное патогенетическое звено дистрофического процесса / Г.Г. Федотова, Р.Е. Киселева // Современные наукоемкие технологии. – 2005. – № 7. – С. 59-60.

88. Фролов В. А. Морфология митохондрий в норме и патологии / В. А. Фролов, В. П. Пухляко. - М. : Изд-во УДН, 1989. - 142 с.
89. Хундрякова, Н. В. Гиперактивация сукцинатдегидрогеназы в лимфоцитах крови новорожденных крысят / Н.В. Хундрякова, М.В. Захарченко, А.В. Захарченко, М.Н. Кондрашова // Биохимия. – 2008. – Т. 73. - №3. - 414–419.
90. Шабалина, И. Г. Адениннуклеотидтранслоказа в митохондриях бурой жировой ткани: содержание и функциональное значение / И.Г. Шабалина, Т. В. Крамарова, Л. И. Крамарова [и др.] // Бюлл. СО РАМН. – 2010. – Т. 30. - № 2. – С. 37-43.
91. Юшков, П.В. Морфогенез микроангиопатий при сахарном диабете / П.В. Юшков, К.В. Опаленов // Сахарный диабет. – 2001. – № 1. – С. 53-56.
92. Abel, E. D. Mitochondrial adaptations to physiological vs. pathological cardiac hypertrophy / E.D. Abel, T. Doenst // Cardiovas. Res. 2011. - V. 90. - P. 234–242.
93. Abel, E. D. Cardiac hypertrophy with preserved contractile function after selective deletion of GLUT4 from the heart / E.D. Abel, H.C. Kaulbach, R. Tian [et al.] // J. Clin. Invest. – 1999. – V. 104. – P. 1703–1714.
94. Abel, E. D. Cardiac remodeling in obesity / E.D. Abel, S.E. Litwin, G. Sweeney // Physiol. Rev. – 2008. – V. 88. – P. 389–419.
95. Altarejos, J. Y. Myocardial ischemia differentially regulates LKB1 and an alternate 5'-AMP-activated protein kinase kinase / J.Y. Altarejos, M. Taniguchi, A.S. Clanachan, G.D. Lopaschuk // J. Biol. Chem. – 2005. – V. 280. – P. 183–190.
96. Amerkhanov, Z. G. Carboxyatractylate- and cyclosporin A- sensitive uncoupling in liver mitochondria of ground squirrels during hibernation and arousal / Z.G. Amerkhanov, M.V. Egorova, O.V. Markova, E.N. Mokhova // Biochem. Mol. Biol. Intern. - 1996. - V. 38. - P. 863-870.
97. An, D. Role of changes in cardiac metabolism in development of diabetic cardiomyopathy / D. An, B. Rodrigues // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2006. – V. 291. – P. H1489–H1506.

98. Ashrafian, H. Perhexiline / H. Ashrafian, J.D. Horowitz, M.P. Frenneaux // *Cardiovasc. Drug. Rev.* – 2007. – V. 25. – P. 76–97.
99. Ashrafian, H. Hypertrophic cardiomyopathy: a paradigm for myocardial energy depletion / H. Ashrafian, C. Redwood, E. Blair, H. Watkins // *Trends. Genet.* – 2003. – № 19. – P. 263–268.
100. Argaud, L. Preconditioning delays  $\text{Ca}^{2+}$ -induced mitochondrial permeability transition / L. Argaud, O. Gateau-Roesch, L. Chalabreysse [et al.] // *Cardiovasc. Res.* – 2004. – № 61. – P. 115-122.
101. Atkinson, L. L. Leptin activates cardiac fatty acid oxidation independent of changes in the AMP-activated protein kinase-acetyl-CoA carboxylase-malonyl-CoA axis / L.L. Atkinson, M.A. Fischer, G.D. Lopaschuk // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277. P. 29424–29430.
102. Baartscheer, A. Increased  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -exchange activity is the cause of increased  $[\text{Na}^+]_i$  and underlies disturbed calcium handling in the rabbit pressure and volume overload heart failure model / A. Baartscheer, C.A. Schumacher, M.M. van Borren [et al.] // *Cardiovasc. Res.* – 2003. – V. 57. – P. 1015–1024.
103. Baines, C. P. The mitochondrial permeability transition pore and ischemia-reperfusion injury / C.P. Baines // *Basic. Res. Cardiol.* – 2009. – V. 104. - № 2. – P. 181-188.
104. Balaban, R. S. Cardiac energy metabolism homeostasis: role of cytosolic calcium / R.S. Balaban // *J. Mol. Coll. Cardiol.* – 2002. – V. 34. – P. 1259-1271.
105. Beauloye, C. AMPK activation, a preventive therapeutic target in the transition from cardiac injury to heart failure / C. Beauloye, L. Bertrand, S. Horman, L. Hue // *Cardiovasc. Res.* – 2011. – V. 90. – № 2. – P. 224-233.
106. Beer, M. Absolute concentrations of high-energy phosphate metabolites in normal, hypertrophied, and failing human myocardium measured noninvasively with  $^{31}\text{P}$ -SLOOP magnetic resonance spectroscopy / M. Beer, T. Seyfarth, J. Sandstede [et al.] // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2002. – V. 40. – P. 1267–1274.

107. Belmadani, S. Post-translational modifications of cardiac tubulin during chronic heart failure in the rat / S. Belmadani, C. Pous, R. Ventura-Clapier [et al.] // *Mol. Cell. Biochem.* – 2002. – V. 237. – P. 39–46.
108. Bers, D.M. Intracellular Na<sup>+</sup> regulation in cardiac myocytes / D.M. Bers, W.H. Barry, S. Despa // *Cardiovasc. Res.* – 2003. – V. 57. – P. 897–912.
109. Bessman, S. P. Transport of energy in muscle: the phosphorylcreatine shuttle / S.P. Bessman, P.J. Geiger // *Science.* – 1981. – V. 211 – P. 448–452.
110. Betteridge, D. J. Epidemiology of the cardiac complications of type 2 diabetes mellitus / D.J. Betteridge // *Medikographia.* - 2001. - V. 23. - P. 95-99.
111. Boudina, S. Mitochondrial uncoupling: a key contributor to reduced cardiac efficiency in diabetes / S. Boudina, E.D. Abel // *Physiology.* – 2006. – V. 21. – P. 250–258.
112. Boudina, S. Mitochondrial energetics in the heart in obesity-related diabetes: direct evidence for increased uncoupled respiration and activation of uncoupling proteins / S. Boudina, S. Sena, H. Theobald [et al.] // *Diabetes.* – 2007. – V. 56. – P. 2457–2466.
113. Brace, M. H. Structural commonalities among integral membrane enzymes / M.N. Brace, B.F. Cravatt, R.S. Stevens // *FEBS Lett.* – 2004. – V. 567. – P. 159–165.
114. Brand, M. D. Mitochondrial proton conductance, standard metabolic rate and metabolic depression / M. D. Brand, T. Bishop, R. G. Boutilier, J. St-Pierre; *Life in the Cold* : Ed. G. Heldmaier, M. Klingenspor. – Berlin : Springer, 2002. - P. 413-430.
115. Brindley, D. N. Shedding light on the enigma of myocardial lipotoxicity: the involvement of known and putative regulators of fatty acid storage and mobilization / D.N. Brindley, B.P.C. Kok, P.C. Kienesberger [et al.] // *Am. J. Physiol.* - 2010. – V. 298. - № 5. – P. E897-E908.
116. Buchanan, J. Reduced cardiac efficiency and altered substrate metabolism precedes the onset of hyperglycemia and contractile dysfunction in two mouse models of

- insulin resistance and obesity / J. Buchanan, P.K. Mazumder, P. Hu [et al.] // *Endocrinology*. – 2005. – V. 146. – P. 5341–5349.
117. Burkart, E. M. Nuclear receptors PPARbeta/delta and PPARalpha direct distinct metabolic regulatory programs in the mouse heart / E.M. Burkart, N. Sambandam, X. Han [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2007. – V. 117. – P. 3930–3939.
118. Chang, J. J. Phospholipase A<sub>2</sub>: function and pharmacological regulation / J.J. Chang, H. Musser, H. McGregor // *Biochem. Pharmacol.* - 1987. - V. 36. - P.2429-2436.
119. Chandler, M. P. Moderate severity heart failure does not involve a downregulation of myocardial fatty acid oxidation / M.P. Chandler, J. Kerner, H. Huang [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2004. – V. 287. – P. H1538–H1543.
120. Chapman, C. J. General features in the stoichiometry and stability of ionophore A23187-cation complexes in homogeneous solution / C.J. Chapman, A.K. Puri, R.W. Taylor, D.R. Pfeiffer // *Arch. Biochem. Biophys.* - 1990. - V. 281. - № 1. - P. 44-57.
121. Chen, H. Paradoxically enhanced heart tolerance to ischaemia in type 1 diabetes and role of increased osmolarity / H. Chen, W.L. Shen, X.H. Wang // *Clin. Exper. Pharmacol. Physiol.* - 2006. – V. 10. - P. 910-916.
122. Chess, D. J. Effects of a high saturated fat diet on cardiac hypertrophy and dysfunction in response to pressure overload / D.J. Chess, B. Lei, B.D. Hoit [et al.] // *J. Card. Fail.* – 2008. – V. 14. P. 82–88.
123. Chess, D. J. Role of diet and fuel overabundance in the development and progression of heart failure / D.J. Chess, W.C. Stanley // *Cardiovasc. Res.* – 2008. – V. 79. – P. 269–278.
124. Cook, W. S. Less extrahepatic induction of fatty acid beta-oxidation enzymes by PPAR alpha / W.S Cook, A.V. Yeldandi, M.S. Rao [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2000. – V. 278. – P. 250–257.
125. Courchesne-Smith, C. Cytoplasmic accumulation of a normally mitochondrial malonyl-CoA decarboxylase by the use of an alternate transcription start site / C.

- Courchesne-Smith, S.H. Jang, Q. Shi [et al.] // Arch. Biochem. Biophys. – 1992. – V. 298. – P. 576–586.
126. Davila-Roman, V. G. Altered myocardial fatty acid and glucose metabolism in idiopathic dilated cardiomyopathy / V.G. Davila-Roman, G. Vedala, P. Herrero // J. Am. Coll. Cardiol. – 2002. – V. 40. – P. 271–277.
127. Davos, C. H. Body mass and survival in patients with chronic heart failure without cachexia: the importance of obesity / C.H. Davos, W. Doehner, M. Rauchhaus [et al.] // J. Card. Fail. – 2003. – V. 9. – P. 29–35.
128. Di Lisa, F. The role of mitochondria in the salvage and the injury of the ischemic myocardium / F. Di Lisa, R. Menabo, M. Canton, V. Petronilli // Biochim. Biophys. Acta. - 1998. - V. 1366. - № 1-2. - P. 69-78.
129. Di Paola, M. Interaction of free fatty acids with mitochondria: coupling, uncoupling and permeability transition / M. Di Paola, M. Lorusso // BBA. – 2006. – V. 1757. – № 9-10. – P. 1330–1337.
130. Dolder, M. Inhibition of the mitochondrial permeability transition by creatine kinase substrates. Requirement for microcompartmentation / M. Dolder, B. Walzel, O. Speer [et al.] // J. Biol. Chem. – 2003. – V. 278. – P. 17760–17766.
131. Duchen, M. R. Mitochondria and calcium in health and disease / M.R. Duchen, A. Verkhratsky, S. Muallem // Cell Calcium. - 2008. - V. 44. - P.1-5.
132. Dudkina, N. V. Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III / N.V. Dudkina, H. Eubel, W. Keegstra [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2005. – V. 102. – P. 3225–3229.
133. Duncan, J. G. Insulin-resistant heart exhibits a mitochondrial biogenic response driven by the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha/PGC-1alpha gene regulatory pathway / J.G. Duncan, J.L. Fong, D.M. Medeiros [et al.] // Circulation. – 2007. – V. 115. – P. 909–917.
134. Dyck J. R. The ischemic heart: starving to stimulate the adiponectin-AMPK signaling axis / J.R. Dyck // Circulation. - 2007. – V. 116. P. 2779–2781.

135. Dyck, J. R. Characterization of rat liver malonyl-CoA decarboxylase and the study of its role in regulating fatty acid metabolism / J.R. Dyck, L.G. Berthiaume, P.D. Thomas [et al.] // *Biochem. J.* – 2000. – V. 350. - P. 599–608.
136. Dyck, J. R. Malonyl coenzyme a decarboxylase inhibition protects the ischemic heart by inhibiting fatty acid oxidation and stimulating glucose oxidation / J.R. Dyck, J.F. Cheng, W.C. Stanley [et al.] // *Circ. Res.* – 2004. – V. 94. - P. 78–84.
137. Dyck, J. R. Absence of malonyl coenzyme A decarboxylase in mice increases cardiac glucose oxidation and protects the heart from ischemic injury / J.R. Dyck, T.A. Hopkins, S. Bonnet [et al.] // *Circulation.* – 2006. – V. 114. – P. 1721–1728.
138. Dyck, J. R. Malonyl CoA control of fatty acid oxidation in the ischemic heart / J.R. Dyck, G.D. Lopaschuk // *J. Mol. Cell Cardiol.* – 2002. – V. 34. P. 1099–1109
139. Dyck, J. R. AMPK alterations in cardiac physiology and pathology: enemy or ally? / J.R. Dyck, G.D. Lopaschuk // *J. Physiol.* – 2006. – V. 574. P. 95–112.
140. Dzeja, P. P. Adenylate kinase: kinetic behavior in intact cells indicates it is integral to multiple cellular processes / P.P. Dzeja, R.J. Zeleznikar, N.D. Goldberg // *Mol. Cell. Biochem.* – 1998. – V. 184. – P. 169-182.
141. Endres, M. Statins: potential new indications in inflammatory conditions / M. Endres // *Atheroscler. Suppl.* - 2006. – V. 7. – № 1. – P. 31-35.
142. Essop, M. F. Reduced heart size and increased myocardial fuel substrate oxidation in ACC2 mutant mice / M.F. Essop, H.S. Choi, C.S.Camp [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2008. – V. 295. – № 1. – P. H256-H265.
143. Evtodienko, Y. V. Sustained oscillations of transmembrane  $Ca^{2+}$  fluxes in mitochondria and their possible biological significance / Y.V. Evtodienko // *Membr. Cell. Biol.* – 2000. – V. 14. – №. 1. – P. 1-17.
144. Ferrari, R. The role of mitochondria in ischemic heart disease / R. Ferrari // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* – 1996. – V. 28. – P. 1-10.
145. Finck, B. N. The cardiac phenotype induced by PPARalpha overexpression mimics that caused by diabetes mellitus / B.N. Finck, J.J. Lehman, T.C. Leone [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2002. – V. 109. – P. 121–130.



146. Finck, B. N. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) regulatory cascade in cardiac physiology and disease / B.N. Finck, D.P. Kelly // *Circulation*. – 2007. – V. 115. – P. 2540–2548.
147. Folmes, C. D. Fatty acid oxidation inhibitors in the management of chronic complications of atherosclerosis / C.D. Folmes, A.S. Clanachan, G.D. Lopaschuk // *Curr. Atheroscler. Rep.* – 2005. – V. 7. P. 63–70.
148. Folmes, C. D. Role of malonyl-CoA in heart disease and the hypothalamic control of obesity / C.D. Folmes, G.D. Lopaschuk // *Cardiovasc. Res.* – 2007. – V. 73. – P. 278–287.
149. Folmes, C. D. High rates of residual fatty acid oxidation during mild ischemia decrease cardiac work and efficiency / C.D. Folmes, D. Sowah, A.S. Clanachan, G.D. Lopaschuk // *J. Mol. Cell Cardiol.* – 2009. – V. 47. – P. 142-148.
150. Fontaine, E. Regulation of the permeability transition pore in skeletal muscle mitochondria. Modulation by electron flow through the respiratory chain complex I / E. Fontaine, O. Eriksson, F. Ichas, P. Bernardi // *J. Biol. Chem.* - 1998. - V. 273. - № 20. - P. 12662-12668.
151. Fukuda, S. Angiogenic signal triggered by ischemic stress induced myocardial repair in rat during chronic infarction / S. Fukuda // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2004. – V. 36. – № 4. – P. 547–59.
152. Fukuhara, A. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin / A. Fukuhara, M. Matsuda, M. Nishizawa [et al.] // *Science*. – 2005. – V. 307. – P. 426–430.
153. Garcia-Palmer, F. J. Lack of functional assembly in mitochondrial supercomplexes: a new insight into impaired mitochondrial function? / F.G. Garcia-Palmer // *Cardiovasc. Res.* – 2008. – V. 80. – P. 3–4.
154. Carley, A. N. Mechanisms responsible for enhanced fatty acid utilization by perfused hearts from type 2 diabetic db/db mice / A.N. Carley, L.L. Atkinson, A. Bonen [et al.] // *Arch. Physiol. Biochem.* – 2007. – V. 113. – P. 65–75.

155. Carley, A. N. Fatty acid metabolism is enhanced in type 2 diabetic hearts / A.N. Carley, D.L. Severson // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2005. – V. 1734. – P. 112–126.
156. Goldberg, I. G. Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase- and CD36-mediated pathways / I.G. Goldberg, R.H. Eckel, N.A. Abumrad // *J. Lipid Res.* – 2008. – V. 50. - P. S86–S90.
157. Gonon, A. T. Adiponectin protects against myocardial ischemia/reperfusion injury via AMPK, Akt and nitric oxide / A.T. Gonon, U. Widegren, A. Bulhak [et al.] // *Cardiovasc. Res.* – 2008. – V. 78. –P. 116–122.
158. Goodwin, G. W. Regulation of fatty acid oxidation of the heart by MCD and ACC during contractile stimulation / G.W. Goodwin, H. Taegtmeier // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 1999. – V. 277. – P. E772–E777.
159. Graham, T. E. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects / T.E. Graham, Q. Yang, M. Bluher [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2006. – V. 354. – P. 2552–2563.
160. Griffiths, E. J. Further evidence that cyclosporine A protects mitochondria from calcium overload by inhibiting a matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase / E.J. Griffiths, A.P. Halestrap // *Biochem. J.* – 1991. – № 274. – P. 611-614.
161. Griffiths, E. J. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischemia, but open upon reperfusion / E.J. Griffiths, A.P. Halestrap // *Biochem. J.* – 1995. – № 307. – P. 93-98.
162. Grynberg, A. The role of lipids in the metabolism of the heart muscle / A. Grynberg // *Medicography.* - 1999. - V. 21. - № 2. - C. 29-35.
163. Guo, Z. Cardiac expression of adiponectin and its receptors in streptozotocin-induced diabetic rats / Z. Guo, Z. Xia, V.G. Yuen, J.H. McNeill // *Metabolism.* – 2007. V. 56. – P. 1363–1371.
164. Hafstad, A. D. Glucose and insulin improve cardiac efficiency and postischemic functional recovery in perfused hearts from type 2 diabetic (db/db) mice / A.D.

- Hafstad, A.M. Khalid, O.J. How [et al.] // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2007. – V. 292. – P. E1288–E1294.
165. Hafstad, A. D. Perfused hearts from type 2 diabetic (db/db) mice show metabolic responsiveness to insulin / A.D. Hafstad, G.H. Solevag, D.L. Severson [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2006. – V. 290. – P. H1763–H1769.
166. Hajri, T. Fatty acid transport across membranes: relevance to nutrition and metabolic pathology / T. Hajri, N.A. Abumrad // *Annu. Rev. Nutr.* – 2002. – V. 22. – P. 383–415.
167. Halestrap, A. P. Calcium-dependent opening of a non-specific pore in the mitochondrial inner membrane is inhibited at pH values below 7 / A.P. Halestrap // *Biochem. J.* – 1991. – № 278. – P. 715-719.
168. Halestrap, A. P. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion – a target for cardioprotection / A.P. Halestrap, S.J. Clarke, S.A. Javadov // *Cardiovasc. Res.* – 2004. – № 61. – P. 372-385.
169. Halestrap, A. P. The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease / A.P. Halestrap, P. Pasdois // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2009. - V. 1787. - № 11. - P. 1402-1415.
170. Hammer, S. Progressive caloric restriction induces dose-dependent changes in myocardial triglyceride content and diastolic function in healthy men / S. Hammer, R.W. van der Meer, H.J. Lamb [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2008. – V. 93: 497–503.
171. Hardie, D. G. AMP-activated protein kinase: the guardian of cardiac energy status / D.G. Hardie // *J. Clin. Invest.* – 2004. – V. 114. P. 465–468.
172. Hardie, D. G. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy / D.G. Hardie // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2007. – V. 8. – P. 774–785.
173. He, W. Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors / W. He, F.J.-P. Miao, D.C.-H Lin [et al.] // *Nature.* – 2004. – V.429. - P.188–193.

174. Heather, L. C. Fatty acid transporter levels and palmitate oxidation rate correlate with ejection fraction in the infarcted rat heart / L.C. Heather, M.A. Cole, C.A. Lygate [et al.] // *Cardiovasc. Res.* – 2006. – V. 72. – P. 430–437.
175. Herrero, P. Increased myocardial fatty acid metabolism in patients with type 1 diabetes mellitus / P. Herrero, L.R. Peterson, J.B. McGill [et al.] // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2006. – V. 47. – P. 598–604.
176. Hinkle, P. C. P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation / P.C. Hinkle // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2005. – V. 1706. – P. 1–11.
177. Holubarsch, C. J. A double-blind randomized multicentre clinical trial to evaluate the efficacy and safety of two doses of etomoxir in comparison with placebo in patients with moderate congestive heart failure: the ERGO (etomoxir for the recovery of glucose oxidation) study / C.J. Holubarsch, M. Rohrbach, M. Karrasch [et al.] // *Clin. Sci.* – 2007. – V. 113. – № 4. – P. 205-212.
178. Hopkins, T. A. Control of cardiac pyruvate dehydrogenase activity in peroxisome proliferator-activated receptor-alpha transgenic mice / T.A. Hopkins, M.C. Sugden, M.J. Holness [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2003. – V. 285. – P. 270–276.
179. Hulbert, A. J. The acyl composition of mammalian phospholipids: an allometric analysis / A.J. Hulbert, T. Rana, P. Couture // *Comp. Biochem. Physiol.* – 2002. – V. 132. - № 3. – P. 515-527.
180. Huss, J. M. Nuclear receptor signaling and cardiac energetic / J.M. Huss, D.P. Kelly // *Circ. Res.* – 2004. – V. 95. – P. 568–578.
181. Huss, J. M. Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance / J.M. Huss, D.P. Kelly // *Clin. Invest.* – 2005. – V.115. - № 3. – P. 547-555.
182. Iacobellis, G. The double role of epicardial adipose tissue as pro- and anti-inflammatory organ / G. Iacobellis, G. Barbaro // *Horm. Metab. Res.* – 2008. – V. 40. – P. 442-445.

183. Idell-Wenger, J. A. Coenzyme A and carnitine distribution in normal and ischemic hearts / J.A. Idell-Wenger, L.W. Grotyohann, J.R. Neely // *J. Biol. Chem.* – 1978. – V. 253. – P. 4310–4318.
184. Jaswal, J. S. Effects of adenosine on myocardial glucose and palmitate metabolism after transient ischemia: role of 5'-AMP-activated protein kinase / J.S. Jaswal, M. Gandhi, B.A. Finegan [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2006. – V. 291. – P. H1883–H1892.
185. Jaswal, J. S. Inhibition of p38 MAPK and AMPK restores adenosine-induced cardioprotection in hearts stressed by antecedent ischemia by glucose utilization / J.S. Jaswal, M. Gandhi, B.A. Finegan [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2007. – V. 293. – P. H1107–H1114.
186. Jaswal, J. S. Partial inhibition of fatty acid  $\beta$ -oxidation with trimetazidine: a novel approach to the treatment of ischemic heart disease / J.S. Jaswal, G.D. Lopaschuk // *Arch. Med. Sci.* – 2007. – V. 3. – P. 1–9.
187. Javadov, S. Ischemic preconditioning inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores in the reperfused rat heart / S. Javadov, S. Clarke, M. Das [et al.] // *J. Physiol.* – 2003. – № 549.2. – P. 513-524.
188. Javadov, S. Mitochondrial permeability transition pore opening as a promising therapeutic target in cardiac diseases / S. Javadov, M. Karmazyn, N. Escobales // *J. Pharm. Exp. Therap.* – 2009. – V. 330. - №3. – P. 670-678.
189. Javadov, S. NHE-1inhibition improves impaired mitochondrial permeability transition and respiratory function during postinfarction remodeling in the rat / S. Javadov, C. Huang, L. Kirshenbaum [et al.] // *J. Moll. Cell. Cardiol.* – 2005. –№ 38. – P. 135-143.
190. Jennings, R. B. The cell biology of acute myocardial ischemia / R.B. Jennings K.A. Reimer // *Annu. Rev. Med.* – 1991. – V. 42. – P. 225–246.
191. Joshi, S. ATP synthase complex from bovine heart mitochondria: the oligomycin sensitivity conferring protein is essential for dicyclohexyl carbodiimide-sensitive

- ATPase / S. Joshi, Y.G. Huang // *Biochim. Biophys. Acta.* - 1991. - V. 1067. - № 2. - P. 255-258.
192. Joubert, F. Modeling the energy transfer pathways. Creatine kinase activities and heterogeneous distribution of ADP in the perfused heart / F. Joubert, J.A., Hoerter, J.L. Mazet // *Mol. Biol. Rep.* – 2002. – № 29. – P. 177–182.
193. Kaasik, A. Energetic crosstalk between organelles: architectural integration of energy production and utilization / A. Kaasik, V. Veksler, E. Boehm [et al.] // *Circ. Res.* – 2001. – V. 89. – P. 153–159.
194. Kadenbach, B. Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation / B. Kadenbach // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2003. – V. 1604. – P. 77–94.
195. Kewalramani, G. AMPK control of myocardial fatty acid metabolism fluctuates with the intensity of insulin-deficient diabetes / G. Kewalramani, D. An, M.S. Kim [et al.] // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2007. – V. 42. – P. 333–342.
196. Killian, J. A. The “double lives” of membrane lipids / J.A. Killian, G. van Meer // *EMBO Rep.* – 2001. – V. 2. – P. 91-95.
197. King, K. L. Diabetes or peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist increases mitochondrial thioesterase I activity in heart / K.L. King, M.E. Young, J. Kerner [et al.] // *J. Lipid. Res.* – 2007. – V. 48. – P. 1511–1517.
198. Kondrashova, M. N. Polarographic observation of substrate - level phosphorylation and its stimulation by acetylcholine / M.N. Kondrashova, N.M. Doliba // *FEBS Lett.* - 1989. - V. 243. – P. 153-155.
199. Korshunov, S. S. Fatty acids as natural uncouplers preventing generation of  $O(\cdot-)_2$  and  $H_2O_2$  by mitochondria in the resting state / S.S. Korshunov, V.P. Skulachev, A.A. Starkov [et al.] // *FEBS Lett.* - 1998. - V. 435. - № 2-3. - P. 215-218.
200. Kowaltowski, A. J. Bcl-2 prevents mitochondrial permeability transition and cytochrome *c* release via maintenance of reduced pyridine nucleotides / A.J. Kowaltowski, A.E. Vercesi, G. Fiskum // *Cell Death Differ.* – 2000. – V. 7. – № 10. – P. 903-910.

201. Kuang, M. Fatty acid translocase/CD36 deficiency does not energetically or functionally compromise hearts before or after ischemia / M. Kuang, M. Febbraio, C. Wagg [et al.] // *Circulation*. – 2004. – V. 109. – P. 1550–1557.
202. Kudo, N. High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase / N. Kudo, A.J. Barr, R.L. Barr [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1995. – V. 270. – P. 17513–17520.
203. Kudo, N. Characterization of 5'AMP-activated protein kinase activity in the heart and its role in inhibiting acetyl-CoA carboxylase during reperfusion following ischemia / N. Kudo, J.G. Gillespie, L. Kung [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1996. – V. 1301. – P. 67–75.
204. Kudo, N. 5'AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl CoA carboxylase can explain the high rates of fatty acid oxidation in reperfused ischemic hearts / N. Kudo, R.L. Barr, G.D. Lopaschuk // *J. Biol. Chem.* – 1995. – V. 270. – P. 17511–17520.
205. Kulinsky, V. I. Two adaptive strategies in adverse conditions - resistant and tolerant. The role of hormones and receptors / V.I. Kulinsky, I.A. Olhovskiy // *Achievements in modern biology*. - № 5-6. – P. 697–714.
206. Lamb, H. J. Metabolic MRI of myocardial and hepatic triglyceride content in response to nutritional interventions / H.J. Lamb, J.W. Smit, R.W. van der Meer [et al.] // *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* – 2008. – V. 11. - P.573–579.
207. Lavie, C. J. Obesity and cardiovascular disease: the Hippocrates paradox? / C.J. Lavie, R.V. Milani // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2003. – V. 42. – P. 677–679.
208. Lavie, C. J. Body composition and prognosis in chronic systolic heart failure: the obesity paradox / C.J. Lavie, A.F. Osman, R.V. Milani, M.R. Mehra // *Am. J. Cardiol.* – 2003. – V. 91. – P. 891–894.
209. Lee, L. Metabolic modulation with perhexiline in chronic heart failure: a randomized, controlled trial of short-term use of a novel treatment / L. Lee, R.

- Campbell, M. Scheuermann-Freestone [et al.] // *Circulation*. – 2005. – V. 112. – P. 3280–3288.
210. Lee, L. Metabolic manipulation in ischaemic heart disease, a novel approach to treatment / L. Lee, J. Horowitz, M. Frenneaux // *Eur. Heart J.* – 2004. – V. 25. – P. 634–641.
211. Lemasters, J. J. Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death / J. J. Lemasters, T.P. Theruvath, Z. Zhong [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – V. 11. - №1787. – P. 1395-1401.
212. Leung, A. W. The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition / A.W. Leung, P. Varanyuwatana, A.P. Halestrap // *J. Biol. Chem.* – 2008. – № 283. – P. 26312-26323.
213. Li, J. AMP-activated protein kinase activates p38 mitogen-activated protein kinase by increasing recruitment of p38 MAPK to TAB1 in the ischemic heart / J. Li, E.J. Miller, J. Ninomiya-Tsuji [et al.] // *Circ. Res.* – 2005. – V. 97. – P. 872–879.
214. Li, L. Adiponectin modulates carnitine palmitoyltransferase-1 through AMPK signaling cascade in rat cardiomyocytes / L. Li, L. Wu, C. Wang [et al.] // *Regul. Pept.* – 2007. – V. 139. – P. 72–79.
215. Li, S. Y. Cardiac contractile dysfunction in Lep/Lep obesity is accompanied by NADPH oxidase activation, oxidative modification of sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase and myosin heavy chain isozyme switch / S.Y. Li, X. Yang, A.F. Ceylan-Isik [et al.] // *Diabetologia.* – 2006. – V. 49. – P. 1434–1446.
216. Liao, R. Cardiac-specific overexpression of GLUT1 prevents the development of heart failure attributable to pressure overload in mice / R. Liao, M. Jain, L. Cui [et al.] // *Circulation.* – 2002. – V. 106. – P. 2125–2131.
217. Lindenfeld, J. Fluid retention with thiazolidinediones: does the mechanism influence the outcome? / J. Lindenfeld, F.A. Masoudi // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2007. – V. 49. – P. 1705–1707.



218. Liu, Q. High levels of fatty acids delay the recovery of intracellular pH and cardiac efficiency in post-ischemic hearts by inhibiting glucose oxidation / Q. Liu, J.C. Docherty, J.C. Rendell [et al.] // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2002. – V. 39. – P. 718–725.
219. Liu, Y. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain / Y. Liu, G. Fiskum, D.Schubert // *J. Neurochem.* – 2002. – V. 80. – P. 780–787.
220. Lloyd, S. G. Impact of low-flow ischemia on substrate oxidation and glycolysis in the isolated perfused rat heart / S.G. Lloyd, P. Wang, H. Zeng, J.C. Chatham // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2004. – V. 287. – P. H351–H362.
221. Lopaschuk, G. D. Beneficial effects of trimetazidine in ex vivo working ischemic hearts are due to a stimulation of glucose oxidation secondary to inhibition of long-chain 3-ketoacyl coenzyme a thiolase / G.D. Lopaschuk, R. Barr, P.D. Thomas, J.R. Dyck // *Circ. Res.* – 2003. - V. 93. – P. e33–e37.
222. Lopaschuk, G. D. Cardiac energy metabolism in obesity / G.D. Lopaschuk, C.D. Folmes, W.C. Stanley // *Circ. Res.* - 2007. – V. 101. – P. e335–e347.
223. Lopaschuk, G. D. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease / G.D. Lopaschuk, J.R. Ussher, C.D. Folmes [et al.] // *Physiol. Rev.* - 2010. - V. 90. - P. 207-258.
224. Lowry, O. H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall // *J. Biol. Chem.* – 1951. – V.193. – P. 265–275.
225. Luiken, J. J. Cellular fatty acid transport in heart and skeletal muscle as facilitated by proteins / J.J. Luiken, F.G. Schaap, F.A. van Nieuwenhoven [et al.] // *Lipids.* – 1999. – V. 34. – P. S169–S175.
226. Luiken, J. J. Regulation of cardiac long-chain fatty acid and glucose uptake by translocation of substrate transporters / J.J. Luiken, S.L.M. Coort, D.P.Y. Koonen [et al.] // *Pflügers Arch.* – 2004. – V. 448. – P. 1–15.

227. Lukyanova, L. D. Mitochondrial signaling in formation of body resistance to hypoxia / L.D. Lukyanova, A.V. Dudchenko, E.L. Germanova [et al.] / In: Xi L., Serebrovskaya N.V. Intermittent Hypoxia and Human Diseases. - New York : Nova Science Publ. Inc., 2009. – P. 423-460.
228. Lukyanova, L. D. The signal function of succinate and free radicals in mechanisms of preconditioning and long-term adaptation to hypoxia / L.D. Lukyanova, E.L. Germanova, Yu.I. Kirova // *Adapt. Biol. Med.* – 2011. - V. 6. - P. 251-277.
229. Martí Massó, J. F. Trimetazidine-induced parkinsonism / J. F. Martí Massó // *Neurologia.* – 2004. – V. 19. – № 7. – P. 392-395.
230. Madrazo, J.A. The PPAR trio: regulators of myocardial energy metabolism in health and disease / J.A. Madrazo, D.P. Kelly // *J. Mol. Cell Cardiol.* – 2008. – V. 44. – P. 968–975.
231. Maslov, L. N. Activation of peripheral  $\delta 2$  opioid receptors increases cardiac tolerance to ischemia/reperfusion injury: Involvement of protein kinase C, NO synthase, KATP channels and the autonomic nervous system / L.N. Maslov Yu.B. Lishmanov, P.R. Oeltgen [et al.] // *Life Sci.* – 2009. – Vol. 84 – № 19-20. – P. 657–663.
232. Masmoudi, K. Trimetazidine - a new aetiology for extrapyramidal disorders: A case of parkinsonism and akathisia / K. Masmoudi, V. Gras-Champel, Y. Douadi [et al.] // *Therapie.* – 2005. – V. 60. - № 6. - P. 603-605.
233. McCarty, M. F. A shift in myocardial substrate, improved endothelial function, and diminished sympathetic activity may contribute to the anti-anginal impact of very-low-fat diets / M.F. McCarty // *Med. Hypotheses.* – 2004. – V. 62. № 1. – P. 62-71.
234. McNulty, P. H. Metabolic responsiveness to insulin in the diabetic heart / P.H. McNulty // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2006. – V. 290. – P. H1749–H1751.

235. McVeigh, J. J. Dichloroacetate stimulation of glucose oxidation improves recovery of ischemic rat hearts / J.J. McVeigh, G.D. Lopaschuk // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 1990. – V. 259. – P. H1079–H1085.
236. Mootha, V. K. Maximum oxidative phosphorylation capacity of the mammalian heart / V.K. Mootha, A.A. Arai, R.S. Balaban // *Am. J. Physiol.* – 1997. – V. 272. – P. 69-775.
237. Morgan, E. E. Effects of chronic activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha or high-fat feeding in a rat infarct model of heart failure / E.E. Morgan, J.H. Rennison, M.E. Young. [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2006. – V. 290. – P. H1899–H1904.
238. Morin, D. Inhibition of mitochondrial membrane permeability as a putative pharmacological target for cardioprotection / D. Morin, R. Assaly, S. Paradis [et al.] // *Curr. Med. Chem.* – 2009. – V. 16. - № 33. – P. 4382-4398.
239. Mouquet, F. Effects of trimetazidine, a partial inhibitor of fatty acid oxidation, on ventricular function and survival after myocardial infarction and reperfusion in the rat / F. Mouquet, D. Rousseau, V. Domergue-Dupont [et al.] // *Fundam. Clin. Pharmacol.* – 2010. – V. 24. № 4. – P. 469-76.
240. Muoio, D. M. Mechanisms of disease: molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes / D.M. Muoio, C.B. Newgard // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2008. – V. 9. – P. 193–205.
241. Murphy, M. P. Superoxide activates uncoupling proteins by generating carbon-centered radicals and initiating lipid peroxidation: studies using a mitochondria-targeted spin trap derived from alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron / M.P. Murphy, K.S. Echtay, F.H. Blaikie [et al.] // *J. Biol. Chem.* 2003. - V. 278. - P. 48534-48545.
242. Murray, A. J. Plasma free fatty acids and peroxisome proliferator-activated receptor alpha in the control of myocardial uncoupling protein levels / A.J. Murray, M. Panagia, D. Hauton [et al.] // *Diabetes.* – 2005. – V. 54. – P. 3496–3502.

243. Nawata, T. Cardioprotection by streptozotocin-induced diabetes and insulin against ischemia/reperfusion injury in rats / T. Nawata, N. Takahashi, T. Opie // *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. – 2002. – V. 40. – № 4. - P. 491–500.
244. Neglia, D. Impaired myocardial metabolic reserve and substrate selection flexibility during stress in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy / D. Neglia, A. De Caterina, P. Marraccini [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2007. – V. 293. – P. H3270–H3278.
245. Neubauer, S. The failing heart—an engine out of fuel / S. Neubauer // *N. Engl. J. Med.* – 2007. – V. 356. – P. 1140–1151.
246. Neubauer, S. Impairment of energy metabolism in intact residual myocardium of rat hearts with chronic myocardial infarction / S. Neubauer, M. Horn, A. Naumann [et al.] // *J. Clin. Invest.* - 1995. - V. 92. - № 3. - P. 1092-1100.
247. Nicholl, T. A. Effects of free fatty acids and dichloroacetate on isolated working diabetic rat heart / T.A. Nicholl, G.D. Lopaschuk, J.H. McNeill // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 1991. – V. 261. – P. H1053–H1059.
248. Nikolaidis, L. A. The development of myocardial insulin resistance in conscious dogs with advanced dilated cardiomyopathy / L.A. Nikolaidis, A. Sturzu, C. Stolarski [et al.] // *Cardiovasc. Res.* – 2004. – V. 61. – P. 297–306.
249. Nissen, S. E. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes / S.E. Nissen, K. Wolski // *N. Engl. J. Med.* – 2007. – V. 356. – P. 2457–2471.
250. Novgorodov, S. A. Permeability transition pore of the inner mitochondrial membrane can operate in two open states with different selectivities / S.A. Novgorodov, T.I. Gudz // *J. Bioenerg. Biomembr.* - 1996. - V. 28. - P. 139-146.
251. O'Donnell, J. M. Accelerated triacylglycerol turnover kinetics in hearts of diabetic rats include evidence for compartmented lipid storage / J.M. O'Donnell, M. Zampino, N.M. Alpert [et al.] // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2006. – V. 290. – P. E448–E455.

252. Okere, I. C. Carnitine palmitoyl transferase-I inhibition is not associated with cardiac hypertrophy in rats fed a high-fat diet / I.C. Okere, M.P. Chandler, T.A. McElfresh, J.H. Rennison [et al.] // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 2007. – V. 34. P. 113–119.
253. Oliveira, P. J. Enhanced permeability transition explains the reduced calcium uptake in cardiac mitochondria from streptozotocin-induced diabetic rats / P. J. Oliveira, R. Seica, P. M. Coxito [et al.] // *FEBS Lett.* – 2003. - № 554. – P. 511–514.
254. Opie, L. H. *The Heart: Physiology and Metabolism* / L.H. Opie - New York : Raven, 1991. – 513 p.
255. Palanivel, R. Globular and full-length forms of adiponectin mediate specific changes in glucose and fatty acid uptake and metabolism in cardiomyocytes / R. Palanivel, X. Fang, M. Park [et al.] // *Cardiovasc. Res.* – 2007. – V. 75. – P. 148–157.
256. Pallotti, F. Isolation and subfractionation of mitochondria from animal cells and tissue culture lines / F. Pallotti, G. Lenaz // *Meth. Cell Biol.* – 2009. - V. 65. - P. 1-35.
257. Panagia, M. PPAR-alpha activation required for decreased glucose uptake and increased susceptibility to injury during ischemia / M. Panagia, G.F. Gibbons, G.K. Radda, K. Clarke // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2005. – V. 288. – P. H2677–H2683.
258. Panchal, A. R. Acute hibernation decreases myocardial pyruvate carboxylation and citrate release / A.R. Panchal, B. Comte, H. Huang [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2001. – V. 281. – P. H1613–H1620.
259. Patel, M. S. Regulation of the pyruvate dehydrogenase complex / M.S. Patel, L.G. Korotchkina // *Biochem. Soc. Trans.* – 2006. – V.34. – P. 217–222.
260. Parang, P. Metabolic modulators for chronic cardiac ischemia / P. Parang, B. Singh, R. Arora // *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* – 2005. – V. 10. – P. 217–223.

261. Paulussen, R. J. Fatty acid-binding capacity of cytosolic proteins of various rat tissues: effect of postnatal development, starvation, sex, clofibrate feeding and light cycle / R.J. Paulussen, G.P. Jansen, J.H. Veerkamp // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1986. – V. 877. – P. 342–349.
262. Perseghin, G. Serum retinol-binding protein-4, leptin, adiponectin concentrations are related to ectopic fat accumulation / G. Perseghin, G. Lattuada, F. De Cobelli [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2007. – V. 92. – P. 4883–4888
263. Petersen, K. F. Etiology of insulin resistance / K.F. Petersen, G.I. Shulman // *Am. J. Med.* – 2006. – V. 119. – P. S10–16.
264. Peterson, L. R. Fatty acids and insulin modulate myocardial substrate metabolism in humans with type 1 diabetes / L.R. Peterson, P. Herrero, J. McGill [et al.] // *Diabetes.* – 2008. – V. 57. – P. 32–40.
265. Peterson, L. R. Effect of obesity and insulin resistance on myocardial substrate metabolism and efficiency in young women / L.R. Peterson, P. Herrero, K.B. Schechtman [et al.] // *Circulation.* – 2004. – V. 109. - P 2191–2196.
266. Phan, J. Lipin, a lipodystrophy and obesity gene / J. Phan, K. Reue // *Cell. Metab.* – 2005. – V. 1. – P. 73-83.
267. Prasad, M. R. Improved myocardial performance induced by clofibrate during reperfusion after acute myocardial infarction / M.R. Prasad, R. Clement, H. Otani [et al.] // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 1988. – V. 66. – P.1518–1523.
268. Pulinilkunnil, T. Evidence for rapid “metabolic switching” through lipoprotein lipase occupation of endothelial-binding sites / T. Pulinilkunnil, A. Abrahani, J. Varghese [et al.] // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2003. – V. 35. – P. 1093–1103.
269. Pulinilkunnil, T. Cardiac lipoprotein lipase: metabolic basis for diabetic heart disease / T. Pulinilkunnil, B. Rodrigues // *Cardiovasc. Res.* – 2006. – V. 69. – P. 329–340.
270. Qanud, K. Reverse changes in cardiac substrate oxidation in dogs recovering from heart failure / K. Qanud, M. Mamdani, M. Pepe [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2008. – V. 295. – P. H2098–H2105.

271. Qi, D. Single-dose dexamethasone induces whole-body insulin resistance and alters both cardiac fatty acid and carbohydrate metabolism / D. Qi, T. Pulinilkunnil, D. An [et al.] // *Diabetes*. – 2004. – V. 53. – P. 1790–1797.
272. Razeghi, P. Metabolic gene expression in fetal and failing human heart / P. Razeghi, M.E. Young, J.L. Alcorn [et al.] // *Circulation*. – 2001. – V. 104. – P. 2923–2931.
273. Remondino, A. Altered expression of proteins of metabolic regulation during remodeling of the left ventricle after myocardial infarction / A. Remondino, N. Rosenblatt-Velin, C. Montessuit [et al.] // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2000. – V. 32. – P. 2025–2034.
274. Robergs, R. A. Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis / R.A. Robergs, F. Ghiasvand, D. Parker // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2004. – V. 287. – P. R502–R516.
275. Rosca, M. G. Cardiac mitochondria in heart failure: decrease in respirasomes and oxidative phosphorylation / M.G. Rosca, E.J. Vazquez, J. Kerner [et al.] // *Cardiovasc Res.* – 2008. – V. 80. – P. 30–39.
276. Roth, E. Hypothesis: muscular glutamine deficiency in sepsis – a necessary step for a hibernation-like state? / E. Roth, R. Oehler // *Nutrition*. – 2010. – V. 26. – P. 571–574.
277. Rousset, S. The biology of mitochondrial uncoupling proteins / S. Rousset, M.C. Alves-Guerra, J. Mozo [et al.] // *Diabetes*. – 2004. – V. 53. – P. S130–S135.
278. Ruiz-Meana, M. Role of sarcoplasmic reticulum in mitochondrial permeability transition and cardiomyocyte death during reperfusion / M. Ruiz-Meana, A. Abellan, E. Miro-Casas [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2009. – № 297. – P. 1281-1289.
279. Russell, R. R. 3rd. AMP-activated protein kinase mediates ischemic glucose uptake and prevents postischemic cardiac dysfunction, apoptosis, and injury / R.R.3rd Russell, J. Li, D.L. Coven [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2004. – V. 114. – P. 495–503.

280. Sabbah, H. N. Mitochondrial abnormalities in myocardium of dogs with chronic heart failure / H.N. Sabbah, V. Sharov, J.M. Riddle [et al.] // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 1992. – V. 24. – P. 1333–1347.
281. Saddik, M. Myocardial triglyceride turnover and contribution to energy substrate utilization in isolated working rat hearts / M. Saddik, G.D. Lopaschuk // *J. Biol. Chem.* – 1991. – V. 266. - P. 8162–8170.
282. Saddik, M. Acetyl-CoA carboxylase regulation of fatty acid oxidation in the heart / M. Saddik, J. Gamble, L.A. Witters, G.D. Lopaschuk // *J. Biol. Chem.* - 1993. – V. 268. – P. 25836–25845.
283. Saddik, M. Triacylglycerol turnover in isolated working hearts of acutely diabetic rats / M. Saddik, G.D. Lopaschuk // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 1994. – V. 72. – P. 1110–1119.
284. Saito, Â. Inhibitory effects of adenine nucleotides on brain mitochondrial permeability transition / Â. Saito, R.F. Castilho // *Neurochem. Res.* – 2010. – V. 35. – № 11. – P. 1667-1674.
285. Sakamoto, J. Contribution of malonyl-CoA decarboxylase to the high fatty acid oxidation rates seen in the diabetic heart / J. Sakamoto, R.L. Barr, K.M. Kavanagh, G.D Lopaschuk // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2000. – V. 278. – P. H1196–H1204.
286. Saks, V. A. Intracellular energetic units in red muscle cells / V.A. Saks, T. Kaambre, P. Sikk [et al.] // *Biochem. J.* – 2001. – V. 356. – P. 643–657.
287. Sambandam, N. Chronic activation of PPARalpha is detrimental to cardiac recovery after ischemia / N. Sambandam, D. Morabito, C. Wagg [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2006. – V. 290. – P. H87–H95.
288. Sambandam, N. Malonyl-CoA decarboxylase (MCD) is differentially regulated in subcellular compartments by 5'AMP-activated protein kinase (AMPK) / N. Sambandam, M. Steinmetz, A. Chu [et al.] // *Eur. J. Biochem.* – 2004. – V. 271. – P. 2831–2840.



289. Schild, L. Short-term impairment of energy production in isolated rat liver mitochondria by hypoxia/reoxygenation: involvement of oxidative protein modification / L. Schild, T. Reinheckel, I. Wiswedel, W. Augustin // *Biochem. J.* – 1997. – V. 328. – P. 205-210
290. Schönfeld, P. Does the function of adenine nucleotide translocase in fatty acid uncoupling depend on the type of mitochondria? / P. Schönfeld // *FEBS Letters.* - 1990. - V. 244. - № 2 - P. 246-248.
291. Schönfeld, P. Fatty acids decrease mitochondrial generation of reactive oxygen species at the reverse electron transport but increase it at the forward transport / P. Schönfeld, L. Wojtczak // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2007. – V. 1767. – P. 1032–1040.
292. Schoonjans, K. Acyl-CoA synthetase mRNA expression is controlled by fibric-acid derivatives, feeding and liver proliferation / K. Schoonjans, B. Staels, P. Grimaldi, J. Auwerx // *Eur. J. Biochem.* – 1993. – V. 216. – P. 615–622.
293. Schulz, H. *Oxidation of Fatty Acids in Eukaryotes* / H. Schulz – Amsterdam : Elsevier, 2007. - P. 131–154.
294. Schwenk, R. W. Regulation of sarcolemmal glucose and fatty acid transporters in cardiac disease / R.W. Schwenk, J.J. Luiken, A. Bonen, J.F. Glatz // *Cardiovasc. Res.* – 2008. – V. 79. – P. 249–258.
295. Semenza, G. L. Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences / G. L. Semenza // *Biochem. Pharmacol.* – 2000. – V. 59. – №1. – P. 47-53.
296. Semenza, G. L. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine / G. L. Semenza // *Cell.* – 2012. – V.148. №3. - P. 399-408.
297. Semenza, G. L. Oxygen sensing, homeostasis and disease / G. L. Semenza // *N. Engl. J. Med.* – 2011. – V. 365. – №6. – P. 537-547
298. Sethi, J. K. Visfatin: the missing link between intra-abdominal obesity and diabetes? / J.K. Sethi, A.Vidal-Puig // *Trends Mol. Med.* – 2005. – V. 11. – P. 344–347.

299. Sharov, V. G. Abnormal mitochondrial respiration in failed human myocardium / V.G. Sharov, A.V., Todor, N. Silverman [et al.] // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2000. – V. 32. – P. 2361–2367.
300. Sharov, V. G. Cyclosporine A attenuates mitochondrial permeability transition and improves mitochondrial respiratory function in cardiomyocytes isolated from dogs with heart failure/ V.G. Sharov, A.V., Todor, S. Khanal [et al.] // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2007. – № 42. – P. 150-158.
301. Sharpe, M. A. Transport of  $K^+$  and cations across phospholipid membranes by nonesterified fatty acids / M.A. Sharpe, C.E. Cooper, J.M. Wrigglesworth // *J. Membr. Biol.* 1994. - V. 141. - P. 21-28.
302. Shen, X. Protection of cardiac mitochondria by overexpression of MnSOD reduces diabetic cardiomyopathy / X. Shen, S. Zheng, N.S. Metreveli, P.N. Epstein // *Diabetes.* – 2005. – V. 55. – P. 798–805.
303. Shibata, R. Adiponectin-mediated modulation of hypertrophic signals in the heart / R. Shibata, N. Ouchi, M. Ito, [et al.] // *Nat. Med.* – 2004. – V. 10. – P. 1384–1389.
304. Shibata, R. Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK- and COX-2-dependent mechanisms / R. Shibata, K. Sato, D.R. Pimentel [et al.] // *Nat. Med.* – 2005. – V. 11. – P. 1096–1103.
305. Shier, W. T. Activation of high levels of endogenous phospholipase  $A_2$  in cultured cells / W.T. Shier // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1979. – V. 76. – № 1. – P. 195–199.
306. Shimizu, J. Load dependence of ventricular performance explained by model of calcium-myofilament interactions / J. Shimizu, K. Todaka, D. Burkhoff // *Am. J. Physiol.* – 2002. – V. 282. – P. 1081-1091.
307. Shinmura, K. Cardioprotective effects of short-term caloric restriction are mediated by adiponectin via activation of AMP-activated protein kinase / K. Shinmura, K. Tamaki, K. Saito [et al.] // *Circulation.* – 2007. – V. 116. P. 2809–2817.

308. Sidell, R. J. Thiazolidinedione treatment normalizes insulin resistance and ischemic injury in the Zucker fatty rat heart / R.J. Sidell, M.A. Cole, N.J. Draper [et al.] // *Diabetes*. – 2002. – V. 51. – P. 1110–1117.
309. Sivet, J. Trimetazidine-induced encephalopathy with choreiform disorders: a case report / J. Sivet, B. de la Gastine Mosquet, P. Lescure [et al.] // *Rev. Med. Interne*. – 2008. – V. 29. - № 6. - P. 512-515.
310. Skulachev, V. P. Membrane-linked systems preventing superoxide formation / V.P. Skulachev // *Biosci. Reports*. - 1997. - V. 17. - № 3. - P. 347-366.
311. Sokolova, T. N. The hypothesis of specific affinity of metabolic pathways inherent to onset of hibernation and reaction to critical stress stimuli / T.N. Sokolova // *J. Stress Physiol. Biochem*. – 2011. - V. 7. - №4. - P. 268-291.
312. Sommet, A. Trimetazidine: a new cause for drug-induced parkinsonism? / A. Sommet, C. Azaïs-Vuillemin, H. Bagheri [et al.] // *Movemet. Disorders*. – 2005. – V. 20. – № 8. P. 1080-1081.
313. Son, N. H. Cardiomyocyte expression of PPARgamma leads to cardiac dysfunction in mice / N.H. Son, T.S. Park, H. Yamashita [et al.] // *J. Clin. Invest*. – 2007. – V. 117. – P. 2791–2801.
314. Stanley, W. C. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart / W.C. Stanley, F.A. Recchia, G.D. Lopaschuk // *Physiol. Rev*. – 2005. – V. 85. P.1093–1129.
315. Stepan, C. M. Resistin and obesity-associated insulin resistance / C.M. Stepan, M.A. Lazar // *Trends Endocrinol. Metab*. – 2002. – V. 13. – P. 18–23.
316. Stroka, D. M. HIF-1 is expressed in normoxia tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia / D.M. Stroka, T. Burkhardt, I.Desballerts // *The FASEB J*. – 2001. – V. 15. – P. 2445-2453.
317. Su, X. Cellular fatty acid uptake: a pathway under construction / X. Su, N.A. Abumrad // *Trends Endocrinol. Metab*. – 2009. – V. 20. – P. 72–77.
318. Summers, S. A. Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity / S.A. Summers // *Prog. Lipid Res*. – 2006. – V. 45. – P. 42–72.

319. Tao, L. Adiponectin cardioprotection after myocardial ischemia/reperfusion involves the reduction of oxidative/nitrative stress / L. Tao, E. Gao, X. Jiao [et al.] // *Circulation*. – 2007. – V. 115. – P. 1408–1416.
320. Taegtmeyer, H. Switching metabolic genes to build a better heart / H. Taegtmeyer // *Circulation*. – 2002. – V. 106. - P. 2043–2045.
321. Tuunanen, H. Trimetazidine, a metabolic modulator, has cardiac and extracardiac benefits in idiopathic dilated cardiomyopathy / H. Tuunanen, E. Engblom, A. Naum [et al.] // *Circulation*. – 2008. – V. 118. – P. 1250–1258.
322. Ussher, J. R. Insulin-stimulated cardiac glucose oxidation is increased in high-fat diet-induced obese mice lacking malonyl CoA decarboxylase / J.R. Ussher, T.R. Koves, J.S. Jaswal [et al.] // *Diabetes*. – 2009. – V. 58. – P. 1766–1775.
323. Ussher, J. R. Clinical implications of energetic problems in cardiovascular disease / J.R. Ussher, G.D. Lopaschuk // *Heart Metabolism*. – 2006. – V. 32. – P. 9–17.
324. Ussher, J. R. Targeting malonyl CoA inhibition of mitochondrial fatty acid uptake as an approach to treat cardiac ischemia/reperfusion / J.R. Ussher, G.D. Lopaschuk // *Basic. Res. Cardiol.* – 2009. – V. 104. – P. 203–210.
325. Ussher, J. R. The malonyl CoA axis as a potential target for treating ischaemic heart disease / J.R. Ussher, G.D. Lopaschuk // *Cardiovasc. Res.* – 2008. – V. 79. – P. 259–268.
326. Waki, H. Endocrine functions of adipose tissue / H. Waki, P. Tontonoz // *Annu. Rev. Pathol.* – 2007. – V. 2. – P. 31–56.
327. Wang, P. A comparison between ranolazine and CVT-4325, a novel inhibitor of fatty acid oxidation, on cardiac metabolism and left ventricular function in rat isolated perfused heart during ischemia and reperfusion / P. Wang, H. Fraser, S.G. Lloyd [et al.] // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2007. – V. 321. P. 213–220.
328. Wang, P. Impact of altered substrate utilization on cardiac function in isolated hearts from Zucker diabetic fatty rats / P. Wang, S.G. Lloyd, H. Zeng // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2005. – V. 288. – P. H2102–H2110.

329. Wang, Y. X. Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity / Y.X. Wang, C.H. Lee, S. Tjep [et al.] // *Cell*. – 2003. – V. 113. – P. 159–170.
330. Wayman, N. S. Ligands of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR-gamma and PPAR-alpha) reduce myocardial infarct size / N.S. Wayman, Y. Hattori, M.C. McDonald [et al.] // *FASEB J.* – 2002. – V. 16. – P. 1027–1040.
331. Weglicki, W. B. Hydrolysis of myocardial lipids during acidosis and ischemia / W.B. Weglicki, K. Owens, C.W. Urshel // *Recent Adv. Stud. Cardiac Struct. Metab.* - 1973. - V. 3. - P. 781-793.
332. Weiss, R. G. ATP flux through creatine kinase in the normal, stressed, and failing human heart / R.G. Weiss, G. Gerstenblith, P.F. Bottomley // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2005. – V. 102. – P. 808–813.
333. Weiss, J. Functional compartmentation of glycolytic versus oxidative metabolism in isolated rabbit heart / J. Weiss, B. Hiltbrand // *J. Clin. Invest.* – 1985. – V. 75. – P. 176-181.
334. Wieckowski, M. R. Fatty acid-induced uncoupling of oxidative phosphorylation is partly due to opening of the mitochondrial permeability transition pore / M.R. Wieckowski, L. Wojtczak // *FEBS Lett.* – 1998. – V.423. – P. 339-342.
335. Wisneski, J. A. Myocardial metabolism of free fatty acids. Studies with <sup>14</sup>C-labeled substrates in humans / J.A. Wisneski, E.W. Gertz, R.A. Neese, M. Mayer // *J. Clin. Invest.* – 1987. – V. 79. P. 359–366.
336. Van der Vusse, G. J. Accumulation of arachidonic acid in ischemic/reperfused cardiac tissue: possible causes and consequences / G.J. Van der Vusse, R.S. Reneman, M. Van Bilsen // *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* - 1997. - V. 57. - P. 85-93.
337. Van der Vusse, G. J. Cardiac fatty acid uptake and transport in health and disease / G.J. Van der Vusse, M. Van Bilsen, J.F. Glatz // *Cardiovasc. Res.* – 2000. – V. 45. P. 279–293.

338. Ventura-Clapier, R. Energy metabolism in heart failure / Ventura-Clapier R., A. Garnier, V. Veksler // *J. Physiol.* - 2004. - V. 555. - № 1. - P.1-13.
339. Xin, X. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands are potent inhibitors of angiogenesis in vitro and in vivo / X. Xin, S. Yang, J. Kowalski [et al.] // *J. Biol. Chem.* - 1999. - V. 274. - P. 9116–9121.
340. Yang, J. CD36 deficiency rescues lipotoxic cardiomyopathy / J. Yang, N. Sambandam, X. Han [et al.] // *Circ. Res.* - 2007. - V. 100. - P. 1208–1217.
341. Yang, Q. Roles of PPARs on regulating myocardial energy and lipid homeostasis / Q. Yang, Y. Li // *J. Mol. Med.* - 2007. - V. 85. - P. 697–706.
342. Yellon, D. M. A “second window of protection” or delayed preconditioning phenomenon: future horizons for myocardial protection? / D.M. Yellon, G.F. Baxter // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* - 1995. - V. 27. - P. 1023-1034.
343. Yue, T. L. Rosiglitazone treatment in Zucker diabetic fatty rats is associated with ameliorated cardiac insulin resistance and protection from ischemia/reperfusion-induced myocardial injury / T.L. Yue, W. Bao, J.L. Gu, J. Cui [et al.] // *Diabetes.* - 2005. - V. 54. - P. 554–562.
344. Zhang, J. Myocardial energetics in cardiac hypertrophy / J. Zhang // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* - 2002. - V. 29. - P. 351–359.
345. Zhang, M. Gluing the respiratory chain together. Cardiolipin is required for supercomplex formation in the inner mitochondrial membrane / M. Zhang, E. Mileykovskaya, W. Dowhan // *J. Biol. Chem.* - 2002. - V. 277. - P. 43553–43556.
346. Zhang, M. Cardiolipin is essential for organization of complexes III and IV into a supercomplex in intact yeast mitochondria / M. Zhang, E. Mileykovskaya, W. Dowhan // *J. Biol. Chem.* - 2005. - V. 280. - P. 29403–29408.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Inhibitors of the ATP/ADP antiporter suppress stimulation of mitochondrial respiration and  $H^+$  permeability by palmitate and anionic detergents / N.N. Brustovetsky, V.I. Dedukhova, **M.V. Egorova**, E.N. Mokhova, V.P. Skulachev // **FEBS Letters** (IF 3,582). – 1990. – V. 272. – P. 187-189.
2. Механизм активации дыхания кардиомиоцитов ненасыщенными жирными кислотами: роль ионов  $Na^+$  / Н.Н. Брустовецкий, **М.В. Егорова**, Е.В. Гришина, Е.И. Маевский, Ю.М. Кокоз, В.П. Зинченко // **Биологические мембраны** (ИФ РИНЦ 0,318). – 1991. – Т. 8. – С. 824-829.
3.  $Na^+$  - зависимый механизм стимуляции дыхания кардиомиоцитов крысы арахидоновой кислотой: роль перекисного окисления липидов и фосфолипазы  $A_2$  / Н.Н. Брустовецкий, **М.В. Егорова**, В.Г. Гогвадзе, Е.В. Гришина, Е.И. Маевский, Ю.М. Кокоз // **Биологические мембраны** (ИФ РИНЦ 0,318). – 1991. – Т. 9. – С. 907-911.
4. Разобщение окислительного фосфорилирования жирными кислотами и детергентами подавляется ингибиторами ADP/ATP – антипортера / Н.Н. Брустовецкий, **М.В. Егорова**, В.И. Дедухова, Е.Н. Мохова, В.П. Скулачев // **Биохимия** (ИФ РИНЦ 1,162). – 1991. – Т. 56. – С. 1024-1028.
5. Thermoregulatory, carboxyatractilate - sensitive uncoupling in heart and skeletal muscle mitochondria correlates with the level of free fatty acids / N.N. Brustovetsky, **M.V. Egorova**, D.Yu. Gnutov, V.G. Gogvadze, E.N. Mokhova, V.P. Skulachev // **FEBS Letters** (IF 3,582). – 1992. – V. 305. – P. 15-17
6. Афанасьев С.А. Структура и энергетический метаболизм миокарда / С.А. Афанасьев, **М.В. Егорова**, И.Л. Телкова // Коронарная и сердечная недостаточность: коллективная **монография**, посвященная 25-летию НИИ кардиологии ТНЦ СО РАМН и 20-летию филиала НИИ кардиологии ТНЦ СО РАМН «Тюменский кардиологический центр» / под ред. Р.С.Карпова. - Томск: СТТ, 2005. – С.6-18.

7. **Егорова, М. В.** Методические подходы к получению изолированных кардиоцитов / М.В. Егорова, С.А. Афанасьев // **Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова** (ИФ РИНЦ 0,569). – 2005. – Т. 91. – № 5 – С. 514-520.
8. **Егорова, М. В.** Простой метод выделения кардиомиоцитов из сердца взрослой крысы / М.В. Егорова, С.А. Афанасьев, С.В. Попов // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины** (ИФ РИНЦ 0,558). – 2005. – Т. 140. – № 9. – С. 357-360.
9. **Егорова, М. В.** Особенности методики получения изолированных клеток сердца / М.В. Егорова, С.А. Афанасьев // **Бюллетень сибирской медицины** (ИФ РИНЦ 0,351). – 2005. – Т. 4. - прил. 1. – С. 183.
10. **Егорова, М. В.** Получение изолированных кардиомиоцитов при сочетанном применении протеолитических ферментов в малых количествах / М.В. Егорова, С.А. Афанасьев // **Сибирский медицинский журнал (г. Томск)** (ИФ РИНЦ 0,145). – 2005. – Т.20. - № 2 (прил.). - С. 77.
11. **Егорова, М. В.** Способ получения изолированных кардиомиоцитов из сердца взрослой крысы / М.В. Егорова, С.А. Афанасьев, С.В. Попов // **Патент РФ на изобретение № 2279145 от 27.06.06.**
12. **Егорова, М. В.** Сопоставление процессов окислительного фосфорилирования в митохондриях печени и сердца при адаптации к неблагоприятным факторам в естественных условиях и в эксперименте / М.В. Егорова // **Нейрогуморальные механизмы регуляции органов пищеварительной системы в норме и при патологии: материалы научной конференции с международным участием, 2 ноября 2007 г. - Томск: СибГМУ, 2007 - С. 82-86.**
13. **Некоторые патогенетические аспекты ремоделирования кардиомиоцитов при формировании сердечной недостаточности / С.А. Афанасьев, Д.С. Кондратьева, Т.Ю. Реброва, М.В. Егорова, А.В. Евтушенко, С.В. Попов // Сибирский медицинский журнал (г. Томск) (ИФ РИНЦ 0,145). – 2007. – № 3. – С. 42-45.**



14. **Егорова, М. В.** Исследование окислительного фосфорилирования в митохондриях сердца крыс при экспериментальном постинфарктном кардиосклерозе / М.В. Егорова, С.А. Афанасьев // Вестник СПбГМА им. И.И. Мечникова. – 2007. - № 2. - С. 58.
15. **Егорова, М. В.** Разобщение окисления и фосфорилирования в митохондриях сердца крыс при экспериментальном постинфарктном кардиосклерозе / М.В. Егорова, С.А. Афанасьев // **Сибирский медицинский журнал** (г. Томск) (ИФ РИНЦ 0,145). – 2007. - № 1. - С. 50-51.
16. **Егорова, М. В.** «Метаболическая ишемия» при экспериментальном постинфарктном кардиосклерозе / М.В. Егорова, С.А. Афанасьев, С.В. Попов // Кардиоваскулярная терапия и профилактика (ИФ РИНЦ 0,704). – 2007. - №6(5) - С. 97.
17. **Егорова, М. В.** Влияние кардиосклероза на потребление кислорода изолированными кардиомиоцитами / М.В. Егорова, С.А. Афанасьев // Вестник аритмологии. – 2007. - № 47. – С. 56.
18. **Егорова, М. В.** Оценка дыхания митохондрий кардиомиоцитов после экспериментального кардиосклероза / М.В. Егорова // Вопросы интегративной физиологии: материалы региональной научно-практической конференции, Красноярск, 22-23 марта 2007 г., вып. 2. - Красноярск: Изд-во «Верес». - С. 136-140.
19. Роль фосфолипаз в развитии различных патологических процессов как компонента неспецифической ответной реакции на стресс / Т.В.Андреева, Е.С. Алексеевская, **М.В. Егорова** // Актуальные проблемы медицины: материалы XI научно-практической конференции 16-17 мая 2008 г. - Абакан: Изд-во ООО «ДиалогСибирь-Абакан», 2008. - С. 8-11.
20. **Егорова, М. В.** Роль фосфолипазы  $A_2$  в активации дыхания изолированных кардиомиоцитов при постинфарктном кардиосклерозе / М.В. Егорова, С.А. Афанасьев, С.В. Попов // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины** (ИФ РИНЦ 0,558). – 2008. – Т. 146. – № 12. – С. 631-634.

21. **Егорова, М. В.** Приспособительные реакции организма крыс при сочетании патологий / М.В. Егорова, С.А. Афанасьев, С.В. Попов // Нейрогуморальные механизмы регуляции висцеральных органов и систем в норме и при патологии: материалы научной конференции с международным участием, посвященной 120-летию кафедры нормальной физиологии СибГМУ (ТМИ) и кафедры физиологии ТГУ - Томск: СибГМУ, 2009. – С.139-147.
22. К вопросу о возможной метаболической составляющей аритмогенной резистентности миокарда при сочетанном развитии постинфарктного ремоделирования сердечной мышцы / С.А. Афанасьев, Д.С. Кондратьева, Т.Ю. Реброва, **М.В. Егорова**, Б.Н. Козлов, С.В. Попов // **Вестник аритмологии.** – 2010. – № 60. – С. 65-69.
23. Сочетание постинфарктного ремоделирования и сахарного диабета усиливает адаптивные реакции организма / **М.В. Егорова**, С.А. Афанасьев, Д.С. Кондратьева, Т.Ю. Реброва // XXI съезд Физиологического общества им. И.П. Павлова. Тезисы докладов. – Москва-Калуга: Типография ООО «БЭСТ-принт», 2010. – С. 202.
24. Проявление адаптивно-приспособительных изменений при сочетанном развитии постинфарктного ремоделирования сердца и сахарного диабета / **М.В. Егорова**, С.А. Афанасьев, С.В. Попов, Р.С. Карпов // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины** (ИФ РИНЦ 0,558). – 2010. – Т. 150. – № 8. – С. 132-135.
25. **Егорова, М. В.** Дыхание митохондрий постинфарктного сердца крыс при окислении различных субстратов / М.В. Егорова, Д.С. Кондратьева, С.А. Афанасьев // **Сибирский медицинский журнал** (г. Томск) (ИФ РИНЦ 0,145). – 2010. – Т. 25. – № 4(1). – С. 116-118.
26. **Егорова, М. В.** Выделение митохондрий из клеток и тканей животных и человека: современные методические приемы / М.В. Егорова, С.А. Афанасьев // **Сибирский медицинский журнал** (г. Томск) (ИФ РИНЦ 0,145). – 2011. – Т. 26. – № 1 (1). – С. 22-28.

27. Possible mechanism of increasing resistance of the myocardium during combination of post infarction remodeling and diabetes mellitus / **M.V. Egorova**, S.A. Afanasiev, D.S. Kondratieva, B.N. Kozlov , S.V. Popov // **Natural Science** (IF 0,61). – 2011. – V. 3. – № 4. – P. 295-300.
28. **Егорова, М. В.** Состояние митохондрий и гипертрофия сердца при развитии стрептозотоцин-индуцированного диабета на фоне экспериментального инфаркта / М.В. Егорова, С.А. Афанасьев // **Сибирский медицинский журнал** (г. Томск) (ИФ РИНЦ 0,145). – 2011. – Т. 26. – № 3 (1). – С. 119-124.
29. Энергетический метаболизм миокарда крыс с постинфарктным кардиосклерозом и сахарным диабетом I типа / Д.С. Кондратьева, **М.В. Егорова**, С.А. Афанасьев // **Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов: материалы пятой Всероссийской научно-практической конференции с международным участием / под ред. проф. В.А. Шурупия.** - Новосибирск, 2011. - С. 100-101.
30. Нарушение энергетического метаболизма миокарда при сердечной недостаточности и сахарном диабете в эксперименте / Д.С. Кондратьева, **М.В. Егорова**, С.А. Афанасьев, С.В. Попов, Р.С. Карпов // **Актуальные проблемы медицины: материалы XII научно-практической конференции / под ред. О.В. Штыгашевой.** - Абакан: Изд-во ГОУ ВПО «Хакасский государственный университет им. Н.Ф. Катанова», 2011. - С. 148-152.
31. Сократительная активность и энергетический метаболизм постинфарктного сердца на фоне диабетического поражения в эксперименте / Д.С. Кондратьева, **М.В. Егорова**, С.А. Афанасьев, Т.Ю. Реброва, С.В. Попов // **Сибирский медицинский журнал** (г. Томск) (ИФ РИНЦ 0,145). – 2011. – Т. 26. – № 2 (1). – С. 136-139.
32. Особенности энергетического метаболизма кардиомиоцитов при постинфарктном кардиосклерозе и сахарном диабете в эксперименте / С.А. Афанасьев, Д.С. Кондратьева, **М.В. Егорова** // **Сахарный диабет, метаболический синдром и сердечно-сосудистые заболевания. Современные**

- подходы к диагностике и лечению: материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Томск, 24-26 октября 2012 г. – Томск: Изд-во «Печатная мануфактура», 2012. – С. 13-15.
33. **Егорова, М. В.** К вопросу о метаболической терапии при патологиях сердца / М.В. Егорова, С.А. Афанасьев // Сахарный диабет, метаболический синдром и сердечно-сосудистые заболевания. Современные подходы к диагностике и лечению: материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Томск, 24-26 октября 2012 г. – Томск: Изд-во «Печатная мануфактура» – 2012. – С. 67-69.
34. **Егорова, М. В.** Кардиопротекторные механизмы с участием жирных кислот / М.В. Егорова // VII Сибирский съезд физиологов. Материалы съезда / под ред. Л.И. Афтанаса, В.А. Труфакина, В.Т. Манчука, И.П. Артюхова. – Красноярск, 2012. – С.168-169.
35. **Егорова, М. В.** Механизмы разобщения дыхания в митохондриях сердца при развитии стрептозотоцин-индуцированного диабета на фоне экспериментального инфаркта / М.В. Егорова, С.А. Афанасьев, С.В. Попов // **Сибирский медицинский журнал** (г. Томск) (ИФ РИНЦ 0,145). – 2012. – Т. 27. – № 1. – С.115-118.
36. **Егорова, М. В.** Регуляторная роль свободных жирных кислот в поддержании мембранного гомеостаза митохондрий сердца при экспериментальной ишемии миокарда / М.В. Егорова, С.А. Афанасьев // **Бюллетень сибирской медицины** (ИФ РИНЦ 0,351). – 2012. – № 3. – С. 31-38.
37. **Егорова, М. В.** Спорные вопросы метаболической терапии при ишемии миокарда / М.В. Егорова, С.А. Афанасьев // Всероссийская конференция «Противоречия современной кардиологии: спорные и нерешенные вопросы», г. Самара, 24-25 ноября 2012 г. - С. 95-96.
38. Сравнительный анализ изменений в структуре миокарда при отдельном и сочетанном постинфарктном и диабетическом поражении сердца / **М.В. Егорова**, Н.В. Крахмаль, С.А. Афанасьев, Ю.В. Роговская, С.В. Попов //

- Фундаментальные исследования** (ИФ РИНЦ 0,322). – 2013. – № 7, вып. 1. – С. 77-82.
39. Изменение гормонального статуса крыс и выраженность стресс-реакции при экспериментальном постинфарктном и диабетическом поражении миокарда / **М.В. Егорова**, Т.Ю. Реброва, С.А. Афанасьев, С.В. Попов // **Фундаментальные исследования** (ИФ РИНЦ 0,322). – 2013. – №7, вып. 1. – С. 83-86.
40. Сравнительное исследование изменений энергетического метаболизма в кардиомиоцитах крыс при постинфарктном кардиосклерозе и сахарном диабете / С.А. Афанасьев, Д.С. Кондратьева, **М.В. Егорова**, С.В. Попов // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины** (ИФ РИНЦ 0,558). – 2013. – Т. 156. – № 8. – С. 149-152.
41. **Егорова, М. В.** Проявление эффекта кросс-адаптации при сочетанном повреждении миокарда / М.В. Егорова, М.А. Медведев // XXII съезд Физиологического общества им. И.П. Павлова: тезисы докладов. – Изд-во ВолГМУ, 2013. – с. 162.
42. Анализ модулирующего влияния арахидоновой кислоты на метаболизм миокарда в норме и при патологии / Е. А. Коровина, **М.В. Егорова** // XXII съезд Физиологического общества им. И.П. Павлова: тезисы докладов. – Изд-во ВолГМУ, 2013. – с. 248.

**Список используемых сокращений**

- АДФ – аденозиндифосфат;  
АК – арахидоновая кислота;  
АКК – ацетил-КоА-карбоксилаза;  
АКС – ацил-КоА-синтетаза;  
АКО – ацил-КоА-оксидаза;  
АКТГ – адренкортикотропный гормон;  
АМФ – аденозинмонофосфат;  
АМФ-ПК – АМФ-активируемая протеинкиназа;  
АНТ – транслоказа адениновых нуклеотидов;  
АТД – атрактилозид;  
АТФ – аденозинтрифосфат  
АТФаза – аденозинтрифосфатаза  
АФК – активные формы кислорода;  
БФБ – бромфенацилбромид;  
ДАГ – диацилглицерол;  
ДК – дыхательный контроль;  
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;  
ЖК – жирные кислоты;  
ИБС – ишемическая болезнь сердца;  
3-КАТ – 3-кетоацил-КоА-тиолаза;  
кАтр – карбоксиатрактилат;  
КМЦ – кардиомиоциты;  
КоА – коэнзим А, связанная форма;  
КоА-SH – коэнзим А, свободная форма;  
КПТ1 – карнитинпальмитоилтрансфераза 1;  
КФ – креатинфосфат;  
ЛДГ – лактатдегидрогеназа;

ЛЖ – левый желудочек;  
ЛПВП – липопротеины высокой плотности;  
ЛПНП – липопротеины низкой плотности;  
ЛПОНП – липопротеины очень низкой плотности;  
МСТ - переносчик монокарбоксильных кислот;  
МКД – малонил-КоА-декарбоксилаза;  
мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота;  
МХ – митохондрии;  
НАДН (NADH) – никотинамидадениндинуклеотид;  
олиго – олигомицин;  
ПГК – программируемая гибель клеток;  
ПДГ – пируватдегидрогеназный комплекс;  
ПК – пальмитиновая кислота;  
ПОД – пероксидаза;  
РНК – рибонуклеиновая кислота;  
СДГ – сукцинатдегидрогеназа;  
СЖК – свободные жирные кислоты;  
СПР – саркоплазматический ретикулум;  
ТГ – триглицериды;  
ФВ – фракция выброса (левого желудочка);  
ФК – функциональный класс;  
ФФ<sub>1</sub> – пирофосфат;  
ФАДН<sub>2</sub> (FADH<sub>2</sub>) – флавинадениндинуклеотид;  
цикло А (CsA) – циклоспорин А (cyclosporin A);  
ЦТК – цикл трикарбоновых кислот;  
ЩФ – щелочная фосфатаза;  
ЭДТА – этилендиаминтетраацетат натрия (трилон Б);  
ЭГТА – этиленгликольтетраацетат;  
ЭТЦ – электрон-транспортная цепь;

CyP-D – cyclophilin D (циклофилин D);

FABPpm; FAT/CD36; FATP 1/6 – белки-транспортеры жирных кислот;

FACS – ацил-КоА-синтаза жирных кислот;

GLUT – glucose transporter, семейство мембранных белков - переносчиков глюкозы;

HIF-1 – hypoxia inducible factor (фактор, индуцируемый гипоксией);

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – перекись водорода;

MPTP – mitochondrial permeability transition pore (митохондриальная пора повышенной проницаемости);

O<sub>2</sub> – молекулярный кислород;

P<sub>i</sub> – inorganic phosphate (неорганический фосфат);

P<sub>i</sub>C – phosphate carrier (переносчик неорганического фосфата);

PPAR (α,β,γ) – члены суперсемейства ядерных лиганд-активированных рецепторов, транскрипционные регуляторы метаболизма липидов;

UCP – uncoupling proteins, митохондриальные разобщающие белки, принадлежащие к семейству анионных переносчиков;

V<sub>3</sub> – скорость дыхания в состоянии 3 при максимальном синтезе АТФ в присутствии АДФ или протонофора;

V<sub>4</sub> – скорость дыхания в состоянии 4 в отсутствие синтеза АТФ или протонофора;

VDAC – voltage dependent anion channel (потенциал зависимый анионный канал, порин);

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов;

Δμ<sub>H</sub><sup>+</sup> – электрохимический потенциал.



## Список иллюстративного материала

### ТАБЛИЦЫ

		стр.
1	Таблица 2.1-1 Обозначения экспериментальных групп и подгрупп, количество животных в группах.....	67
2	Таблица 2.1.1-1 Весовые показатели животных на 40-е сутки после экспериментальной коронароокклюзии миокарда крысы.....	69
3	Таблица 3.1-1 Уровень глюкозы в крови, масса тела и показатели гипертрофии миокарда у животных в экспериментальных группах....	91
4	Таблица 3.1-2 Морфологические показатели миокарда левого желудочка сердца крыс разных экспериментальных групп.....	93
5	Таблица 3.2-1 Изменения скорости поглощения кислорода митохондриями сердца и концентрации свободных жирных кислот в сыворотке крови крыс.....	105
6	Таблица 3.2-2 Сравнение показателей дыхания митохондрий в группах комбинированного воздействия по отношению к показателям в группах отдельных патологий.....	110
7	Таблица 3.2-3 Влияние жирных кислот и модуляторов активности фосфолипазы $A_2$ на скорость поглощения кислорода изолированными кардиомиоцитами.....	118
8	Таблица 3.2-4 Влияние различных метаболических супрессоров на скорость поглощения кислорода митохондриями сердца экспериментальных крыс.....	123
9	Таблица 3.3-1 Содержание свободных жирных кислот и активность лактатдегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы и щелочной фосфатазы в миокарде крыс.....	130
10	Таблица 3.3 – 2 Взаимосвязь показателей дыхания и концентрации жирных кислот в митохондриях: ранговые корреляции Спирмена.....	131

11	Таблица 3.4-1 Показатели стресс-реакции при постинфарктном и диабетическом повреждении миокарда.....	137
----	--	-----

## РИСУНКИ

1	Рисунок 1.4.2-1 Компоненты митохондриальной поры.....	41
2	Рисунок 1.4.2-2 Предполагаемый механизм открытия МРТР.....	43
3	Рисунок 2.1-1 Вариации длительности и сочетаний прямого («инфаркт») и опосредованного («диабет») экспериментальных воздействий: обозначение групп и подгрупп в них.....	66
4	Рисунок 2.1.1-1 Типичный вид интактного сердца крысы и сердца после коронароокклюзии.....	68
5	Рисунок 2.1.1-2 Поперечный срез левого желудочка крысы, через 6 недель после экспериментальной коронароокклюзии.....	68
6	Рисунок 2.1.3-1 Динамика выживаемости крыс в группах комбинированного воздействия.....	70
7	Рисунок 2.2-1 Изолированный кардиомиоцит взрослой крысы в среде хранения с 0,4% трипановым синим.....	73
8	Рисунок 2.2-2 Продольный срез изолированного кардиомиоцита.....	74
9	Рисунок 2.5-1 Схематическое изображение устройства электрода Кларка и термостатируемой ячейки для измерения скорости поглощения кислорода.....	79
10	Рисунок 2.7-1 Принцип работы глюкометра и конструкция тест-полоски.....	83
11	Рисунок 2.9-1 Капилляры в миокарде левого желудочка крысы.....	85
12	Рисунок 3.1-1 Структура миокарда левого желудочка контрольного, постинфарктного и диабетического сердца крысы.....	95
13	Рисунок 3.1-2 Структура миокарда левого желудочка при комбинированном воздействии, в IV и V группах.....	96

14	Рисунок 3.1-3 Структура кардиомиоцитов миокарда крыс в I - IV группах.....	100
15	Рисунок 3.2-1. Влияние арахидоновой кислоты на скорость поглощения кислорода кардиомиоцитами крыс в контроле и при постинфарктном кардиосклерозе.....	114
16	Рисунок 3.2-2. Сопоставление стимулированного мелитином дыхания кардиомиоцитов интактных животных с дыханием кардиомиоцитов при постинфарктном кардиосклерозе.....	115
17	Рисунок 3.2-3 Сводная гистограмма для сопоставления влияния бромфенацилбромида на исходное и стимулированное дыхание кардиомиоцитов.....	116
18	Рисунок 3.2-4 Влияние пальмитиновой и арахидоновой кислот на скорость потребления кислорода изолированными кардиомиоцитами животных разных экспериментальных групп в условиях высокой и низкой концентрации кислорода в среде инкубации.....	120
19	Рисунок 3.3-1 Визуальное сопоставление активности сукцинатдегидрогеназы, щелочной фосфатазы и плотности капилляров в миокарде экспериментальных крыс.....	134
20	Рисунок 3.3-2 Стимуляция свободными жирными кислотами адаптивных процессов в кардиомиоцитах.....	145
21	Рисунок 3.3-3 Стимуляция свободными жирными кислотами внеклеточных механизмов адаптации на системном уровне.....	148

## БЛАГОДАРНОСТИ

За все время выполнения настоящего исследования, автор ощущал моральную поддержку множества окружающих его людей: это коллеги по работе, студенты, родственники, друзья. Удивительно благожелательная атмосфера сохранялась на протяжении всего времени выполнения этой работы.

В первую очередь, глубокая благодарность за моральную поддержку и веру в успех, добрые человеческие отношения, поддержку в тяжелых жизненных ситуациях, моему дорогому начальнику и научному консультанту, заведующему кафедрой нормальной физиологии, доктору медицинских наук, профессору, академику РАМН, заслуженному деятелю науки РФ Михаилу Андреевичу Медведеву.

Моя глубочайшая признательность еще одному замечательному человеку, без помощи которого, материальной и моральной поддержки, добрых советов, вдумчивого отношения, эта работа не состоялась бы, - заведующему лабораторией молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики НИИ кардиологии, доктору медицинских наук, профессору Сергею Александровичу Афанасьеву.

Огромная благодарность дорогому мне человеку, декану педиатрического факультета СибГМУ, Василию Борисовичу Студницкому, за его дружескую поддержку, внимание, требовательность, надежду и веру в автора, как научного исследователя.

Искренняя любовь и признательность всем моим коллегам по кафедре, за теплое, дружеское отношение, готовность помочь, выслушать и ободрить, за чувство юмора, за атмосферу сплоченности и поддержки.

Особая благодарность моим коллегам и соавторам, научным сотрудникам НИИ кардиологии СО РАМН, Дине Степановне Кондратьевой и Татьяне Юрьевне Ребровой, оказавшим неоценимую помощь в выполнении данной работы, и с которыми так приятно работать и общаться.

С искренней признательностью благодарю за постоянную готовность проконсультировать, выслушать и помочь, коллегу и подругу, доцента кафедры эндокринологии и диабетологии СибГМУ Татьяну Владимировну Сапину.

За терпение, любовь и поддержку благодарю своих близких и родных, в первую очередь, своего дорогого и любимого отца, Владимира Николаевича Егорова, и свою милую доченьку, Софию Александровну Егорову. Софии отдельная благодарность за помощь в обработке и оформлении рисунков к диссертации.

Моя нежная любовь и благодарность моему ангелу-хранителю, маме, Инне Христиановне Егоровой. Эта работа посвящена ее светлой памяти.

В заключение, хочется высказать свою благодарность еще многим коллегам, чьи добрые слова, поступки или отношение, так или иначе, помогли мне в выполнении работы:

Байкову Александру Николаевичу, Брустовецкому Николаю Нисоновичу, Васильеву Владимиру Николаевичу, Ковалеву Игорю Викторовичу, Легоминовой Татьяне Георгиевне, Логвинову Сергею Валентиновичу, Мильто Ивану Васильевичу, Новицкому Вячеславу Викторовичу, Огородовой Людмиле Михайловне, Петровой Ирине Викторовне, Поляковой Ирине Петровне, Рязанцевой Наталье Владимировне, Суходоло Ирине Владимировне, Хлусовой Марине Юрьевне и многим другим;

- отдельная благодарность моим помощникам-труженикам, Елизавете Сергеевне Алексеевской и Татьяне Викторовне Андреевой (Куцыковой), студенткам, ныне обучающимся в аспирантуре.

- и, конечно же, большая благодарность моим многоуважаемым рецензентам и оппонентам, взявшим на себя нелегкий труд изучения и оценки настоящей работы.