РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ТОМСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ КАРДИОЛОГИИ

На правах рукописи

Реброва
Татьяна Юрьевна

ВКЛАД μ- И δ-ОПИАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В РЕГУЛЯЦИЮ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В УСЛОВИЯХ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ СЕРДЦА

14.00.16 - патологическая физиология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
член-корреспондент РАМН,
профессор
Ю.Б. Лишманов
Научный консультант:
доктор медицинских наук

Л.Н. Маслов

Томск - 2001

Оглавление

Стр

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 5

ВВЕДЕНИЕ 7

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 15

1.1. Патогенетическая роль свободных радикалов при повреждениях сердца 15

1.2. Антиоксидантные механизмы защиты миокарда при свободнорадикальных повреждениях . . 24

1.3. Эндогенная опиоидная система и устойчивость миокарда к действию повреждающих факторов . . . . . 30 . . . . . .

1.4. Опиатергическая регуляция свободнорадикальных процессов . . . . . 38 . . . . . .

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ . . . 43

2.1. Препараты и животные 43

2.2. Экспериментальные модели 47

2.2.1. Перфузия изолированного миокарда по Лангендорфу . . . . . 47 . .

2.2.2. Моделирование свободнорадикального повреждения сердца 51

.
2.3. Биохимические методы исследования 51
2.3.1. Оценка интенсивности процессов перекисного окисления липидов и активности антиокислительных ферментов 51
. .
2.3.2. Определение активности креатинфосфокиназы 54
. . . . . .
2.4. Радиоиммунное определение содержания простагландинов в экстрактах ткани 56
миокарда .

2.4.4. Статистическая обработка результатов 57

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ 58

3.1. Вклад опиатных рецепторов в обеспечение устойчивости сердца к свободнорадикальному повреждению 58

3.1.1. Влияние смешанного агониста μ- и δ-опиатных рецепторов – даларгина - на резистентность миокарда к повреждающему действию окислительного стресса 60

3.1.2. Изменения инотропной функции изолированного миокарда в условиях индукции свободнорадикальных процессов на фоне предварительной стимуляции μ- и δ-опиатных рецепторов 66

3.2. Участие μ-опиатных рецепторов в реализации кардиопротекторного эффекта опиоидов . . 73

3.2.1. Влияние системного введения лигандов μ-опиатных рецепторов на процессы липопероксидации и активность антиокислительных ферментов в миокарде при активации свободнорадикальных процессов 73

3.2.2. Изменение сократимости изолированного миокарда при окислительном стрессе, индуцированном на фоне in vivo-стимуляции μ-опиатных рецепторов 79

3.3. Стимуляция δ-опиатных рецепторов как способ повышения устойчивости изолированного сердца к повреждающему действию активных форм кислорода 87

3.3.1. Процессы перекисного окисления липидов и антиокислительная защита миокарда при свободнорадикальном повреждении изолированного сердца на фоне системного введения лигандов δ-опиатных рецепторов . . 87

3.3.2. Влияние внутривенного введения лигандов δ-опиатных рецепторов на показатели сократительной функции миокарда при окислительном стрессе 94

3.3.3. Роль кардиальных рецепторов в реализации протекторного эффекта δ-лигандов 102

3.3.4. Влияние in vitro-стимуляции δ-опиатных рецепторов на сократительную активность изолированного миокарда при окислительном стрессе 110

3.4. Возможные внутриклеточные механизмы, опосредующие регуляторные влияния лигандов δ-опиатных рецепторов на активность антиокислительных ферментов 123

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 134

ВЫВОДЫ 145

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 147

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АКМ - активные кислородные метаболиты

АКТГ - адренокортикотропный гормон

АТФ - аденозинтрифосфорная кислота

ГК - гексокиназа

ГФДГ - глюкозо- 6-фосфат-дегидрогеназа

ДК - диеновые конъюгаты

ДРЛЖ - давление, развиваемое левым желудочком

КДД - конечное диастолическое давление

КФ - креатинфосфат

КФК - креатинфосфокиназа

$K^{+}_{АТР}$-каналы - АТФ-зависимые калиевые каналы

ЛДГ - лактатдегидрогеназа

МДА - малоновый диальдегид

МСС - максимальная скорость сокращения

МСР - максимальная скорость расслабления

НАДФН – восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотид фосфата

НАД+ -окисленная форма никотинамидадениндинуклеотида

НАДН –восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотида

H_2O_2 – перекись водорода

$O^{\bullet-}_2$ - супероксиданионрадикал

ОП - опиоидные пептиды

ОР - опиатные рецепторы

ПГ - простагландины

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты

ПЦ – простациклин

Ca^{2+} - ионы кальция

$[Ca^{2+}]i$ - внутриклеточные ионы кальция

СОД – супероксиддисмутаза

СПР – саркоплазматический ретикулум

ТБК - тиобарбитуровая кислота

$ТхА_2$ - тромбоксан $А_2$

ЧСС – частота сердечных сокращений

цАМФ - циклический аденозинмонофосфат

цГМФ - циклический гуанозинмонофосфат

NADH - восстановленная форма никотинамиддинуклеотида

NO – оксид азота

SH-группы - сульфгидрильные группы

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы.

Заболевания сердечно-сосудистой системы остаются одной из главных причин общей смертности в развитых странах [234]. В настоящее время накоплены доказательства того, что важным патогенетическим фактором развития многих заболеваний сердца и сосудов является гиперпродукция свободных радикалов, например, супероксида и гидропероксида, а также индукция свободнорадикальных процессов в липидных структурах клетки [117, 155, 180, 200, 205, 227, 230]. Общеизвестным является и тот факт, что тромболитическая терапия острого инфаркта миокарда и такие кардиохирургические вмешательства как аортокоронарное шунтирование и трансплантация сердца, в процессе которых миокард подвергается ишемии-реперфузии, неизбежно ведут к активации свободнорадикальных процессов в сердечной мышце [6, 12, 28, 52, 90]. Интенсивное образование оксирадикалов

может сопровождаться повреждением мембран и ядерных структур клеток, что, в свою очередь, может служить патогенетическим фактором развития сердечно-сосудистых заболеваний [21, 32, 148]. Кроме того, в литературе приводятся данные о наличии обратной корреляции между содержанием антиоксидантов в плазме крови и риском развития сердечно-сосудистой патологии [21, 146, 147]. Установлено, что предварительное введение фармакологических агентов, обладающих антирадикальной активностью, способствует повышению резистентности миокарда к патогенному действию реоксигенации [4, 6, 15, 51, 59, 104]. Многочисленные экспериментальные и клинические наблюдения свидетельствуют о снижении активности основных ферментативных антиоксидантов в результате ишемии сердца [11, 48, 161, 165, 198, 205]. Эти факты позволили исследователям предположить, что защищать миокард от воздействия окислительного стресса можно не только с помощью соединений, обладающих прямой антирадикальной активностью, но и с помощью ферментов, способных нейтрализовать активные формы кислорода.

Так, в настоящее время установлено, что внутривенное введение антиокислительного фермента – супероксиддисмутазы (СОД) способствует повышению устойчивости миокарда к ишемии-реперфузии [213, 236]. Эффективность терапевтического действия СОД увеличивается при ее совместном введении с каталазой [170, 177].

Однако, по данным литературы, применение известных ингибиторов перекисного окисления не всегда оказывает выраженное кардиопротекторное действие [103, 113, 139, 211, 229]. Это связано с тем, что неферментативные антиоксиданты, будучи активными донорами электронов, в процессе нейтрализации радикалов жирных кислот и кислорода могут сами трансформироваться в свободные радикалы

прооксидантного типа [18, 193, 214, 215, 245], а защитный эффект экзогенных СОД и каталазы ограничен низкой проницаемостью сарколеммы кардиомиоцитов для этих энзимов [34, 170, 177].

Таким образом, актуальность поиска новых кардиотропных препаратов, способных эффективно защищать миокард от свободнорадикального повреждения при минимальных побочных эффектах, не вызывает сомнения. Логично предположить, что достичь повышения резистентности миокарда к повреждающему действию активных форм кислорода можно путем активации ферментов антиоксидантной защиты клетки. В этом случае исчезнет проблема трансмембранного переноса экзогенных энзимов, неизбежно возникающая при их использовании. Однако при этом остается открытым вопрос о том, с помощью каких фармакологических воздействий можно добиться повышения активности ферментов, нейтрализующих активные формы кислорода.

Анализ данных, полученных в нашей лаборатории, позволяет сделать предположение о том, что одним из подходов к решению указанной проблемы может явиться использование опиоидных пептидов, способных модулировать процессы пероксидации липидов [68, 69, 70, 93, 94]. Так, показано, что введение агонистов опиатных рецепторов способствует повышению резистентности сердца к различным повреждающим воздействиям [68, 69, 70, 93, 94], в патогенезе которых важную роль играет активация свободнорадикальных реакций. В частности установлено, что стимуляция опиатных рецепторов, предшествующая кратковременной коронарооккклюзии и реперфузии, обеспечивает ограничение размеров зоны некроза [143, 223], а также эффективно предупреждает реперфузионное повреждение изолированного сердца [69, 94]. Предварительное использование опиоидов повышает толерантность миокарда к

влиянию интенсивной стресс-реакции [69, 66, 71, 78, 93], важным компонентом патогенеза которой является активация свободнорадикальных процессов в липидных структурах клеток [71, 81]. Сопоставляя эти факты можно предположить, что опиоидные пептиды могут повышать активность антиокислительных ферментов и, тем самым, позитивно влиять на устойчивость сердца к неблагоприятным факторам, в генезе которых важную роль играет окислительный стресс.

Цель работы: исследовать вклад μ- и δ-опиатных рецепторов в регуляцию процессов перекисного окисления липидов и обеспечение устойчивости миокарда к свободнорадикальному повреждению.

ЗАДАЧИ:

1. Исследовать возможность опиатергической коррекции повреждений сарколеммы кардиомиоцитов и нарушений сократимости изолированного перфузируемого сердца, вызванных окислительным стрессом.
2. Оценить влияние сочетанной стимуляции периферических μ- и δ-опиатных рецепторов на уровень накопления продуктов перекисного окисления липидов и активность супероксиддисмутазы и каталазы в миокарде при моделировании его свободнорадикального повреждения.
3. Изучить участие простаноидов в реализации кардиопротекторного эффекта активации μ- и δ-опиатных рецепторов в условиях стимуляции липоперекисных процессов.
4. Исследовать вклад μ-рецепторов в регуляцию резистентности сарколеммы кардиомиоцитов, уровня малонового диальдегида, диеновых конъюгатов, активности каталазы и супероксиддисмутазы, а также сократимости миокарда при окислительном стрессе.
5. Изучить эффекты in vivo- и in vitro-стимуляции δ-

опиатных рецепторов на устойчивость кардиомиоцитов, динамику накопления липоперекисей, активность антиокислительных ферментов и контрактильность миокарда в условиях стимуляции перекисного окисления липидов.

6. Выяснить роль NO-синтазы в реализации кардиопротекторного эффекта, обусловленного селективной активацией δ-опиатных рецепторов в условиях интенсификации свободнорадикальных процессов.
7. Оценить участие эндогенных опиоидов в процессах обеспечения резистентности миокарда к действию окислительного стресса.

Научная новизна и практическая значимость.

В работе предложены новые принципы предупреждения свободнорадикальных повреждений изолированного сердца, связанные с воздействием на опиатные рецепторы. В процессе исследования было впервые установлено, что предварительная in vivo-стимуляция периферических δ-опиатных рецепторов, в значительной степени, повышает устойчивость миокарда к повреждающему действию активных форм кислорода. Принципиально новым является выдвинутое в работе положение о том, что данный кардиопротекторный эффект δ-агонистов связан с повышением активности супероксиддисмутазы и угнетением процессов пероксидации липидов в ткани миокарда. Показано, что активация δ-рецепторов, расположенных на мембранах кардиомиоцитов, не влияет на резистентность сердца к окислительному стрессу. Установлено, что стимуляция опиатных рецепторов в условиях интенсивного образования продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) обеспечивает увеличение индекса “простациклин/тромбоксан”.

Впервые получены данные о том, что активация μ-рецепторов не защищает миокард от патогенного действия свободных радикалов.

Настоящая работа вносит вклад в развитие фундаментальных представлений о роли опиоидной системы в механизмах повышения толерантности кардиомиоцитов к свободнорадикальному повреждению.

Основные положения работы могут быть использованы в качестве теоретической основы для прикладных исследований, направленных на создание принципиально новых фармакологических препаратов, способных активировать ферментативные системы антиоксидантной защиты сердца.

По результатам выполненных исследований получен патент № 2163817 на использование опиоидного пептида в качестве препарата, обладающего кардиопротекторной активностью.

Работа выполнена в соответствии с темой № 095 "Роль мю- и дельта-опиатных рецепторов в патогенезе реперфузионного нарушения ритма и сократимости изолированного сердца" (№ Госрегистрации 01.9.90 001639) основного плана научных исследований НИИ кардиологии ТНЦ СО РАМН.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Предварительная in vivo-активация δ-опиатных рецепторов способствует повышению резистентности кардиомиоцитов к действию свободных радикалов. В реализации данного кардиопротекторного эффекта важную роль играют NO-синтаза, супероксиддисмутаза и угнетение процессов пероксидации липидов.

2. Стимуляция μ-рецепторов снижает устойчивость сердца к патогенному действию активных форм кислорода.

3. Эндогенные агонисты μ- и δ- рецепторов не играют существенной роли в регуляции толерантности миокарда к окислительному стрессу.

Апробация диссертации.

Материалы диссертации обсуждались на конференции НИИ кардиологии ТНЦ СО РАМН "Актуальные проблемы кардиологии" (Томск, 9-10 сентября 1997 г.); второй ежегодной научной сессии Кемеровского кардиологического центра СО РАМН "Актуальные проблемы кардиологии и сердечно-сосудистой хирургии" (Кемерово, 16 октября 1998 г.); межрегиональной научной конференции Сибири и Дальнего Востока, посвященной 150-летию со дня рождения академика И.П. Павлова. (Томск, 25 - 26 ноября 1999 г.); региональной научной конференции "Актуальные проблемы кардиологии", посвященной 20-летию НИИ кардиологии ТНЦ СО РАМН (Томск, 14-15 сентября 2000 г.); региональной научной конференции "Актуальные проблемы кардиологии" (Тюмень, 22-23 ноября 2000 г.)

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 13 печатных работ, из них 6 статей в центральных журналах, 8 публикаций - в материалах региональных конференций.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 179 страницах машинописного текста и состоит из введения, трех глав, заключения, выводов и списка литературы, включающего 251 источник, из которых 114 отечественных и 137 иностранных. Диссертация иллюстрирована 8 таблицами и 25 рисунками.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1.Патогенетическая роль свободных радикалов при повреждениях сердца

В настоящее время сердечно-сосудистые заболевания являются основной причиной смертности трудоспособного населения в развитых и развивающихся странах [234]. В многочисленных экспериментальных и клинических исследованиях показан вклад процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в патогенез инфаркта миокарда [14, 20, 48, 83, 88, 135, 161], атеросклероза [18, 45, 99, 230], ишемической болезни сердца (ИБС) [1, 8, 44, 148, 150], стенокардии [47, 97]. Как известно, ПОЛ протекает по механизму свободнорадикальных цепных реакций, в результате которых образуются активные кислородные метаболиты (АКМ), радикалы жирных кислот и их перекисей [11, 18]. Повышение тканевого уровня реактивных оксирадикалов в процессе развития патологических процессов или в результате воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды на организм характеризуется как состояние оксидативного (или окислительного) стресса [34]. Активные формы кислорода, благодаря своей высокой химической реактивности, способны вызывать свободнорадикальную оксидацию и повреждение мембранных липидов [18, 34], ядерных нуклеиновых кислот [167], мембраносвязанных и цитозольных белков, выполняющих в клетке многочисленные функции: сохранение ионного гомеостаза внутриклеточной среды, синтез белков, жиров, углеводов, макроэргов; обеспечение сократительной активности кардиомиоцитов и т.д. [74, 179, 231, 246]. Избыточное образование активных форм кислорода приводит к нарушению функции отдельных клеток, а затем уже и органа в целом.

В настоящее время установлено, что перекисное окисление липидов является одним из наиболее сильных модификаторов

липидов биологических мембран [11, 18, 97 113]. Так, активация ПОЛ способствует увеличению проницаемости клеточных мембран для различных ионов, следствием чего может явиться нарушение ионного гомеостаза внутриклеточной среды [242]. Эффект потери клеточными мембранами барьерных свойств может быть обусловлен ионофороподобным действием продуктов ПОЛ или снижением мембранного потенциала клетки [18]. Активация процессов ПОЛ в митохондриальных мембранах сопровождается нарушением синтеза макроэргов [156, 185, 212], вследствие чего снижается интенсивность энергозависимой аккумуляции Ca^{2+} в саркоплазматическом ретикулуме (СПР) и увеличивается концентрация кальция в цитоплазме [18]. В СПР наблюдается три основных эффекта перекисного окисления липидов [107]: (1) увеличение пассивной утечки Ca^{2+}, (2) выраженное уменьшение скорости активного накопления Ca^{2+}, (3) умеренное изменение активности АТФаз. Нарушение процессов элиминации Ca^{2+} из саркоплазмы и его транспорта в СПР способствует возникновению Ca^{2+}-перегрузки кардиомиоцитов [179, 231]. Перегрузка кардиомиоцитов ионами кальция, как известно, вызывает нарушение насосной функции миокарда [96], а также обеспечивает активацию Ca^{2+}-зависимой фосфолипазы A_2 и, как следствие, повреждение сарколеммы клеток миокарда [11]. Активация Ca^{2+}-зависимых протеаз может способствовать разрушению сарколеммального аппарата кардиомиоцитов, в частности, тропонина миофибрилл, вставочных дисков, связывающих кардиомиоциты между собой [133]. Возникающая в результате перегрузки Ca^{2+} кардиомиоцитов контрактура может сопровождаться разрывом вставочных дисков и сарколеммы, то есть стать причиной механического нарушения клеток миокарда и миокардиального синцития в целом [81].

Нарушение целостности сарколеммы и изменение функциональной активности СПР кардиомиоцитов приводит к

дополнительному поступлению Ca^{2+} в цитоплазму, в результате замыкается круг патологических реакций, приводящих к нарушениям липидного бислоя мембран.

Важную роль в активации свободнорадикальных реакций в липидных структурах клеток играет наличие следующих факторов:

1. Наличие субстратов окисления, для процессов ПОЛ таковыми служат полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК).

2. Присутствие в органах и тканях молекулярного кислорода, необходимого для образования его активных форм на стадии инициации свободных радикалов. В настоящее время имеется достаточное количество данных, согласно которым свободнорадикальные реакции могут протекать при очень низких значениях pO_2 в тканях. Так установлено, что в системе при концентрации O_2, равной всего 10^{-6} М, все липидные радикалы превращаются в перекисные, а скорость свободнорадикальной реакции не зависит от концентрации O_2 и практически не меняется вплоть до полного исчезновения O_2 из системы [11, 19].

В литературе рассматривается ряд систем, играющих важную роль в генерировании активных форм кислорода как в физиологических, так и в патологических условиях. Так $O^{\bullet}_{-}$ может образовываться в незначительных количествах в физиологических условиях в результате “утечки” электронов в дыхательной цепи митохондрий, а скорость его образования находится в прямой зависимости от степени сопряженности дыхательной цепи и резко возрастает при блокаде дыхательной цепи [56]. Увеличение скорости образования $O^{\bullet}_{-}$ по такому пути возможно как в результате применения специфических блокаторов дыхательной цепи, так и при ишемии органа [11, 61].

Образование активных форм кислорода отмечено также в электронно-транспортной цепи микросом в НАДФН-цитохром P_{450}-

зависимой системе гидроксилирования ксенобиотиков [3, 89]. НАДФН-цитохром P_{450}-зависимая система гидроксилирования ксенобиотиков содержится главным образом в эндоплазматическом ретикулуме печени, однако аналогичные системы имеются и в других органах, за исключением саркоплазматического ретикулума миокарда и скелетных мышц [57].

Возможно образование активных форм кислорода, в частности $O^{\bullet}_{2}$, в процессе метаболизма пуринов и пиримидинов по ксантиноксидазному пути [114]. Представление об участии системы гипоксантин-ксантиноксидаза в образовании активных форм кислорода в процессе ишемии органов базируется, по крайней мере, на основании двух наблюдений, касающихся, во-первых, конверсии ксантиндегидрогеназы в ксантиноксидазу в зоне ишемии и, во-вторых, повышения уровня субстратов реакции в ишемизированном органе [11, 18].

Кроме этого, образование активных кислородных форм происходит при синтезе простагландина-Н из простагландина-G_2 на начальных этапах метаболизма арахидоновой кислоты. Наконец, циклооксигеназа и липоксигеназа являются ферментами образующими гидроперекиси и МДА, т.е. сами могут приводить к индукции ферментативного ПОЛ [11].

Образующиеся АКМ быстро реагируют с жирными кислотами мембранных фосфолипидов и ПНЖК с образованием первичных продуктов ПОЛ – гидроперекисей липидов [19, 48]. Дальнейшее протекание процессов ПОЛ предполагает наличие восстановленных комплексов металлов переменной валентности [18]. При участи этих комплексов за счет радикального распада гидроперекисей липидов возникают радикалы перекисей жирных кислот, способные атаковать непредельные липиды мембран. Этот процесс способствует дальнейшей активации реакций свободнорадикального окисления липидов. При выраженной активации ПОЛ, когда окислительной деградации

подвергается значительное количество мембранных фосфолипидов, изменения в липидном микроокружении интегральных белков ограничивают конформационную подвижность полипептидной цепи, необходимую для нормального функционирования ферментов, рецепторов [9] и каналообразующих белков [49].

3. Для инициации и протекания реакций свободнорадикального окисления в биологических системах необходимо присутствие как кислородных радикалов, так и ионов металлов переменной валентности, наиболее распространенным представителем которых в организме является железо, присутствующее в составе гемоглобина, ферритина и трансферрина [18].

Вклад эффектов, возникающих при действии свободных радикалов на липидный бислой мембраны, в патогенез заболеваний человека можно представить в виде единой схемы (рис. 1).

Важным объектом воздействия свободных радикалов в клетках, в том числе и в кардиомиоцитах, являются белки. Окислительное действие АКМ приводит к трем вариантам изменения физико-химических свойств белков: фрагментации, агрегации и подверженности протеолизу [246]. В результате усиления процессов свободнорадикального окисления происходит изменение свойств таких мембранных белков, как транспортные Ca^{2+}-АТФаза [179, 231] и K^{+}/Na^{+}-АТФаза [108] , цитохромы b_5, с, P_{450} [19, 74]. В основе указанного модифицирующего воздействия может также лежать обеднение микроокружения белков полиеновыми фосфолипидами, образование межмолекулярных сшивок за счет взаимодействия со вторичными продуктами ПОЛ, окисление сульфгидрильных групп (SH-групп) аминокислотных остатков [106]. Критическим элементом кардиомиоцитов, содержащим SH-группы и подверженным токсическому дей-

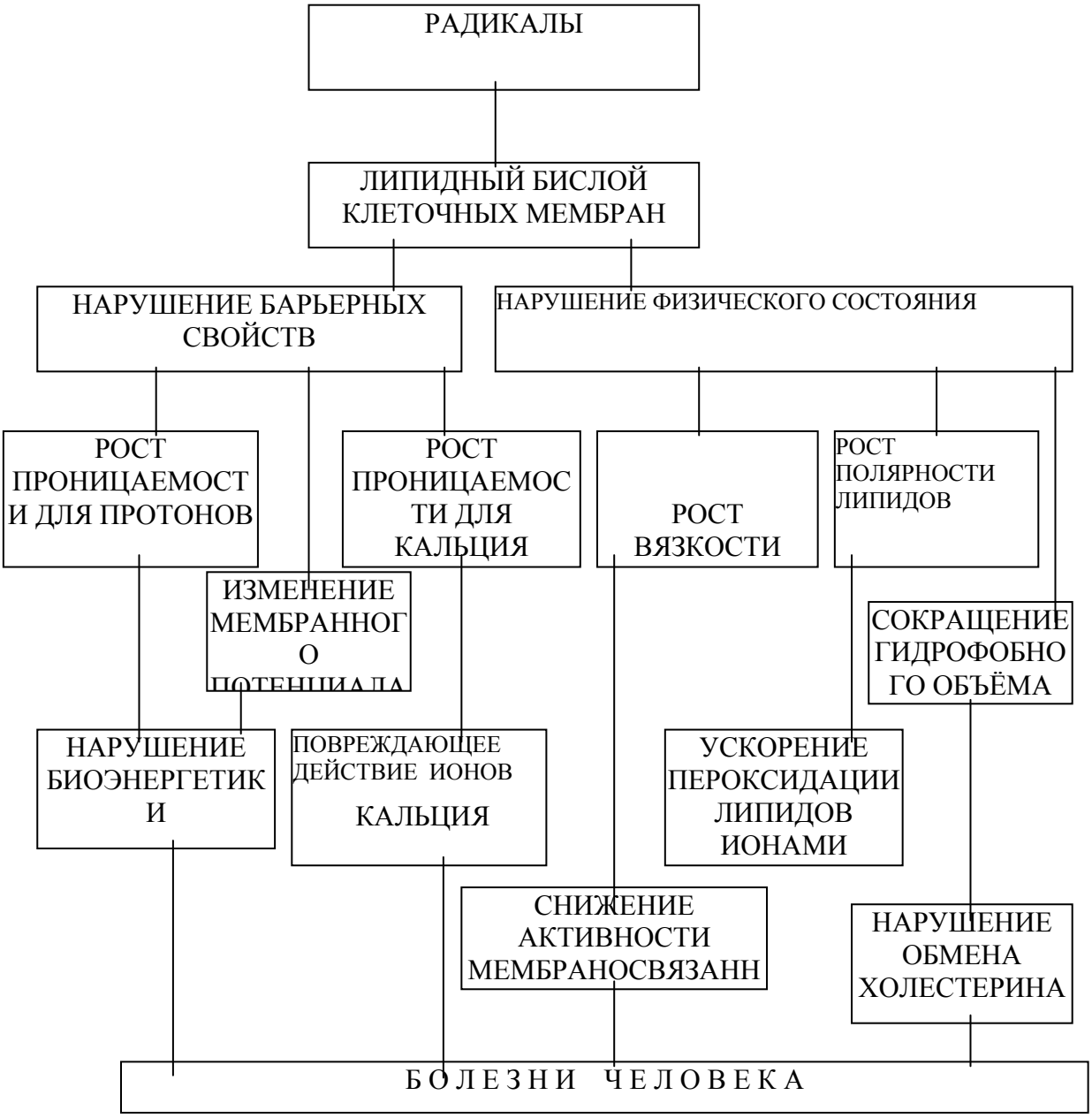


Рис.1. Вклад эффектов, возникающих при действии свободных радикалов на липидный бислой мембраны, в патогенез заболеваний человека. Цитировано по Владимирову Ю.А. [18]

ствию АКМ, является Ca^{2+}-АТФаза [179, 231]. Повреждение этой ионной помпы приводит к нарушению транспорта ионов Ca^{2+} через мембрану, увеличению концентрации $[Ca^{2+}]i$, что

сопровождается проявлениями повреждающих эффектов избытка Ca^{2+}, о которых говорилось выше.

Интенсификация свободнорадикальных процессов приводит к снижению активности ферментативных антиоксидантов. Так, показано, что ишемия сопровождается снижением активности супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы, что ограничивает способность клеток метаболизировать активные формы кислорода [11, 34] и контролировать интенсивность протекания свободнорадикальных реакций. Причиной такого снижения ферментативной активности может быть как нарушение энергетического обеспечения и снижение вследствие этого синтеза ферментов de novo, так и прямое повреждение активного центра ферментов избытком свободных радикалов [25, 30, 58]. Одновременно с инактивацией ферментативного звена антиоксидантной системы отмечается снижение общей антиокислительной активности [11], что свидетельствует в пользу истощения запасов неферментативных антиоксидантов в очаге повреждения. Такое снижение антиоксидантной защиты клетки способно потенциировать повреждающее действие свободнорадикальных процессов.

Из всего вышесказанного следует, что повреждающее действие свободнорадикальных процессов ведет к увеличению проницаемости липидного бислоя мембраны, нарушению функционирования белков (мембраносвязанных АТФаз, цитохромов, рецепторного аппарата клетки и цитозольных ферментов), что приводит, в конечном итоге, к грубому нарушению структуры и функций клеточных органелл и гибели клетки.

1.2. Антиоксидантные механизмы защиты миокарда при свободнорадикальных повреждениях

Основными факторами, контролирующими интенсивность образования и формирование патологических эффектов активных форм кислорода и реактивных гидроперекисей липидов в тканях, являются антиоксиданты. Система антиоксидантов представлена в организме ферментативными и неферментативными антиоксидантами.

К числу неферментативных антиоксидантов относят: аскорбиновую кислоту, токоферолы, каротиноиды, ретинол, цистеин, мочевую кислоту, растительные флавоноиды, ненасыщенные жирные кислоты и др. [14, 41, 86]. В основе механизма действия неферментативных антиоксидантов лежит их способность легко отдавать электрон свободным радикалам, превращая их, тем самым, в химически инертные соединения. Однако неферментативные антиоксиданты выполняют в организме лишь буферную функцию по отношению к свободнорадикальным метаболитам, так как будучи активными донорами электронов они при нейтрализации радикалов жирных кислот и кислорода сами трансформируются в свободные радикалы прооксидантного типа - аскорбил, токоферил, ретинил и др., правда с намного меньшей радикальной активностью по сравнению с АКМ и перекисными радикалами жирных кислот [18, 193, 214, 215,

245]. За счет указанного феномена неферментативные антиоксиданты создают временной лаг-период, позволяющий организму активировать синтез основных "тушителей" оксирадикалов - антиоксидантных ферментов [240].

Важно отметить и то, что при переходе в свободнорадикальную форму неферментативные антиоксиданты способны восстанавливать и, как следствие, высвобождать ионы металлов с переменной валентностью (Fe^{3+}, Cu^{2+} Zn^{+}, Mn^{3+} и др.) из трансферрина, ферритина, церулоплазмина и металл-содержащих энзимов, которые благодаря своим электроннодонорным свойствам могут поддерживать и даже отягощать свободнорадикальное окисление липидов [140, 151, 159, 203, 214]. Помимо сказанного выше, недостатком большинства неферментативных антиоксидантов является их адаптивная инертность, обусловленная ограниченным депонированием в организме и большой зависимостью от поступления с пищевыми продуктами, что имеет неблагоприятное прогностическое значение в условиях длительного воздействия на организм оксидативных стресс-факторов [154].

С этой позиции принципиально важным преимуществом ферментативных антиоксидантов является возможность их синтеза в организме [171, 184, 186, 209]. При этом индукторами синтеза энзимов, реализующими свой эффект на генетическом уровне, могут выступать соответствующие активные формы кислорода [100, 233]. Преимуществом ферментативной инактивации активных форм кислорода является и меньшая токсичность продуктов нейтрализации. Следует отметить, что молекулы антиокислительных ферментов многократно участвуют в реакции нейтрализации активных форм кислорода или гидроперекисей липидов, поскольку их функционирование происходит циклически с восстановлением активности фермента.

Система ферментов, ответственных за удаление активных форм кислорода и стабильных радикалов, а также разложение перекисей липидов нерадикальным путем представлена в клетке четырьмя основными энзимами: супероксиддисмутаза (СОД, КФ 1.15.1.1.), каталаза (КФ 1.11.1.6), глутатионпероксидаза (КФ 1.11.1.9) и глутатионредуктаза (КФ 1.6.4.2.). Последовательное взаимодействие между собой двух координированных энзимов - СОД и каталаза - ингибирует образование гидроксильных радикалов, тем самым регулируя ПОЛ на стадии инициации цепи, когда идет взаимодействие активных форм кислорода с ненасыщенными жирными кислотами. Заключительные этапы процесса ПОЛ находятся под контролем глутатионзависимых ферментов - глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы. Глутатионпероксидаза востанавливает гидроперекиси и перекиси ненасыщенных жирных кислот в оксидопроизводные с окислением восстановленного глутатиона, а глутатионредуктаза катализирует восстановление окисленного глутатиона за счет окисления НАДФН. Помимо гидроперекисей липидов глутатионпероксидаза может разлагать H_2O_2, и обладает к ней более высоким сродством по сравнению с каталазой, поэтому первая работает при низких концентрациях перекиси водорода, а каталаза играет ведущую роль в защите клеток от окислительного стресса, вызванного высокими концентрациями H_2O_2 [138, 224].

Супероксиддисмутаза является единственным среди известных антиоксидантных ферментов, непосредственно обеспечивающим обрыв цепей кислород-зависимых свободнорадикальных реакций в клетках аэробных организмов. Она осуществляет рекомбинацию радикалов $O_2^{\bullet-}$ с образованием H_2O_2 и триплетного кислорода [101]. Супероксиддисмутаза, представлена в живых организмах несколькими изоферментными формами, отличающимися строением активного центра [34]. Изоэнзим, содержащий медь и цинк (Cu, Zn-СОД) чувствителен

к цианиду и локализован в ядрах, цитоплазме, пероксисомах, межмембранном пространстве митохондрий [174, 176]. Цианидрезистентная марганцевая изоформа (Mn-СОД) локализована в митохондриях [101, 244]. Основным изоэнзимом плазмы, лимфы и синовиальной жидкости является экстрацеллюлярная высокомолекулярная форма СОД [188]. Таким образом, наличие нескольких изоферментных форм СОД, а также широкий диапазон действая pH фермента - от 4,8 до 10 [34] - свидетельствуют о ее важной биологической роли в живых организмах.

Регуляция активности СОД осуществляется всей многокомпонентной редокс-системой клетки. Интермедиаты окислительно-восстановительного метаболизма, являясь генераторами $O_2^{\bullet-}$, могут выполнять триггерную роль: индуцировать синтез фермента при увеличении концентрации доноров электронов [100]. Снижение активности СОД может быть обусловлено увеличением как концентрации H_2O_2 [163], так и токсических продуктов пероксидации липидов (перекисей жирных кислот, альдегидов, кетонов), которые способствуют подавлению активности СОД и других антиокислительных ферментов [30, 58, 126]. Следовательно, активность СОД находится в прямой зависимости от интенсивности процессов ПОЛ, а снижение ее активности, в свою очередь, способствует увеличению содержания перекисей липидов.

Регулирующее действие на активность СОД оказывают глутатион, цистеин и другие SH-содержащие соединения [101]. Так, значительное увеличение активности Cu,Zn-СОД в печени крыс обнаружено в опытах in vitro при введении глутатиона, цистеина и других сульфгидрильных соединений [162]. Активация СОД в данном случае связывается авторами с восстановлением Cu^{2+} в активном центре фермента SH-соединениями, вызывающими ускорение окислительно-

восстановительного цикла Cu^{2+} - Cu^{+} и, следовательно, увеличение скорости ферментативной дисмутации.

В настоящее время показано участие оксида азота (NO) в регуляции активности СОД [136, 251]. Возможно, что данное регуляторное влияние осуществляется за счет контроля активности процессов ПОЛ, поскольку во многих исследованиях NO рассматривается как антиоксидант, который тормозит развитие радикальных окислительных реакций [172, 191, 201].

Как отмечалось выше, синергистом СОД в регуляции процессов инициации свободнорадикальных реакций является каталаза - гемсодержащий фермент, способствующий разложению перекиси водорода в реакции [11, 244]:

$Кат\text{-}Fe^{3+} + H_2O_2 = Кат\text{-}Fe^{3+} + H_2O + O_2$

В клетках до 80% каталазы локализовано в пероксисомах, где её концентрация составляет 10^{-6}М, и 20% - в цитозоле [11]. Каталаза относится к ферментам, которые наиболее длительно сохраняют свою высокую активность, и почти не требуют энергии активации. Скорость реакции, катализируемой этим энзимом, лимитируется лишь скоростью диффузии субстрата к активному центру. Каталаза, так же как и СОД, подвержена регуляторному влиянию со стороны NO [121, 196], поскольку в ее активном центре содержится атом железа, способный взаимодействовать с молекулой оксида азота.

В экспериментальных исследованиях in vivo показана возможность эффективной защиты миокарда от повреждающего действия пероксидации липидов путем введения экзогенных антиоксидантных ферментов [127, 213, 236], что делает возможным их применение в терапии инфаркта миокарда и других патологических процессов в организме, сопровождающихся активацией свободно-радикальных процессов. Однако, из-за большой молекулярной массы (250 кД) каталаза плохо проникает внутрь клеток [170, 177], а во внеклеточных

жидкостях быстро теряет свою активность в результате действия протеолитических ферментов, что может служить ограничением фармакологического применения фермента. Вместе с тем, показано, что совместное применение СОД и каталазы значительно эффективнее защищает клетки от окислительного стресса, чем использование ферментов по отдельности [170, 177].

Литературные сведения о ключевом значении пероксидации липидов, а, следовательно, и активности ферментативных представителей антиоксидантной системы в патогенезе различных видов сердечно-сосудистой патологии служат основанием для поиска новых способов эффективной защиты миокарда от патологического влияния окислительного стресса. В этом плане заслуживают внимания данные литературы о кардиопротекторных и антиаритмических эффектах опиоидных пептидов [27, 63, 64, 65, 66, 67, 93, 94, 143, 222, 223]. Эти данные дают возможность предполагать влияние опиоидов на интенсивность протекания свободнорадикальных реакций в ткани миокарда и активность СОД и каталазы.

1.3. Эндогенная опиоидная система и устойчивость миокарда к действию повреждающих факторов

Опиаты – одни из самых древних средств, известных медицине. Они применяются в качестве обезболивающих или наркотических веществ уже около 18 веков. В настоящее время показано участие опиоидной системы в формировании устойчивости организма, в целом, и миокарда, в частности, к патогенному влиянию стрессорных [65, 66, 93, 76, 78] и аритмогенных факторов [75, 77, 91, 92], а также к повреждениям, вызванным ишемией и последующей реперфузией [67, 94, 143, 222, 223]. Тем не менее, остается еще много вопросов о механизмах реализации защитных эффектов опиатов в процессе развития патологических процессов.

Известные на сегодняшний день литературные данные свидетельствуют о позитивном влиянии агонистов ОР в отношении сократимости сердца и скорости репаративных процессов в сердечной мышце при моделировании у животных острого инфаркта миокарда [7, 23, 24, 33, 36, 98]. В работе Афонской Н.А. с соавт. (1986 г.) было показано, что введение одного из энкефалинов - даларгина - кроликам на фоне острой ишемии миокарда стимулировало рост капилляров, пролиферацию клеточных

элементов, образование коллагена и миофибробластов, а также способствовало более полноценному рубцеванию и ускорению заживления [7]. Приведённые данные о стимуляции даларгином репаративных процессов в сердце при экспериментальном инфаркте миокарда согласуются с результатами исследований, проведенных Л.В. Масловой и соавт. (1991 г.), показавших способность этого опиоида стимулировать биосинтез белка в миокарде в условиях стресса [79].

Особый интерес вызывают работы, посвященные влиянию опиоидных пептидов на сократимость сердечной мышцы при экспериментальном инфаркте миокарда. Так, в ряде исследований было показано, что введение крысам бета-эндорфина предупреждает наблюдаемое при инфаркте нарушение сократимости условно интактных отделов сердца [33, 82]. На модели тотальной ишемии изолированного перфузируемого сердца также показано, что селективные агонисты μ-ОР DAMGO и DALDA при внутривенном введении крысам в дозе 0,1 мг/кг препятствуют падению давления, развиваемого левым желудочком, и ограничивают выход КФК в оттекающий от миокарда перфузат в реперфузионном периоде[67]. В то же время блокада μ-рецепторов предупреждает возникновение нарушений диастолической релаксации миокарда в постишемическом периоде [67, 69]. Таким образом, предварительное введение ОП позволяет предупредить снижение ударного и минутного объема сердца при ишемии-реперфузии. Наряду с этим, имеются данные, что внесение в перфузионный раствор блокатора ОР - налоксона, также способствует повышению резистентности миокарда к повреждающему действию гипоксии изолированного перфузируемого сердца крысы [181].

В нашей лаборатории было показано, что энкефалины способны оказывать кардиопротекторное действие в ходе развития интенсивной стресс-реакции, что выражалось уменьшением аккумуляции меченного пирофосфатом технеция в миокарде и снижением концентрации креатинфосфокиназы (КФК) в плазме крови [65]. Однако, было обнаружено и то, что кардиопротекторный эффект у стрессированных животных развивается и в ответ на введение неселективного блокатора ОР - налоксона [65, 66]. Все эти факты свидетельствуют о противоречивости литературных данных о роли опиоидных пептидов и их рецепторов в регуляции целостности мембран кардиомиоцитов.

Исследования, выполненные группой ученых под руководством проф. G.J.Gross, свидетельствуют о повышении толерантности миокарда к патогенному влиянию ишемии в результате предварительной стимуляции ОР. Так, ими было показано, что предварительное введение агониста δ_1-ОР TAN-67 способствует ограничению размера зоны некроза при экспериментальной коронарооккклюзии [143, 223]. Согласно рабочей гипотезе этих авторов реализация протекторного эффекта лигандов ОР осуществляется в результате активациии G-белок-сопряженных АТФ-зависимых калиевых каналов ($К^+_{АТР}$-каналы), поскольку показано, что предварительное ведение животным блокатора митохондриальных $К^+_{АТР}$-каналов - 5-hydroxydecanoic acid препятствует реализации защитного эффекта TAN-67 [143]. Аналогичные результаты были получены и на культуре кардиомиоцитов желудочков эмбрионов цыплят, предобработка которых блокатором сарколеммальных $К_{АТР}$-каналов - глибенкламидом или блокатором митохондриальных $К_{АТР}$-каналов - 5-hydroxydecanoic acid нивелировала проявление защитного

эффекта морфина при моделировании 90 минутной ишемии [183]. Это выражалось повышением процента гибели кардиомиоцитов и увеличением выхода креатинфосфокиназы в инкубационную среду по сравнению с культурой кардиомиоцитов, подвергшейся ишемическому воздействию на фоне предварительного воздействия μ-агонистом - морфином. В настоящее время показано, что активация митохондриальных $К^{+}_{АТР}$-каналов способствует повышению устойчивости кардиомиоцитов к ишемическим и реперфузионным повреждениям [116, 145], что обеспечивает быстрое восстановление нормального уровня АТФ в клетках миокарда в реоксигенационном периоде [116, 145]. В свою очередь, высокое содержание АТФ в кардиомиоцитах создает условия для эффективной работы энергозависимых $Са^{2+}$-насосов и, как следствие, предупреждает возникновение реоксигенационной $Са^{2+}$-перегрузки миокарда и улучшает насосную функцию сердца в реперфузионном периоде [116, 145].

Согласно публикациям Downey J.M. et.al. [194], внутриклеточным посредником, участвующим в реализации протекторного эффекта морфина при ишемическом повреждении миокарда, оцениваемого по ограничению зоны некроза, можно считать протеинкиназу С. Ее активация, наблюдаемая при введении морфина, носит рецептор-опосредованный характер, доказательством чего служит то, что предварительное введение блокатора протеинкиназы С или налоксона устраняло кардиопротекторный эффект морфина [194].

Как было отмечено выше, энкефалины способны повышать толерантность миокарда к стресс-индуцированным повреждениям. Так, введение крысам даларгина, предшествующее 6-часовому эмоционально-болевому стрессу, существенно ограничивало накопление сердечной

мышцей меченного технецием пирофосфата [63, 71], и снижало уровень креатинфосфокиназы в сыворотке крови экспериментальных животных [63, 71]. Аналогичный протекторный эффект синтетических энкефалинов наблюдался и при моделировании у животных 24-часового иммобилизационного стресса [65, 66, 93]. В механизме защитного действия опиоидных пептидов при стрессорных повреждениях сердца главную роль отводят ограничению адренергического звена стресс-реакции [93]. Установлено, что в процессе развития стресс-реакции происходит сопряженный выход АКТГ и бета-эндорфина из гипофиза [141], а так же катехоламинов и энкефалинов из хромофинных клеток надпочечников [110, 118]. Высвобождение ОП из мест локализации происходит не тонически, а лишь при высокой и длительной импульсной активности нерва и значительном выделении медиатора, в ситуации типичной для стресс-реакции. При этом опиоидные пептиды ингибируют дальнейшее высвобождение катехоламинов из надпочечников, симпатических терминалей и тем самым предупреждают его чрезмерный выход из нервных терминалей [157, 164].

В механизме кардиопротекторного действия ОП при стрессорных повреждениях существенное место занимает, скорее всего, не только ограничение выброса катехоламинов в кровь, но и способность опиоидов ингибировать активность аденилатциклазы с последующим снижением уровня циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) [128, 175]. Как известно, цАМФ модулирует работу Ca^{2+}-каналов в сердце через активацию протеинкиназы А, которая, в свою очередь, фосфорилирует белки Ca^{2+}-каналов, что ведет к увеличению ионного тока по этим каналам и Ca^{2+}-перегрузке кардиомиоцитов [16]. В результате активации ОР происходит уменьшение цАМФ-

зависимого поступления Ca^{2+} в миоплазму, и, следовательно, ограничение повреждающего действия избытка $[Ca^{2+}]i$ [81]. Согласно нашим данным, энкефалины предупреждают изадриновое повреждение сердца и способствуют снижению уровня цАМФ в мокарде [65]. Аналогичный эффект даларгина в отношении уровня циклических нуклеотидов наблюдался и при моделировании острого инфаркта миокарда. Внутривенная инъекция данного пептида, выполненная за 10 мин до коронарооккклюзии, способствовала достоверному уменьшению уровня цАМФ в ткани сердца по сравнению с контролем (экспериментальный инфаркт миокарда) [65]. Содержание цГМФ в миокарде при этом изменялось противоположным образом [65]. Логично предположить, что более низкое содержание цАМФ в неишемизированной зоне сердца крыс, получавших даларгин, можно рассматривать в качестве механизма, опосредующего кардиопротекторное и антиаритмическое действие опиоидных пептидов. Можно говорить о функциональном антагонизме опиоидов и катехоламинов на клеточном уровне, так как обнаружена способность даларгина препятствовать формированию повреждений миокарда и подъему содержания цАМФ в сердечной мышце при введении высоких доз изадрина [65]. Однако в литературе отсутствуют данные о прямой опиатергической регуляции синтеза и гидролиза цАМФ или цГМФ в периферических органах и тканях, и выдвигаются лишь предположения о взаимодействии эндорфинов и энкефалинов с системой внутриклеточных мессенджеров по принципу пептидергической модуляции гормональных, симпатических и парасимпатических влияний на эффекторные органы [65].

Опиатергическое повышение толерантности миокарда к стрессорным и ишемическим воздействиям, в определенной

степени, опосредовано изменениями интенсивности синтеза простагландинов. Так, синтетические аналоги лей-энкефалина - даларгин и энкефалинамид - способствуют нормализации уровня тромбоксана A_2 ($ТхА_2$) и простациклина (Пц), а следовательно и Пц/$ТхА_2$ индекса, в миокарде и плазме крови экспериментальных животных при стрессе и изадриновом некрозе миокарда [63, 68, 71]. Синтезируемый тромбоцитами $ТхА_2$ известен как сильнейший вазоконстриктор и агент, потенциирующий агрегацию тромбоцитов [142, 241]. В норме физиологические эффекты тромбоксана сбалансированы простациклином, который синтезируется клетками эндотелия сосудов и является мощным вазодилататором и дезагрегантом [131]. Исходя из этого, есть все основания считать, что увеличение индекса Пц/$ТхА_2$ у экспериментальных животных отражает активацию одного из важнейших механизмов кардиопротекторного действия опиоидов, опосредованного через систему простагландинов. Об опосредовании защитных эффектов даларгина через систему простагландинов свидетельствует также тот факт, что предварительная инъекция этого пептида модулирует изменение уровня простагландинов Е и $F_{2\alpha}$ при эмоционально-болевом стрессе [68, 71].

Процессы синтеза простагландинов в организме тесно взаимосвязаны с реакциями свободнорадикального окисления липидов. Известно, что метаболизм арахидоновой кислоты может протекать как по циклооксигеназному пути с образованием простагландинов ($ПГЕ_2$, $ПГF_{2\alpha}$, $ПГI_2$, $ПГА_2$), так и по липооксигеназному с образованием эндоперекисей [113]. Метаболизм арахидоновой кислоты сопровождается образованием активных форм кислорода, которые могут инициировать запуск процессов пероксидации липидов в тканях. Вместе с тем, циклооксигеназа и липоксигеназа являются ферментами, образующими гидроперекиси липидов и малоновый диальдегид

[11]. Иными словами, повышение активности этих ферментов может индуцировать ПОЛ. В свою очередь, эндоперекиси жирных кислот ингибируют простациклин-синтетазу [197], снижая образование ПЦ и смещая баланс ПЦ/$ТхА_2$ в пользу последнего. Согласно литературным данным, простагландины могут оказывать ингибирующее влияние на интенсивное течение процессов ПОЛ через торможение выброса катехоламинов из надпочечников и симпатических терминалей, локализованных в миокарде [95]. Катехоламины, как мы уже говорили выше, являются эндогенными индукторами свободнорадикальных процессов в клетке. Кроме того, показано участие простациклина в процессах антиоксидантной защиты клеточных структур от повреждающего действия ПОЛ, опосредованное через активацию жирорастворимых антиоксидантов [26, 31].

Тесная взаимосвязь между каскадом синтеза простаноидов и процессами пероксидации липидов, а также показанная выше способность энкефалинов оказывать модулирующее воздействие на уровень ПГ в условиях стресса [71], позволила нам сделать предположение о возможности регуляторного воздействия опиоидных пептидов на интенсивность свободнорадикальных процессов в мембранных структурах кардиомиоцитов. Исследованиями нашей лаборатории была показана способность энкефалинов подавлять активность процессов ПОЛ в кардиомиоцитах при моделировании эмоционально-болевого [65, 71], иммобилизационного [93] и окислительного [70] видов стресса. По мнению Ф.З. Меерсона [81], система антиоксидантов является одним из звеньев периферических стресс-лимитирующих систем организма [81]. Следовательно, одним из механизмов реализации защитных свойств энкефалинов может являться именно повышение активности системы неферментативных и ферментативных антиоксидантов. Обзор литературных данных, посвященных изучению механизмов опиатергической регуляции

свободнорадикальных процессов, представлен в следующей главе диссертационной работы.

1.4. Опиатергическая регуляция свободнорадикальных процессов

В настоящее время широко известен и не вызывает сомнения тот факт, что одной из составляющих патогенеза большинства сердечно-сосудистых заболеваний является чрезмерная активация процессов свободнорадикального окисления липидов [8, 47, 88, 97, 99, 135, 161, 230],

которая сопровождается повреждением мембран кардиомиоцитов [11, 18, 49]. В связи с этим, идет постоянный поиск новых классов веществ, способных регулировать интенсивность свободнорадикальных процессов и, тем самым влиять, на клиническое течение заболевания [41, 86, 204, 235]. В предыдущем разделе литературного обзора, посвященного рассмотрению механизмов опиатергического повышения устойчивости миокарда к действию повреждающих факторов, было сделано предположение, что одним из механизмов реализации кардиопротекторного эффекта ОП является их способность снижать интенсивность процессов пероксидации липидов. Литература, посвященная проблеме опиатергической регуляции скорости протекания свободнорадикальных процессов и активности антиокислительных ферментов, носит разрозненный и противоречивый характер. Встречаются лишь отдельные сообщения о влиянии опиоидной системы на процессы ПОЛ, протекающие в различных тканях. Причем в большинстве работ рассматривается влияние ОП на уровень накопления продуктов пероксидации липидов, и не исследуется состояние системы антиоксидантов.

Исследования, проведенные в нашей лаборатории, показали, что важным звеном кардиопротекторного действия экзогенных агонистов опиатных рецепторов в условиях ишемии-реперфузии [94] и стресса [65, 71, 94] является угнетение процессов липопероксидации в ткани миокарда. Изучение рецепторной специфичности "антиперекисного" эффекта опиоидных пептидов показало то, что его реализация наблюдается при активации опиатных рецепторов μ-типа [66, 93, 94]. Так, предварительное внутривенное введение экзогенных агонистов μ-опиатных рецепторов способствовало повышению толерантности кардиомиоцитов к повреждению и уменьшению образования продуктов ПОЛ в процессе реперфузии ишемизированного миокарда [94], или моделировании

иммобилизационного стресса [93]. Следует отметить, что блокада μ-ОР изолированного миокарда при помощи селективного антагониста CTAP сопровождалась увеличением степени реперфузионного повреждения сарколеммы и накоплением диеновых конъюгатов в ткани сердца [94]. Эти данные также свидетельствуют в пользу участия опиоидной системы, в частности, ее эндогенных лигандов, в регуляции процессов свободнорадикального окисления липидов в миокарде. В то же время, целью проведенных исследований не являлось изучение состояния ферментативного и неферментативного звена системы антиоксидантов в ткани миокарда при вышеозначенных условиях, сопровождающихся интенсификацией пероксидации липидов. Поэтому вопрос о возможности опиатергической регуляции активности антиокислительных ферментов в ткани миокарда до настоящего времени остается открытым.

Современными исследованиями показано, что к снижению интенсивности свободнорадикальных процессов приводит и активация δ-ОР. Вызывают несомненный интерес данные о способности агониста δ-ОР - DADLE - подавлять индуцированную метамфитамином пероксидацию липидов в синаптосомах головного мозга [237]. Авторы работы отмечают, что по способности ингибировать супероксиданион, генерируемый ксантиноксидазой, и гидроксильный радикал, генерируемый Fe^{2+}-цитратом, DADLE приближается к глутатиону, а по способности ингибировать пероксидацию липидов, индуцированную Fe^{2+}-аскорбатом, лишь незначительно слабее глутатиона. Таким образом, вклад в механизмы нейропротекторного эффекта DADLE подавления процессов ПОЛ очевиден.

В литературе отмечается наличие антиоксидантных свойств и у неселективного антагониста ОР – налоксона [178], который, например, ослабляет Fe^{2+}-индуцированную

пероксидацию в липосомах. Эффект ингибирования ПОЛ в этом случае носит дозозависимый характер и проявляется тем сильнее, чем выше используемая концентрация налоксона. Подавление пероксидации в липосомах позволило авторам предположить, что налоксон наряду со свойствами антагониста ОР, обладает и свойствами прямого антиоксиданта в условиях активации ПОЛ. Согласно мнению авторов статьи, антиоксидантный эффект налоксона связан с образованием комплекса Fe^{2+}-налоксон [178]. Высказывается и предположение, что налоксон аналогично кортикостероидам обладает мембраностабилизирующими свойствами, что является более вероятным механизмом реализации его антиоксидантного эффекта [178].

Однако, в нашей лаборатории были получены данные, свидетельствующие в пользу того, что реализация протекторных свойств налоксона обусловлена не только его прямым действием на мембрану, но и опосредована взаимодействием с кардиальными опиатными рецепторами. Так, на модели изолированного перфузируемого сердца показано, что предварительное внутривенное введение L-налоксона в дозе 0,5 мг/кг способствовало повышению резистентности мембран кардиомиоцитов к влиянию ишемии-реперфузии, о чем можно было судить по уменьшению активности КФК в оттекающем перфузате как в начале, так и в конце реперфузионного периода [94]. Параллельно происходило снижение интенсивности ПОЛ в ткани изолированного миокарда на 5-ой минуте реперфузии. Использованный в этой работе правовращающий изомер – D-налоксон, не взаимодействущий с опиатными рецепторами, также проявлял антиоксидантное и кардиопротекторное действие, но уступал в этом отношении L-налоксону [94]. На этом основании авторы предполагают, что кардиопротекторные и "антиперекисные" свойства L-налоксона проявляются как за счет его прямого стабилизирующего

действия на мембраны кардиомиоцитов, так и через блокаду кардиальных опиатных рецепторов δ-типа, поскольку селективный антагонист μ-ОР CTAP усиливал реоксигенационные повреждения сарколеммы и интенсификацию свободнорадикальных процессов.

Наряду с исследованиями, свидетельствующими о наличии у экзогенных и эндогенных лигандов ОР способности подавлять активацию пероксидации липидов, встречаются и работы, в которых получен прямо противоположный результат. Так, в исследованиях Sharp B.M. et al. [225] установлено, что β-эндорфин и динорфин в концентрации 10^{-14} – 10^{-12} М стимулируют продукцию $O_2^{\bullet}$ полиморфноядерными лейкоцитами и перитониальными макрофагами человека. Вероятно, что в данном случае интенсификация образования $O_2^{\bullet}$ в ответ на стимуляцию ОР обусловлена специфичностью выбранного объекта исследования. Поскольку известно, что активные формы кислорода участвуют в реализации антибактериальной и цитотоксической активности клеток иммунной системы [17, 50]. Поэтому повышение продукции $O_2^{\bullet}$, в данном случае, скорее всего, следует рассматривать как положительный эффект опиатопосредованного усиления неспецифического иммунного ответа, а не как процесс, приводящий к патологической активации пероксидации липидов.

К сожалению, в современной литературе мы не встретили работ, посвященных изучению опиатергической регуляции активности антиокислительных ферментов в ткани миокарда. Однако анализ литературы, позволяет предполагать наличие опиатергических эффектов со стороны опиоидной системы в отношении ферментативных антиоксидантов. Так, экспериментально показано, что активация ОР приводит к повышению активности NO-синтазы и увеличению продукции эндогенного NO в организме крысы [124]. Также показано

участие NO в регуляции активности СОД [136, 251] и каталазы [121, 196]. Регуляция оксидом азота ферментативной активности может осуществляться либо за счет подавления интенсивности процессов ПОЛ, поскольку во многих исследованиях NO рассматривается как антиоксидант [172, 191, 201], либо в результате прямого взаимодействия NO с активным центром фермента [121].

Таким образом, приведенные литературные данные позволяют говорить о возможной регуляторной роли в отношении реакций свободнорадикального окисления липидов. В то же время, имеющиеся на сегодняшний день публикации не позволяют однозначно ответить на вопрос о внутриклеточных механизмах реализации этих эффектов. Изучению регуляции антиокислительных ферментов СОД и каталазы со стороны агонистов μ- и δ-опиатных рецепторов в условиях окислительного стресса и будет посвящена часть данной диссертационной работы. Использование селективных антагонистов μ- и δ-рецепторов позволит конкретизировать участие эндогенных опиоидов в тонической регуляции процессов пероксидации липидов и активности изучаемых ферментов.

Глава 2. Материалы и методы исследования

2.1. Препараты и животные

Экспериментальные исследования выполняли на модели изолированного перфузируемого сердца крысы. Преимущество подобных исследований по сравнению с работами, выполняемыми in vivo, состоит в том, что миокард в такой модели выведен из-под влияния целого ряда регуляторных систем целого

организма, что дает возможность обнаружить нарушения биохимических процессов и сократительной функции, зависящие только от нарушений структуры и метаболизма миокарда. При проведении экспериментальных исследований мы использовали модель окислительного стресса, которая позволяет оценить влияние активных форм кислорода, и в частности, супероксиданионрадикала на структурное и функциональное состояние миокарда. Несмотря на то, что в эксперименте мы не можем полностью воспроизвести условия, приводящие к развитию сердечно-сосудистых заболеваний человека, ценность такого подхода состоит в том, что он позволяет изучить механизмы повреждения и защитного действия кардиотропных веществ. В опытах на изолированных сердцах можно оценить именно кардиальные механизмы развития повреждений сердца при интенсификации свободнорадикальных реакций и возможность их коррекции с помощью исследуемых препаратов.

Исследования выполнены на изолированных сердцах крыс линии Вистар массой 250-300 г. Для моделирования окислительного стресса проводили перфузию миокарда раствором Кребса-Хензелайта, содержащим систему Fe^{2+} - аскорбиновая кислота.

В отдельных сериях экспериментов введение лигандов опиатных рецепторов крысам осуществляли внутривенно за 15 мин до выделения сердца. После выделения и помещения в условия искусственной перфузии, сердца подвергали воздействию окислительного стресса. В других сериях непосредственно перед моделированием окислительного стресса проводили перфузию изолированного сердца в течение 5 или 15 минут раствором, содержащим агонисты δ-опиатных рецепторов. В качестве контроля для оценки базального уровня биохимических показателей использовали сердца интактных крыс, перфузированные раствором Кребса-Хензелайта в течение 40 мин без добавления $FeSO_4$ и аскорбата. Группу, в которой

сердца подвергались воздействию активных форм кислорода, использовали в качестве контроля для оценки защитного действия исследуемых лигандов опиатных рецепторов.

В работе были использованы следующие селективные и неселективные лиганды μ- и δ-ОР:

- смешанный агонист μ- и δ-ОР – даларгин ([D-Ala2-, Leu5,Arg6]-enkephalin) [54], синтезирован в КНЦ РАМН;

- высокоселективный агонист μ-ОР –DAMGO ([D-Ala2,N-Me-Phe4,Gly-ol5]-enkephalin) [153];

- высокоселективный агонист μ-ОР –DALDA ([D-Arg2,Lys4]-dermorphin-(1-4)-amide) [218, 219];

- селективный агонист δ-ОР DSLET ([D-Ser2,Leu5,Thr6]-enkephalin) [144];

- селективный агонист δ-ОР DTLET ([D-Thr2,Leu5]-enkephalyl-Thr6) [134];

- высокоселективный антагонист μ-ОР CTAP (NH2-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Arg-Thr-L-Pen-Thr-NH2) [206];

- высокоселективный антагонист δ-ОР ICI 174,864 (N, N-dial-Alyl-Tyr-Aib-Aib-Phe-LeuOH, где Aib – alpha – aminoisobutiric acid) [129, 132].

При выборе дозы введения используемых препаратов руководствовались литературными данными о кардиотропных эффектах опиоидных пептидов при введении in vivo [64, 65, 66, 129, 130,132, 144, 153, 192, 218, 219].

Использованные в работе селективные лиганды опиатных рецепторов были синтезированы в компании Chiron Mimotopes Peptide Systems, (San Diego, США) и любезно предоставлены нам Dr. K.Gormley (NIDA, США).

В работе также был использован блокатор NO-синтазы L-NAME [124]. Инъекцию L-NAME осуществляли в дозе 50 мг/кг за 30 мин до начала эксперимента, либо за 15 мин до внутривенного введения DSLET. Препарат был закуплен в

компании ICN Biomedicals (Aurora, Ohio, США).

Характеристика проведенных экспериментов дана в таблице 1.

Таблица 1

Распределение животных по сериям экспериментов

№	**Серии экспериментов**	Число наблюдений в группе
1	Интактный контроль: нормоксическая перфузия в течение 40 мин.	n=31
2	Контроль: in vitro активация процессов ПОЛ в течение 20 мин (в дальнейшем - 20 мин активация ПОЛ).	n=50
3	Внутривенное введение неселективного агониста μ- и δ-ОР даларгина (0,1 мг/кг) + 20 мин активация ПОЛ	n=15
4	Внутривенное введение селективного агониста μ-ОР DAMGO (0,1 мг/кг) + 20 мин активация ПОЛ	n=16
5	Внутривенное введение селективного агониста μ-ОР DALDA (0,1 мг/кг) + 20 мин активация ПОЛ	n=19

6	Внутривенное введение селективного агониста δ-ОР DSLET (0,1 мг/кг) + 20 мин активация ПОЛ	n=12
7	Внутривенное введение селективного агониста δ-ОР DTLET (0,1 мг/кг) + 20 мин активация ПОЛ	n=18
8	Внутривенное введение селективного блокатора μ-ОР CTAP (0,1 мг/кг) + 20 мин активация ПОЛ	n=12
9	Внутривенное введение селективного блокатора δ-ОР ICI 174,864 (0,1 мг/кг) + 20 мин активация ПОЛ	n=14
10	Введение в перфузионную среду агониста δ-ОР DSLET (0,1 мг/л, 15 мин перфузии) + 20 мин активация ПОЛ	n=8
11	Введение в перфузионную среду агониста μ- и δ-ОР даларгина (2 мг/л, 5 мин перфузии) + 20 мин активация ПОЛ	n=10
12	Внутривенное введение селективного блокатора δ-ОР ICI 174,864 (0,1 мг/кг) + внутривенное введение агониста δ-ОР DTLET (0,1 мг/кг) + 20 мин активация ПОЛ	n=13
13	Внутривенное введение блокатора NO-синтазы L-NAME (50 мг/кг) + 20 мин активация ПОЛ	n=12
14	Внутривенное введение блокатора NO-синтазы L-NAME (50 мг/кг) +внутривенное введение агониста δ-ОР DTLET (0,1 мг/кг) + 20 мин активация ПОЛ	n=12

При проведении экспериментов руководствовались рекомендациями, изложенными в Приказе N 755 МЗ СССР от 12 августа 1977г.

Используемые для работы экзогенные лиганды опиатных рецепторов растворяли ex tempore в изотоническом растворе NaCl и вводили в бедренную вену крысы за 15 минут до выделения сердца, а также непосредственно в перфузионный раствор перед моделированием свободнорадикального повреждения.

2.2. Экспериментальные модели

2.2.1. Перфузия изолированного миокарда по Лангендорфу

Эвтаназию животных производили методом цервикальной дислокации, после чего быстро удаляли кожный покров с грудной клетки и вскрывали ее ножницами, делая три разреза: один - поперек грудины и два продольных. Пинцетом с резиновыми наконечниками на браншах захватывали подходящие к сердцу сосуды, после чего их отсекали выше места захвата. Выделенное сердце с целью остановки спонтанных сокращений переносили в охлажденный до +4°С раствор Кребса-Хензелайта, после чего помещали в термостабилизированную увлажненную камеру (рац. предложение № 112/10-85) и вводили канюлю в восходящую дугу аорты, через которую поступал физиологический раствор [137]. В работе использовали физиологический раствор Кребса-Хензелайта следующего состава (в ммоль/л): NaCl - 120; KCl - 4.8; $CaCl_2$ - 2.0; $MgSO_4$ - 1.2; KH_2PO_4 - 1.2; $NaHCO_3$ - 20.0; глюкоза - 10. Перфузионный раствор насыщали газовой смесью, содержащей 95% O_2 и 5% CO_2 [5]. Для приготовления физиологического раствора использовали реактивы квалификации "ХЧ" и "ЧДА". Перфузию сердца проводили по методу Лангендорфа по

открытому контуру [137]. Температура раствора была 37±0,5°С, давление - 60 мм рт.ст., pH=7,6.

Сократительную функцию сердца регистрировали в изоволюмическом режиме с помощью введенного в полость левого желудочка латексного баллончика, соединенного с датчиком артериального давления полиграфа “Салют”. Сигнал от датчика через усилитель УБФ4-03 подавался на индикатор ИМ-789 для визуального контроля. Одновременно проводили запись кривой внутрижелудочкового давления и ее первой производной для последующего расчета параметров сократимости изолированного сердца с помощью оригинальной прикладной программы "ANNA", разработанной для регистрации и обработки выходного сигнала с установки изолированного сердца совместно с научным сотрудником Института оптики атмосферы ТНЦ СО РАН И.А. Розенковым. Блок-схема экспериментальной установки изолированного сердца представлена на рис. 2.

Продолжительность периода адаптации изолированного сердца к условиям перфузии составляла 20 мин [120]. После регистрации исходных параметров сократимости сердца, проводили активацию свободнорадикальных процессов в ткани миокарда (раздел 2.2.2.). Параметры сократительной активности изолированного сердца в каждой серии экспериментов регистрировали перед моделированием окислительного стресса и на 5,10,15 и 20 мин воздействия активных форм кислорода.

Для характеристики сократительной активности изолированного миокарда в условиях стандартной перфузии и при моделировании окислительного стресса мы использовали следующие показатели:

FS - давление, развиваемое левым желудочком изолированного сердца (мм.рт.ст.) – расчитывается как разница между систолическим и диастолическим давлением

[217]. Уменьшение данного показателя при моделировании окислительного стресса является одним из показателей тяжести повреждения сердечной мышцы.

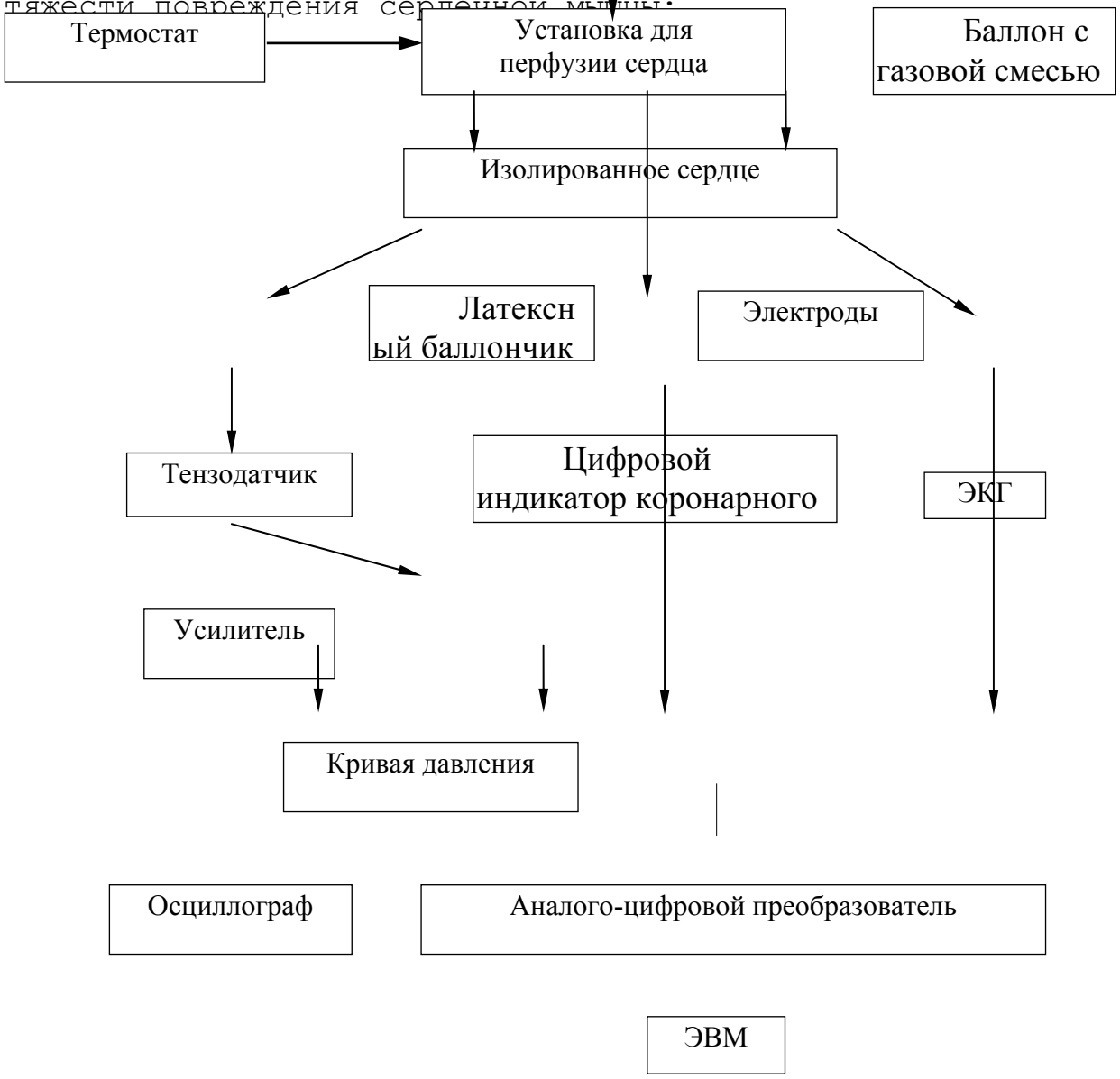


Рис. 2. Блок-схема экспериментальной установки изолированного сердца.

FN -конечное диастолическое давление (выражали в % от исходного) служит для оценки степени расслабления миокарда. Удаление Ca^{2+} из миоплазмы – энергозависимый процесс, поэтому в условиях дефицита АТФ происходит неполное удаление Ca^{2+} от миофибрилл и развивается контрактура сердца [39, 40];

ЧСС - частота сердечных сокращений (уд/мин) – число сокращений сердца в течение одной минуты;

dT – длительность кардиоцикла (мсек) – отрезок времени от начала одного сокращения сердца до начала другого;

МСС - максимальная скорость сокращения (мм.рт.ст./сек) – рассчитывается как максимум производной первого порядка от кривой развития давления в левом желудочке. Этот параметр свидетельствует о скорости образования актомиозиновых мостиков в кардиомиоцитах и определяется скоростью поступления Ca^{2+} к миофибриллам в начале сокращения из внутри- и внеклеточных депо [84];

МСР - максимальная скорость расслабления (мм.рт.ст./сек) – характеризует состояние процесса расслабления миокарда и определяется скоростью удаления Ca^{2+} в СПР и рассчитывается как минимум производной первого порядка от кривой развития давления в левом желудочке [84].

В конце периода адаптации миокарда к условиям перфузии и на 20 минуте оксидативного воздействия на миокард получали аликвоты оттекающего от изолированного сердца перфузата для определения в нем активности креатинфосфокиназы (КФК), являющейся маркером повреждения сарколеммы кардиомиоцитов [11, 62, 181]. По окончании эксперимента сердца замораживали в жидком азоте для последующего определения продуктов ПОЛ и активности антиокислительных ферментов СОД и каталазы.

2.2.2. Моделирование свободнорадикального повреждения сердца

При проведении экспериментов с целью активации перекисного окисления липидов в кардиомиоцитах изолированного сердца мы использовали систему: Fe^{2+} - аскорбиновая кислота. Изолированные сердца перфузировали в течении 20 минут раствором Кребса-Хензелайта, содержащим $FeSO_4$ (0,2 мМ) и аскорбат (0,5 мМ). Данный выбор был обусловлен тем, что в этой системе образуется супероксиданионрадикал, который является одним из сильнейших модификатором ненасыщенных жирных кислот, входящих в состав мембран кардиомиоцитов [18]. Для того чтобы сравнивать процессы, развивающиеся при активации свободнорадикальных реакций, в целом организме и на уровне отдельно взятого органа использование этой системы, на наш взгляд, вполне адекватно. Поскольку известно, что в процессах активации свободнорадикальных реакций в организме принимают участие ионы металлов переменной валентности [18], однако лишь ионы железа присутствуют в биологических жидкостях и внутри клеток в значительных количествах. В биологических объектах существует ряд систем, способных восстанавливать окисленные в процессе взаимодействия с кислородом ионы железа. К ним относятся низкомолекулярные восстановители: аскорбат, восстановленная форма никотинамиддинуклеотида, восстановленный глутатион, которые присутствуют в каждой клетке. Следовательно, нам представляется возможным использование данной системы для моделирования окислительного стресса в изолированном миокарде.

2.3. Биохимические методы исследования

2.3.1. Оценка интенсивности процессов перекисного окисления липидов и активности антиокислительных ферментов

Для оценки состояния ПОЛ в ткани миокарда определяли содержание первичных продуктов ПОЛ - диеновых конъюгатов (ДК), а также содержание одного из конечных продуктов - малонового диальдегида (МДА). О состоянии системы антиокислительных ферментов в образцах миокарда различных экспериментальных групп судили по активности супероксиддисмутазы и каталазы.

Определение содержания малонового диальдегида

Определение содержания малонового диальдегида в ткани миокарда проводили методом [250]. Принцип метода: при нагревании в кислой среде часть продуктов ПОЛ, относящихся к классу эндоперекисей, разлагается с образованием малонового диальдегида, взаимодействие которого с двумя молекулами тиобарбитуровой кислоты приводит к формированию окрашенного в розовый цвет комплекса [250].

Навески ткани миокарда гомогенизировали в 1 мл 50 мМ трис-буфера pH=7,4. Гомогенат переносили в стеклянные пробирки, ступку ополаскивали 1 мл буфера. В пробирки с гомогенатом вносили 2 мл 30% трихлоруксусной кислоты и 1 мл 0,75% тиобарбитуровой кислоты. Затем пробы инкубировали 15 минут на водяной бане при температуре +99°С - +100°С, охлаждали и центрифугировали 15 мин при 3000 об./мин. Оптическую плотность супернатанта регистрировали на спектрофотометре SPECORD M-40 (Германия) при длине волны 535 нм. Контроль на реактивы проходил все вышеперечисленные этапы. Расчет концентрации МДА производили с учетом коэффициента молярной экстинкции, равного $1,56 \times 10^5$ ммоль$^{-1}$ см$^{-1}$ в нмоль /г ткани [53].

Определение содержания диеновых конъюгатов

Определение содержания диеновых конъюгатов осуществляли по методу [60]. Принцип метода основан на интенсивном

поглощении светового излучения конъюгированными диенами в области 232 - 234 нм [119]. Последние образуются благодаря миграции двойных связей в жирно-кислотных ациллах, содержащих 3 и более двойных связей.

В стеклянные пробирку, содержащую 1 мл этанола, вносили растертую в жидком азоте навеску ткани миокарда и добавляли 4 мл н-гексана. Пробирки закрывали и встряхивали на шейкере для пробирок. Затем пробы выдерживали 15 - 20 мин для самопроизвольного расслоения фаз. В чистые пробирки отбирали по 3,5 мл верхнего гексанового слоя. К остаткам образцов добавляли 4 мл н-гексана и повторно гомогенизировали. После самопроизвольного расслоения фаз отбирали по 4 мл гексанового слоя и объединяли первый и второй экстракты. Для оценки содержания ДК проводится спектрофотометрическое измерение оптической плотности гексановых экстрактов против исходного н-гексана при длине волны 233 нм. Содержание ДК в образцах миокарда выражали в ΔD_{233}/ гр ткани.

Активность каталазы

Активность каталазы определяли по методу [55]. Принцип метода основан на способности H_2O_2 образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс. Реакцию запускали добавлением 0,1 мл гомогената миокарда (100 мг ткани на 1 мл 0,05 М трис-HCl-буфера, pH=7,8) к 2 мл 0,03% раствора H_2O_2.. В "холостую" пробу вместо гомогената вносили 0,1 мл дистилированной воды. Реакцию останавливали через 10 минут добавлением 1 мл 4% молибдата аммония. Интенсивность развившейся окраски измеряли спектрофотометрически при λ=410 нм против контрольной пробы, в которую вместо перекиси водорода вносили 2 мл дистилированной воды. Активность каталазы рассчитывали по формуле:

где

$$КАТ(ммоль/мин/гбелка) = \frac{(Ахол - Аопыт) \cdot V \cdot t \cdot K}{C},$$

Ахол и Аопыт - экстинции холостой и опытной проб, V - объем вносимой пробы, t - время инкубации в секундах, К - коэффициент молярной экстинции H_2O_2 , равный 22,2 $\cdot 10^3$ мМоль$^{-1}$ см$^{-1}$, С - количество белка в пробе в граммах.

Определение активности супероксиддисмутазы

Метод оценки активности супероксиддисмутазы (СОД) в гомогенатах миокарда животных различных групп [13] основан на способности данного фермента ингибировать автоокисление адреналина [195]. Адреналин в сильно щелочной среде подвергается автоокислению [195], в результате которого образуется $O_2^{\bullet}$, опосредующий процесс автоокисления. Супероксиддисмутаза дисмутируя $O_2^{\bullet}$ до перекиси и молекулярного кислорода ингибирует, тем самым, процесс образования адренохрома из адреналина. Таким образом, степень ингибирования автоокисления адреналина прямо пропорциональна активности СОД в исследуемом образце.

Автоокисление адреналина изучали при pH=10,2 и регистрировали по образованию адренохрома при λ=480 нм. Стандартные определения выполняли в 3 мл 0,05 М Na-карбонатного буфера pH 10,2, содержащего 10^{-4} М ЭДТА, в сантиметровой кювете, термостатируемой при 25°С. Реакционная смесь содержала 3 х 10 $^{-4}$ М L-адреналина. Реакцию запускали добавлением в кювету 0,4 мл раствора адреналина (pH 2,5). Гомогенат исследуемых образцов вносили в объеме 0,02 мл. В качестве стандарта использовали очищенный фермент супероксиддисмутазы (ICN Biomedicals, Ohio, США). Активность фермента в гомогенатах пересчитывали на мг белка.

Определение общего белка

Общий белок определяли биуретовым методом [29]. В основе реакции лежит способность пептидных связей образовывать с сульфатом меди в щелочной среде окрашенные комплексные соединения, интенсивность окраски при этом зависит от количества пептидных связей в цепи.

2.3.2. Определение активности креатинфосфокиназы

Активность кратинфосфокиназы (КФК) в оттекающем от сердца перфузате определяли с использованием коммерческих энзиматических наборов фирмы "Sigma" (St.Louis, США). Метод основан на увеличении поглощения при 340 нм, которое строго пропорционально активности КФК в образце, вносимом в кювету с инкубационной смесью. Это, так называемый, трехступенчатый метод:

$$\text{КФ} + \text{АДФ} \xrightarrow{\text{КФК}} \text{креатин} + \text{АТФ}$$

$$\text{АТФ} + \text{глюкоза} \xrightarrow{\text{ГК}} \text{АДФ} + \text{клюкоза-6-фосфат}$$

$$\text{клюкоза-6-фосфат} + \text{НАД} \xrightarrow{\text{ГФДГ}} \text{6-фосфоглюконат} + \text{НАДН}$$

В состав инкубационной среды входит глюкоза, гексокиназа (ГК), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (ГФДГ) и никотинамиддинуклеотид ($НАД^+$). Полученная на первом этапе АТФ включается в реакцию фосфорилирования глюкозы. Образующийся при этом глюкозо-6-фосфат на третьем этапе участвует в восстановлении $НАД^+$ до НАДН. Таким образом, скорость образования НАДН, измеряемая спектрофотометрически при длине волны λ=340нм, пропорциональна активности КФК.

В термостатируемую кювету вносили 1 мл реакционной смеси и прогревали в течение 2 минут. Затем добавляли 0,2 мл перфузата и инкубировали при 30°С, измеряя оптическую

плотность на 3-й и 5-й минуте от начала инкубации. Активность КФК вычисляли по формуле:

$$КФК(\frac{мкмольNADH}{мин \times л}) = \frac{(Анач - Аконеч) \times V \times 10000}{6{,}22 \times P \times 2},$$ где

Анач - оптическая плотность на 3 минуте инкубации пробы, Аконеч - оптическая плотность на 5 минуте инкубации пробы, V - общий объем (мл), Р – объем пробы (мл), 6,22 – коэффициент молярной экстинции НАДН при 340 нм, 1000 - коэффициент пересчета на литр.

2.4. Радиоиммунное определение содержания простагландинов в экстрактах ткани миокарда

Общей основой радиоиммунных исследований in vitro является конкуренция немеченых (“холодных”) молекул определяемого вещества и молекул этого же вещества, соединенных с радиоактивной меткой (^{125}I, ^{3}H и др.), за связывание со специфическими биндинг-системами. В качестве биндинг-систем могут выступать: имунная сыворотка (РИА), специфические тканевые рецепторы (радиорецепторный анализ), белки различных тканей (метод конкурентно-белкового связывания) [111].

РИА-анализ подразумевает следующие основные этапы: 1) внесение в пробирку исследуемой пробы или раствора стандарта, меченного антигена, антисыворотки или другого специфически связывающего компонента в присутствии буфера; 2) инкубация проб в оптимальных для каждого набора условиях, что необходимо для установления динамического равновесия между процессами образования и распада иммунных комплексов; 3) сепарация связанной и свободной фракций меченного лиганда методами: фракционного осаждения полиэтиленгликолем, сульфатом аммония, этанолом, адсорбции

на активированном угле, силикатах и др. с последующим центрифугированием и аспирацией или декантированием супернатанта; 4) радиометрия проб и математическая обработка результатов.

Методические детали проведения радиоконкурентного анализа описаны в инструкциях фирм-изготовителей для каждого РИА-комплекта. В своей работе мы использовали следующие наборы для проведения РИА-исследований: фирмы “Amersham” (Англия) - для определения 6-кето-простагландина-$F_{1\alpha}$ (RPA 515) и тромбоксана B_2 (RPA 516).

Радиоиммунному определению содержания простагландинов предшествовала процедура экстракции анализируемого лиганда из опытного образца миокарда. Экстракцию простагландинов из ткани миокарда проводили модифицированным методом Jaffe и соавт. [169]. Использованный нами метод отличался от оригинала тем, что петролейный эфир был заменен на пентан. Навески замороженного в жидком азоте миокарда, гомогенизировали в смеси из 1 мл 0,01 М фосфатного буфера, приготовленного на 0,15 М NaCl (pH 7,4) и 3 мл экстрагирующего раствора (этилацетат : изопропанол : 0,2 М HCl в соотношении 3:3:1 по объему). После гомогенизации к образцам добавляли 2 мл этилацетата, 3 мл воды, перемешивали. Пробы подвергали центрифугированию при 2000g в течение 20 мин. Вехнюю фазу переносили количественно в чистые пробирки и упаривали под вакуумом при t=+85°C.

Содержание простациклина и тромбоксана определяли по уровню их стабильных метаболитов 6-кето-простагландина F_{1a} и тромбоксана типа B_2.

2.4.4. Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов исследования проводили на персональном компьютере с использованием пакета прикладных программ STATGRAPHICS 3.0. В случае

распределения близкого к нормальному для проверки гипотезы о равенстве групповых средних использовали t-критерий Стьюдента. Для каждого анализируемого показателя вычисляли среднее (X), ошибку среднего (m), среднеквадратичное отклонение (σ) и критерий значимости Стьюдента (t). Статистически значимыми считались различия при $p<0,05$. Результаты всех экспериментов приведены в таблицах в виде X ± m. Параметры сократительной функции миокарда выражали как в абсолютных значениях (мм рт.ст., мм рт.ст./сек, уд/мин), так и в процентах относительно исходного уровня в группе.

Глава 3. Результаты собственных исследований и их обсуждение

3.1. Вклад опиатных рецепторов в обеспечение устойчивости сердца к свободнорадикальному повреждению

Процессы перекисного окисления липидов, протекающие по свободнорадикальному механизму, чрезвычайно широко распространены в биологических мембранах и принимают участие в физиологических процессах, протекающих в клетке. Увеличение интенсивности процессов ПОЛ вносит определенный вклад в патогенез заболеваний практически всех систем организма, в том числе и сердечно-сосудистой [11, 18, 44, 47, 48, 228, 161]. Интенсификация процессов пероксидации липидов сопровождается нарушением целостности мембранных структур кардиомиоцитов [11, 16, 46], нарушением активности Ca^{2+}-АТФазы [231], что приводит к развитию сократительной дисфункции миокарда [168, 190, 199], и

нарушению энергетического обеспечения миокарда [125].

Используемые в современной клинической практике антиоксиданты остаются недостаточно эффективными средствами защиты клеток миокарда от повреждающего действия активных форм кислорода и свободных радикалов жирных кислот. Единичные работы посвящены применению антиоксидантов для профилактики сократительной дисфункции сердца при патологических состояниях миокарда, в патогенезе которых играют роль активация свободнорадикальных процессов [15, 104, 139, 229]. Несмотря на пристальное внимание ученых к этому вопросу, до сих пор продолжается поиск наиболее эффективных препаратов для фармакологической защиты миокарда от повреждающего действия реактивных оксирадикалов и продуктов пероксидации липидов.

В настоящее время является доказанным фактом участие процессов ПОЛ в развитии стрессорных [81], ишемических и реперфузионных [11, 18]повреждений миокарда. В то же время показано участие опиоидной системы в формировании устойчивости миокарда к повреждающему действию стресса [93, 66, 71] и ишемии-реперфузии [67, 223]. Сопоставление этих двух фактов позволило нам предположить в качестве одного из путей реализации кардиопротекторного действия лигандов опиатных рецепторов их влияние на скорость протекания процессов ПОЛ. В предыдущих работах, направленных на исследование протекторного и "антиоксидантного" эффектов смешанного μ- и δ- агониста ОР - даларгина при эмоционально-болевом стрессе, нами было обнаружено снижение интенсивности аккумуляции сердечной мышцей меченного радиоактивным технецием пирофосфата (используемого для диагностики повреждения кардиомиоцитов) и уменьшение накопления продуктов ПОЛ в ткани миокарда [71]. Перед нами встал вопрос: реализуется ли ингибирующий эффект опиоидов на процессы ПОЛ через активацию антиокислительных

ферментов, или является следствием опиатергического снижения выброса катехоламинов, способных активировать свободнорадикальные процессы.

Исходя из вышесказанного, мы провели исследования по оценке кардиопротекторного и "антиокислительного" эффектов даларгина при направленной активации перекисного окисления липидов в изолированном перфузируемом миокарде крыс. Это позволило нам максимально исключить адренергический компонент активации процессов пероксидации липидов, а также оценить динамику сократительной активности миокарда при окислительном стрессе и возможность коррекции сократительной дисфункции путем введения лигандов опиатных рецепторов.

3.1.1. Влияние смешанного агониста μ- и δ-опиатных рецепторов – даларгина - на резистентность миокарда к повреждающему действию окислительного стресса

В наших экспериментах моделирование окислительного стресса in vitro в изолированном миокарде крыс сопровождалось интенсификацией процессов ПОЛ, что подтверждается увеличением содержания МДА в миокарде на 71% и ДК на 23% (табл. 2). Одновременно в перфузионном растворе, оттекающем от сердца, мы наблюдали повышение уровня активности КФК в 4,5 раза относительно исходных значений (рис. 3), что свидетельствует о повреждении сарколеммы кардиомиоцитов. Одной из причин нарушения целостности липидного бислоя мембраны при моделировании окислительного стресса является интенсификация процессов ПОЛ, что подтверждается в наших экспериментах фактом

усиленного накопления МДА и ДК в образцах миокарда контрольной группы (табл. 2). В результате протекания свободнорадикальных реакций развиваются повреждения не только наружной клеточной мембраны, но и мембранных структур клеточных органелл, в том числе и лизосом, что приводит к лабилизации лизосомальных ферментов, значительную часть которых составляют протеазы и фосфолипазы [Меерсон Ф.З. 1984]. Активация этих ферментов завершается необратимой деструкцией кардиомиоцитов и выходом КФК в перфузат, что и отмечалось в наших экспериментах.

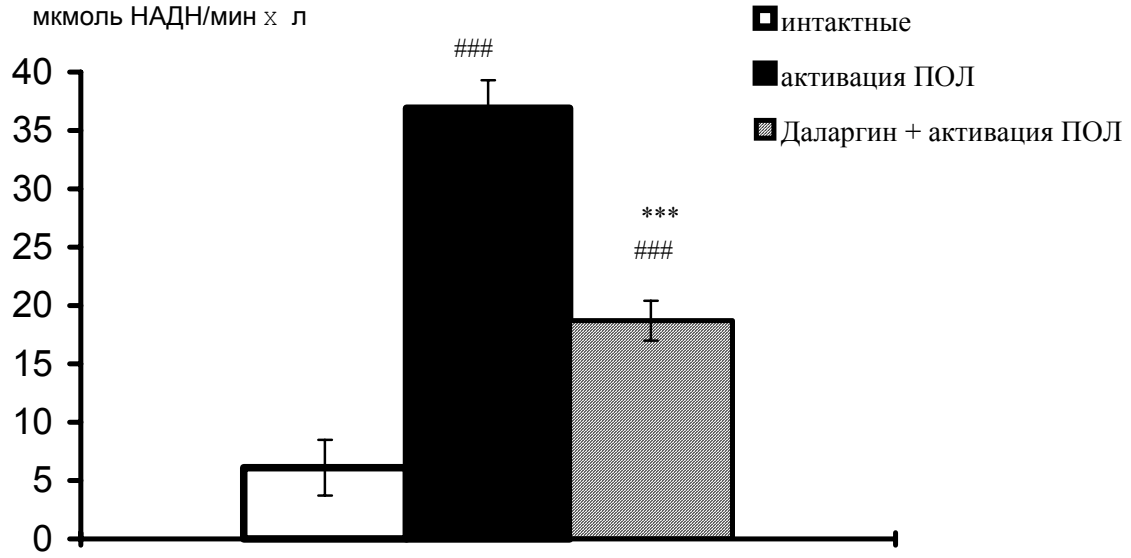


Рис. 3. Влияние предварительного введения лигандов опиатных рецепторов на активность КФК (мкмоль NADH/мин·л.) в оттекающем от изолированного сердца перфузате при активации перекисного окисления липидов. Примечание: # - достоверность различий относительно интактных сердец - $p<0,05$, ### - $p<0,001$; *** - достоверность различий относительно сердец, подвергшихся окислительному стрессу - $p<0,001$

Защита клеток живых организмов от воздействия активных форм кислорода и гидроперекисей липидов осуществляется системой антиоксидантов, включающей в себя представителей ферментативной и неферментативной природы [11, 86]. Определение активности ферментативных антиоксидантов в образцах миокарда контрольной группы показало, что стимуляция ПОЛ сопровождается достоверным увеличением активности каталазы и снижением СОД относительно аналогичных значений в интактной группе (табл. 2).

Таблица 2

Влияние предварительного введения даларгина на уровень продуктов ПОЛ, активность антиокислительных ферментов и синтез простагландинов в изолированном миокарде при окислительном стрессе

Группа животных / Исследуемый показатель	интактные сердца n=16	ктивация ПОЛ =22	аларгин (0,1 мг/кг, в/в)+ активация ПОЛ =12
ДК ΔE_{232}/г ткани	0,363±0,021	0,514±0,028 $p_1 < 0,001$	0,254 ± 0,017 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$
МДА нмоль/г ткани	1,19 ± 0,06	2,04 ± 0,14 $p_1 < 0,001$	1,34 ± 0,07 $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,001$
Каталаза (ммоль/мин/ 1г белка)	15,2 ± 0,75	21,9 ± 1,41 $p_1 < 0,001$	19,7 ± 0,53 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$
СОД (ммоль/мин/мг белка)	7,81 ± 0,15	2,23 ± 0,26 $p_1 < 0,001$	4,46 ± 0,29 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,01$

Простациклин (нг/г ткани)	994,6 ± 120,6	355,7 ± 57,9 $p_1 < 0,001$	565,5 ± 35,4 $p_1 < 0,01$ $p_2<0,01$
Тромбоксан A_2 (нг/г ткани)	61,7 ± 5,5	54,3 ± 10,4 $p_1 > 0,05$	33,3 ± 2,4 $p_1 < 0,001$ $p_2<0,001$
ПЦ/$ТХА_2$ (усл.ед.)	16,1 ± 1,8	6,56 ± 0,92 $p_1 < 0,001$	16,1 ± 1,3 $p_1 > 0,05$ $p_2<0,001$

Примечание : p_1 - достоверность различий относительно группы интактных сердец, p_2 – достоверность различий по отношению к группе сердец, перфузированных Fe^{2+} + аскорбат; n- количество животных в группе.

Отмеченное нами ингибирование СОД в условиях активации ПОЛ можно объяснить способностью перекисей жирных кислот вызывать подавление активности СОД [30, 58] в результате их взаимодействия с активным центром энзима [25]. С другой стороны, снижение активности СОД, обусловленное действием различных факторов, может по принципу обратной связи привести к увеличению образования перекисей липидов.

Повышение активности каталазы в условиях окислительного стресса, на наш взгляд, может представлять собой элемент компенсаторной реакции в ответ на повышение уровня активных форм кислорода в клетке. Природа обнаруженного нами феномена повышения активности каталазы в ответ на активацию ПОЛ остается не известной.

Процессы пероксидации липидов в клеточных мембранах взаимосвязаны с каскадом синтеза простагландинов [158], что

подробно изложено в обзоре литературы. При проведении экспериментов на изолированных перфузируемых сердцах крыс мы установили, что в условиях индукции ПОЛ в ткани миокарда содержание простациклина (ПЦ) снижалось на 60% относительно показателей в интактном миокарде. В то же время уровень тромбоксана A_2 (Тх A_2) достоверно не изменялся (табл.2), а соотношение ПЦ/$ТХА_2$ досноверно уменьшалось по сравнению с группой интактных сердец (табл.2). При активации процессов ПОЛ в миокарде, согласно литературным данным [197], происходит ингибирование простациклинсинтетазы и, следовательно, снижается синтез ПЦ в образцах миокарда, что и было отмечено в наших экспериментах. Снижение интенсивности синтеза ПЦ под влиянием окислительного стресса приводит к уменьшению соотношения ПЦ/$ТХА_2$, что может косвенно свидетельствовать о превалировании эффектов $ТХА_2$ над эффектами ПЦ. Известно, что $ТХА_2$ обладает вазоконстрикторными свойствами и способствует повреждению кардиомиоцитов в процессе развития ОИМ [232, 241]. Простациклин, являющийся физиологическим антагонистом тромбоксана, оказывает кардиопротекторный эффект при ишемии миокарда [131]. Таким образом, смещение соотношения ПЦ/$ТХА_2$ в сторону тромбоксана при окислительном стрессе, на наш взгляд, является неблагоприятным фактором в плане устойчивости мембранных структур кардиомиоцитов к окислительному стрессу.

Системное введение смешанного μ- и δ-агониста даларгина, предшествующее оксидативному воздействию, способствовало увеличению резистентности сарколеммы к повреждающему действию активных форм кислорода, о чем свидетельствует достоверное, по сравнению с группой контроля, снижение КФК в оттекающем от сердца перфузате (рис. 3). Реализация кардиопротекторного эффекта даларгина возможна на наш взгляд двумя путями. С одной стороны,

инъекция даларгина способствовала ограничению интенсивности накопления продуктов пероксидации липидов и увеличению активности ферментов антиокислительной защиты в ткани миокарда, при окислительном воздействии. Так, содержание МДА было снижено относительно значений в контрольной группе на 34%, а ДК на 51%. При этом активность СОД возрастала в 2 раза, а значения каталазной активности достоверно не отличались от контрольных показателей. С другой стороны, предварительная инъекция даларгина сопровождается изменениями в направленности синтеза простагландинов. Наблюдается достоверное увеличение содержания ПЦ, и снижение $ТХА_2$ в ткани миокарда. При этом происходит восстановление соотношения ПЦ/$ТХА_2$ до значений интактного контроля (табл. 2). Представленные данные позволяют думать, что в основе обнаруженного нами свойства даларгина активировать биосинтез простациклина лежит его способность предупреждать образование продуктов ПОЛ, являющихся, как отмечалось выше, ингибиторами простациклинсинтетазы [197]. Вместе с тем, остаются не ясными механизмы энкефалинергического ингибирования синтеза тромбоксана. Суммируя полученые факты, можно предположить, что модуляция процессов биосинтеза простагландинов вносит определенный вклад в реализацию кардиопротекторных свойств даларгина при окислительном стрессе.

Таким образом, представленные результаты свидетельствуют о том, что системное введение даларгина защищает кардиомиоциты от повреждающего действия окислительного стресса. Реализация этого протекторного эффекта возможна за счет стимулирующего действия пептида на активность ключевого фермента защиты клеток от активных форм кислорода - СОД, снижения интенсивности пероксидации липидов в ткани миокарда, с одной стороны, и модулирующего влияния на синтез простагландинов, с другой стороны.

Полученные результаты поставили вопрос о том какие типы опиатных рецепторов принимают участие в реализации кардиопротекторного и "антиоксидантного" эффектов, обнаруженных у агониста ОР в условиях окислительного стресса. В литературе отсутствуют сведения о внутриклеточных механизмах повышения ферментативной активности СОД в ответ на введение даларгина при активации ПОЛ. В то же время, нас интересовал вопрос каким образом влияет интенсификация свободнорадикальных процессов на сократительную функцию миокарда, и будут ли препараты, обладающие кардиопротекторными свойствами, влиять на сократительную активность миокарда при окислительном стрессе. Решению этих вопросов будут посвящены следующие разделы диссертационной работы.

3.1.2. Изменения инотропной функции изолированного миокарда в условиях индукции свободнорадикальных процессов на фоне предварительной стимуляции μ- и δ-опиатных рецепторов

Окислительный стресс сопровождался развитием сократительной дисфункции изолированного миокарда, что выражалось снижением давления, развиваемого левым желудочком (ДРЛЖ), в течение всего периода активации свободнорадикальных процессов (рис. 4а). В конце экспериментального воздействия этот показатель был в 2,7 раза ниже исходных значений в группе. Одновременно наблюдалось увеличение конечного диастолического давления (КДД) (рис. 4б). На 20 минуте перфузии сердечно-мышечного препарата раствором Кребса-Хензеляйта, содержащим Fe^{2+}-аскорбат, этот показатель увеличивался в 1,6 раза по сравнению с исходными значениями, что свидетельствует о формировании контрактуры сердца. Общеизвестно, что главной

причиной контрактуры является перегрузка кардиомиоцитов ионами кальция. В связи с этим, представляется уместным предположить, что и в нашем случае имеет место Ca^{2+}-перегрузка клеток сердца. Так, согласно данным литературы, активные формы кислорода оказывают ингибирующее влияние на активность Ca^{2+}–АТФазы [231], что в свою очередь сопровождается нарушением удаления Ca^{2+} из саркоплазмы, и возникновением Ca^{2+}-перегрузки кардиомиоцитов. С другой стороны, процессы ПОЛ вызывают нарушение целостности клеточных мембран, что ведет к массивному неконтролируемому входу ионов кальция в саркоплазму [96]. Возникает перегрузка клеток миокарда ионами кальция, что ведет к увеличению количества Ca^{2+}, депонированного в СПР и митохондриях [96].

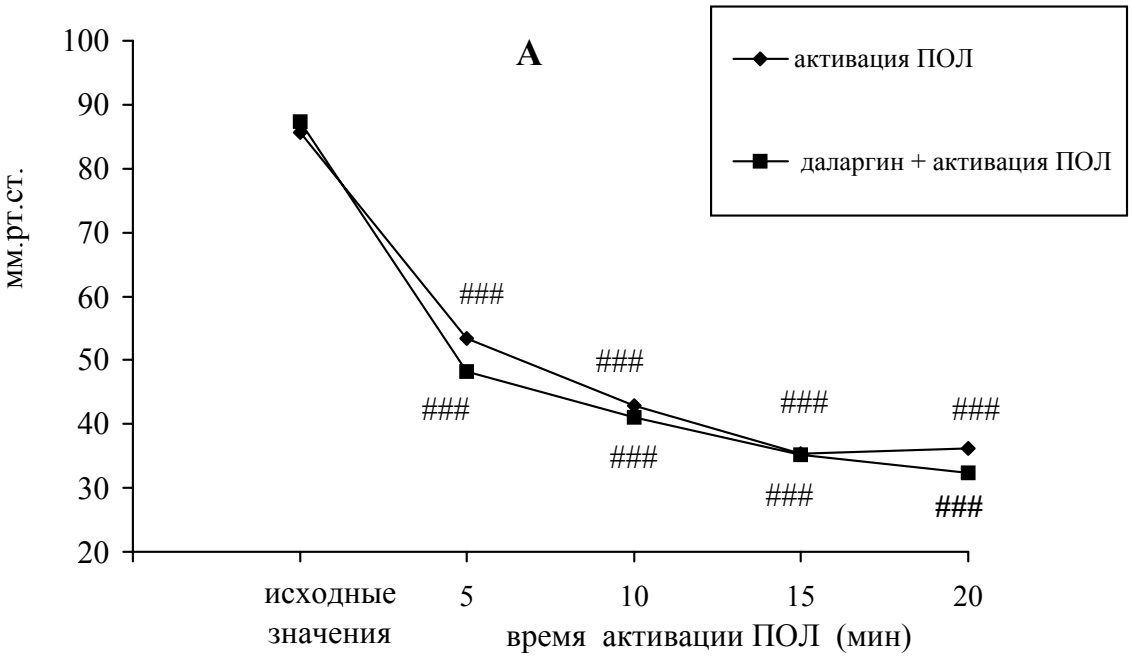
В то же время известно, что избыток Ca^{2+} обладает самостоятельным повреждающим действием – вызывает внутри клеток развитие комплекса патологических процессов, называемых “кальциевой триадой” [96]. Кальциевая триада слагается из контрактуры миофибрилл, активации фосфолипаз и протеаз, разрушающих диски миофибрилл, и нарушения окисления и фосфорилирования в перегруженных кальцием митохондриях [125]. В результате замыкается круг внутриклеточных патологических процессов, приводящих к развитию контрактуры и нарушению процессов сокращения и расслабления миокарда.

Предварительная активация μ- и δ-ОР при помощи их смешанного агониста даларгина не сопровождалась изменениями показателей ДРЛЖ и КДД (рис 4 а,б). Несмотря на наличие у даларгина кардиопротекторного и “антиоксидантного” эффектов, он не оказывал влияния на вызываемые окисидативным воздействием изменения активности Ca^{2+}–АТФазы и ионной проницаемости сарколеммы. Следовательно, можно предположить, что отсутствие положительной динамики

показателей ДРЛЖ и КДД связано с отсутствием у даларгина механизмов защиты структуры и функции Ca^{2+}-АТФазы от повреждающего действия активных форм кислорода.

Важной характеристикой функционального состояния сердца является динамика максимальных скоростей сокращения (МСС) и расслабления (МСР) сердечной мышцы. Максимальная скорость сокращения характеризует скорость образования актомиозиновых мостиков в систолу миокарда и определяется темпом поступления Ca^{2+} к миофибриллам в начале сокращения из СПР и внеклеточной среды [84, 216].

В процессе сокращения, как известно, принимают участие Ca^{2+}-каналы сарколеммы и СПР, а так же Na^{+}/Ca^{2+}-обменник [72, 109]. Максимальная скорость расслабления определяется ско-



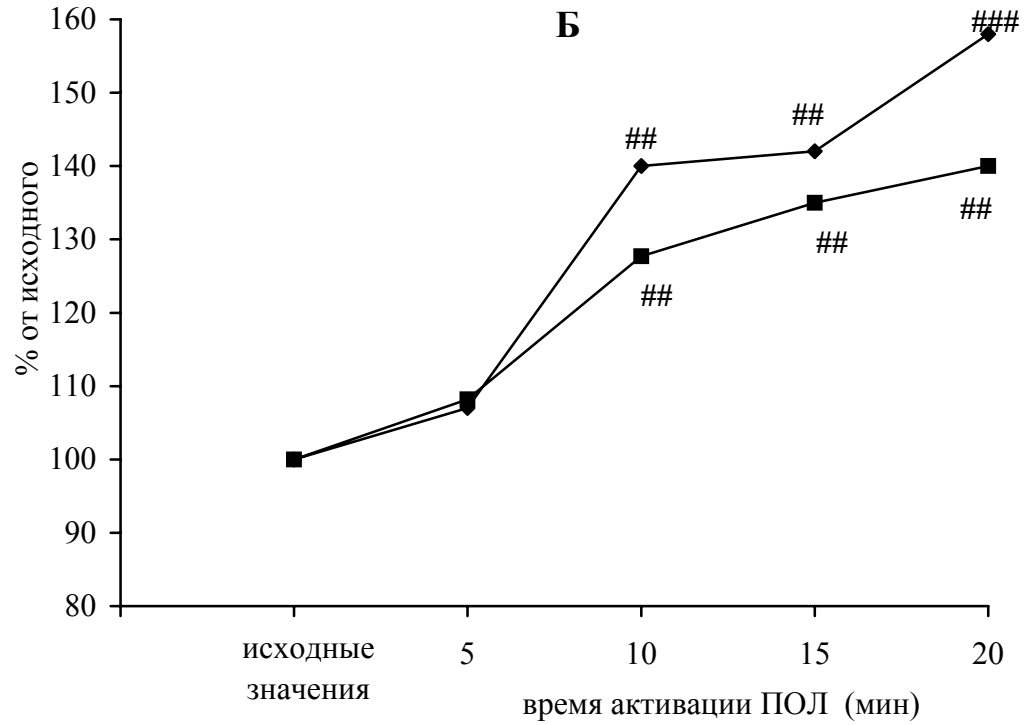
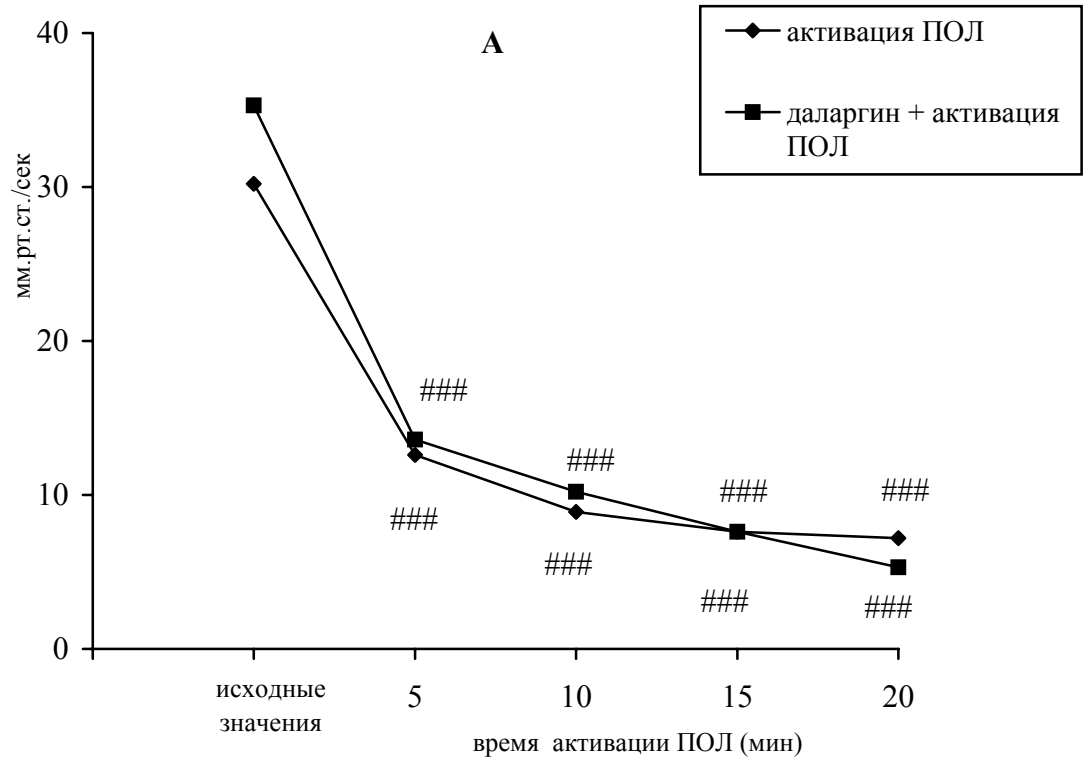


Рис. 4. Влияние предварительного введения даларгина на динамику изменения давления, развиваемого левым желудочком, (А) и конечного диастолического давления (Б) изолированного сердца крыс в процессе активации ПОЛ. Примечания: ## - достоверные отличия от исходных значений в группе($p<0,01$), ### - $p<0,001$.



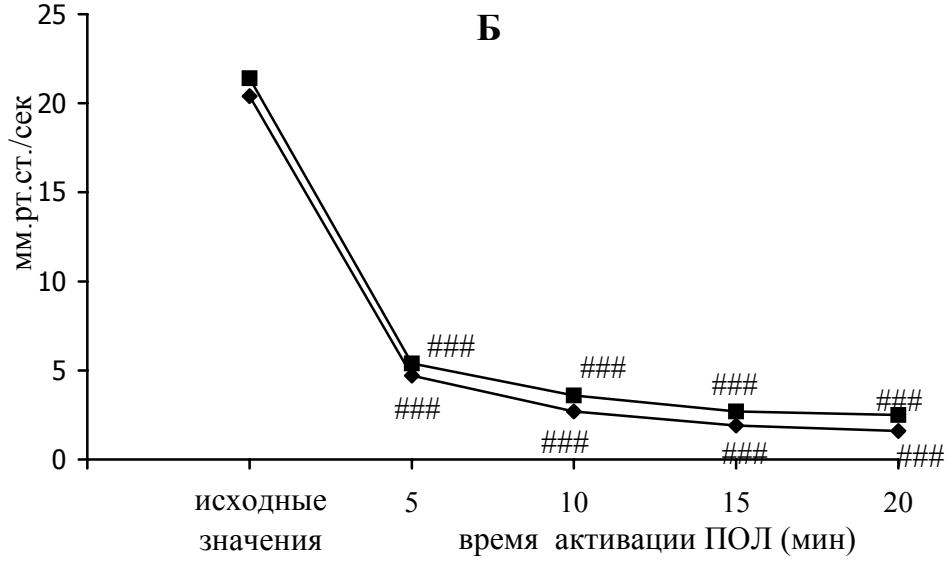


Рис. 5. Динамика изменения максимальной скорости сокращения (А) и максимальной скорости расслабления (Б) в процессе моделирования окислительного стресса на фоне предварительного введения крысам даларгина.

Примечания: ### - достоверность различий относительно исходных значений в группе ($p<0,001$).

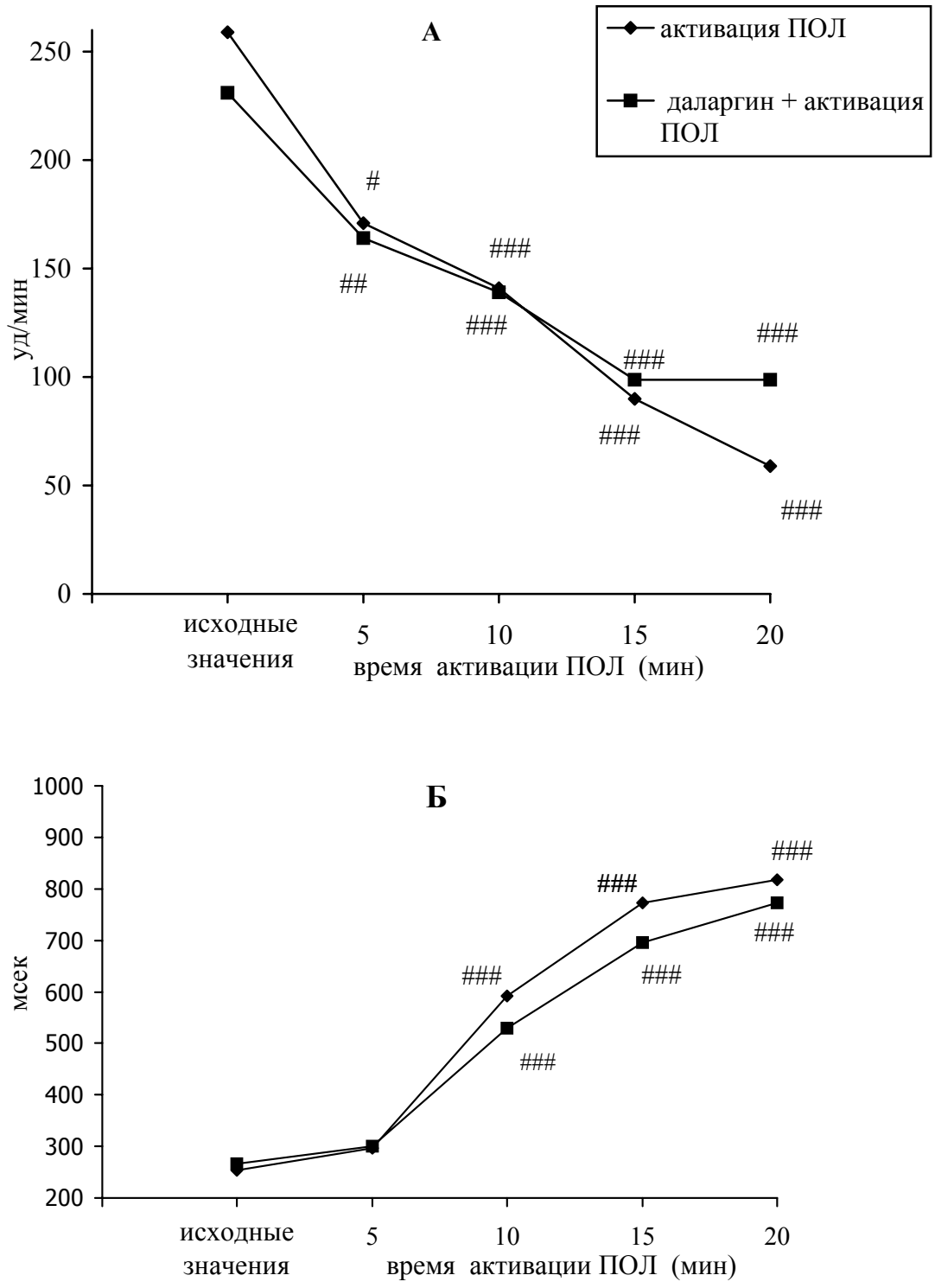


Рис. 6. Изменение частоты сердечных сокращений (А) и времени длительности кардиоцикла (Б) при моделировании окислительного стресса на фоне стимуляции даларгином μ и δ-опиатных рецепторов.

Примечания: ## - достоверность различий от исходных значений ($p<0,01$), ### - $p<0,001$.

ростью удаления Ca^{2+} из саркоплазмы в СПР и во внеклеточную жидкость [82, 84]. Процессы расслабления миокарда носят энергозависимый характер, в них принимают участие Ca^{2+}-АТФазы мембран кардиомиоцитов и СПР, а так же Na^{+}/Ca^{2+} - обменник [72, 109].

Активация свободнорадикальных процессов в препаратах изолированного миокарда сопровождалась снижением показателей МСС и МСР кардиомиоцитов (рис. 5 а,б), что свидетельствует о нарушении транспорта Ca^{2+} в динамике сердечного цикла. Из представленных на рис. 5 данных видно, что в процессе активации ПОЛ скорость расслабления сердечной мышцы снижается более интенсивно по сравнению со скоростью сокращения. Это дает возможность косвенно предположить, что при активации свободнорадикальных процессов в наибольшей степени повреждаются субклеточные структуры, отвечающие за процессы удаления Ca^{2+} из саркоплазмы. Следовательно, избыток $[Ca^{2+}]_i$ в процессе кардиоцикла, скорее всего, обусловлен преобладанием процессов поступления Ca^{2+} в саркоплазму над процессами его элиминации во внеклеточное пространство и СПР. Предварительное внутривенное введение даларгина не оказало положительного эффекта на динамику показателей МСС и МСР как в условиях стандартной перфузии (до окислительного стресса), так и в процессе активации ПОЛ.

Обнаруженные нами угнетение сократительной функции миокарда и развитие контрактуры являются не единственными проявлениями повреждающего воздействия окислительного стресса на сердце. При индукции свободнорадикальных процессов в изолированном миокарде мы наблюдали развитие брадикардии (рис. 6а). К 20 минуте экспериментального воздействия ЧСС снижалось в 4,5 раза, а длительность кардиоцикла в 5 раз превышала исходные значения (рис. 6б.).

Согласно литературным данным, в возникновении брадикардии принимают участие следующие основные механизмы [43]: уменьшение скорости диастолической деполяризации в клетках синусового узла, увеличение абсолютного значения потенциала покоя и повышение порогового потенциала.

Большое значение в формировании трансмембранного потенциала играют ионы Ca^{2+} [2]. Окислительный стресс, сопровождается перегрузкой кардиомиоцитов ионами кальция и нарушением процессов окислительного фосфорилирования, что приводит к угнетению всех энергозависимых процессов в кардиомиоцитах [160, 125]. Результатом описанных процессов и является, видимо, замедление релаксации и угнетение автоматизма синусового узла.

Системное введение даларгина не влияло на падение частоты сердечных сокращений при моделировании окислительного стресса. Очевидно, отсутствие достоверных различий значений ЧСС и длительности кардиоцикла между контрольной и экспериментальной группами обусловлено отсутствием регуляторного влияния опиоидных пептидов на механизмы ионного гомеостаза клетки в условиях окислительного стресса.

Суммируя полученные данные, можно заключить, что активация свободнорадикальных процессов сопровождается развитием стойкого угнетения хронотропной и инотропной функции изолированного миокарда и снижением показателей максимальной скорости сокращения и расслабления. Совместная активация μ- и δ-ОР не отражается на насосной функции сердца как в условиях стандартной перфузии, так и в процессе окислительного стресса. Это свидетельствует об отсутствии у даларгина защитных механизмов в отношении ионных каналов и Ca^{2+}-АТФазы.

3.2. Участие μ-опиатных рецепторов в реализации кардиопротекторного эффекта опиоидов

Как было показано в предыдущем разделе работы, системная активация μ- и δ-рецепторов вносит существенный вклад в формирование устойчивости клеток миокарда к повреждающему действию окислительного стресса, но не предупреждает развития их сократительной дисфункции. Для решения вопроса об участии μ-опиатных рецепторов в регуляции интенсивности процессов ПОЛ и устойчивости мембранных структур кардиомиоцитов к окислительному стрессу были проведены эксперименты с предварительным внутривенным введением высокоселективных агонистов рецепторов данного типа. Серия опытов с системным введением антагониста μ-ОР позволила оценить участие эндогенной опиоидной системы в регуляции резистентности миокарда в условиях активации процессов пероксидации липидов. Параллельно при проведении экспериментов мы оценивали влияние системного введения лигандов μ-рецепторов на показатели сократительной активности миокарда как до окислительного стресса, так и в процессе его моделирования.

3.2.1. Влияние системного введения лигандов μ-опиатных рецепторов на процессы липопероксидации и активность антиокислительных ферментов в миокарде при активации свободнорадикальных процессов

Предварительное системное введение селективного μ-агониста DAMGO в дозе 0,1 мг/ кг не приводило к изменению интенсивности выхода КФК в перфузат, оттекающий от сердец, в которых были активированы свободнорадикальные процессы (рис.7). Это свидетельствует об отсутствии

кардиопротекторного эффекта у данного лиганда μ-ОР в указанных условиях. Активация μ-ОР при помощи другого агониста этого типа рецепторов DALDA также не сопровождалась повышением резистентности миокарда к повреждающему воздействию окислительного стресса, о чем свидетельствует отсутствие достоверных различий по уровню КФК в перфузате между контрольной и опытной группами (рис. 7).

Стимуляция μ-рецепторов с помощью DAMGO способствовала снижению уровня малонового диальдегида в ткани миокарда на 40% относительно контрольной группы, но не влияла на уровень диеновых конъюгатов (табл. 3). Аналогичные изменения уровня продуктов ПОЛ были обнаружены и в препаратах миокарда, подвергшихся окислительному стрессу на фоне активации μ-ОР с помощью DALDA. Так, уровень МДА при этом снижался на 37%, а показатель ДК достоверно не изменялся относительно группы контроля (табл. 3).

Как известно, МДА образуется не только в результате деградации диеновых конъюгатов жирных кислот, но и в процессе образования простагландинов [242], поэтому снижение продукции МДА в ответ на стимуляцию μ-ОР могло явиться следствием угнетения биосинтеза некоторых простагландинов. Так, ранее нами было установлено, что агонисты μ- и δ-ОР способны угнетать биосинтез тромбоксана в миокарде [65, 70, 71, 78].

Стимуляция μ-рецепторов с помощью DAMGO ограничивала стресс-индуцированное снижение активности СОД и полностью устраняла вызванные активацией ПОЛ изменения активности каталазы (табл. 3). Сходные изменения активности СОД были обнаружены нами и в группе с предварительным введением DALDA.

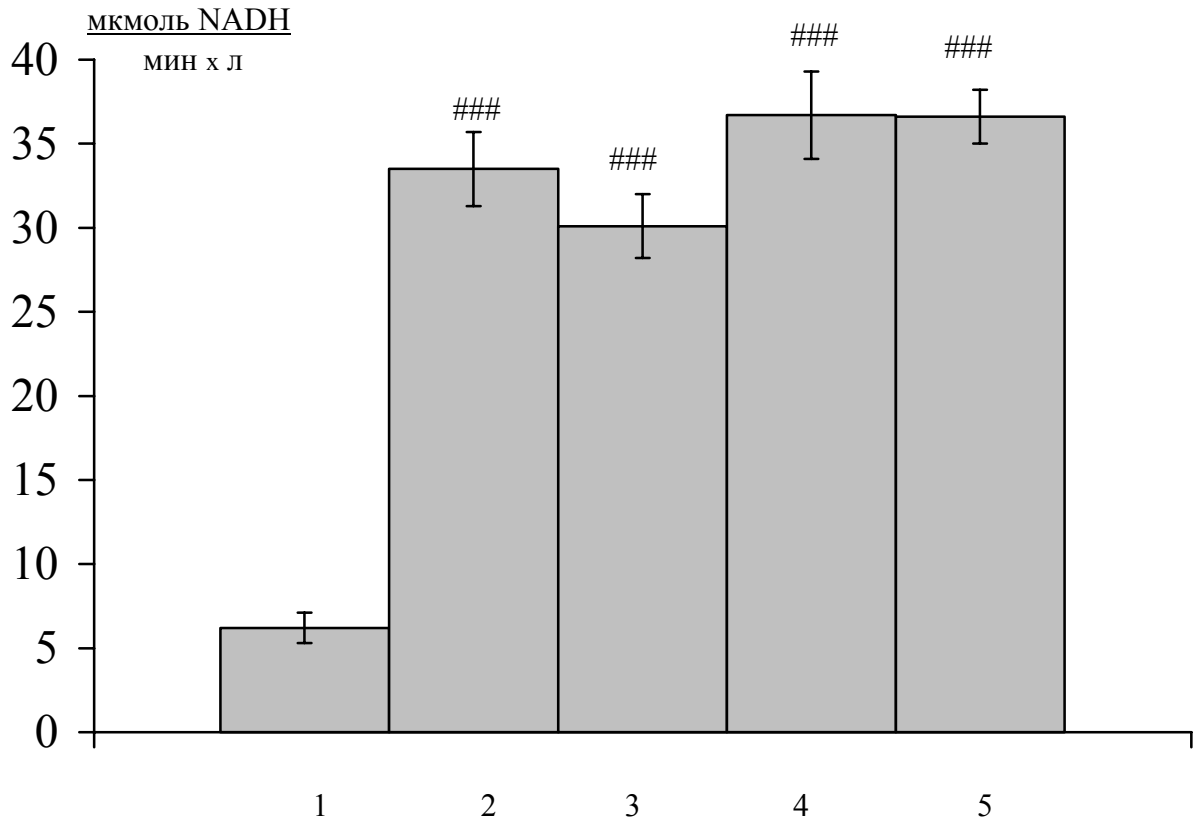


Рис. 7. Влияние лигандов μ-опиатных рецепторов на активность КФК в оттекающем от сердца перфузате при активации свободнорадикальных процессов.

Серии экспериментов:

1. Интактные сердца (n = 14)
2. Окислительный стресс (n = 14)
3. DAMGO + окислительный стресс (n = 12)
4. DALDA + окислительный стресс (n = 13)
5. CTAP + окислительный стресс (n = 14)

Примечания: ### p< 0,001 - достоверность различий по отношению к группе интактных животных; n – количество животных в группе.

Таблица 3

Влияние лигандов μ-опиатных рецепторов на уровень продуктов ПОЛ и активность антиокислительных ферментов в миокарде крыс при окислительном стрессе

Исследуемый показатель / Группа животных	МДА нмоль/г ткани	ДК ΔE_{232}/г ткани	Каталаза (ммоль/мин /1г белка)	СОД (ммоль/мин /мг белка)
Интактные n=15	1,19 ± 0,06	0,363 ± 0,021	15,2 ± 0,75	7,81 ± 0,15
Активация ПОЛ n=15	2,04 ± 0,14 $p_1 < 0,001$	0,445 ± 0,014 $p_1 < 0,01$	21,9 ± 1,41 $p_1 < 0,001$	2,23 ± 0,26 $p_1 < 0,001$
DAMGO (0,1 мг/кг, в/в) + активация ПОЛ n = 13	1,22 ± 0,04 $P_1 > 0,05$ $p_2 < 0,001$	0,437 ± 0,029 $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$	14,9 ± 0,61 $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,001$	4,27 ± 0,13 $P_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$
DALDA (0,1 мг/кг, в/в) + активация ПОЛ n = 13	1,29 ± 0,06 $P_1 > 0,05$ $p_2 < 0,001$	0,408 ± 0,060 $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$	21,5 ± 0,78 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$	4,80 ± 0,28 $P_1 < 0,05$ $p_2 < 0,01$
СТАР (0,1 мг/кг, в/в) + активация ПОЛ n = 13	2,01 ± 0,06 $P_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$	0,432 ± 0,017 $P_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$	18,4 ± 1,08 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	3,01 ± 0,18 $P_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$

Примечание : p_1 - достоверность различий относительно группы интактных сердец, p_2 - достоверность различий относительно группы сердец, подвергшихся окислительному стрессу; n –количество животных в группе.

Однако активность каталазы при этом не изменялась относительно контроля (табл.3).

Из полученных данных видно, что предварительная стимуляция μ-ОР предупреждает снижение активности СОД в ткани миокарда, вызванное индукцией свободнорадикальных процессов. Однако подобная μ-опиатергическая активация СОД, видимо, оказывается недостаточной для того, чтобы в полной мере защитить миокард от повреждающего действия активных форм кислорода. Свидетельством того может служить то, что в перфузате, оттекающем от сердец крыс, получавших агонисты μ-ОР, сохранялась такая же высокая активность КФК, как и в контрольной группе.

Сложно трактовать разнонаправленные изменения каталазной активности под влиянием агонистов μ-ОР в условиях окислительного стресса. Исходя из литературных данных снижение активности каталазы в группе с предварительным введением DAMGO, может проявляться в результате ингибирования этого фермента под влиянием NO [121, 196], увеличение синтеза которого показано при стимуляции μ-рецепторов эндоморфином [124]. С другой стороны остается открытым вопрос почему использование другого μ-агониста - DALDA - не сопровождалось изменением активности каталазы.

Введение антагониста μ-ОР CTAP, предшествующее окислительному стрессу, не приводило к достоверным изменениям выхода КФК в оттекающий перфузат (рис. 7) Нами не было также отмечено снижения интенсивности накопления МДА и ДК в ткани изолированного миокарда относительно контрольной группы (табл. 3). Исследование показателей

антиокислительной защиты миокарда в рассматриваемой группе показало, что фармакологическое "выключение" μ-ОР не сопровождалось какими-либо изменениями активности СОД. В то же время интенсивность энзиматического расщепления H_2O_2 превышала значения у интактных крыс, но была ниже, чем в группе контроля. Следовательно, устранение влияния эндогенной опиоидной системы на рецепторы μ-типа не сказывалось на резистентности миокарда к окислительному стрессу, и интенсивности протекания ПОЛ.

Суммируя результаты, представленные в этой главе, можно заключить, что как активация, так и блокада μ-ОР не вносила значимого вклада в формирование устойчивости миокарда к повреждающему действию окислительного стресса. При этом наблюдалось слабовыраженная способность агонистов μ-ОР контролировать процессы ПОЛ, что выражалось, в частности, в снижении уровня МДА, и стимулирующем эффекте на активность СОД. Регуляторное влияние μ-агонистов, оказываемое в отношении каталазной активности, неоднозначно и требует дальнейшего изучения. Блокада данного типа рецепторов не влила на интенсивность протекания процессов пероксидации липидов и показатели СОД, но способствовала снижению активности каталазы. Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что активация μ-ОР не играет ключевой роли в реализации кардиопротекторного и "антиоксидантного" эффектов опиоидов, отмеченных нами при влиянии окислительного стресса на миокард.

3.2.2. Изменение сократимости изолированного миокарда при окислительном стрессе, индуцированном на фоне in vivo-стимуляции μ-опиатных рецепторов

Как мы уже отмечали выше (глава 3.1.2.) моделирование окислительного стресса значительно нарушает сократительную активность изолированного миокарда, что проявлялось

снижением давления, развиваемого левым желудочком (ДРЛЖ), на 44 % относительно исходного уровня (рис. 4а). Это в свою очередь, сопровождалось снижением показателей максимальной скорости сокращения (МСС) и максимальной скорости расслабления (МСР) миокарда. Одновременно со снижением ДРЛЖ изолированного сердца мы отмечали увеличение на 42% конечного диастолического давления (КДД) по сравнению с показателем в конце периода адаптации (рис. 4б). Данный факт свидетельствует о формировании выраженной контрактуры сердца. Так же следует отметить, что оксидативное воздействие отрицательно сказывается на хронотропной функции миокарда.

Системное введение μ-агониста DAMGO способствовало увеличению ДРЛЖ. Так в условиях стандартной перфузии изолированного миокарда (рис. 8а) на фоне стимуляции μ-ОР этот показатель на 30% превышал аналогичные значения в интактном контроле. К сожалению, данный положительный инотропный эффект DAMGO не сохранялся при последующей стимуляции ПОЛ, когда значения ДРЛЖ не отличались от таковых в группе контрольных сердец. Активация μ-рецепторов путем системного введения DALDA также сопровождалась усилением насосной функции миокарда. Так, исходные значения ДРЛЖ в этой серии, зарегистрированные перед моделированием окислительного стресса, превышали контрольные показатели в на 26% (рис. 8а).

Динамика увеличения конечного диастолического давления в процессе стимуляции ПОЛ в группах с использованием μ-агонистов отличалась от таковой в контроле. Так в группе с предварительной инъекцией DAMGO наблюдалось достоверное относительно контрольной группы увеличение данного показателя в течение всего периода активации свободнорадикальных процессов (рис. 8б). Сходное по своей

динамике повышение КДД наблюдалось и в группе с предварительным введением DALDA. Так в первые 5 мин периода активации ПОЛ было зафиксировано увеличение КДД выше контрольных величин ($p<0,001$) (рис. 8б). В дальнейшем этот показатель оставался на достигнутом уровне и в конце периода активации ПОЛ не превышал значений в группе контроля.

Предварительная блокада μ-ОР с помощью СТАР не повлияла на исходное значение ДРЛЖ, а дальнейшая интенсификация пероксидации липидов способствовала более интенсивному, чем в группе контроля, снижению данного показателя (рис. 8а). В то же время, на протяжении всего эксперимента не было отмечено достоверных отличий по величине КДД (рис. 8б) между опытной и контрольной группами.

Обнаруженный нами положительный инотропный эффект in vivo-активации μ-ОР, по-видимому, связан с увеличением систолической концентрации Ca^{2+} в цитоплазме клетки. Так группой исследователей, возглавляемой проф. T.M. Wong, было показано, что активация μ-ОР изолированного сердца приводит к увеличению $[Ca^{2+}]_i$ за счет мобилизации последнего из СПР [166]. В то же время известно, что активные формы кислорода ингибируют Na^+/Ca^{2+}-обменник [173] и Ca^{2+}-АТФазы [179, 231]. Обнаруженное нами усиление контрактуры в процессе сочетанного воздействия активации ПОЛ и стимуляции μ-ОР, скорее всего, является результатом одновременного увеличения входа Ca^{2+} из СПР в миоплазму за счет активации μ-рецепторов и нарушения его элиминации из саркоплазмы в результате инактивации Ca^{2+}–АТФазы под действием свободных радикалов. Общеизвестно, что причиной контрактуры является повышение $[Ca^{2+}]i$, а перегрузка кардиомиоцитов ионами кальция ведет к усилению их повреждения [96].

В пользу участия μ-ОР в регуляции насосной функции миокарда свидетельствуют и результаты наших экспериментов с использованием μ-антагониста СТАР. Оказалось, что блокада этих рецепторов оказывает эффект, прямо противоположный их стимуляции. Так, если активация μ-ОР способствовала усилению сократимости миокарда, то “фармакологическое выключение” этих рецепторов сопровождалось более интенсивным, чем в группе контроля, снижением ДРЛЖ в периоде активации процессов ПОЛ. Вместе с тем, μ-антагонист СТАР, в отличие от μ-агонистов не влиял на величину “свободнорадикальной” контрактуры. Очевидно, блокада μ-ОР приводит к усугублению возникающих при активации ПОЛ нарушений сократительной функции миокарда за счет снижения мобилизации Ca^{2+} из СПР. В пользу подобного предположения говорят данные исследований группы проф. T.M. Wong, свидетельствующие об усиленной мобилизации Ca^{2+} из СПР при активации μ-ОР [166]. Логично предположить, что блокада μ-ОР может оказывать прямо противоположный эффект, то есть снижать амплитуду колебаний $[Ca^{2+}]_i$. Наблюдаемое в наших экспериментах снижение силы сокращения левого желудочка, скорее всего, является результатом кумуляции отрицательного влияния на инотропную функцию миокарда окислительного стресса и эффекта, вызванного блокадой μ-ОР.

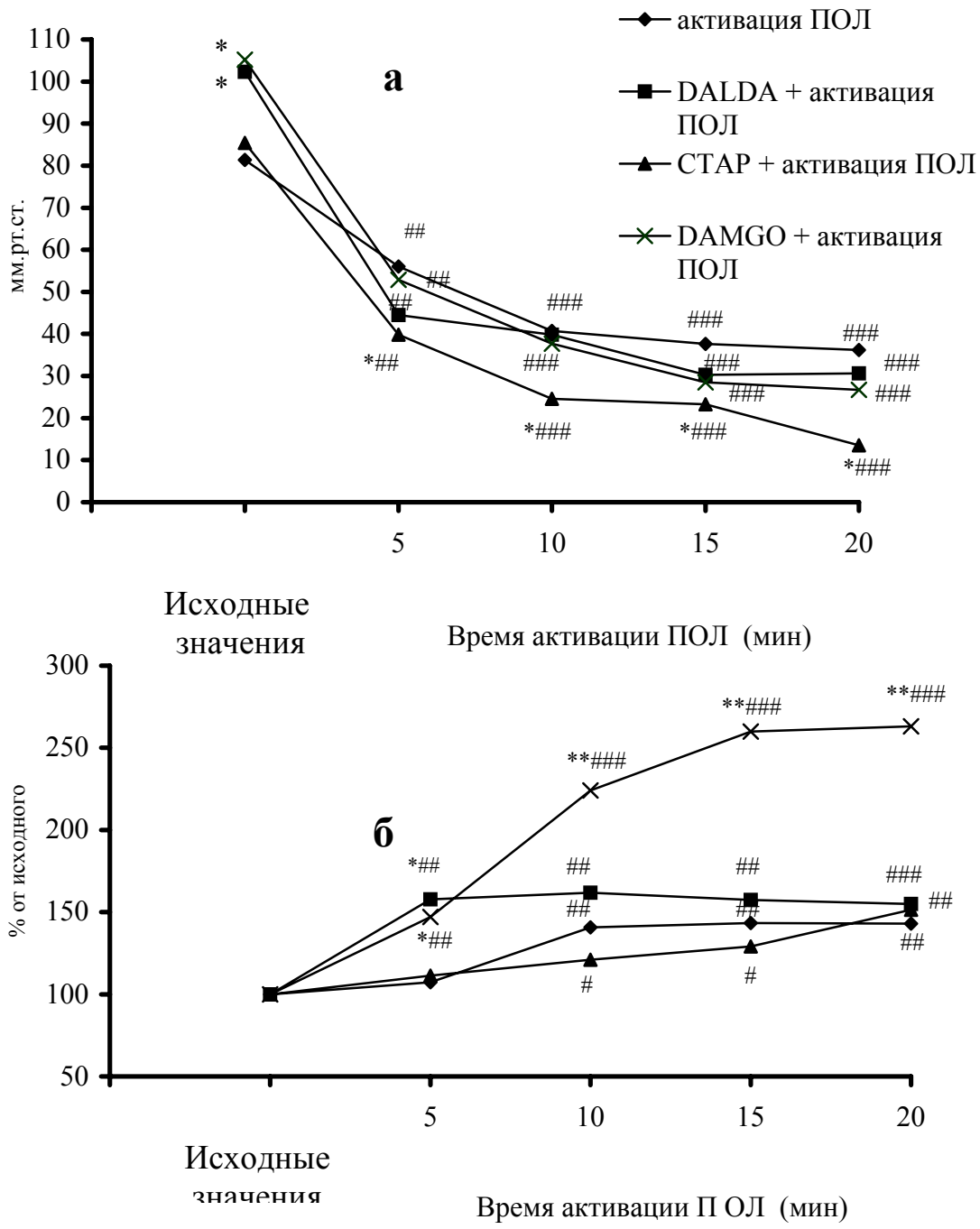


Рис. 8. Влияние окислительного стресса и предварительного введения лигандов μ-опиатных рецепторов на показатели давления, развиваемого левым желудочком, (а) и конечного диастолического давления (б). Примечания: # - достоверность различий по отношению к исходным величинам в группе $p<0,05$, ## - $p<0,01$, ### - $p<0,001$; * - достоверность различий по отношению к аналогичным

показателям группы сердец, в ткани которых было активировано ПОЛ (p<0,05), ** - p<0,01.

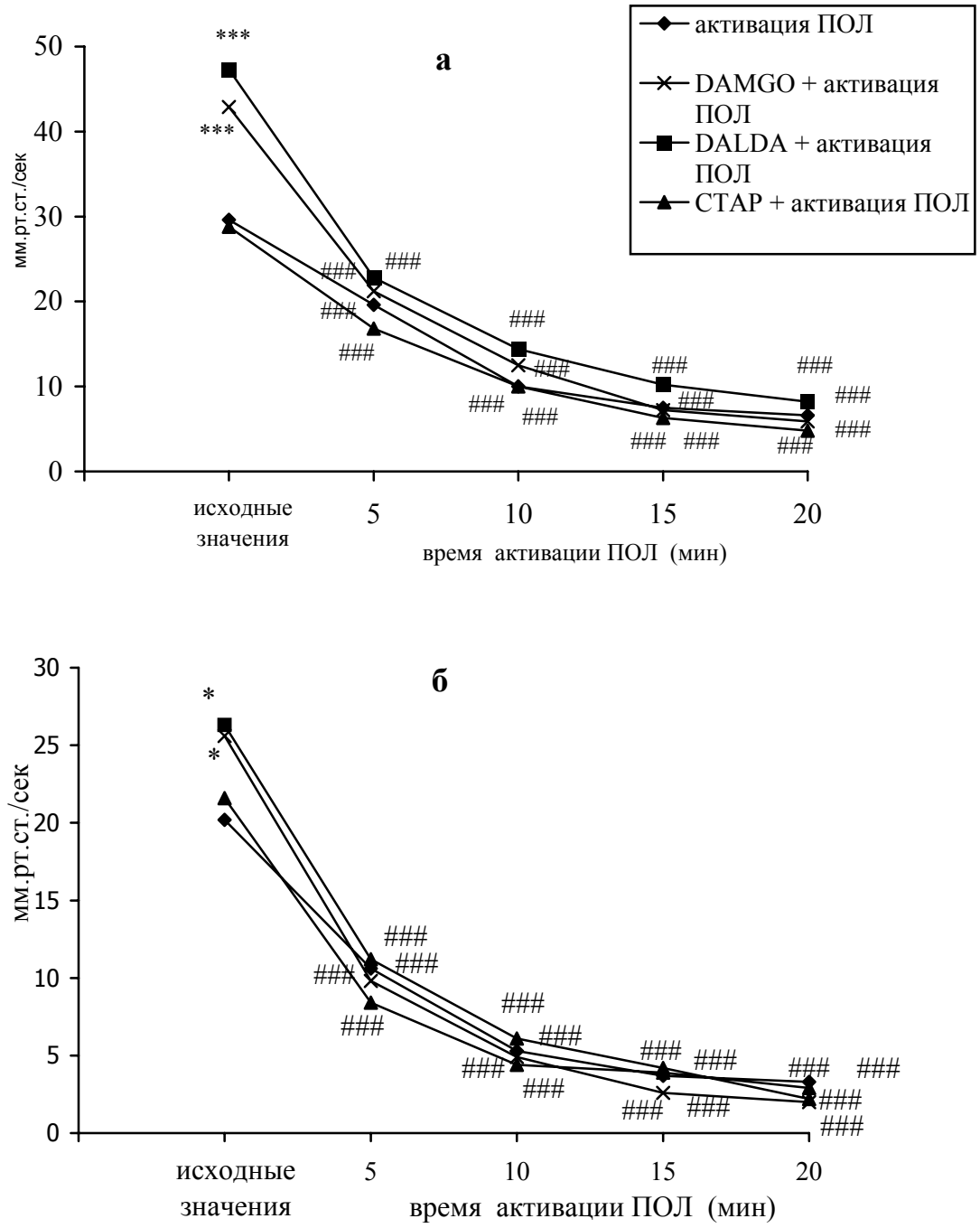


Рис. 9. Влияние системного введения лигандов μ-ОР на динамику изменения максимальной скорости сокращения (а) и максимальной скорости расслабления (б) в процессе моделирования окислительного стресса. Примечания: ### - достоверность различий по отношению к исходным значениям в группе (p<0,001). * - достоверность различий по отношению к

аналогичным показателям в группе контроля (p<0,05), *** - p<0,001.

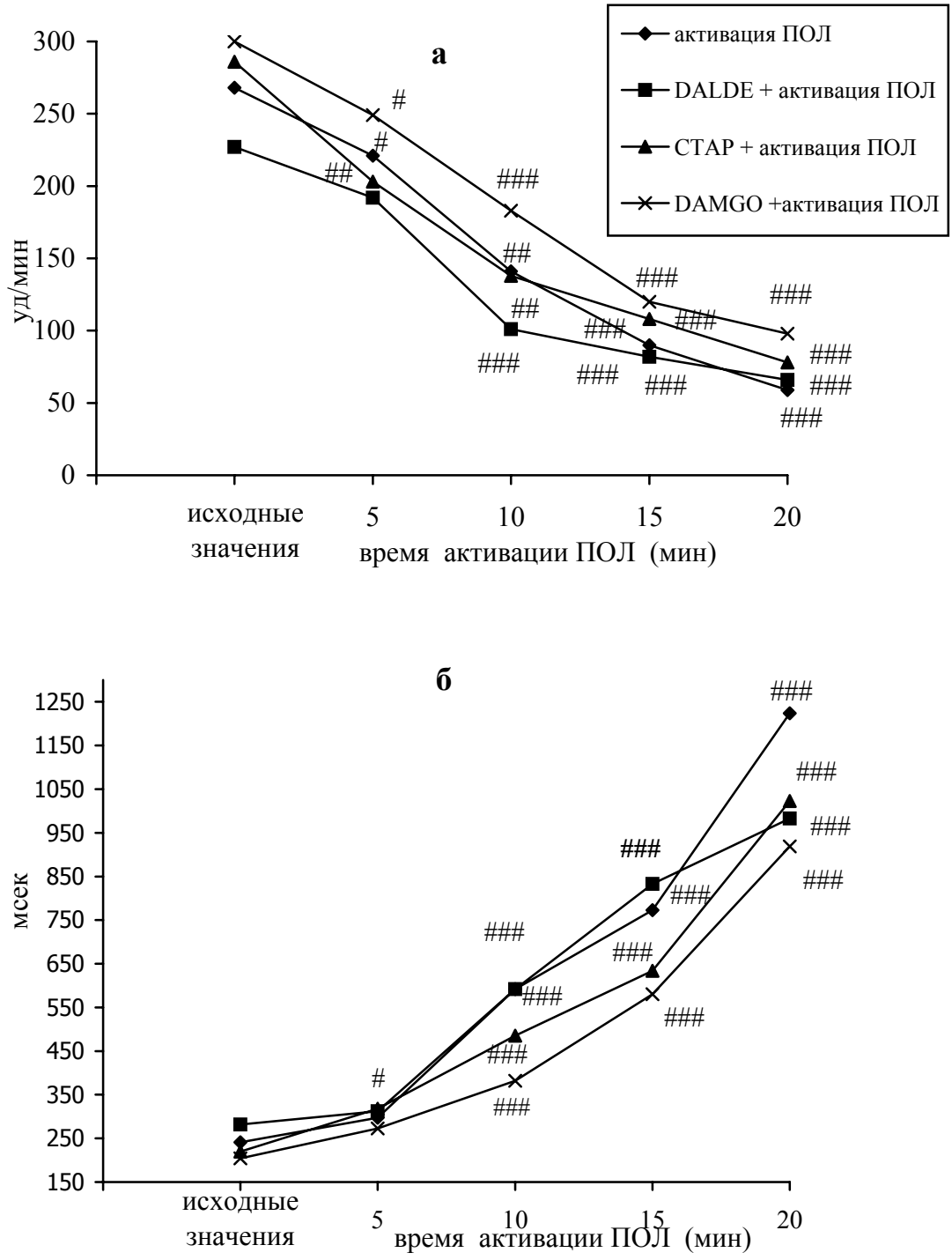


Рис. 10. Динамика изменений частоты сердечных сокращений (а) и времени длительности кардиоцикла (б) при моделировании окислительного стресса на фоне

предварительного системного введения лигандов μ-ОР. Примечания: # - достоверность отличий от исходных значений ($p<0,05$), ## - $p<0,01$, ###-$p<0,001$.

Парентеральное введение селективных μ-агонистов DAMGO и DALDA явилось причиной выраженного увеличения максимальной скорости сокращения (МСС) и расслабления (МСР) изолированной сердечной мышцы (рис. 9). Увеличение МСС косвенно свидетельствует об ускорении поступления Ca^{2+} в саркоплазму кардиомиоцитов, а повышение МСР позволяет говорить об увеличении скорости его элиминации из миоплазмы, поскольку процессы сокращения и расслабления кардиомиоцитов напрямую зависят от колебаний $[Ca^{2+}]_i$ [39]. Согласно литературным данным основными внутриклеточными либераторами саркоплазматического кальция являются цАМФ [122, 189] и инозитолтрифосфат [202]. Исходя из этого можно предположить, что положительное влияние агонистов μ-ОР на скоростные характеристики процесса сокращения миокарда опосредуется через стимуляцию синтеза инозитолтрифосфата или цАМФ. В то же время стимуляция μ-ОР в наших экспериментах сопровождалась также увеличением скорости релаксации миокарда, что косвенно свидетельствует об усилении энергозависимого процесса элиминации Ca^{2+} из миоплазмы кардиомиоцитов. Этот эффект также может быть опосредован через увеличение внутриклеточного уровня цАМФ, который, как известно, одновременно увеличивает и скорость мобилизации Ca^{2+} из СПР, и скорость депонирования Ca^{2+} в саркоплазматическом ретикулуме [122]. Однако данные литературы свидетельствуют о том, что опиоиды, напротив, способствуют снижению уровня цАМФ в кардиомиоцитах [65], поэтому механизм обнаруженного нами увеличение МСС и МСР требует дальнейшего всестороннего изучения.

Активация свободнорадикальных процессов в сердцах, составивших группы с внутривенным введением DAMGO и DALDA, сопровождалась снижением МСС и МСР до значений в контрольной группе (рис. 9). Это лишний раз свидетельствует об отсутствии у исследуемых пептидов способности предупреждать нарушения ионной проницаемости мембраны, вызванные окислительным стрессом.

Системная блокада μ-ОР при парентеральном введении СТАР не сопровождалась достоверными изменениями значений максимальных скоростей сокращения и расслабления как до-, так и на фоне стимуляции ПОЛ (рис. 9), что можно трактовать в пользу отсутствия тонической опиоидной регуляции процессов, определяющих динамику $[Ca^{2+}]i$ в течение кардиоцикла.

Исследование хронотропных эффектов лигандов μ-ОР показало, что внутривенное введение агонистов или антагониста не вызывало достоверных изменений ЧСС и длительности кардиоцикла как до окислительного стресса, так и в процессе его моделирования (рис.10). Этот факт, свидетельствует, что активация μ-ОР не отражается на функции клеток водителя ритма и проводящей системы сердца.

Таким образом, приведенные в настоящем разделе данные показывают, что стимуляция μ-ОР сопровождается увеличением давления, развиваемого левым желудочком, МСС и МСР в условиях нормы, но не предупреждает депрессии этих показателей в результате активации свободнорадикальных процессов. В то же время агонисты μ-ОР усугубляют развивающуюся в процессе окислительного стресса контрактуру, что, несомненно, сказывается на сократительной способности миокарда. Блокада данного типа рецепторов потенцирует отрицательный инотропный эффект окислительного стресса. Эти данные свидетельствуют в пользу участия μ-

опиатных рецепторов и эндогенных μ-агонистов в регуляции сократимости миокарда в норме и в условиях активации свободнорадикальных процессов.

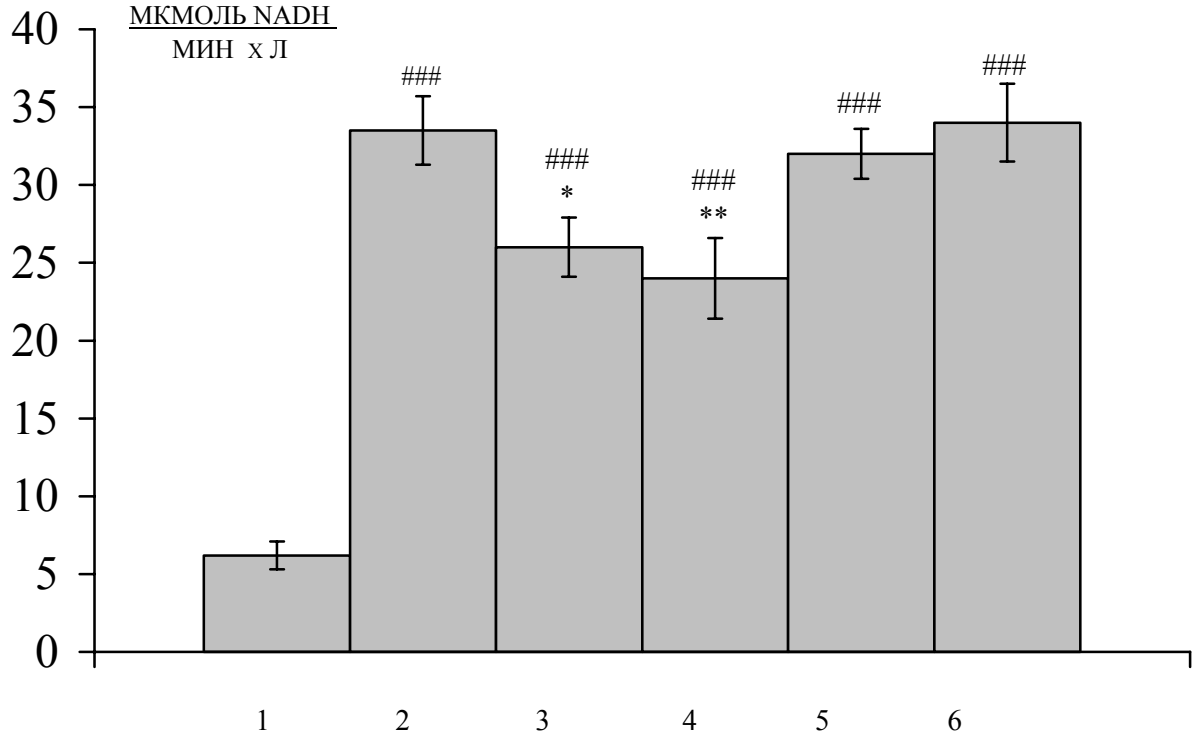
3.3. Стимуляция δ-опиатных рецепторов как способ повышения устойчивости изолированного сердца к повреждающему действию активных форм кислорода

В предыдущих разделах работы нами были представлены результаты, свидетельствующие о связанном с активацией опиатных рецепторов повышении резистентности миокарда к окислительному стрессу. Указанное повышение устойчивости миокарда сочеталось с уменьшением интенсивности процессов пероксидации липидов и повышением активности СОД. Также было отмечено отсутствие кардиопротекторных и "антиоксидатных" свойств у селективных агонистов μ-ОР DALDA и DAMGO. Перечисленные факты позволили нам предположить, что основной вклад в опиатергическое повышение толерантности миокарда к повреждающему воздействию окислительного стресса вносят рецепторы δ-типа.

3.3.1. Процессы перекисного окисления липидов и антиокислительная защита миокарда при свободнорадикальном повреждении изолированного сердца на фоне системного введения лигандов δ-опиатных рецепторов

Предшествующее окислительному стрессу системное введение селективного δ-агониста DSLET способствовало

уменьшению активности КФК в оттекающем от поврежденного сердца перфузате в 1,4 раза по сравнению с группой контроля (рис. 11), что свидетельствует о повышении резистентности кардиомиоцитов к патогенному воздействию активных форм кислорода. Аналогичный эффект мы наблюдали и при использовании другого селективного агониста δ-ОР DTLET (рис. 11). Полученные данные подтверждают выдвинутое нами предположение об участии δ-опиатных рецепторов в повышении



толерантности миокарда к окислительному стрессу.

Рис. 11. Влияние селективных лигандов δ-опиатных рецепторов на интенсивность выхода КФК в оттекающий от изолированного сердца перфузат при активации свободнорадикальных процессов.

Серии экспериментов:

1. Интактные сердца (n = 14)
2. Окислительный стресс (n = 14)
3. DSLET + окислительный стресс (n = 12)
4. DTLET + окислительный стресс (n = 13)
5. ICI + окислительный стресс (n = 14)

6. ICI + DSLET + окислительный стресс (n = 14)

Примечания: ### - достоверность различий относительно группы интактных животных (p<0,001); * - достоверность различий относительно группы сердец, подвергшихся окислительному стрессу (p<0,05), ** - p<0,01; n – количество животных в группе.

Проведение серии экспериментов с совместным введением антагониста δ-рецепторов -ICI 174,684 и агониста - DSLET показало, что предварительная блокада рецепторов данного типа препятствует реализации кардиопротекторного эффекта DSLET в условиях активации свободнорадикальных процессов. Так, уровень КФК в перфузате, оттекающем от сердец рассматриваемой группы, достоверно не изменялся относительно контроля (моделирование окислительного стресса) (рис. 11). Следует отметить, что селективная блокада δ-ОР с помощью внутривенного введения ICI 174,684 не отражалась на интенсивности выхода КФК в перфузат (рис.11). Полученный факт служит еще одним подтверждением того, что в реализации кардиопротекторного эффекта опиоидов в данных условиях ведущую роль играет активация δ-ОР.

В условиях предварительной активации δ-ОР при помощи внутривенного введения DSLET или DTLET нами было отмечено снижение уровня накопления в миокарде продуктов ПОЛ по сравнению с группой контроля. Так, после предварительной инъекции DSLET содержание ДК уменьшалось на 13,7%, а МДА - на 33,8% относительно контрольной группы сердец, подвергшихся окислительному стрессу (табл. 4). Предварительное системное введение DTLET в тех же условиях способствовало снижению уровня ДК на 16,4% , а МДА на 46,6% (табл. 4).

Определение активности антиокислительных ферментов в образцах миокарда животных, составивших опытные группы, показало, что предварительное введение синтетических опиоидов предупреждает ингибирование СОД, наблюдаемое при моделировании окислительного стресса. Как видно из таблицы 4, показатели активности СОД в образцах миокарда этих групп достоверно превышали контрольные значения и не отличались от интактных. Вместе с тем, введение исследуемых нами δ-

агонистов приводило к снижению уровня каталазной активности, относительно группы сердец, подвергшихся оксидативному воздействию. Однако значения этого показателя достоверно превышали интактный уровень.

Таблица 4

Участие лигандов δ-опиатных рецепторов в регуляции интенсивности перокисидации липидов и активности антиокислительных ферментов в миокарде крыс при окислительном стрессе (X±m).

Исследуемый показатель / Группа животных	МДА нмоль/г ткани	ДК ΔE_{232}/г ткани	Каталаза ммоль/мин /г белка	СОД ммоль/мин/ мг белка
Интактные n=15	1,19 ± 0,06	0,363 ± 0,021	15,2 ± 0,75	7,81 ± 0,25
Активация ПОЛ n=15	2,04 ± 0,14 $p_1 < 0,001$	0,445 ± 0,014 $p_1 < 0,01$	21,9 ± 1,41 $p_1 < 0,001$	2,23 ± 0,26 $p_1 < 0,001$
DSLET (0,1 мг/кг в/в) + активация ПОЛ n = 12	1,35 ± 0,04 $P_1 > 0,05$ $p_2 < 0,001$	0,384 ± 0,013 $P_1 > 0,05$ $p_2 < 0,001$	17,9 ± 0,54 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,01$	7,87 ± 0,36 $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,001$
DTLET (0,1 мг/кг в/в) + активация ПОЛ	1,09 ± 0,05 $P_1 > 0,05$ $p_2 < 0,001$	0,372 ± 0,018 $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,01$	18,7 ± 0,36 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$	8,94 ± 0,47 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,001$

n = 12				

ICI (2,5 мг/кг в/в) + активация ПОЛ n = 10	1,78 ± 0,05 $P_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$	0,469 ± 0,012 $P_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$	19,7 ± 0,83 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$	3,24 ± 0,38 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$
ICI (2,5 мг/кг в/в) + DSLET (0,1 мг/кг в/в) + активация ПОЛ n = 10	1,99 ± 0,07 $P_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$	0,479 ± 0,013 $P_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$	20,45 ± 0,73 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$	3,15 ± 0,29 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$

Примечание: p_1 - достоверность различий относительно группы интактных сердец, p_2 - достоверность различий относительно руппы серцец, перфузированных Fe^{+2} -аскорбат в течении 20 мин.

Исходя из полученных нами данных, можно предположить, что подавление процессов ПОЛ реализуется за счет положительного влияния стимуляции δ-ОР на активность антиокислительных ферментов, так как в группах с предварительным введением DSLET или DTLET нами было отмечено восстановление активности СОД до уровня интактных сердец, и сохранение активности каталазы выше значений в интактной группе. Общеизвестно, что каталаза способствует инактивации H_2O_2, образующейся в реакции дисмутации $O^{\bullet}_{2}$ под действием СОД. В данном случае эти два фермента работают сопряжено и одновременное увеличение их активности в

условиях окислительного стресса при предварительной стимуляции δ-ОР обеспечивает утилизацию активных форм кислорода и их метаболитов и, следовательно, способствует снижению как интенсивности свободно-радикального окисления липидов, так и накопления кардиотоксических продуктов, образующихся в процессе ПОЛ. В свою очередь снижение интенсивности ПОЛ, связанное с введением δ-агонистов, обеспечивает повышение толерантности миокарда к окислительному стрессу.

Из таблицы 4 видно, что блокада δ-ОР с помощью ICI 174,684 не оказывала достоверного влияния на уровень накопления МДА и ДК и активность антиокислительных ферментов в ткани миокарда, подвергшегося свободнорадикальному воздействию. Это позволяет исключить участие эндогенных энкефалинов в тонической регуляции процессов, определяющих устойчивость миокарда к патогенному воздействию активных форм кислорода.

Отмеченная нами способность δ-агонистов подавлять чрезмерно интенсивное протекание процессов ПОЛ и оказывать регуляторное влияние на активность ферментов антиокислительной защиты миокарда носит рецептор-опосредованный характер. Доказательством этого служит тот факт, что блокада данного типа рецепторов, предшествующая инъекции DSLET, сопровождается достоверным ($p<0,01$) увеличением содержания продуктов пероксидации и падением активности СОД по отношению к группе животных, получавших предварительно только DSLET (табл. 4).

Остается открытым вопрос о механизмах опиатергической регуляции ферментативной активности СОД и каталазы. Имеющиеся в литературе сведения, указывающие на участие NO в опосредовании вазоактивных эффектов энкефалинов [124], и данные, свидетельствующие о регуляторном влиянии NO на

активность СОД в условиях ишемии-реперфузии [251], позволили нам предположить возможность участия NO в реализации регуляторного влияния синтетических энкефалинов на активность СОД в условиях окислительного стресса. Существуют в литературе указания и на то, что регуляторному воздействию NO подвержен другой исследуемый нами фермент – каталаза [121, 196], что также даёт возможность рассматривать NO в качестве внутриклеточного посредника эффектов, связанных со стимуляцией ОР. В то же время, в ряде работ отмечается, что сама молекула NO обладает прямыми антиоксидантными свойствами [87, 172, 201] за счет способности инактивировать активные формы кислорода. В связи с вышесказанным, нами было проведено исследование возможного участия NO в реализации кардиопротекторного и "антиоксидантного" эффектов лигандов δ-ОР. Результаты этих экспериментов будут представлены в главе 3.4.

Таким образом, представленные результаты позволяют сделать вывод об участии опиатных рецепторов δ-типа в формировании устойчивости сарколеммы, поскольку системная стимуляция этих рецепторов способствует уменьшению степени повреждения миокарда, вызванных окислительным стрессом, а их предварительная блокада нивелирует кардиопротекторный эффект экзогенных агонистов. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о важной роли СОД и каталазы в механизмах реализации эффектов агонистов δ-ОР, в отношении процессов пероксидации липидов в ткани миокарда при окислительном стрессе.

Обнаруженная нами способность синтетических агонистов предупреждать повышенное образование продуктов ПОЛ и снижение активности СОД носит δ-рецептор опосредованный характер. В то же время, оставались открытыми вопросы о том рецепторы какой локализации (кардиальной или

экстракардиальной) принимают участие в реализации защитного эффекта опиоидов, и какие внутриклеточные посредники принимают в этом участие. Исследования, предпринятые для решения этих вопросов, будут представлены в последующих разделах диссертации.

3.3.2. Влияние внутривенного введения лигандов δ-опиатных рецепторов на показатели сократительной функции миокарда при окислительном стрессе

Мы уже отмечали, что при окислительном стрессе значительно нарушается сократительная активность изолированного сердца. Как показано на рисунке 12а, давление, развиваемое левым желудочком (ДРЛЖ) сердца животных контрольной группы снижалось в течение всего периода активации свободнорадикальных процессов и составило в конце эксперимента 44,5% от исходных показателей. Одновременно со снижением ДРЛЖ изолированного сердца мы зафиксировали увеличение на конечного диастолического давления 42,8% (рис.12 б), что свидетельствует о формировании контрактуры кардиомиоцитов. Наряду с этим, в контрольной группе при моделировании окислительного стресса наблюдалось падение частоты сердечных сокращений (рис 14а) и скоростных характеристик процессов сокращения и расслабления миокарда(рис. 13 а, б).

Активация δ-ОР путем внутривенного введения DSLET или DTLET не оказывала достоверно значимого влияния на показатели ДРЛЖ изолированного сердца как до-, так и в процессе активации перекисного окисления липидов (рис 12а). Не было отмечено и достоверного влияния исследуемых δ-агонистов на степень контрактуры сердечной мышцы, формирующейся в процессе окислительного стресса (рис. 12

б). Результаты проведенных экспериментов показывают, что активация δ-ОР не защищает сократительный аппарат кардиомиоцитов от воздействия активных форм кислорода.

Блокада δ-ОР с помощью селективного антагониста ICI 174,684 не повлияла на исходные значения рассматриваемых показателей функциональной активности миокарда (рис. 12а,б), но вызвала более интенсивное, по сравнению с контролем, снижение систолического давления в левом желудочке (рис. 12а). На 15-20 мин моделирования окислительного стресса эти различия становились достоверно значимыми. У сердечно-мышечных препаратов этой группы на 5 минуте активации свободнорадикальных процессов наблюдался достоверный подъём конечного диастолического давления (рис. 12б). На последующих сроках эксперимента сохранялась лишь тенденция к повышенным значениям этого показателя. Полученные результаты позволяют предположить определённое участие эндогенных лигандов опиоидной системы в регуляции инотропной функции миокарда при патологически высокой активности свободнорадикальных процессов. При совместном введении δ-антагониста и δ-агониста на протяжении всего периода оксидативного воздействия сохранялся отмеченный для ICI 174.864 отрицательный инотропный эффект, но не было отмечено развития высокого диастолического давления (рис. 12а,б).

Из литературы известна способность δ-агонистов увеличивать $[Ca^{2+}]i$ в изолированных кардиомиоцитах [238, 239, 249]. Кроме того агонисты δ-рецепторов способны модулировать транспорт Ca^{2+} на уровне саркоплазматического ретикулума [249].

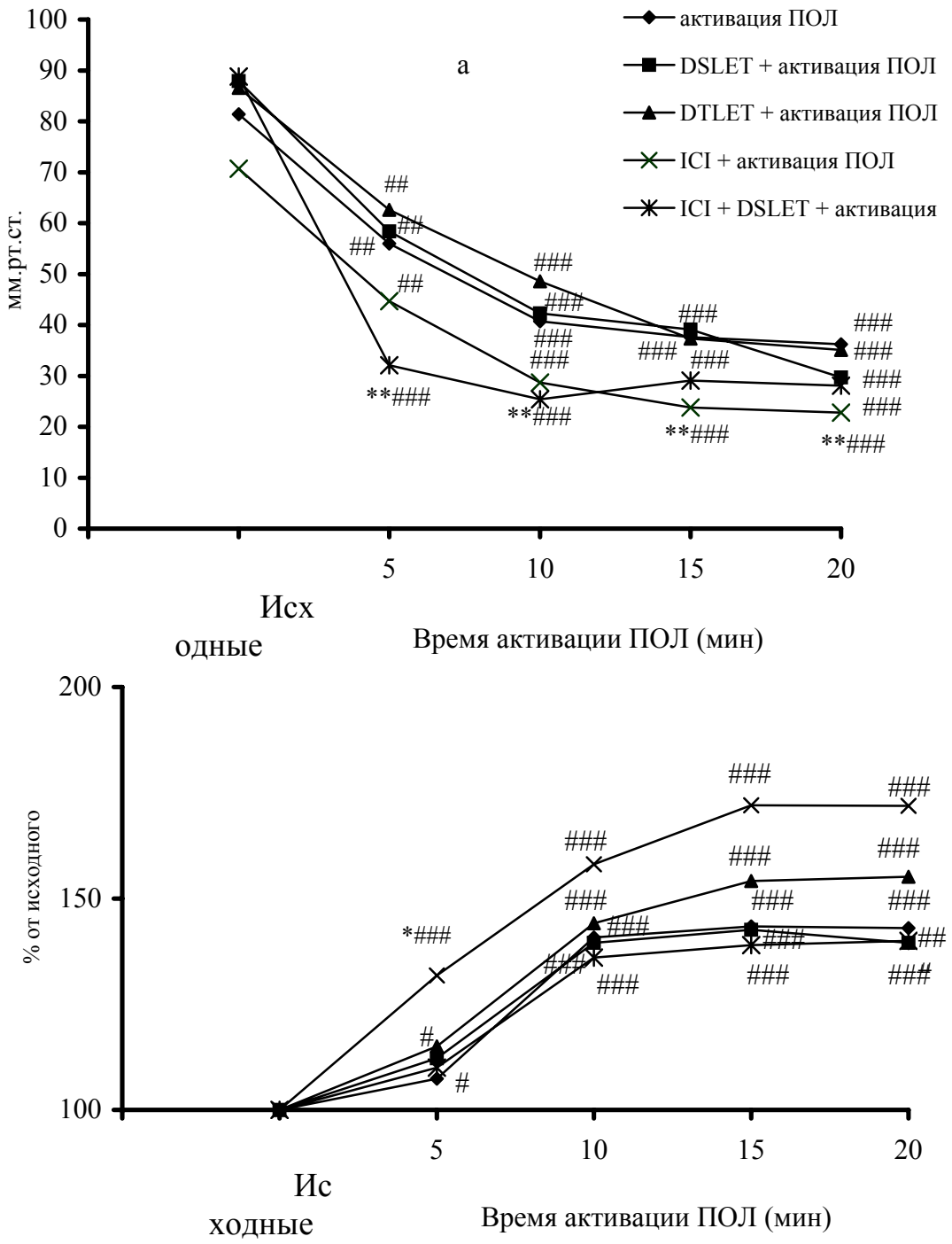


Рис. 12. Влияние окислительного стресса на фоне предварительного внутривенного введения лигандов δ-опиатных рецепторов на показатели давления, развиваемого левым желудочком, (а) и конечного диастолического давления (б); # - достоверность различий относительно исходных значений в группе ($p<0,05$), ## - $p<0,01$, ### - $p<0,001$; * - достоверность различий относительно группы сердец в ткани которых было активировано ПОЛ ($p< 0,05$),

** - p<0,01.

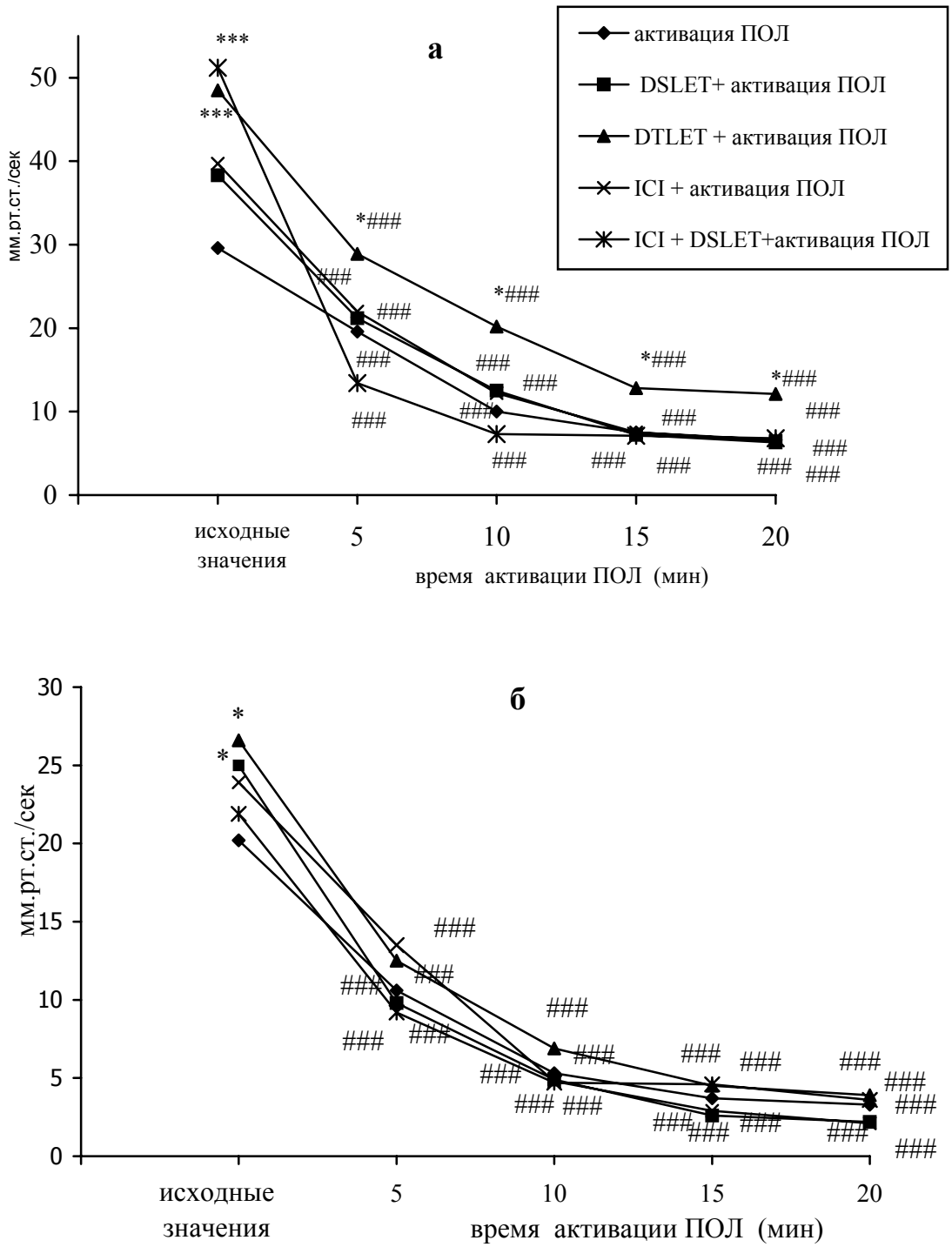


Рис. 13. Влияние системного введения лигандов δ-ОР на динамику изменения максимальной скорости сокращения (а) и максимальной скорости расслабления (б) в процессе моделирования окислительного стресса.

Примечание: ### - достоверность различий по отношению к исходным значениям в группе ($p<0,001$); * - достоверность

различий относительно контрольной группы ($p<0,05$), *** - $p<0,001$.

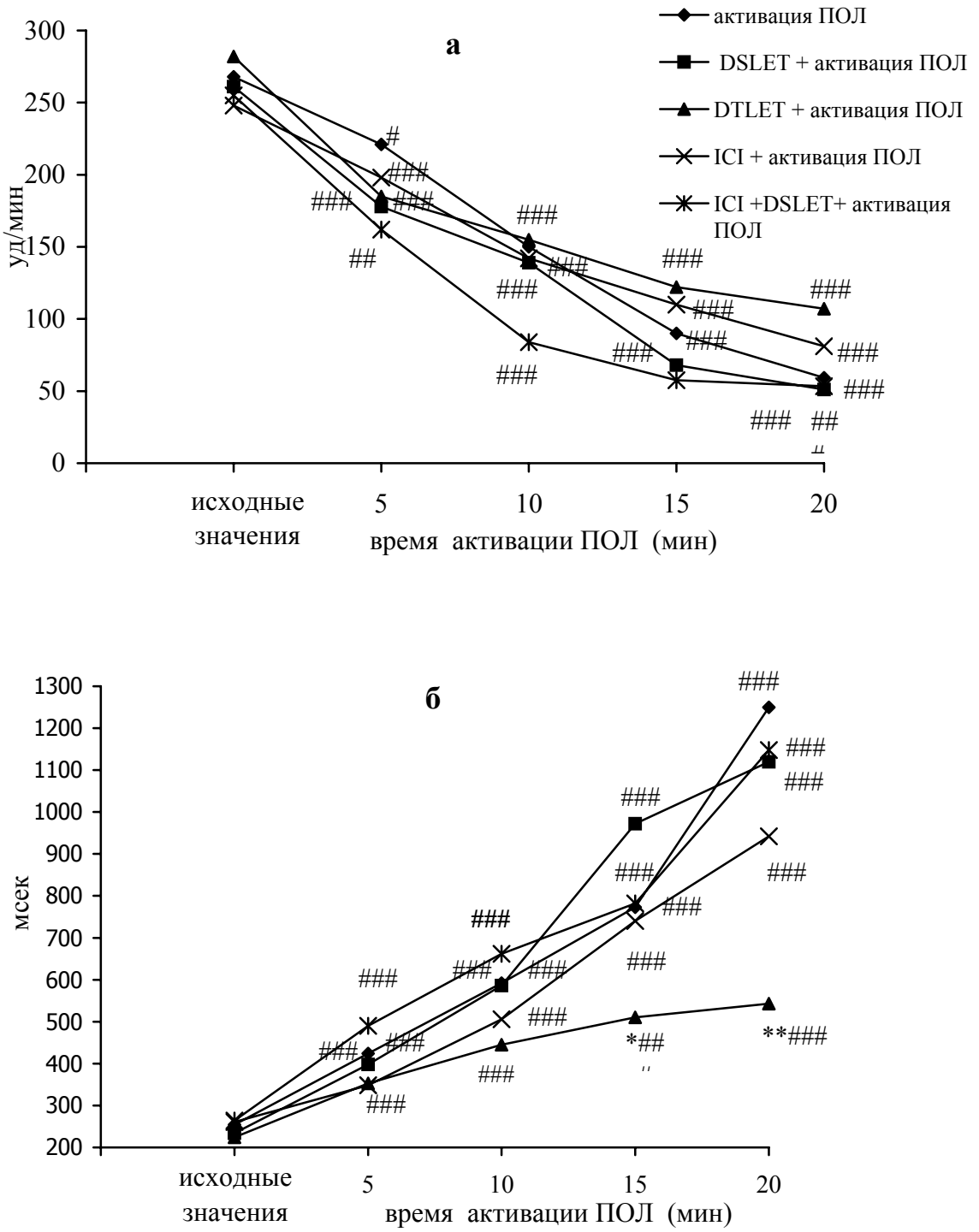


Рис. 14. Изменение частоты сердечных сокращений (а) и времени длительности кардиоцикла (б) при моделировании окислительного стресса на фоне блокады и стимуляции δ-опиатных рецепторов.

Примечание: ## - достоверность отличий от исходных значений в группе ($p<0,01$), ### - $p<0,001$; * -

достоверность отличий от группы контроля ($p<0,05$), ** - $p<0,01$.

В связи с этим логично предположить, что блокада данного типа рецепторов может оказывать прямо противоположный эффект, то есть снижать амплитуду $[Ca^{2+}]i$, что и объясняет наличие отрицательного инотропного эффекта у антагониста δ-рецепторов в условиях окислительного стресса. Отсутствие положительного инотропных эффектов у использованных в наших экспериментах агонистов δ-ОР, вероятно, обусловлено особенностями выбранного нами объекта исследования.

Активация δ-ОР при внутривенном введении DSLET или DTLET сопровождалась повышением исходных значений скоростных характеристик процессов сокращения и расслабления миокарда. Так в группе животных, получивших внутривенно DSLET, значение МСС, зарегистрированное до моделирования окислительного стресса, превышало в 1,3 раза таковое в контрольной группе (рис. 13а,б), а предварительная инъекция DTLET способствовала увеличению исходного значения МСС в 1,6 раза (рис. 13а). В группах сердец, полученных от животных с введением лигандов ОР, так же было отмечено увеличение в 1,3 раза показателя МСР относительно контроля (рис. 13б). Увеличение МСС и МСР, с одной стороны, косвенно свидетельствует об ускорении поступления Ca^{2+} в саркоплазму кардиомиоцитов, а с другой стороны, позволяет говорить об увеличении скорости элиминации этого иона из миоплазмы, поскольку процессы сокращения и расслабления кардиомиоцитов напрямую зависят от колебаний $[Ca^{2+}]i$ [39, 96].

В процессе окислительного стресса в рассматриваемых группах наблюдалась неоднозначная динамика МСС и МСР. Так, DSLET не предупреждал падения скоростей сокращения и

расслабления под влиянием активных форм кислорода, а DTLET способствовал сохранению достоверно высокого относительно контроля уровня МСС, но не оказывал существенного влияния на МСР. Очевидно, проявление положительного эффекта на показатель МСС в процессе моделирования окислительного стресса на фоне введения DTLET обусловлено индивидуальными свойствами данного препарата ускорять процесс выхода Ca^{2+} из СПР, которое не присуще всем без исключения агонистам данного типа рецепторов.

Высокие значения МСС и МСР в группе животных, получавших и δ-агонист, и δ-антагонист (рис. 13а,б), свидетельствуют, что положительное влияние DSLET на эти показатели обусловлено, вероятнее всего, его неспецифическим влиянием на внутриклеточные механизмы, отвечающие за Ca^{2+}-гомеостаз клетки. В этом плане следует отметить и то, что селективная блокада δ-рецепторов ICI 174,864 не сопровождалась изменениями значений МСС и МСР (рис. 13 а, б).

Оценка хронотропной функции миокарда показала, что активация δ-ОР при помощи DSLET не сопровождается достоверными изменениями частоты сердечных сокращений на протяжении всего эксперимента (рис. 14а). В группе с парентеральным введением DTLET в период активации свободнорадикальных процессов наблюдалась тенденция к увеличению ЧСС по сравнению с контролем. К 20 минуте экспериментального воздействия это увеличение становилось достоверным. Аналогичные изменения в группах претерпевал и показатель длительности кардиоцикла (рис. 14 б). При использовании в качестве агониста DSLET нами не было зарегистрировано различий показателя показателя длительности кардиоцикла по сравнению с контролем(рис. 14б). А в результате предварительной инъекции DTLET

отмечалось достоверное уменьшение данного показателя на 15 и 20 мин экспериментального воздействия, что также свидетельствует об улучшении хронотропной функции миокарда при использовании данного пептида. Блокада δ-ОР с помощью внутривенного введения ICI 174,864 не приводила к достоверным изменениям показателей хронотропной функции миокарда (рис. 14а,б). В то же время, его инъекция, предшествующая системному введению DSLET, сопровождалась усугублением отрицательного инотропного влияния окислительного стресса на 10 и 20 минутах (рис. 14а), при этом не было отмечено увеличения длительности кардиоцикла (рис 14б).

Суммируя полученные результаты об участии δ-рецепторов в регуляции функциональной активности миокарда как в физиологических условиях, так и при моделировании окислительного стресса, можно сделать заключение, что их вклад в этот процесс менее значим по сравнению с μ-ОР. Такой вывод возможно сделать поскольку in vivo-стимуляция δ-рецепторов не отражалась на параметрах сократимости миокарда на протяжении всего эксперимента, в то время как активация μ-ОР сопровождалась положительным инотропным эффектом в условиях стандартной перфузии миокарда. Блокада δ-ОР усугубляла снижение систолического давления в левом желудочке, вызванное влиянием активных форм кислорода на миокард. Отмеченный отрицательный инотропный эффект δ-антагониста сохранялся и при совместном использовании антагониста и агониста δ-рецепторов. Несмотря на то, что активация δ-ОР сопровождалась повышением резистентности сарколеммы кардиомиоцитов к влиянию активных форм кислорода и снижением интенсивности накопления продуктов ПОЛ, мы не обнаружили в наших экспериментах положительных изменений

сократимости изолированного миокарда, нарушенной в результате окислительного стресса.

3.3.3. Роль кардиальных рецепторов в реализации протекторного эффекта δ-лигандов

Эксперименты, посвященные изучению вклада μ- и δ-субпопуляций ОР в формирование резистентности миокарда к повреждающему действию окислительного стресса, показали, что ведущую роль в этих процессах играет активация рецепторов δ-типа. Согласно нашей рабочей гипотезе, основанной на полученных ранее результатах, в механизмах опиатергической защиты миокарда от воздействия активных форм кислорода принимают участие антиоксиданты и простагландины. Использованный нами при проведении экспериментов метод внутривенного введения лигандов опиатных рецепторов не позволил однозначно ответить на вопрос о том, прямо или опосредованно через другие регуляторные системы организма оказывают свое влияние ОП на процессы ПОЛ и биосинтез простагландинов в миокарде. Для решения поставленных вопросов нами были проведены эксперименты с введением агонистов ОР in vitro в раствор Кребса-Хензелайта.

Перфузия изолированных сердец в течение 5 мин раствором, содержащим 2 мг/л смешанного агониста μ- и δ-ОР даларгина, не повлияла на устойчивость сарколеммы кардиомиоцитов к окислительному стрессу. Нами не было отмечено достоверных различий активности КФК в оттекающем от сердец перфузате контрольной и опытной групп (рис. 15). Использование in vitro 0,1 мг/л селективного агониста δ-ОР

DSLET в течении 15 мин также не сопровождалось снижением активности КФК в перфузате, оттекающем от сердец данной группы (рис. 15). Следовательно, повышение резистентности сарколеммы кардиомиоцитов, обусловленное активацией δ-ОР, наблюдается лишь при системном введении агонистов данного типа рецепторов и,

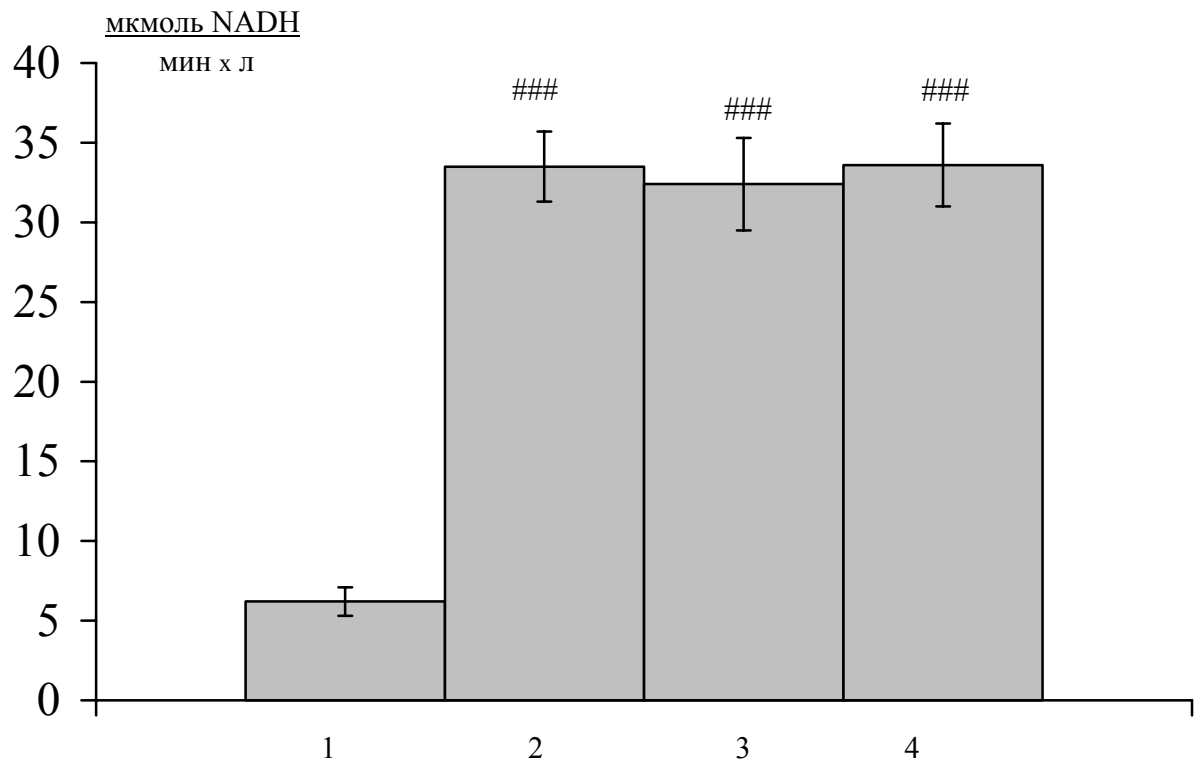


Рис. 15. Влияние предварительной стимуляции кардиальных опиатных рецепторов на интенсивность выхода КФК в оттекающий от сердца перфузат при активации свободнорадикальных процессов.

Серии экспериментов:

1. Интактные сердца (n = 14)
2. Окислительный стресс (n = 14)
3. даларгин (2 мг/л, перфузия 5 мин) + окислительный стресс (n = 12)

4. DSLET (0,1 мг/л, перфузия 15 мин) + окислительный стресс (n = 8)

Примечание: ### p< 0,001, достоверность различий по отношению к группе сердец интактных животных; n – количество экспериментов в группе.

возможно, связано с мобилизацией эндогенных модуляторов. Активация кардиальных δ-ОР не способствует защите миокарда от повреждающего воздействия активных форм кислорода.

При стимуляции даларгином кардиальных μ- и δ- опиатных рецепторов нами не было отмечено снижения уровня МДА и ДК в ткани миокарда относительно соответствующих величин в контрольной группе (табл. 5). Активность каталазы в группе с in vitro-введением даларгина была на уровне значений в контрольной группе и достоверно превышала значения в группе интактных сердец. Активность СОД в гомогенатах сердец рассматриваемой группы была резко снижена и не отличалась от таковой в контроле. По-видимому, снижение активности СОД и определяло, в данном случае, повышенное накопление продуктов ПОЛ.

Как видно из табл. 5, стимуляция ПОЛ в ткани изолированного миокарда сопровождалась достоверным снижением уровня ПЦ на 60%. Исходя из этого, можно предположить участие эндоперекисей в механизме угнетения биосинтеза ПЦ после введения $FeSO_4$ + аскорбат, так как известно, что усиление продуктов пероксидации липидов является ингибирующим фактором для простациклинсинтетазы [197]. Уровень $ТхА_2$ не претерпевал достоверных изменений (табл. 5). Снижение синтеза ПЦ определило уменьшение индекса ПЦ/$ТхА_2$ по отношению к его значению в ткани интактных сердец, что свидетельствует об угнетении функциональной активности данного звена системы ПГ [73].

Предварительная перфузия миокарда раствором даларгина не вызывала достоверных изменений со стороны синтеза ПЦ по отношению к контрольной группе, однако содержание $ТхА_2$ при этом снижалось на 41%, что вело к повышению индекса ПЦ/$ТхА_2$. Одновременное снижение синтеза ПЦ и $ТхА_2$, по-видимому, может

Таблица 5

Влияние даларгина на интенсивность процессов перекисного окисления липидов, активность антиокислительных ферментов и метаболизм арахидоновой кислоты в миокарде крыс при окислительном стрессе (X ± m).

Группа животных / исследуемый показатель	Интактные значения n=16	Активация ПОЛ (контрольная группа) n=22	даларгин in vitro (2 мг/л) + активация ПОЛ n=12
ДК ΔE_{232}/г ткани	0,463 ± 0,021	0,696 ± 0,041 p_1 <0,001	0,658 ± 0,035 p_1 <0,001 p_2 >0,05
МДА нмоль/г ткани	1,19 ± 0,06	2,07 ± 0,04 p_1 <0,001	1,98 ± 0,05 p_1 <0,001 p_2 >0,05
Каталаза ммоль/мин/1г белка	15,2 ± 0,75	20,8 ± 1,38 p_1 <0,001	20,7 ± 0,84 p_1<0,001 p_2 >0,05
СОД ммоль/мин/мг белка	7,81 ± 0,15	2,23 ± 0,26 p_1 <0,001	2,27 ± 0,29 p_1<0,001 p_2 >0,05
Простациклин нг/г ткани	994,6 ± 120,6	355,7 ± 57,9 p_1 <0,001	370,9 ± 36,8 p_1<0,01 p_2>0,01

Тромбоксан A_2 нг/г ткани	61,7 ± 5,5	54,3 ± 10,4 $p_1 > 0,05$	32,9 ± 2,5 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$
ПЦ/$ТХА_2$ усл.ед.	16,1 ± 1,8	6,56 ± 0,92 $p_1 < 0,001$	10,6 ± 0,9 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,001$

Примечание: p_1 - достоверность различий относительно группы интактных сердец, p_2 – достоверность различий относительно группы сердец, перфузированных Fe^{2+} + аскорбат.

быть обусловлено возрастанием в этом случае удельного веса липоксигеназного пути метаболизма арахидоновой кислоты. При сравнении результатов влияния даларгина при его in vivo- (табл. 2) и in vitro-введении(табл. 5) на синтез ПЦ видно, что его модулирующий эффект наиболее выражен при использовании пептида in vivo. Однако, следует отметить что, при введении in vitro сохраняется влияние даларгина на процессы синтеза $ТхА_2$.

Анализируя полученные результаты, можно сказать, что предшествующая окислительному стрессу, стимуляция даларгином кардиальных μ- и δ-ОР не сопровождалась повышением резистентности сарколеммы кардиомиоцитов и снижением интенсивности процессов пероксидации липидов в ткани изолированного сердца, что свидетельтствует об опосредованном влиянии опиоидных пептидов на процессы свободнорадикального окисления липидов в миокарде.

Как отмечалось выше использование in vitro селективного δ-агониста DSLET не способствовало защите сарколеммы кардиомиоцитов от повреждающего действия окислительного стресса (рис.15). При определении содержания продуктов ПОЛ в гомогенатах сердец этой группы не было обнаружено достоверного снижения интенсивности образования МДА и ДК по

сравнению с контролем (табл. 6). Гомогенаты ткани сердец данной группы обладали повышенной активностью в отношении расщепления H_2O_2, что позволяет говорить о высокой ферментативной активности каталазы, в то же время их способность дисмутировать $O_2^{\bullet}$ была значительно подавлена (табл. 6). Результаты определения продуктов пероксидации липидов и антиоксидантной обеспеченности миокарда в группе с введением DSLET in vitro свидетельствуют, что активация кардиальных δ-ОР не способст-

Таблица 6

Содержание продуктов ПОЛ и активность антиокислительных ферментов в ткани изолированного миокарда, подвергшегося окислительному стрессу на фоне предварительной in vitro-стимуляции δ-ОР (X ± m)

Показатель / Группа животных	МДА нмоль/г ткани	ДК ΔE_{232}/г ткани	Каталаза ммоль/мин /г белка	СОД ммоль/мин/ мг белка
Интактные n=15	1,19 ± 0,06	0,463 ± 0,021	15,2 ± 0,75	7,81 ± 0,25
Активация ПОЛ (контроль) n=15	2,07 ± 0,04 $p_1 < 0,001$	0,696 ± 0,041 $p_1 < 0,001$	20,8 ± 1,38 $p_1 < 0,001$	2,43 ± 0,31 $p_1 < 0,001$
DSLET in vitro (0,1 мг/л, перфузия 15 мин) + активация ПОЛ n = 8	2,09 ± 0,03 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$	0,611 ± 0,039 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$	19,7 ± 1,12 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$	3,17 ± 0,37 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$

Примечание: p_1 - достоверность различий относительно группы интактных сердец, p_2 - то же относительно группы сердец, перфузированных Fe^{+2} (0,2 мМ) + аскорбат (0,5 мМ) в течении 20 мин

вует повышению устойчивости миокарда к патологическому воздействию активных форм кислорода.

Таким образом, результаты проведенных исследований, изложенные в главах 3.1.1., 3.2.1., 3.3.1. и 3.3.3., позволяют предполагать, что именно системная активация δ-рецепторов способствует повышению резистентности изолированного миокарда к повреждающему действию активных форм кислорода. Вероятнее всего, в условиях окислительного стресса реализация кардиопротекторного эффекта неселективных и селективных δ-агонистов при системном введении (даларгин, DSLET и DTLET) связана с ингибированием процессов перекисного окисления липидов и усилением антиоксидантной защиты миокарда, поскольку одновременно со снижением активности креатинкиназы в перфузате мы наблюдали уменьшение содержания продуктов ПОЛ и увеличение ферментативной активности СОД в гомогенатах сердец, составивших экспериментальные группы.

Результаты экспериментов позволяют уверенно утверждать, что именно активация δ-опиатных рецепторов защищает мембраны кардиомиоцитов от повреждаюшего воздействия активных форм кислорода. Данный эффект обладает рецепторной специфичностью, поскольку предварительная селективная блокада δ- рецепторов полностью устраняет проявление как кардиопротекторного, так и "антиоксидантного" эффектов DSLET. Кроме того, селективные δ-агонисты с различной химической структурой DSLET и DTLET оказывают практически

идентичный эффект на процессы пероксидации липидов и активность антиокислительных ферментов (табл. 4) в ткани изолированного миокарда, что также является косвенным доказательством δ-рецепторной специфичности обнаруженных нами феноменов.

Оставался открытым вопрос о локализации δ-ОР, принимающих участие в реализации эффектов δ-агонистов. На наш взгляд, наиболее логично было предположить, что рецепторы располагаются на сарколемме кардиомиоцитов. Однако эксперименты с введением δ-агонистов в перфузат изолированного сердца не подтвердили эту рабочую гипотезу. Оказалось, что активация кардиальных δ-ОР с помощью введения в перфузионный раствор даларгина или DSLET не отразилась на устойчивости мембран кардиомиоцитов к окислительному стрессу (рис. 15; табл. 6). Следовательно, кардиопротекторный эффект, наблюдаемый при системной стимуляции δ-ОР, формируется только на уровне целого организма и не связан с кардиальными опиатными рецепторами. Возможно, что стимуляция δ-ОР приводит к появлению в плазме крови нейрогуморальных факторов, обеспечивающих формирование резистентности миокарда к окислительному стрессу. В частности показано, что инъекция опиоидов сопровождается изменением уровня ряда гормонов (катехоламины, АКТГ, кортизол, инсулин, вазопрессин) в плазме крови экспериментальных животных [65]. Вероятно, подобное изменение гормонального фона обеспечивает повышение устойчивости мембран кардиомиоцитов к патогенному действию свободных радикалов.

Стимуляция μ-ОР не предупреждает повреждения кардиомиоцитов и снижения активности супероксиддисмутазы, обусловленных воздействием на миокард активных кислородных форм.

3.3.4.Влияние in vitro-стимуляции δ-опиатных рецепторов на сократительную активность изолированного миокарда при окислительном стрессе

С целью корректной оценки параметров сократимости изолированного миокарда при проведении серий экспериментов с введением лигандов δ-ОР in vitro, нами были выполнены серии контрольных опытов, схемы которых по срокам перфузии полностью соответствовали опытным группам. Серия контрольных экспериментов с 35-минутной перфузией изолированных сердец раствором Кребса-Хензелайта без добавления лигандов опиатных рецепторов и дальнейшей активацией процессов свободнорадикального окисления липидов показала, что в течение 20-минутного периода адаптации к условиям перфузии достигается стабильный уровень сократительной активности, который в последующие 15 мин перфузии претерпевает определенные изменения (табл. 7). Так, через 35 мин перфузии миокарда раствором Кребса-Хензелайта мы отмечали достоверное снижение частоты сердечных сокращений, максимальных скоростей сокращения и расслабления и увеличения конечного диастолического давления относительно соответствующих значений в конце периода стабилизации параметров сократимости. Поскольку продолжительность периода перфузии, предшествующего окислительному стрессу, в наших экспериментах с введением агонистов опиатных рецепторов не превышала 35 мин, следует считать, что в опытных сериях все изменения параметров сократимости миокарда, отличные от представленных в таблице, обусловлены влиянием добавляемых в перфузат пептидов и не связаны с продолжительностью перфузии.

Таблица 7

Динамика параметров сократительной активности изолированного миокарда в условиях контрольной перфузии без моделирования окислительного стресса (X ± m)

Измеряемый параметр	20 мин периода стабилизации параметров сократимости изолированного сердца к условиям перфузии		35 мин от начала перфузии раствором Кребса-Хензелайта	
ЧСС (уд/ мин) n=10	250,0 ± 17,6	100%	181,7 ± 19,6##	73%
ДРЛЖ (мм.рт.ст.) n=10	77,4 ± 4,3	100%	66,9 ± 4,2	86%
КДД (% от исходного) n=10	100	100%	123,7 ± 6,5#	123%
МСС (мм.рт.ст./с) n=10	36,8 ± 1,5	100%	23,9 ± 2,4###	65%
МСР (мм.рт.ст./с) n=10	19,1 ± 1,8	100%	9,7 ± 0,4###	51%

Примечание: # - достоверность отличия от исходных значений в группе ($p<0,05$); ## - $p<0,01$; ### - $p<0,001$; n - число наблюдений в группе. ЧСС – частота сердечных сокращений, ДРЛЖ – давление, развиваемое левым желудочком, КДД – конечное диастолическое давление, МСС – максимальная

скорость сокращения, МСР – максимальная скорость расслабления.

Дальнейшая активация свободнорадикальных процессов в ткани изолированного сердца путем введения в перфузионный раствор Fe^{2+} и аскорбата приводила к значительным нарушениям параметров сократимости миокарда, аналогичным таковым в предыдущих контрольных сериях экспериментов (рис 16, 17, 18).

При стимуляции μ- и δ-рецепторов путем добавления в перфузионный раствор даларгина мы не зафиксировали значимых изменений показателей сократимости миокарда относительно контрольной группы. Активация μ- и δ-рецепторов, проводимая in vitro, сопровождалась лишь тенденцией к увеличению ДРЛЖ (рис. 16а) и снижению (относительно контроля) конечного диастолического давления (рис. 16б) в периоде моделирования окислительного стресса. Наблюдалась также тенденция к повышению МСС, приобретавшая на 10 мин периода активации ПОЛ достоверный характер (рис. 17а). В то же время мы не отметили статистически значимых изменений показателя МСР изолированного миокарда (рис. 17б). В рассматриваемой группе нами не было зафиксировано влияния даларгина на изменения частоты сердечных сокращений (рис. 18а) и длительности кардиоцикла (рис. 18б), обусловленные воздействием на миокард активных форм кислорода. Таким образом, из представленных результатов видно, что in vitro-активация μ- и δ-ОР при помощи смешанного агониста даларгина не предупреждала нарушений сократительной функции миокарда, обусловленных воздействием на кардиомиоциты активных форм кислорода.

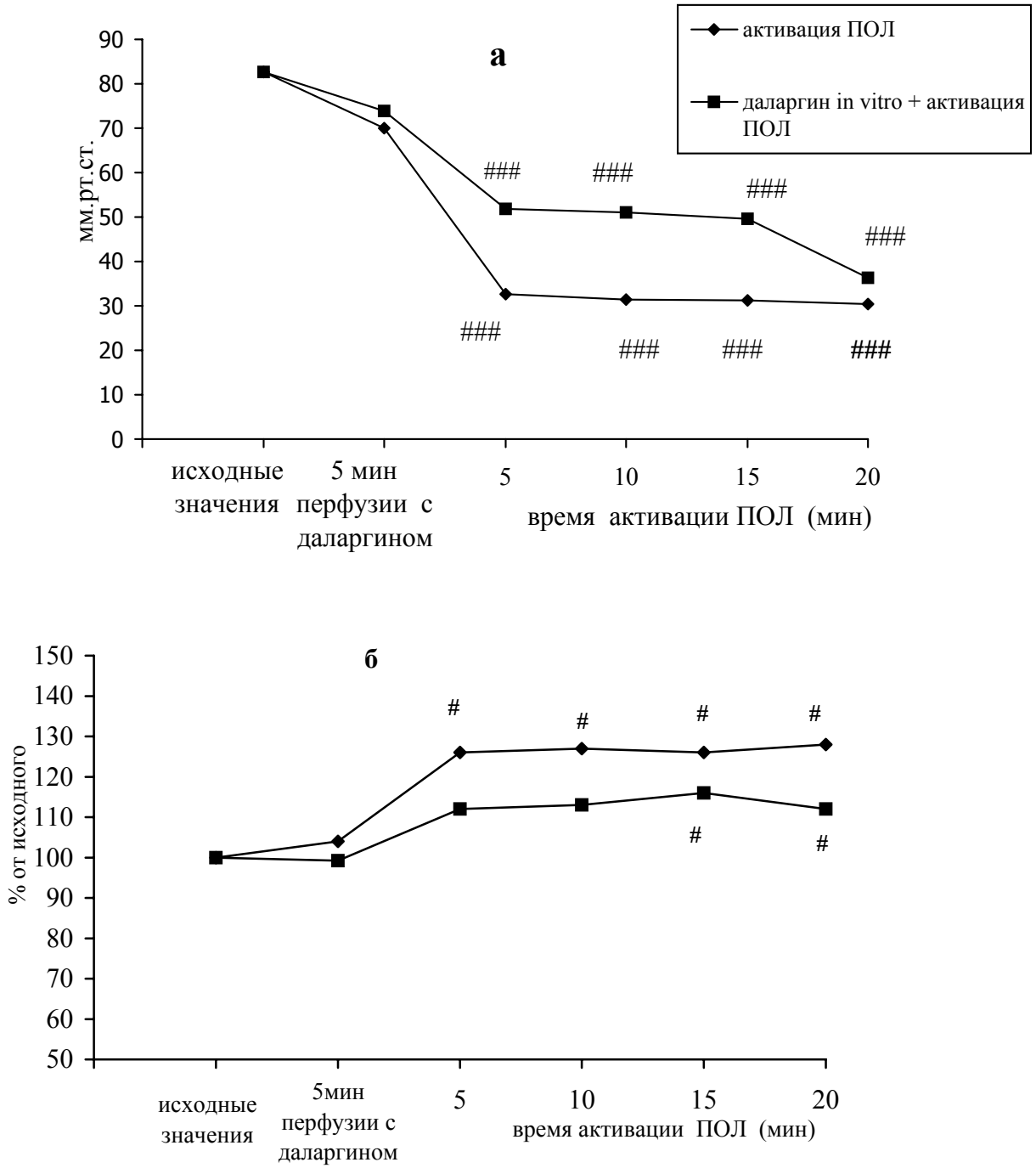


Рис. 16. Динамика давления, развиваемого левым желудочком, (а) и конечного диастолического давления (б) изолированного сердца крыс в процессе активации свободнорадикальных процессов на фоне предварительного добавления смешанного μ- и δ-агониста даларгина в перфузат. Примечание: # - достоверные отличия от исходных значений в группе ($p<0,05$), ###-$p<0,001$.

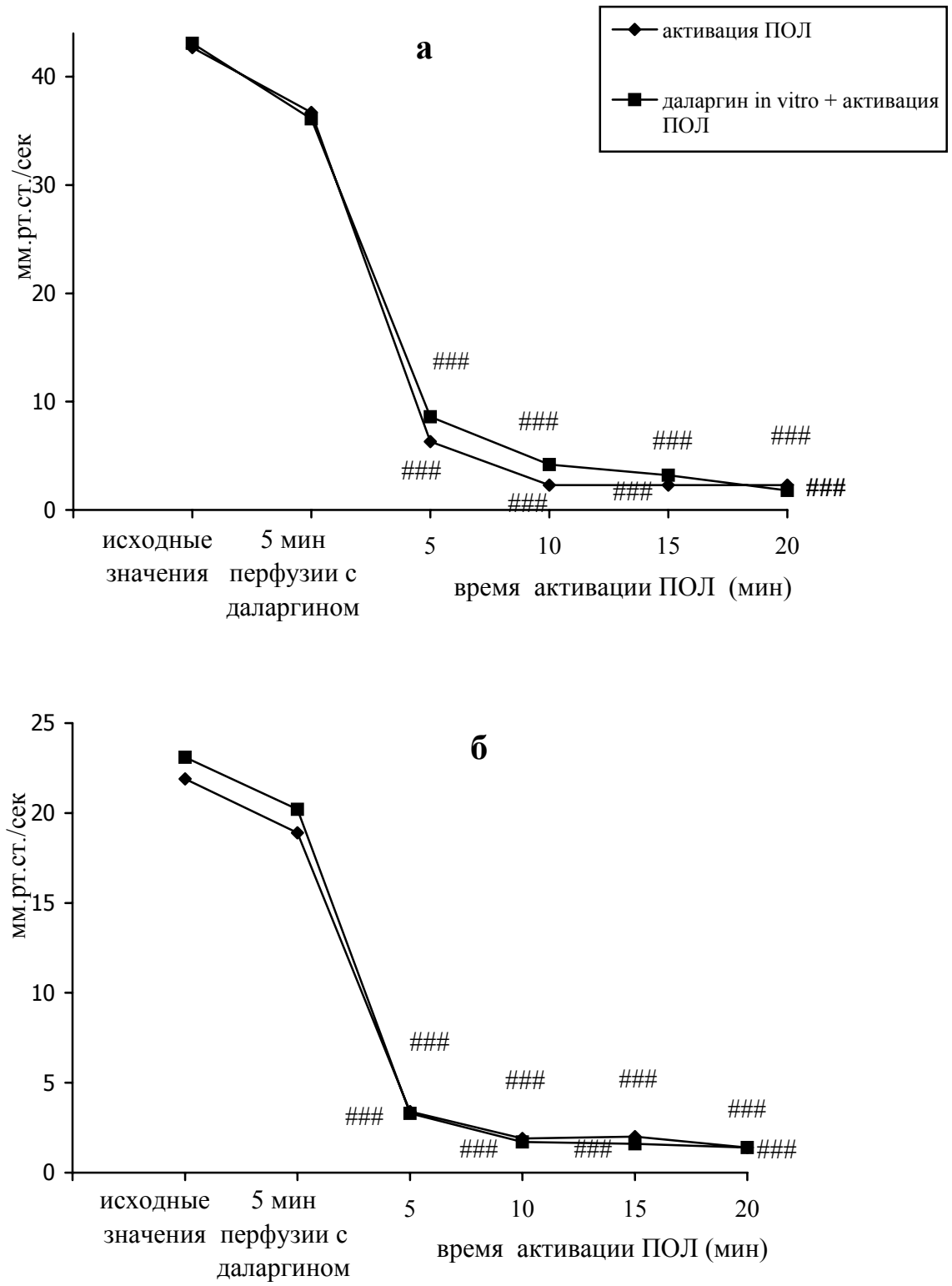


Рис. 17. Динамика максимальной скорости сокращения (а) и максимальной скорости расслабления (б) в процессе моделирования окислительного стресса на фоне введения даларгина в перфузат изолированных сердец крыс. Примечание: ### - достоверность отличий от исходных значений в группе($p<0,001$).

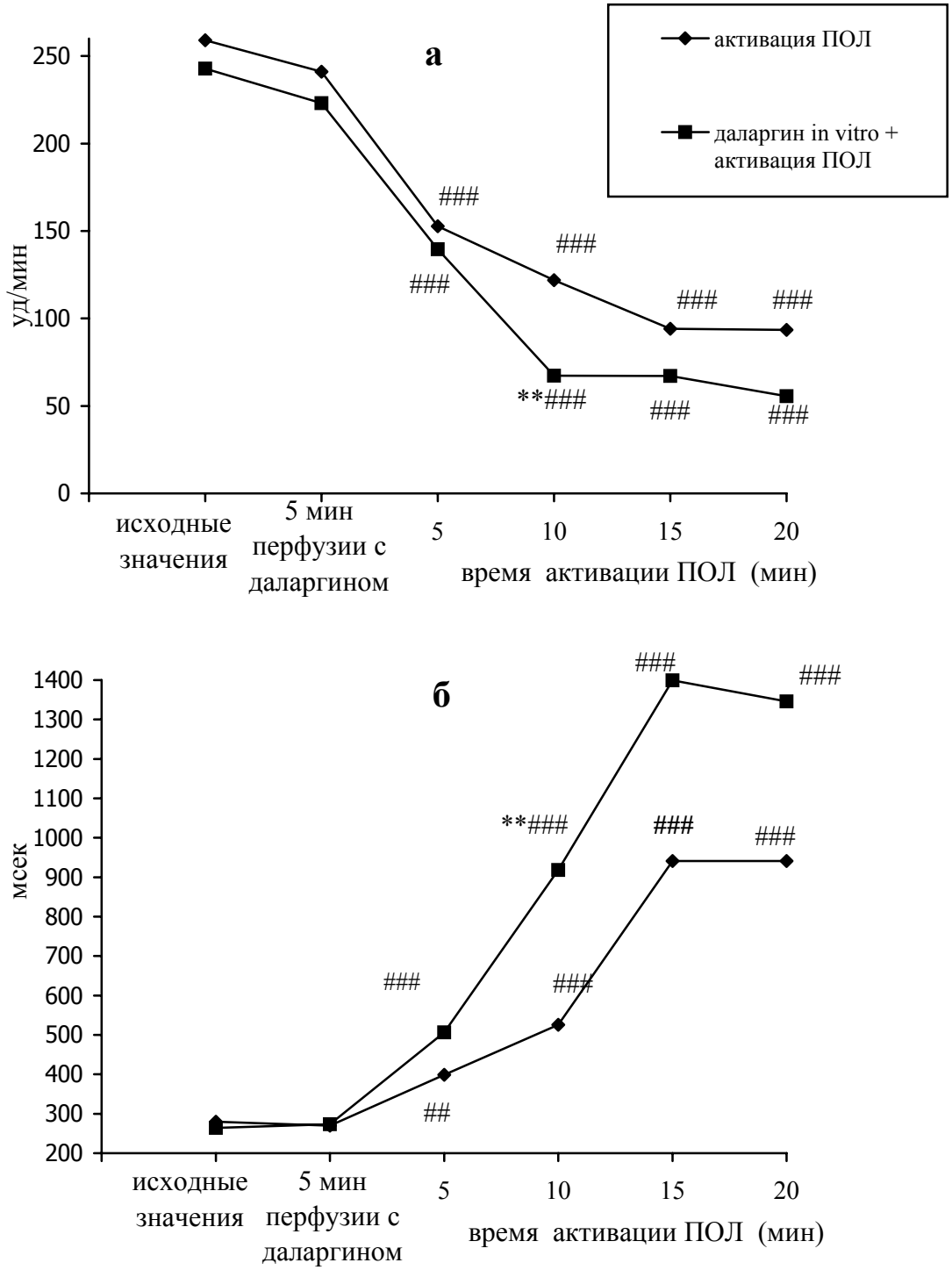


Рис. 18. Изменение частоты сердечных сокращений (а) и времени длительности кардиоцикла (б) при моделировании окислительного стресса на фоне in vitro-стимуляции μ- и δ-опиатных рецепторов. Примечание: ## - достоверность отличий от исходных значений ($p<0,01$), ### - $p<0,001$. **- достоверность отличий от группы с окислительным стрессом ($p<0,01$).

Использование в качестве активатора кардиальных δ-рецепторов их селективного агониста DSLET сопровождалось выраженным снижением сократительной активности миокарда. Так, на 5 мин перфузии изолированного сердца раствором Кребса-Хензелайта, содержащим DSLET, наблюдалась отчетливая тенденция к уменьшению давления, развиваемого левым желудочком (ДРЛЖ), которая в процессе дальнейшей перфузии препаратом приобрела достоверный характер (рис. 19а). Падение систолического давления в результате in vitro-активации δ-рецепторов сочеталось с увеличением показателя конечного диастолического давления (КДД), причем достоверный подъем этого показателя наблюдался уже на 5-ой минуте перфузии и сохранялось в течение всего времени воздействия DSLET на миокард (рис. 19б). Снижение ДРЛЖ при введении указанного пептида в перфузионный раствор, на наш взгляд, обусловлено повышением КДД, поскольку ДРЛЖ рассчитывается как разница между максимальным систолическим и конечным диастолическим давлениями [217]. В связи с этим, повышение КДД (как это наблюдалось в нашем эксперименте при внесении DSLET в перфузионный раствор) может обусловить снижение величины развиваемого давления. Развитие контрактуры кардиомиоцитов, обусловленное введением DSLET in vitro, свидетельствует о повышении $[Ca^{2+}]i$, что является следствием его избыточного поступления в миоплазму или снижением скорости его удаления. Имеющиеся литературные данные позволяют предположить, что увеличение $[Ca^{2+}]i$ в нашем случае может быть результатом пептидергического усиления синтеза инозитолтрифосфата [238], являющегося внутриклеточным либератором саркоплазматического кальция [189, 202]. В то же время, определенный вклад в повышение $[Ca^{2+}]i$, на наш взгляд, может вносить и нарушение процессов его депонирования в СПР. В свою очередь известно, что скорость депонирования Ca^{2+} в

саркоплазматический ретикулум находится в прямой зависимости от концентрации цАМФ [122]. Опираясь на результаты исследований, выполненных в нашей лаборатории in vivo, свидетельствующие, что смешанный агонист μ- и δ-ОР даларгин способен предупреждать увеличение уровня цАМФ в миокарде, вызванное коронарооккклюзией [68], можно предположить, что стимуляция δ-рецепторов in vitro может способствовать снижению синтеза цАМФ и, следовательно, уменьшению скорости депонирования Ca^{2+} в СПР, что в свою очередь, влечет за собой увеличение $[Ca^{2+}]i$. Таким образом, усиленное поступление Ca^{2+} в миоплазму за счет активации инозитолтрифосфатного пути, с одной стороны, и снижение скорости элиминации ионов кальция, обусловленное угнетением синтеза цАМФ, с другой стороны, приводят к формированию стойкой контрактуры кардиомиоцитов. Вероятнее всего, результатом снижения синтеза цАМФ является и обнаруженное нами уменьшение максимальных скоростей сокращения и расслабления сердечной мышцы в процессе in vitro-активации δ-рецепторов (рис. 20а,б). Так, в конце периода стимуляции δ-рецепторов снижение МСС относительно соответствующих значений в контроле составило 56%, а МСР - 60%. В то же время, нами не было отмечено изменений показателей ЧСС и длительности кардиоцикла (рис. 21а,б).

Полученный в наших экспериментах факт отрицательного инотропного влияния in vitro-стимуляции кардиальных δ-рецепторов, отмечается и в исследованиях других авторов [238, 239], которые отмечают связь между падением амплитуды сокращения изолированных кардиомиоцитов под влиянием лей- и мет-энкефалинов и снижением выхода Ca^{2+} в миоплазму из СПР.

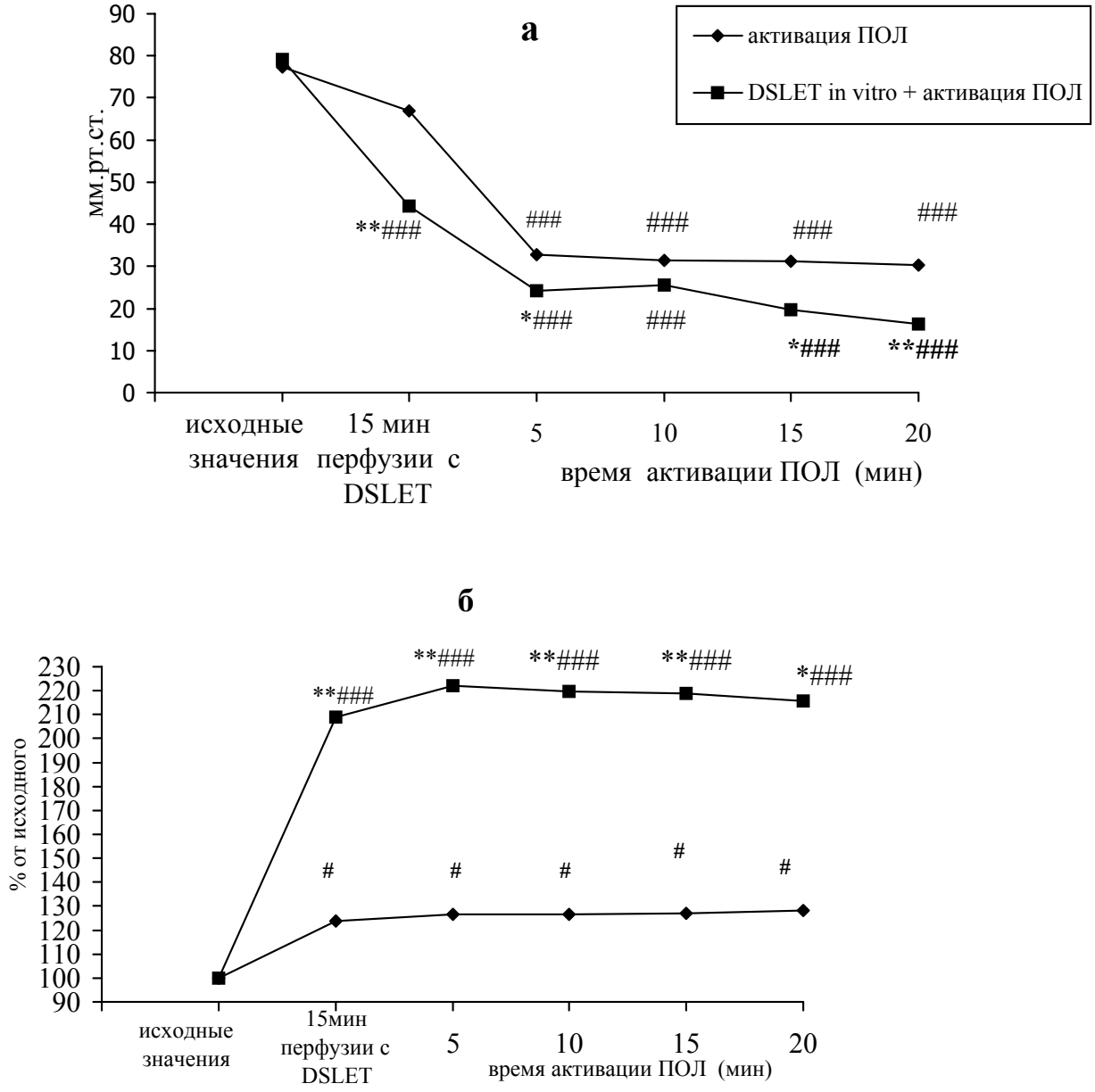


Рис. 19. Динамика давления, развиваемого левым желудочком, (а) и конечного диастолического давления (б) изолированного сердца крыс в процессе активации свободнорадикальных процессов на фоне предварительного введения в перфузат селективного δ-агониста DSLET. Примечание: # -достоверные отличия от исходных значений ($p<0,05$), ###-$p<0,001$; *- достоверность отличий от группы с окислительным стрессом ($p<0,05$), **- $p<0,01$.

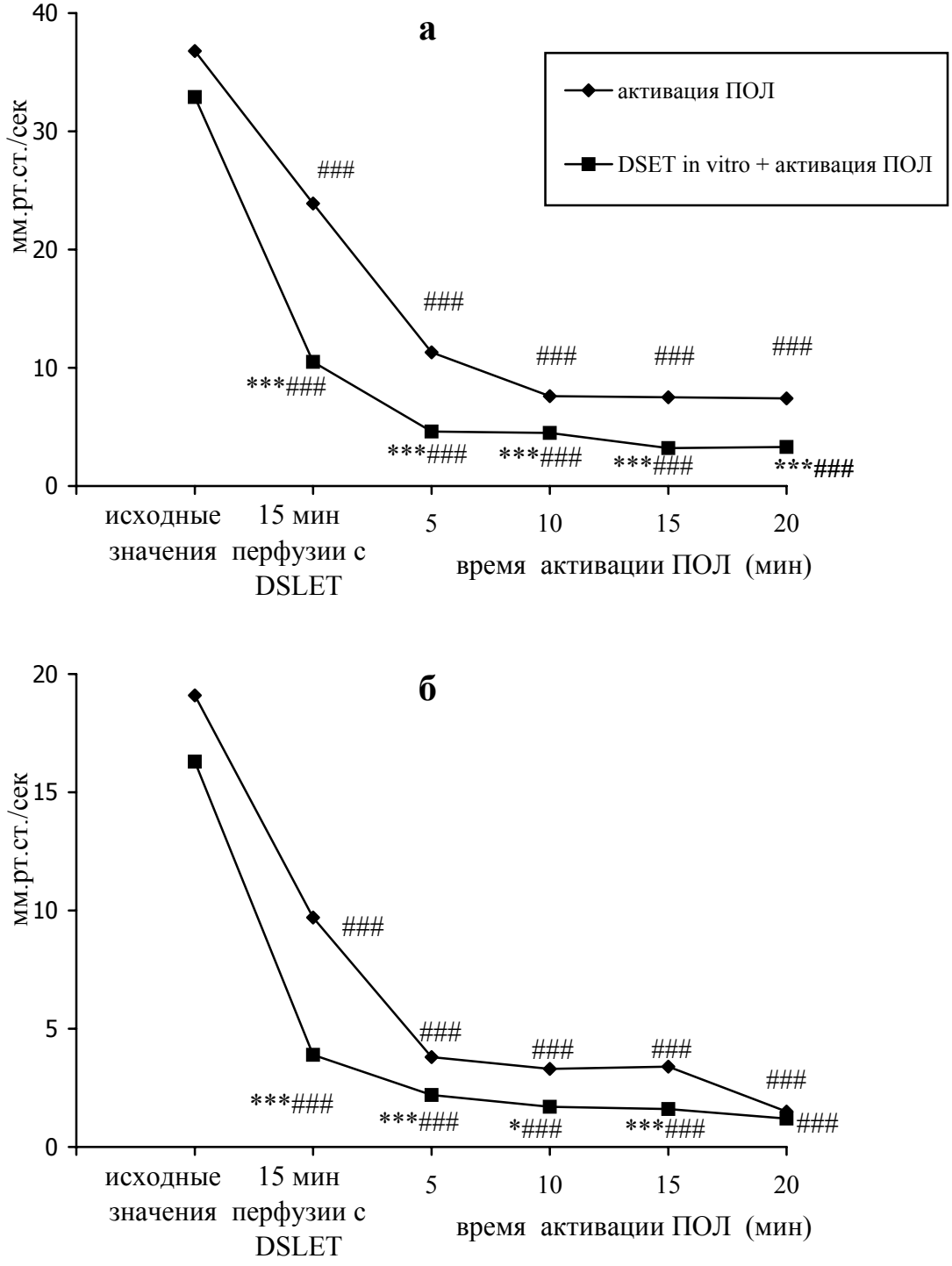


Рис. 20. Динамика максимальной скорости сокращения (а) и максимальной скорости расслабления (б) в процессе моделирования окислительного стресса на фоне введения DSLET в перфузат изолированных сердец крыс. Примечание: ### - достоверность отличий от исходных значений в группе ($p<0,001$); * - достоверность отличий от контроля ($p<0,05$), *** - $p<0,001$.

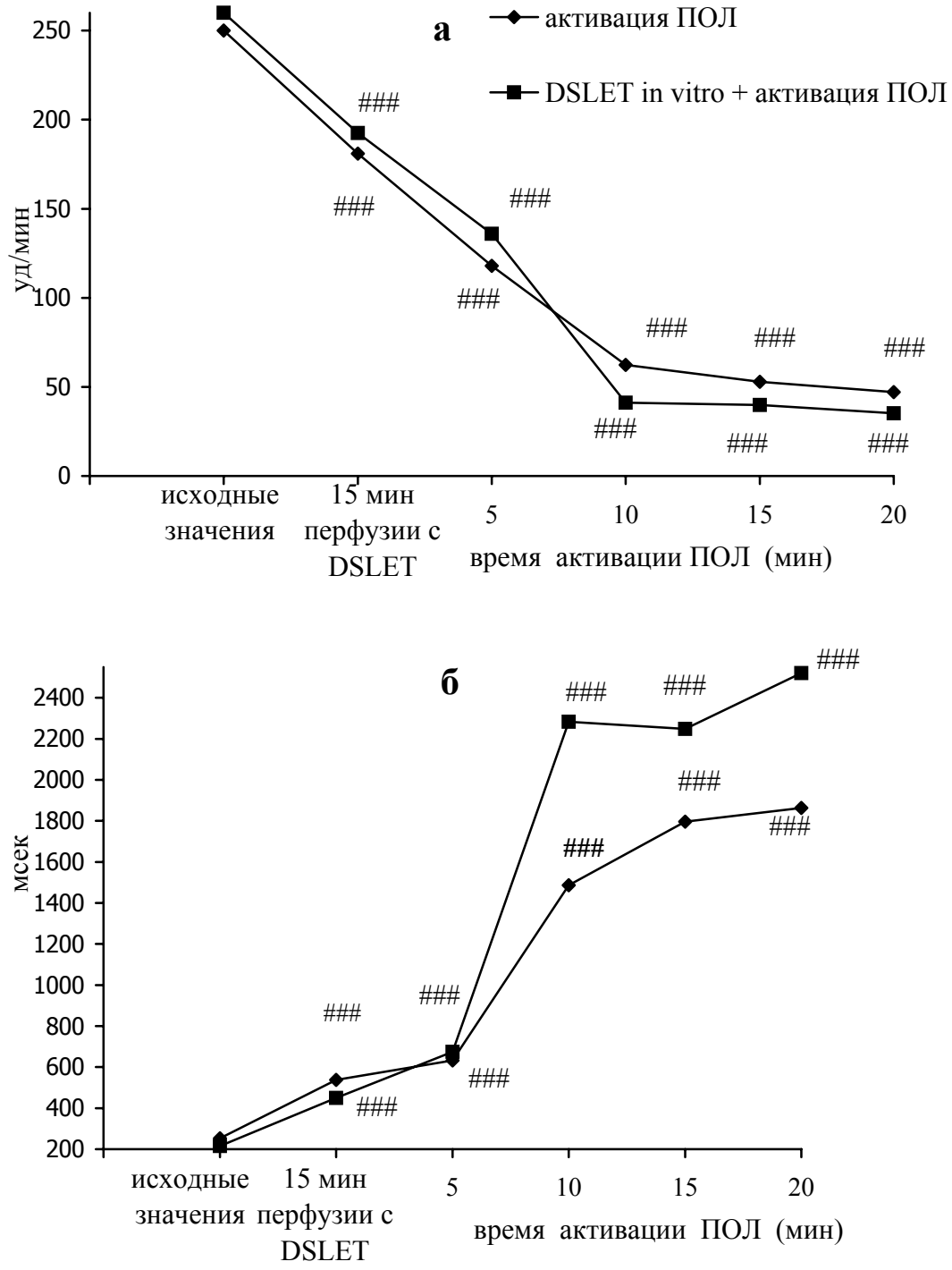


Рис. 21. Изменение частоты сердечных сокращений (а) и длительности кардиоцикла (б) при моделировании окислительного стресса на фоне in vitro-стимуляции δ-опиатных рецепторов. Примечания: # - достоверность отличий от исходных значений в группе($p<0,05$), ### - $p<0,001$.

Имеющиеся в нашем распоряжении экспериментальные данные не позволяют однозначно ответить на вопрос о молекулярном механизме изменений насосной функции изолированного миокарда, вызванных активацией кардиальных δ-рецепторов требует более детального изучения, выходящего за рамки настоящего исследования.

Активация свободнорадикальных процессов на фоне стимуляции кардиальных δ-рецепторов сопровождалось более выраженными, чем в контроле, изменениям показателей систолического и диастолического давления в левом желудочке (рис. 19а, б). Так, ДРЛЖ через 20 мин активации свободнорадикальных процессов было в 1,9 раза ниже соответствующего показателя в контрольной группе. Конечное диастолическое давление превысило аналогичные значения в контроле в 1,7 раза. Как было отмечено раньше, увеличение показателя КДД является одной из причин снижения величины ДРЛЖ. Следовательно, в данном случае наблюдается суммирование отрицательных инотропных эффектов окислительного стресса и предварительной in vitro-активации δ-ОР.

Снижение показателей МСС и МСР относительно аналогичных контрольных величин, отмеченное при in vitro-стимуляции кардиальных δ-ОР, сохранялось и в процессе активации свободнорадикальных процессов (рис. 20а, б), что, согласно нашим предположениям, является результатом уменьшения содержания цАМФ в кардиомиоцитах.

В то же время активация кардиальных δ-рецепторов не отразилась на динамике изменений ЧСС и длительности кардиоцикла, вызванных окислительным стрессом (рис. 21а,б). Следует отметить, что нами не было отмечено эффектов активации δ-ОР в отношении исходных значений ЧСС и длительности кардиоцикла. Это свидетельствует о том, что

активация кардиальных δ-рецепторов не влияет на функциональное состояние клеток проводящей системы миокарда как в условиях стандартной перфузии, так и при окислительном стрессе.

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать выводы о том, что активация даларгином μ- и δ-опиатных рецепторов, локализованных в кардиомиоцитах, не отражается на показателях функциональной активности миокарда как до-, так и в процессе активации свободнорадикальных процессов. В отличии от этого стимуляция δ-рецепторов интактного миокарда с помощью селективного агониста DSLET сопровождается развитием отрицательного инотропного эффекта, нарушением процессов расслабления сердечной мышцы, снижением максимальных скоростей сокращения и расслабления, что способствует формированию ещё больших нарушений сократительной функции изолированного миокарда.

3.4. Возможные внутриклеточные механизмы, опосредующие регуляторные влияния лигандов δ-опиатных рецепторов на активность антиокислительных ферментов

Данные, представленные в предыдущих главах диссертационной работы, убедительно доказывают участие опиоидной системы, а в частности лигандов опиатных рецепторов δ-типа, в формировании резистентности кардиомиоцитов к повреждающему действию окислительного стресса. Согласно результатам наших исследований, в реализации кардиопротекторного эффекта δ-лигандов при их системном введении основную роль играет СОД, нормализация активности которой в условиях окислительного стресса наблюдалась в результате активации δ-рецепторов. Современные литературные данные не позволили нам однозначно ответить на вопрос о механизмах опиатергической регуляции исследуемых нами антиокислительных ферментов при стимуляции свободнорадикальных процессов. В то же время, сопоставление данных литературы, свидетельствующих о регуляторном влиянии NO на активность СОД [251] и каталазы [121, 196] в условиях ишемии-реперфузии, а также данных о способности лигандов ОР стимулировать синтез NO [124] позволило нам предположить участие NO в модуляции активности СОД и каталазы δ-лигандами в условиях окислительного стресса. Кроме того, в настоящее время известно, что молекула оксида азота в физиологических концентрациях обладает антиоксидантными свойствами и способна тормозить развитие радикальных окислительных реакций [87, 172, 201]. Следовательно, по принципу положительной обратной связи NO, снижая интенсивность процессов образования гидроперекисей липидов, может повышать активность антиокислительных ферментов [101].

В связи с вышесказанным, нами были проведены эксперименты по изучению влияния предварительного

внутривенного введения животным ингибитора NO-синтазы - L-NAME - на реализацию обнаруженных нами эффектов δ-агониста - DSLET - в условиях активации свободнорадикальных процессов. Это позволило оценить вклад NO в реализацию кардиопротекторного и “антиоксидантного” эффектов δ-агонистов при окислительном стрессе.

Внутривенное введение L-NAME в дозе 50 мг/кг, достаточной для полной супрессии синтеза NO in vitro [124], не отразилось на интенсивности выхода КФК из клеток миокарда, подвергшихся свободнорадикальному воздействию (рис. 22). Уровень продуктов пероксидации липидов - МДА и ДК - в ткани сердец данной группы не отличалась от аналогичных показателей в стресс-контроле (табл. 8). Не было отмечено изменений со стороны активности миокардиальной СОД (табл. 8), а среднее значение активности каталазы в сердцах этой группы на 70% превышало аналогичное в группе контроля (табл. 8). Последнее, согласно данным литературы, может быть обусловлено снижением содержания в клетке оксида азота, проявляющего в отношении активного центра этого фермента ингибирующие свойства [121, 196].

Системное введение DSLET на фоне предварительной блокады NO-синтазы не оказало кардиопротекторного эффекта в условиях активации свободнорадикальных процессов: активность КФК, определяемая в оттекающем от сердец этой группы перфузате, не отличалась от аналогичного значения в контрольной группе (рис. 22). Это дает основание предполагать участие NO в механизмах опиатергического повышения устойчивости кардиомиоцитов к окислительному стрессу.

Кроме того, в данной группе было отмечено повышенное накопление тканью миокарда продуктов пероксидации липидов (табл. 8), что свидетельствует о зависимости “антиоксидантного” эффекта DSLET от уровня синтеза NO.

Предварительное введение L-NAME устраняло δ-ОР-зависимое увеличение активности СОД (табл. 8). В этом случае активность каталазы соответствовала показателям в группе стресс-контроля (табл. 8).

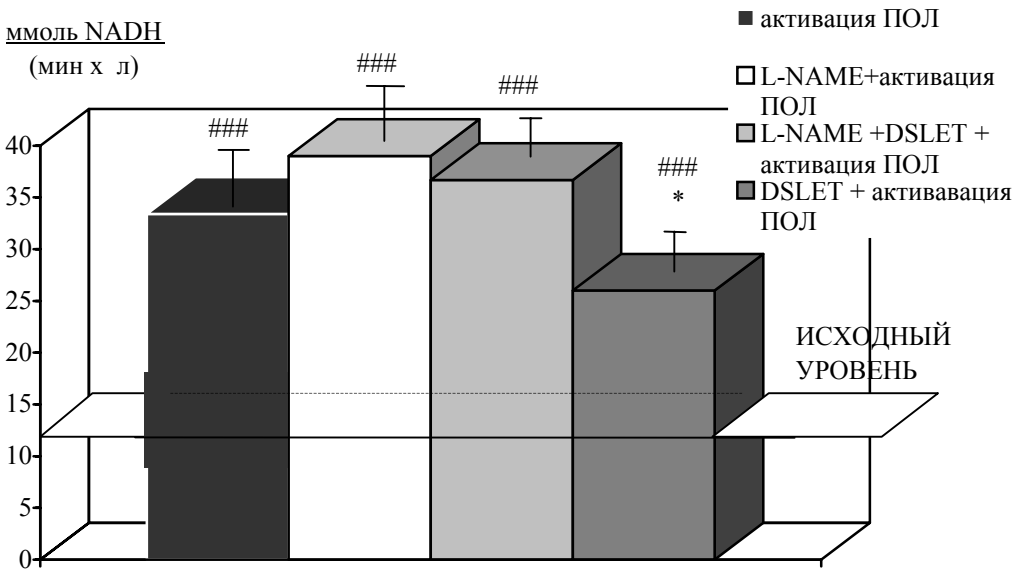


Рис. 22. Влияние блокады синтеза оксида азота на интенсивность выхода из миокарда КФК при активации свободнорадикальных процессов на фоне системной стимуляции δ-ОР. Примечание: ### - достоверные отличия от исходного уровня в группе ($p<0,001$); * - достоверные отличия от группы сердец, в которых было активировано ПОЛ ($p<0,05$).

Таблица 8

Влияние предварительного введения L-NAME и DSLET на содержание продуктов ПОЛ и активность антиокислительных ферментов в ткани изолированного миокарда, подвергшегося окислительному стрессу (X ± m)

показатель / Группа животных	МДА нмоль/г ткани	ДК ΔE_{232}/г ткани	Каталаза ммоль/мин /1г белка	СОД ммоль/мин/мг белка
Интактные n=15	1,19 ± 0,06	0,363 ± 0,021	15,2 ± 0,75	7,81 ± 0,25
Активация ПОЛ n=15	2,04 ± 0,14 $p_1 < 0,001$	0,445 ± 0,014 $p_1 < 0,01$	21,9 ± 1,41 $p_1 < 0,001$	2,23 ± 0,26 $p_1 < 0,001$
L-NAME (50 мг/кг в/в) + активация ПОЛ n = 13	1,84 ± 0,08 $P_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$	0,445 ± 0,017 $p_1 < 0,01$ $p_2 > 0,05$	25,28 ± 0,66 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$	2,72 ± 0,36 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$
L-NAME (50 мг/кг в/в) + DSLET (0,1 мг/кг в/в) + активация ПОЛ n = 12	1,91 ± 0,13 $P_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$	0,507 ± 0,020 $p_1 < 0,01$ $p_2 > 0,05$	20,58 ± 0,39 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$	2,75 ± 0,17 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$

Примечание: p_1 – достоверность различий относительно группы интактных сердец, p_2 - достоверность различий относительно группы сердец, в которых было активировано перекисное окисление липидов.

Полученные результаты дают основания предполагать участие NO в реализации кардиопротекторного эффекта DSLET и

его влияния на активность антиокислительных ферментов, а, следовательно, и на интенсивность процессов ПОЛ. Вероятно, эффекты NO на активность СОД опосредованы через регуляцию интенсивности процессв ПОЛ, поскольку сама молекула оксида азота в физиологических концентрациях может выступать как антиоксидант, который тормозит развитие радикальных окислительных реакций, связываясь со свободными и входящими в состав гема ионами железа, а так же ингибируя разложение липоперекисей в реакции Фентона [172]. Кроме того, "перехватывая" радикалы $RO_2^{\bullet}$ [201], NO способствут повышению активности СОД, поскольку известна способность перекисей жирных кислот ингибировать активный центр фермента [25]. В свою очередь, восстановление способности СОД дисмутировать супероксиданион кислорода приводит к уменьшению его повреждающего действия на липидный бислой сарколеммы. Эти предположения подтверждаются данными зарубежных исследователей, показавших увеличение синтеза и активности Cu, Zn –СОД в культуре клеток, инкубированных в среде, содержащей донор NO – SNAP (S-nitroso-N-acetylpenicillamine) [136]. Регуляция оксидом азота ферментативной активности каталазы, согласно литературным данным, осуществляется в результате его взаимодействия с гемом активного центра [196] .

Блокада синтеза NO не повлияла как на исходную величину ДРЛЖ, так и на динамику её изменения в процессе моделирования окислительного стресса (рис. 23а). Не было отмечено эффекта L-NAME на прирост КДД, развивающийся в течение периода активации свободнорадикальных реакций (рис. 23б).

Однако при обработке кривых сокращения–расслабления сердец этой группы, было найдено снижение исходных показателей максимальных скоростей сокращения и расслабления (рис. 24а,б), что, вероятно, обусловлено

неспицифическим влиянием L-NAME на осцилляцию Ca^{2+} в процессе сокращения, поскольку используемая дозировка L-NAME была, согласно литературным данным, [124] максимально допустимой.

На 5 и 10 мин воздействия активных форм кислорода на рабочий миокард наблюдалось увеличение показателя МСС относительно соответствующих контрольных величин (рис. 24а). Максимальная скорость расслабления увеличивалась только на 10 мин окислительного стресса (рис. 24б). Нам представляется возможным предположить, что после блокады синтеза NO с помощью L-NAME наблюдается следующая цепочка событий. Поскольку оксид азота является активатором гуанилатциклазы [105], то после прекращения его синтеза наблюдается замедление синтеза цГМФ. Общеизвестно, что цГМФ является функциональным антагонистом цАМФ и, соответственно, замедляет выброс Ca^{2+} из СПР и его аккумуляцию в саркоплазматическом ретикулуме, что в конечном итоге ведет к замедлению сокращения и расслабления сердца [112]. Уместно предположить, что падение уровня цГМФ после инъекции L-NAME оказывает прямо противоположный эффект на транспорт кальция в клетке, в результате происходит повышение МСС и МСР в препаратах сердец данной группы, как мы и наблюдали в наших экспериментах (рис. 24а,б).

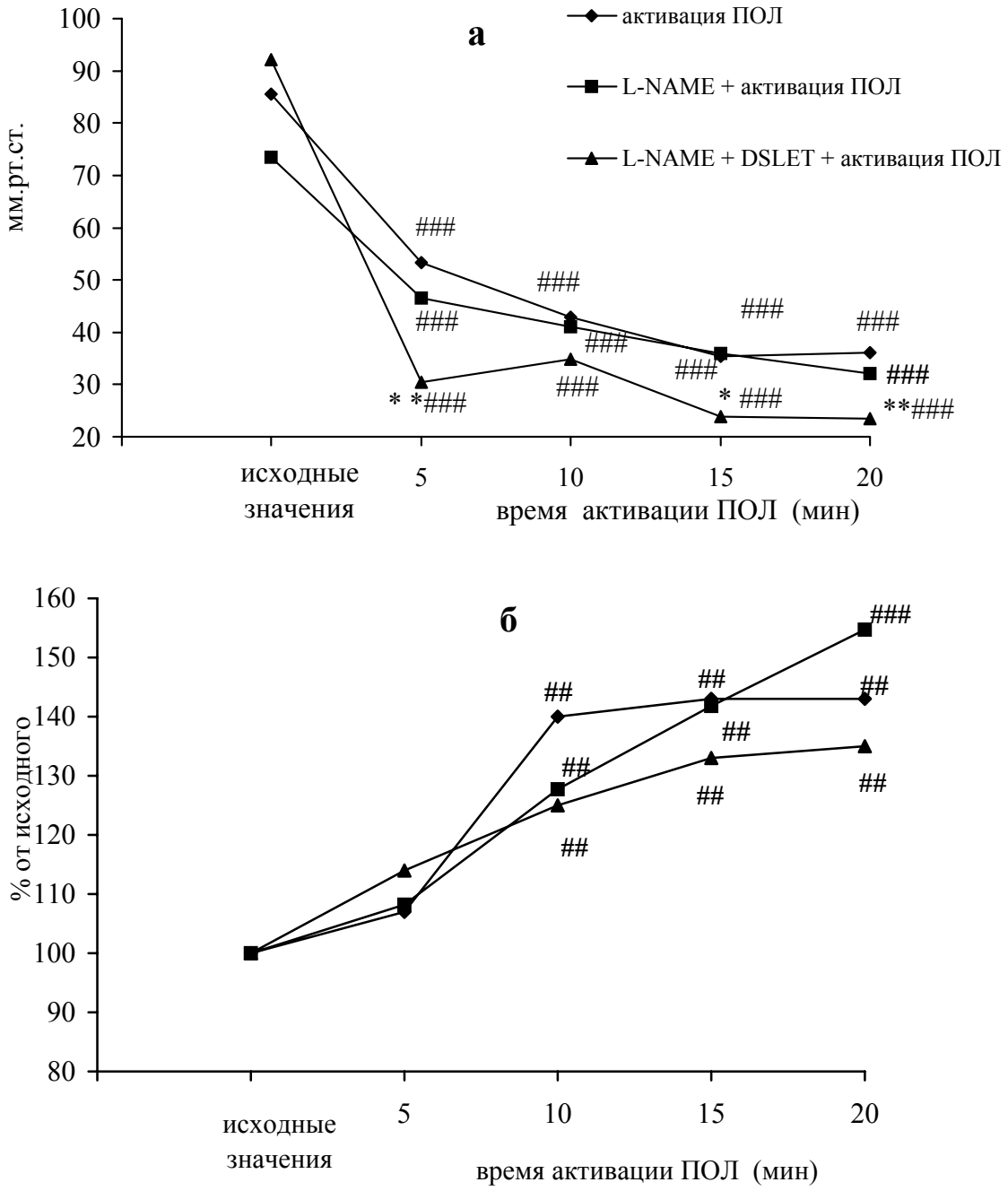


Рис. 23. Влияние δ-агониста DSLET на фоне блокады синтеза NO на динамику давления развиваемого левым желудочком (А) и конечного диастолического давления (Б) изолированного сердца крыс в процессе активации свободнорадикальных процессов.

Примечание: ## -достоверные отличия от исходных значений ($p<0,01$), ### - $p<0,001$; * - достоверные отличия от значений в контроле ($p<0,05$), ** - $p<0,01$.

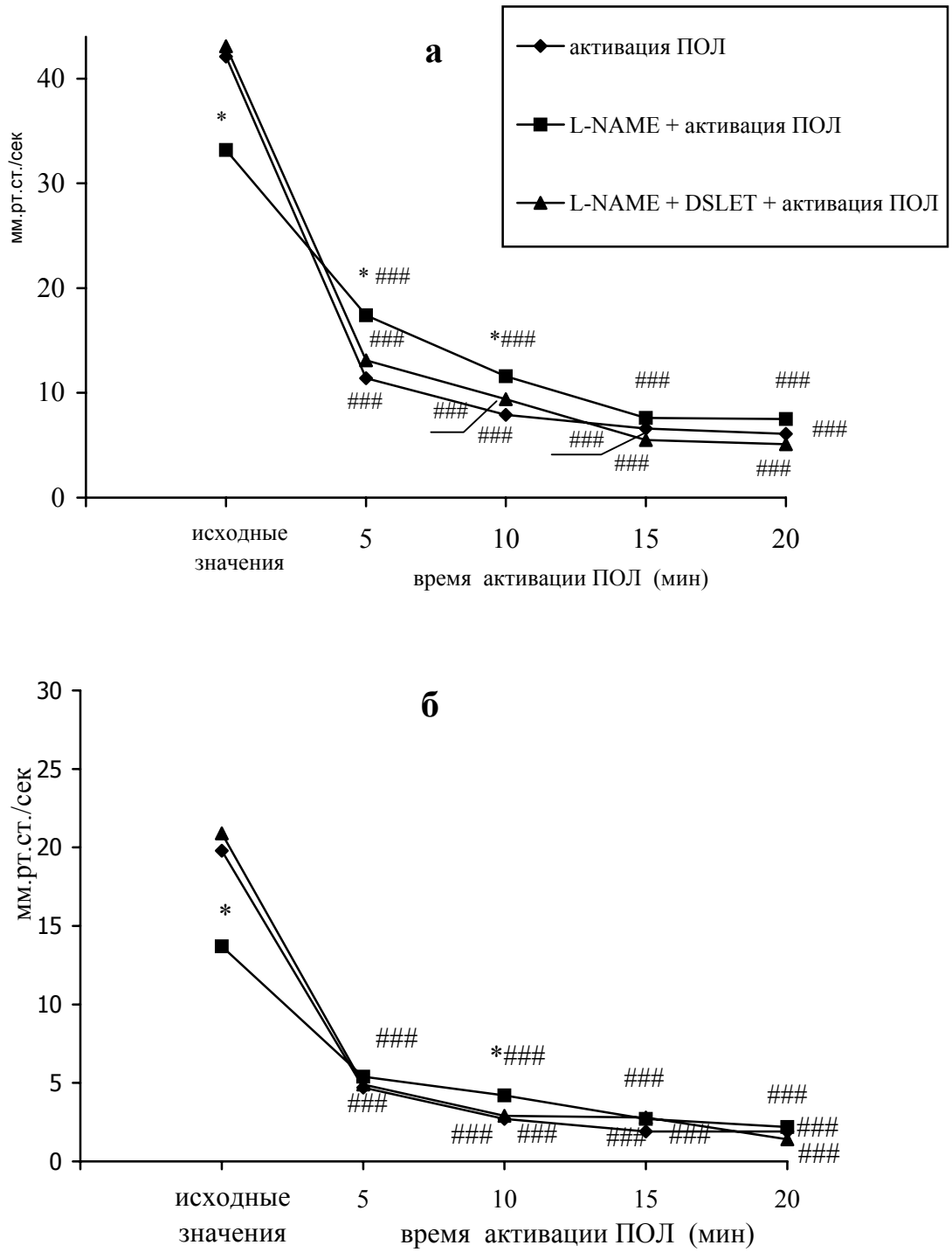


Рис. 24. Динамика максимальной скорости сокращения (а) и максимальной скорости расслабления (б) в процессе моделирования окислительного стресса на фоне предварительного введения крысам L-NAME и DSLET. Примечание: ### - достоверность отличий от исходных значений в группе ($p<0,001$); * - достоверность отличий от значений в контроле ($p<0,05$), ** - $p<0,01$.

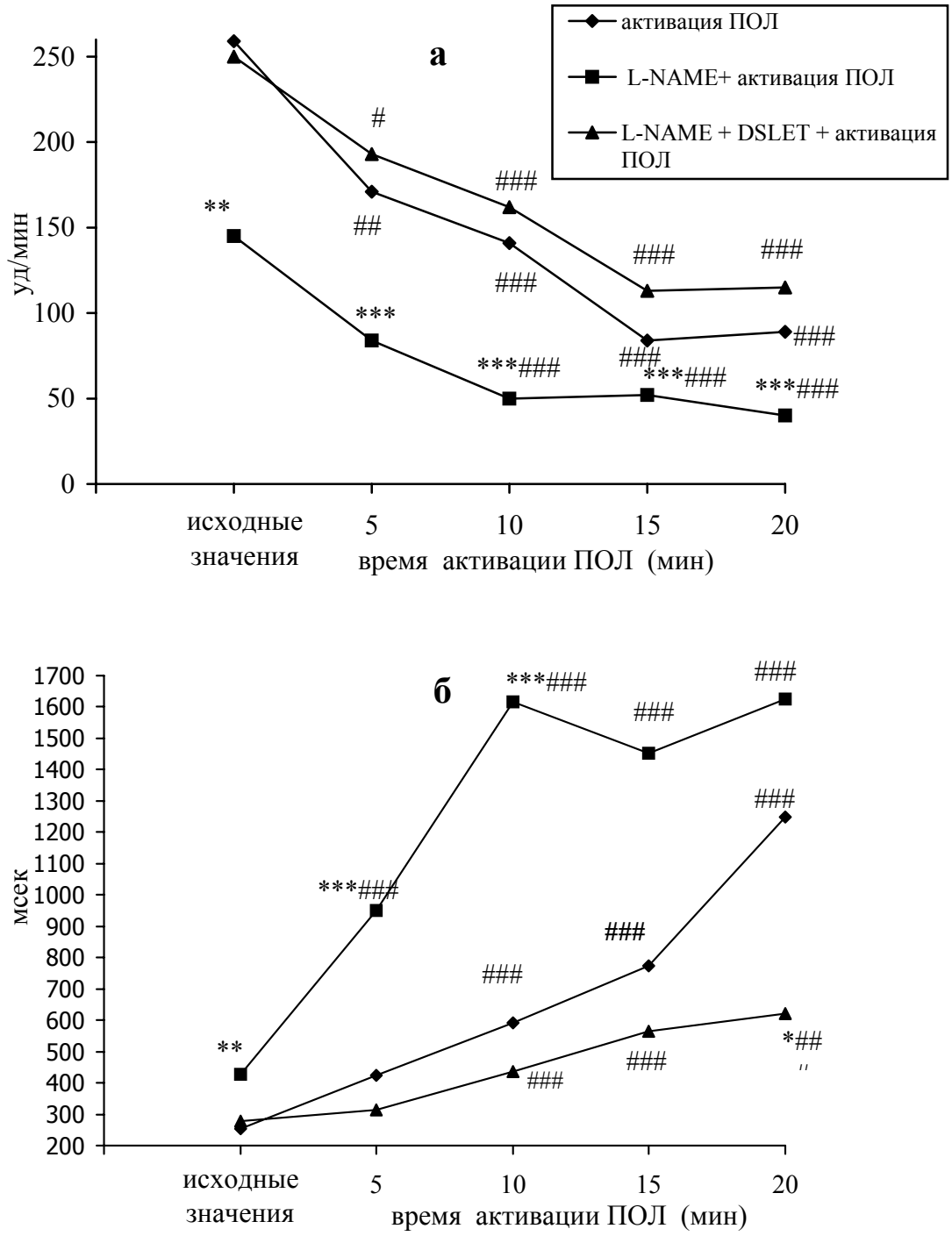


Рис. 25. Изменение частоты сердечных сокращений (а) и длительности кардиоцикла (б) при моделировании окислительного стресса на фоне блокады синтеза оксида азота и стимуляции δ-опиатных рецепторов. Примечание: ## - достоверность отличий от исходных значений в группе ($p<0,01$), ###-$p<0,001$. **- достоверность отличий от группы контроля ($p<0,01$), *** - $p<0,001$.

Блокада NO-синтазы у крыс сопровождалась в условиях стандартной перфузии миокарда развитием выраженной брадикардии, и, соответственно, увеличением длительности кардиоцикла (рис. 25а,б). В настоящее время показано участие NO в регуляции спонтанной активности синоатриального узла и, соответственно, частоты сердечных сокращений [152]. Так, установлено, что снижение частоты сердечных сокращений развивается в результате снижения синтеза NO [152, 210]. Полагают, что этот эффект связан с изменением ионного тока в медленных Ca^{2+}-каналах синусового узла [152, 201]. Видимо, аналогичная ситуация наблюдалась и в наших экспериментах в результате системного введения блокатора NO-синтазы L-NAME. Отмеченный нами отрицательный хронотропный эффект L-NAME сохранялся и в условиях активации свободнорадикальных процессов (рис. 25 а), следствием чего было увеличение длительности кардиоцикла относительно контроля (рис. 25 б).

При активации свободнорадикальных процессов на фоне совместного внутривенного введения крысам L-NAME и DSLET отмечалось пародоксальное снижение давления, развиваемого левым желудочком изолированного сердца. Значения этого показателя были достоверно меньше значений в контроле (при инъекции одного L-NAME или DSLET подобного эффекта не наблюдалось) (рис. 23а). При этом конечное диастолическое давление имело лишь тенденцию к уменьшению по сравнению с аналогичным показателем в контрольной группе (рис. 23б). Динамика показателей МСС и МСР в этой группе не отличалась от соответствующих величин в контроле как до-, так и в процессе моделирования окислительного стресса (рис. 24а,б). Имеющиеся в литературе данные не позволяют однозначно объяснить эффект совместного введения L-NAME и DSLET на динамику систолического давления в условиях окислительного стресса. Для более конкретных рассуждений по этому вопросу

необходимо дополнительное исследование влияния активации δ-ОР на фоне сниженного синтеза NO на сократительную активность миокарда в условиях активации процессов свободнорадикального окисления.

Стимуляция δ-ОР при помощи DSLET нивелировала отрицательный хронотропный эффект (рис. 25а), отмеченный при введении L-NAME. Это свидетельствует о том, что введение DSLET способствует нормализации функциональной активности клеток синоатриального узла, измененной в результате синтеза NO. Повышение частоты сокращения изолированного миокарда в этой группе сопровождалось уменьшением длительности кардиоцикла (рис. 25б), что обусловлено обратнопропорциональной зависимостью между величиной этих параметров.

Таким образом, эксперименты с использованием блокатора NO-синтазы L-NAME и δ-агониста DSLET свидетельствуют об участии NO в механизмах реализации кардиопротекторного эффекта опиоидов в условиях стимуляции свободнорадикальных процессов. Установлена важная роль оксида азота в опиатергической регуляции активности СОД, а следовательно, и процессов пероксидации липидов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Внутриклеточный гомеостаз в норме обеспечивается согласованным функционированием многочисленных вторичных мессенджеров, мембранных рецепторов и нейрогуморальных факторов. Для поиска оптимальных путей снижения функциональных нарушений, возникающих на уровне целого организма и отдельных органов, необходимо понимание этих тонких взаимосвязей. В настоящее время накоплено множество экспериментальных и клинических данных о том, что нарушение динамического равновесия между про- и антиоксидантами является важным звеном патогенеза таких распространенных сердечно-сосудистых заболеваний как атеросклероз [42, 117, 155, 200, 205, 230] инфаркт миокарда [88, 135, 161], артериальная гипертония [180, 226, 221]. Это диктует необходимость изучения изменений активности антиоксидантов и интенсивности перекисного окисления липидов на разных стадиях развития заболеваний, а также поиска новых путей повышения защиты миокарда от повреждающего действия активных форм кислорода и перекисей жирных кислот.

Исследователями неоднократно выдвигалась идея о том, что опиоидные пептиды способны модулировать изменения периферических стресс-лимитирующих систем (антиоксидантов, простаноидов) организма [65, 66, 68, 71, 81, 85]. Однако опиоидные механизмы, регулирующие устойчивость миокарда к свободнорадикальным процессам, остаются недостаточно изученными. Для выяснения участия опиоидной системы в формировании резистентности миокарда к окислительному стрессу мы провели экспериментальные исследования на модели изолированного перфузируемого сердца с использованием агонистов и блокаторов μ- и δ-опиатных рецепторов, результаты которых изложены в данной работе.

В начале необходимо было установить, как скажется активация μ- и δ- опиатных рецепторов на резистентности

миокарда к повреждающему эффекту окислительного стресса. Для стимуляции периферических опиатных рецепторов нами был использован смешанный агонист μ- и δ-опиатных рецепторов – D-Ala2,Leu5,Arg6-энкефалин (даларгин), поскольку в предшествующих исследованиях, проведенных в нашей лаборатории, было показано, что введение этого пептида способствует повышению толерантности сердца к стрессорным [63, 66, 71, 76] и ишемическим [94] воздействиям, сопровождающимся, как известно, активацией свободнорадикальных процессов [11, 18, 62, 81]. При выборе даларгина в качестве "фармакологического инструмента" мы руководствовались литературными данными о его высокой кардиоваскулярной активности [80, 37], устойчивости к энзиматическому гидролизу [38] и низкой проницаемости гематоэнцефалического барьера для этого пептида [102].

Как показали результаты наших экспериментов, активация свободнорадикальных процессов в ткани миокарда вызывает значительное снижение сократительной активности изолированного перфузируемого сердца крыс и приводит к увеличению выхода КФК в оттекающий от миокарда перфузат, что свидетельствует о нарушении целостности сарколеммы кардиомиоцитов.

При этом было обнаружено, что активация липоперекисных процессов в изолированном сердце сопровождается снижением активности основного фермента антиоксидантной защиты клетки - супероксиддисмутазы. Предварительная стимуляция периферических μ- и δ-опиатных рецепторов (ОР) при помощи системного введения животным даларгина перед изоляцией сердца индуцировала повышение устойчивости кардиомиоцитов к повреждающему воздействию окислительного стресса, что выразилось снижением уровня КФК в перфузате. Полученные нами данные позволяют предположить, что кардиопротекторный эффект даларгина может быть связан с опиатергической

активацией супероксиддисмутазы и снижением интенсивности пероксидации липидов (уменьшение содержания малонового диальдегида и диеновых конъюгатов в ткани миокарда). С другой стороны, было установлено, что активация опиатных рецепторов, предшествующая моделированию окислительного стресса, оказывает модулирующее влияние на синтез простаноидов, подавляя образование тромбоксана и увеличивая синтез простациклина (ПЦ). Подобное повышение уровня ПЦ в ткани сердца может способствовать повышению толерантности кардиомиоцитов к действию активных форм кислорода, поскольку простациклин обладает способностью супрессировать ПОЛ [31]. В то же время, совместная активация μ- и δ-ОР не предотвращала снижения насосной функции сердца в условиях моделирования окислительного стресса. Результаты проведенной серии экспериментов свидетельствуют о том, что активация μ- и δ-рецепторов может способствовать повышению устойчивости миокарда к повреждающему действию окислительного стресса, но не позволяет однозначно ответить на вопрос о том, какой из указанных типов ОР играет ключевую роль в реализации кардиопротекторного эффекта опиоидов. Для того, чтобы ответить на этот вопрос, нами были проведены серии экспериментов с использованием селективных агонистов и антагонистов μ- и δ-опиатных рецепторов.

Предварительное внутривенное введение селективных μ-агонистов DAMGO или DALDA за 15 мин до выделения сердца не отразилось на интенсивности выхода КФК в перфузионный раствор в условиях моделирования окислительного стресса. Полученный факт позволяет сделать вывод о том, что активация периферических μ-опиатных рецепторов не влияет на устойчивость миокарда к свободнорадикальному повреждению. При этом была отмечена слабовыраженная способность

агонистов μ-опиатных рецепторов контролировать процессы пероксидации липидов, что выразилось, в частности, снижением уровня малонового диальдегида и умеренным повышением активности супероксиддисмутазы.

Видимо, подобный уровень активации супероксиддисмутазы оказался недостаточным для того, чтобы в полной мере защитить миокард от действия активных форм кислорода. Именно по этой причине при стимуляции опиатных рецепторов μ-типа мы не отметили полной супрессии процессов пероксидации липидов, на что указывает сохранение повышенного уровня диеновых конъюгатов в этих условиях.

Снижение накопления малонового диальдегида в миокарде рассматриваемых групп, по всей видимости, является следствием угнетения активности циклооксигеназы, поскольку малоновый диальдегид (МДА) образуется не только в результате деградации диеновых конъюгатов жирных кислот, но и в процессе образования простагландинов [10]. Следовательно, обнаруженное нами снижение продукции МДА в ответ на стимуляцию μ-опиатных рецепторов могло явиться результатом ингибирования биосинтеза простаноидов. Так, например, ранее нами было установлено, что селективный агонист μ-OP DALDA способен угнетать биосинтез тромбоксана в миокарде [78].

Изменения активности каталазы в условиях окислительного стресса, вызываемого на фоне предварительного внутривенного введения DALDA или DAMGO, имели противоположную направленность, что не позволяет однозначно трактовать возможность регуляторного влияния μ-агонистов на данный фермент.

Блокада опиатных рецепторов μ-типа не отразилась на устойчивости миокарда к окислительному стрессу, интенсивности процессов пероксидации липидов и активности

супероксиддисмутазы, но, в то же время, способствовала снижению активности каталазы. Это позволяет говорить о том, что эндогенные μ-агонисты не участвуют в регуляции устойчивости сарколеммы кардиомиоцитов к свободнорадикальному повреждению.

Выполненные нами эксперименты на интактных препаратах изолированного сердца позволили установить, что стимуляция μ-опиатных рецепторов (при предварительном внутривенном введении крысам DAMGO или DALDA) сопровождается развитием положительного инотропного эффекта, о чем можно судить по увеличению силы сокращений изолированного сердца. Однако моделирование окислительного стресса полностью нивелировало проявление положительного инотропного влияния μ-агонистов на функцию миокарда. Более того, оказалось, что стимуляция μ-ОР усугубляла контрактуру, развивающуюся в ходе окислительного стресса. Обнаруженный нами положительный инотропный эффект in vivo-активации μ-опиатных рецепторов, по-видимому, связан с увеличением систолической концентрации Ca^{2+} в цитоплазме клетки. Так, группой исследователей, возглавляемых проф. T.M.Wong, было показано, что активация μ-ОР изолированных кардиомиоцитов приводит к увеличению $[Ca^{2+}]_i$ за счет мобилизации последнего из саркоплазматического ретикулума [166]. Результатом этого является увеличение амплитуды сокращения клеток сердца. Современными исследованиями показано, что активные формы кислорода оказывают ингибирующее влияние на Na^+/Ca^{2+}-обменник [173] и Ca^{2+}-АТФазы [179, 231]. Следовательно, отмеченное в экспериментах усиление контрактуры в условиях интенсивного образования липоперекисей на фоне предварительного введения μ-агонистов, скорее всего, является результатом как усиленного поступления Ca^{2+} в миоплазму из саркоплазматического ретикулума в результате стимуляции μ-

рецепторов, так и нарушения его удаления из саркоплазмы вследствие инактивации Ca^{2+}–АТФазы.

В пользу участия μ-опиатных рецепторов в регуляции насосной функции миокарда свидетельствуют и результаты экспериментов с использованием μ-антагониста CTAP. Его предварительное введение потенцировало отрицательный инотропный эффект окислительного стресса, и, в то же время, не влияло на формирование контрактуры. Очевидно, блокада μ-рецепторов приводит к усугублению возникающих при активации перекисного окисления липидов нарушений процессов сокращения миокарда за счет снижения мобилизации Ca^{2+} из саркоплазматичекого ретикулума. Выдвинутое нами предположение можно объяснить, исходя из результатов уже упомянутой работы группы проф. T.M. Wong, в которой было показано, что стимуляция μ-ОР приводит к усилению мобилизации Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума [166], логично предположить, что блокада μ-рецепторов может оказывать прямо противоположный эффект, то есть снижать амплитуду колебаний $[Ca^{2+}]_i$.

Таким образом, результаты наших исследований показали, что стимуляция периферических μ-опиатных рецепторов усугубляет контрактуру миокарда в условиях моделирования окислительного стресса.

Совершенно иной эффект на изолированное сердце оказывала активация периферических δ-опиатных рецепторов. При внутривенном введении селективных агонистов этих рецепторов (DSLET или DTLET), неспособных проникать через гематоэнцефалический барьер [115], было отмечено повышение резистентности кардиомиоцитов к свободнорадикальному повреждению. Одновременно наблюдалось снижение уровня продуктов ПОЛ в миокарде. Кроме того, было установлено, что стимуляция δ-опиатных рецепторов способствует восстановлению

активности супероксиддисмутазы до уровня, характерного для сердец интактных крыс, и сохранению активности каталазы выше базальных значений. Общеизвестно, что каталаза обеспечивает инактивацию H_2O_2, образующейся в реакции дисмутации $O_2^{\bullet-}$ под действием СОД. Эти два фермента работают сопряженно, поэтому одновременное сохранение их активности в условиях окислительного стресса обеспечивает утилизацию как $O_2^{\bullet-}$, так и продукта его дисмутации - H_2O_2. Можно предположить, что инактивация $O_2^{\bullet-}$ и H_2O_2 препятствует инициации процессов перекисного окисления липидов, что, в конечном итоге, обеспечивает повышение резистентности кардиомиоцитов к повреждающему действию окислительного стресса в результате стимуляции δ-рецепторов. Предварительная блокада δ-ОР с помощью ICI 174,864 полностью устраняла δ-рецептор-зависимое повышение активности супероксиддисмутазы и снижение интенсивности образование продуктов ПОЛ, что служит доказательством δ-рецепторной природы защитных эффектов опиоидных пептидов.

Несмотря на то, что активация δ-ОР сопровождалась повышением резистентности сарколеммы кардиомиоцитов к повреждающему действию активных форм кислорода и снижением интенсивности накопления продуктов ПОЛ, нами не было зафиксировано положительных изменений инотропной функции миокарда, нарушенной в результате окислительного стресса. В то же время, блокада δ-рецепторов усугубляла снижение силы сокращений сердца, вызванное воздействием на миокард активных форм кислорода, что дает основание предполагать участие эндогенной опиоидной системы в регуляции функционального состояния миокарда при активации свободнорадикальных процессов. Сопоставление этих фактов говорит о том, что δ-рецепторы не вносят существенного вклада в регуляцию насосной функции сердца в условиях

нормы, но при развитии окислительного стресса эндогенные δ-агонисты способны препятствовать развитию сократительной дисфункции миокарда. Анализируя полученные данные об участии δ-рецепторов в регуляции насосной функции миокарда как в физиологических условиях, так и при моделировании окислительного стресса, можно сделать заключение, что их вклад в этот процесс менее значим по сравнению с μ-ОР.

Таким образом, результаты исследований показали, что предварительная активация δ-ОР способствует сохранению целостности мембран кардиомиоцитов и снижению интенсивности свободнорадикальных процессов в миокарде в условиях окислительного стресса, но не влияет на нарушения насосной функции сердца, вызванные свободными радикалами. Согласно нашей рабочей гипотезе, протекторные эффекты δ-агонистов являются результатом опиатергического повышения активности супероксиддисмузы.

С целью изучения участия μ- и δ-опиатных рецепторов, локализованных в миокарде, в регуляции толерантности кардиомиоцитов к патогенному действию свободных радикалов мы предприняли исследования с введением опиоидов непосредственно в перфузионный раствор изолированного сердца. Результаты этих экспериментов показали, что активация кардиальных μ- и δ-рецепторов не влияет на степень повреждения клеток миокарда в результате окислительного стресса, не сказывается на интенсивности накопления продуктов ПОЛ, не изменяет активность антиокислительных ферментов. Сопоставление этих фактов позволило нам сделать вывод о том, что кардиопротекторный и "антиоксидантный" эффекты δ-агонистов реализуются только при стимуляции периферических δ-рецепторов на уровне целого организма и не связаны с кардиальными ОР. Возможно, что системная стимуляция δ-рецепторов вызывает появление в

плазме крови нейрогуморальных факторов, обеспечивающих формирование резистентности миокарда к окислительному стрессу. В частности показано, что инъекция опиоидов сопровождается изменением уровня ряда гормонов (катехоламины, АКТГ, кортизол, инсулин, вазопрессин, предсердный натрийуретический пептид) в плазме крови экспериментальных животных [65]. Вероятно, подобное изменение гормонального фона играет определенную роль в обеспечении устойчивости мембран кардиомиоцитов к патогенному действию свободных радикалов.

Исследования инотропной функции миокарда показали, что совместная активация кардиальных μ- и δ-опиатных рецепторов с помощью даларгина не отразилась на показателях функциональной активности миокарда как до-, так и в процессе моделирования окислительного стресса. В то же время, селективная in vitro-стимуляция δ-рецепторов, локализованных в миокарде, сопровождается развитием отрицательного инотропного эффекта, нарушением процессов расслабления сердечной мышцы, что ещё больше усугубляет сократительную дисфункцию изолированного миокарда, вызванную активными формами кислорода. Угнетение насосной функции сердца, в условиях in vitro-стимуляции кардиальных δ-рецепторов обусловлено, на наш взгляд, значительным повышением конечного диастолического давления (КДД), то есть усилением контрактуры миокарда. Поскольку давление, развиваемое левым желудочком, рассчитывается как разница между значениями максимального систолического и конечного диастолического давления [217], можно полагать, что повышение КДД в конечном итоге, может обусловить снижение насосной функции миокарда. Формирование контрактуры миокарда в ответ на активацию δ-рецепторов in vitro является, в свою очередь, косвенным показателем повышения

$[Ca^{2+}]_i$. Имеющиеся в настоящее время литературные данные свидетельствуют, что "оккупация" δ-рецепторов агонистами ведет к активации фосфолипазы С и увеличению синтеза инозитолтрифосфата [238], являющегося внутриклеточным либератором саркоплазматического кальция [189, 202]. В конечном итоге, такая последовательность событий приводит к увеличению $[Ca^{2+}]_i$ в цитоплазме клеток сердца [189] и увеличению диастолического давления, что и наблюдалось в наших экспериментах.

До настоящего времени оставался открытым вопрос о механизмах опиатергической регуляции активности супероксиддисмутазы и каталазы. Анализ литературных данных позволил нам предположить, что внутриклеточным мессенджером, обеспечивающим передачу сигнала от δ-рецептора к антиокислительным ферментам, может служить оксид азота [121, 124, 136, 196, 251].

Наши эксперименты с предварительным введением животным L-NAME показали отсутствие эффекта блокады синтеза NO в отношении интенсивности ПОЛ и активности СОД при моделировании окислительного стресса. Увеличение активности каталазы в образцах миокарда данной группы по отношению к контрольным значениям, скорее всего, обусловлено ослаблением ингибирующего влияния NO на каталазу [121, 196].

Блокада NO-синтазы, предшествующая активации δ-опиатных рецепторов, препятствовала проявлению кардиопротекторного эффекта δ-агониста DSLET при моделировании окислительного стресса. Это дает основание для предположения об участии NO в реализации защитного эффекта опиоидных пептидов. Параллельно в ткани миокарда данной группы было отмечено исчезновение “антиоксидантного” эффекта, связанного со стимуляцией δ-ОР. Полученные результаты дают нам возможность

предположить, что влияние DSLET на активность антиокислительных ферментов и интенсивность процессов ПОЛ опосредовано через активацию синтеза оксида азота NO-синтазой. Если принять во внимание тот факт, что оксид азота способен вступать в реакцию нейтрализации со свободными радикалами [201], то возможно предположить, что увеличение синтеза NO в ответ на стимуляцию δ-ОР повлечет за собой ослабление свободнорадикальных процессов. В этом случае изменение активности супероксиддисмутазы и каталазы может быть лишь следствием снижения содержания пероксидов и свободных радикалов, выступающих в роли ингибиторов СОД [25].

Таким образом, результаты проведенных исследований показали, что опиоидная система вносит весомый вклад в формирование резистентности миокарда к окислительному стрессу. В реализации данного кардиопротекторного эффекта важную роль играет NO-синтаза, повышение активности супероксиддисмутазы и угнетение процессов пероксидации липидов. На наш взгляд, способность агонистов δ-опиатных рецепторов стимулировать активность антиокислительных энзимов открывает перспективы для разработки нового подхода к решению проблемы защиты сердца от патогенного влияния активных форм кислорода при проведении тромболитической терапии острого инфаркта миокарда и в кардиохирургической практике, когда реперфузия миокарда после длительного периода ишемии неизбежно приводит к окислительному стрессу и снижению антирадикальной защиты кардиомиоцитов [6, 11, 12, 28, 52, 90, 220].

В Ы В О Д Ы

1. Активация периферических μ- и δ-опиатных рецепторов при помощи D-Ala^2,Leu^5,Arg^6-энкефалина способствует повышению устойчивости мембран кардиомиоцитов к свободнорадикальному повреждению и не влияет на выраженность нарушений сократительной функции миокарда в условиях активации окислительного стресса.
2. Увеличение активности супероксиддисмутазы, вызванное сочетанной стимуляцией μ- и δ-опиатных рецепторов, сопровождается повышением устойчивости кардиомиоцитов к патогенному действию активных форм кислорода в условиях моделирования окислительного стресса.
3. Кардиопротекторный эффект стимуляции периферических μ- и δ-опиатных рецепторов при активации ПОЛ реализуется параллельно с увеличением уровня простациклина и снижением содержания тромбоксана в миокарде.
4. Селективная стимуляция μ-рецепторов на фоне усиленной пероксидации липидов способствует умеренному повышению активности супероксиддисмутазы и снижению уровня малонового диальдегида в ткани миокарда, но не изменяет динамику накопления диеновых конъюгатов и усугубляет нарушение процессов расслабления сердечно-мышечных препаратов.
5. Резистентность сарколеммы кардиомиоцитов к свободнорадикальному повреждению in vitro повышается после предварительной стимуляции периферических δ-опиатных рецепторов. Агонисты μ-рецепторов не оказывают подобного эффекта.
6. Уровень малонового диальдегида и диеновых конъюгатов, повышенный в ткани сердца после введения Fe^{2+}-аскорбата, снижается под влиянием стимуляции периферических δ-

рецепторов, что обусловлено опиатергическим увеличением активности супероксиддисмутазы. Параметры сократимости изолированного сердца при этом не изменяются.

7. In vitro-активация кардиальных δ-опиатных рецепторов не влияет на степень повреждения мембран кардиомиоцитов и накопление продуктов ПОЛ в процессе окислительного стресса, одновременно способствуя ухудшению диастолической фунции миокарда.
8. Опосредующую роль в реализации опиатергического повышения толерантности сердца к действию активных форм кислорода играет NO-синтаза.
9. Эндогенные лиганды опиатных рецепторов не играют существенной роли в обеспечении резистентности мембран кардиомиоцитов к действию свободных радикалов, но эндогенные агонисты μ-опиатных рецепторов ослабляют отрицательный инотропный эффект окислительного стресса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Азизов О.А., Вахрушев Т.В., Дремина Е.С. Динамика образования первичных и вторичных продуктов ПОЛ при медьзависимом окислении липопротеинов низкой плотности сыворотки крови больных ИБС // Бюл. экспер. биол. и мед. – 1996. – № 7. – С. 32-36.
2. Андреев Н.А., Пичкур К.К. Аритмии сердца: диагностика.- Рига: Зинатие, 1985.- 239 с.
3. Арчаков А.И. Микросомальное окисление. – М.: Наука, 1975. – 327с.
4. Афанасьев С.А., Вечерский Ю.Ю., Пономаренко И.В., Шипулин В.М. Влияние антиоксиданта гистохрома на электрическую стабильность миокарда больных ишемической болезнью сердца в раннем постокклюзионном периоде операции аортокоронарного шунтирования // Кардиология. – 2000. - № 8. – С. 30-33.
5. Афанасьев С.А., Лаптев Б.И., Прокопьева В.Д., Ларионов Н.П. Исследование защитного действия аминазина при ишемии и реперфузии изолированного сердца // Биол. науки - 1986.- № 3.- С. 25-29.
6. Афанасьев С.А., Ласукова Т.В., Чернявский А.М., Вечерский Ю.Ю., Пономаренко И.В. Влияние гистохрома на показатели перекисного окисления липидов при хирургическом лечении пациентов с ишемической болезнью сердца разных

функциональных классов // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 1999. – Т. 62. - № 6. – С.32-34.

7. Афонская Н.А., Ильинский О.Б., Кондаленко В.Ф., Спевак С.Е., Черначенко Н. М. Влияние опиоидного пептида на заживление экспериментального инфаркта миокарда // Бюлл. экспер. биол. и мед. –1986. - № 12. – с. 754-757.
8. Барсель В.А., Щедрина И.С., Вахляев В.Д., Аксютина М.С., Парамонова М.А., Юдичев И.С. Сыркин А.Л. Состояние системы перекисного окисления липидов у больных ишемической болезнью седца // Кардиология. – 1998. – Т. 38. - №5. – С. 18-20.
9. Белоконева О.С., Зайцев С.В. Роль мембранных липидов в регуляции функционирования рецепторов нейромедиаторов // Биохимия. – 1993. – Т. 58. - № 11. – С. 1685-1709.
10. Белоусов Ю.Б., Азизова О.А., Разумов В.Б. Влияние верапамила на функциональное состояние тромбоцитов у больных ишемической болезнью сердца // Кардиология. - 1989. – № 2. – С. 42-45.
11. Биленко М.В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов (молекулярные механизмы, пути предупреждения и лечения). - М.: Медицина, 1989.- 368 с.
12. Бояринов Г.А., Конторщикова К.Н., Мухина И.Р. Перекисное окисление липидов и сократительная функция миокарда в постишемическом периоде в зависимости от уровня гипотермической защиты миокарда // Бюлл. экспер. биол. и мед. – 1991. - № 10. – С. 374 – 376.
13. Брусов О.С., Герасимов А.М., Панченко Л.Ф. Влияние природных ингибиторов радикальных реакций на автоокисление адреналина // Бюлл. экспер. биол. и мед. - 1976. - № 1. – С. 33-34.

14. Бурлаков Е.Б., Храпова Н.Г. Перекисное окисление липидов мембран и природные антиоксиданты // Успехи химии. - 1985. – Т. 54. – С. 1540-1558.

15. Бурлаков Е.Б., Башкатова В.Г., Давыдов Б.В., Полумисков В.Ю. Перекисное окисление липидов и система антиоксидантов при инфаркте миокарда, и их коррекция препаратами антиоксидантами // Фармакологическая коррекция гипоксических состояний. / Сб. научных работ. - Гродно, 1991. – Ч.3. - С. 407.

16. Ватанабе А.М., Линдерман Дж.П. Механизмы адренергической и холинергической регуляции сократимости миокарда // Физиология и патофизиология сердца. Под ред. Н. Сперилакиса. В 2-х томах. - М.: Медицина, 1990. - Т. 2. - С. 124-168.

17. Вершигора А.Ф. Общая иммунология – Киев: Выща шк. – 1990. – 735 с.

18. Владимиров Ю.А., Азизова О.А., Деев А.И., Козлов А.В., Осипов А.Н., Рощупкин Д.И. Свободные радикалы в живых системах. - Итоги науки и техники. Сер.: биофизика.– М. – ВИНИТИ. - 1991. – т. 29. - 247 с.

19. Владимиров Ю.А., Арчаков Р.М. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. – М.: Наука , 1972. – 252 с.

20. Волков Л.П., Бондоренко М.И., Северин Н.Ф. Динамика липоперекисей и свободных жирных кислот у больных острым инфарктом миокарда // Врачебное дело. - 1981. - № 12. – С. 35-38.

21. Галактионова Л.П., Ельчанинова С.А., Варшавский Б.Я. Недостаточность антиоксидантных ферментов как возможный фактор хронизации патологического процесса // Паллиативная медицина и реабилитация в здравоохранении /

Сб. научных работ. - Москва, 1998. - С. 60.

22. Галактионова Л.П., Ельчанинова С.А. Роль оксидантного и антиоксидантного статуса организма в развитии хронической патологии // Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины / Материалы международной конференции молодых ученых России. - Москва, 1998. - С. 49.
23. Галанкина И.Е., Рогацкий Т.Г., Рябинин А.В. Влияние аналога энкефалинов - тегафлара на эволюцию экспериментального инфаркта миокарда // Бюлл. Всесоюз. Кардиолог. Научного центра АМН ССР. - 1985. - Том. 9. - № 2. - С. 55-57.
24. Голиков А.П., Рябинкин В.А., Жолудев А.А., Лукьянов М.М., Авилова О.А. Эффективность синтетического пептида даларгина при остром инфаркте миокарда // Кардиология. - 1990. - № 3 - С. 24-27.
25. Гудзь Т.И, Пешкова Е.Г., Гончаренко Е.Н. Ингибирование активности СОД гидроперекисью линоленовой кислоты // Радиобиология. – 1982. – Т. 22. – вып. 5. – С. 674-677.
26. Дац М.С., Островский И.М. Цитопротективное действие простагландинов // Патол. физиол. и эксперим. терапия. - 1985. - № 3. - С. 82-85.
27. Дворцин Г.Ф. Кардиопротекторный эффект нового отечественного аналога эндогенных опиоидов при стрессе, вызванном тотальной ишемией миокарда, и некоторые его механизмы // Патол. физиол. и экспер. терапия.- 1990.- № 2.- С.13-16.
28. Дементьева И.И., Демуров Е.А., Гусаков В.М. Роль гипоксии в усилени перекисного окисления липидов и тканевого метаболизма у больных оперированных в условиях искуственного кровообращения // Анестезиология и реаниматология - 1990.- № 6.- С.41-45.
29. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. - М.: Мир. 1991. – 544 с.

30. Дудник Д.Б., Тихадзе А.К., Алексеенко А.В. Изменение активности супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы в процессе интенсификации перекисного окисления липидов при ишемии печени // Бюл. эксперим. биол. и мед.- 1981. - Т. 91. - № 4. – С. 451- 453.

31. Ефимов В.В., Ладный А.И. Влияние простациклина на показатели липидного обмена и уровень перекисного окисления липидов в плазме и мембранах эритроцитов // Патол. физиол. и эксперим. терапия. - 1986. - № 1. - С. 14-16.

32. Закирова А.Н. Корреляционные связи перекисного окисления липидов, антиоксидантной защиты и микрореологических нарушений в развитии ИБС // Тер. архив. - 1996. - № 9. - С. 37-40.

33. Заяц В.И., Божко А.П. Влияние β- эндорфина на сократительную функцию неишемизированных отделов сердца при экспериментальном инфаркте // Механизмы адаптации и компенсации, методы их тренировки, контроля и стимуляции. Минск, 1985. – С. 80-81.

34. Зенков Н.К., Меньшикова Е.Б., Шергин С.М. Окислительный стресс. Диагностика, терапия, профилактика. – Новосибирск, 1993. – 181с.

35. Золоев Г.К. Влияние энкефалинов на концентрацию адениннуклеотидов в печени и сердце при экспериментальном инфаркте миокарда // Кардиология 1987.- N4.- С.109-110.

36. Золоев Г.К., Слепушкин В.Д., Титов М.И. Влияние энкефалинов на метаболические показатели при экспериментальном инфаркте миокарда у крыс // Кардиология. - 1985. - № 8. - С.72-74.

37. Золоев Г.К., Слепушкин В.Д., Титов М.И. Влияние энкефалинов на сердечно-сосудистую систему // Кровообращение. - 1986. - № 4. - С. 45-47.

38. Каленикова Е.И., Дмитриева О.Ф., Коробов Н.В. Фармакокинетика даларгина // Вопр. мед. химии. – 1988.- № 1. - С.75-83.

39. Капелько В.И., Горина М.С. Кальциевая регуляция сокращения и расслабления сердечной мышцы // Регуляция сократительной функции и метаболизма миокарда.- М.: Наука, 1987.

40. Капелько В.И., Новикова Н.А., Сакс В.А. Расслабимость и растяжимость сердца при энергодефиците // Физиол. журн. СССР им. И. М. Сеченова.- 1988.- т.74.- № 2.- С.202-207.

41. Капитанов А.Б., Пишенов А.М. Каратиноиды как антиоксидантные модуляторы клеточного метаболизма // Успехи современной биологии. - 1997. – Т. 116. - № 2. – С. 179-193.

42. Карпов Р.С., Дудко В.А. Атеросклероз: патогенез, клиника, функциональная диагностика и лечение. - Томск: СТТ, 1998. - 656с.

43. Касс Р.С. Ионные основы электрической активности сердца // Физиология и патофизиология сердца / Под ред. Н. Сперелакиса. В 2-х томах. – М.: Медицина , 1990. – Т. 1. – С. 128-150.

44. Каценович Э.Р., Гусакова С.Д., Ибрагимов У.К. Интенсивность свободно-радикального окисления и жирнокислотный состав липидов у больных ИБС // Кардиология . – 1982. - №3. – С. 76 –79.

45. Киселева Н.Г., Метельская В.А. Перова Н.В. Обоснованность и тактика применения витаминов – антиоксидантов в профилактике атеросклероза // Кардиология . – 1998. – Т. 78. - № 12. – С. 77-81.

46. Коган А.Х. Корреляционная взаимосвязь между интенсивностью свободнорадикального перикисного окисления липидов и степенью повреждения миокарда // в кн. Новое в

диагностике и лечении заболеваний сердечно-сосудистой системы. - М. 1976. – с. 75-77.

47. Коган А.Х., Ершов В.И., Соколова И.Я. О механизмах усиления свободнорадикальных прооцессов у больных ИБС-стенокардией в зависимости от ее тяжести // Тер. архив. –1994. – Т. 66.- № 4. – С. 32-35.

48. Коган А.Х., Кудрин А.Х., Кактурский Л.В., Лосев Н. И. Свободнорадикальные перекисные механизмы патогенеза ишемии миокарда и их ферментативная регуляция // Пат. физиол.- 1992. - № 2. – С. 5-15.

49. Коган В.Е., Архипенко Ю.В., Писарев В.А. Повреждение мембран саркоплазматического ретикулума при перекисном окислении и его роль в развитии мышечной патологии // В кн.: Биофизика мембран. - М.: 1981. С. 88-95.

50. Коган А.Х., Попова Е.Н. Генерация активных форм кислорода лейкоцитами крови и альвеолярными макрофагами, содержание продукта перекисного окисления липидов малонового диальдегида и антиперекисная защита при саркоидозе и идиопатическом фиброзирующем альвеолите // Пульмонология. – 1996. - № 1. - с. 50-55.

51. Коновалова Г.Г., Ланкин В.В., Бескровнова Н.И. Роль ингибиторов перекисного окисления липидов в защите миокарда от ишемических повреждений // Архив патологии. – 1989. – Т. 51. – вып. 6. – С.19-24.

52. Корниенко А.И., Иванченко В.М., Киртаев А.Г., Дедов Е.И. Состояние перекисного окисления липидов у больных ИБС при операциях аортокоронарного шунтирования с использованием эпидуральной анестезии // Анестезиология и реаниматология. – 1995. - №1. – С. 42-45.

53. Коробейникова Э.Н. Модификация определения продуктов перекисного окисления липидов в реакции с тиобарбитуровой кислотой // Лабораторное дело. - 1989. - №7 . - С. 8 - 10.

54. Коробов Н.В. Даларгин - опиоидоподобный пептид периферического действия // Фармакол. и токсикол.- 1988.- № 4.- С.35-38.

55. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. - 1988. - №1. – С. 16-19.

56. Кошкин В.В. Образование перекиси водорода в митохондриях скелетных мышц // Биохимия. – 1984. – Т. 49. - № 11. – С. 1908-1911.

57. Кошкин В.В. Генерация супероксидного радикала и перекисное окисление липидов в скелетных мышцах // Биохимия. – 1985. –Т. 50. - № 9. – С. 1406-1410.

58. Ланкин В.З., Вандышев Д.Б., Тихадзе А.К. Влияние гипероксии на активность супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы в тканях мышей // Докл. АН СССР. – 1981. – Т. 259. – № 1. –С. 229-231.

59. Ласукова Т.В., Ускина Е.В., Афанасьев С.А., Пономаренко И.В., Нарыжная Н.В., Чернявский А.М., Лишманов Ю.Б. Влияние эмоксипина и гистохрома на процесс перекисного окисления липидов и активность МВ-креатинфосфокиназы сыворотки крови больных ИБС в динамике операции аорто-коронарного шунтирования // Эксперим. и клинич. фармакология. - 1997. - № 5. – С. 51-53.

60. Лебедев А.В., Афанасьев С.А., Алексеева Е.Д. Влияние возраста и ишемии на уровень липоперекисей и липидрастворимых антиоксидантов в сердце человека // Бюлл. экспер.биол. и мед. - 1995. - №6. - С. 584-586.

61. Леденев А.Н., Рууге Э.К. Генерация супероксидных радикалов митохондриями сердца в условиях ишемии // Бюл. экспер. биол и мед. – 1985. - № 9. – С. 303-305.

62. Литвицкий П.Ф., Сандриков В.А., Демуров Е.А. Адаптивные и патогенные эффекты реперфузии и реоксигенации миокарда. – М: Медицина. – 1994. – 320с.

63. Лишманов Ю.Б. Использование энкефалинов для предупреждения стрессорного повреждения сердца в эксперименте // Бюлл. экспер. биол. и мед. – 1986. - №9. – С. 271 –272.

64. Лишманов Ю.Б., Крылатов А.В., Маслов Л.Н. Роль периферических опиатных рецепторов мю- и дельта-типов в регуляции устойчивости сердца к аритмогенным воздействиям // Российский физиол. журнал.- 1997.- Т. 83. - № 7.- С. 80-87.

65. Лишманов Ю.Б., Маслов Л.Н. Опиоиные нейропептиды, стресс и адаптационная защита сердца. – Томск, 1994. – 352 с.

66. Лишманов Ю.Б., Маслов Л.Н, Ласукова Т.В. Роль опиоидной системы в адаптации организма и защите сердца при стрессе // Успехи физиологических наук. - 1997. - № 1. - С. 75-93.

67. Лишманов Ю.Б., Маслов Л.Н., Наумова А.В., Богомаз С.А. Активация μ-опиатных рецепторов как фактор повышения устойчивости сердца к ишемическим и реперфузионным повреждениям // Российский физ. журнал. им Сеченова. - 1998. – Том.84. - № 11. - С. 1223-1230.

68. Лишманов Ю.Б. , Маслов Л.Н., Реброва Т.Ю. Влияние энкефалинов на активность периферических стресс - лимитирующих систем в процессе развития аритмий, вызванных острой ишемией миокарда // Бюлл. ТНЦ АМН СССР. - 1991. - Вып. 4. - С 3-14.

69. Лишманов Ю.Б., Наумова А.В., Ласукова Т.В., Маслов Л.Н. Блокада опиатных рецепторов и реакция сердца на повреждение при ишемии и реперфузии // Кардиология. – 1998. - № 11. – С. 38-42.

70. Лишманов Ю.Б., Реброва Т.Ю., Афанасьев С.А., Кравченко С.И. Влияние синтетических энкефалинов на синтез

простагландинов и перекисное окисление липидов в изолированном сердце крыс при активации свободнорадикальных процессов // Бюлл. экспер. биол. и мед. –1992. - №11. – С. 88–91.

71. Лишманов Ю.Б., Травков Ю.А., Федотова Т.В., Реброва Т.Ю. Влияние опиоидных нейропептидов на систему простагландинов и процессы перекисного окисления липидов в миокарде при его стрессорном повреждении // Бюлл. экспер. биол. и мед. –1991. - №6. – С. 619–621.
72. Маллинс Л.Дж. Роль Na^{+}-Ca^{2+}-обмена в клетках ткани сердечной мышцы. Физиология и патофизиология сердца / Под ред. Н. Сперелакиса. В 2-х томах. – М.: Медицина, 1990. – Т.1. – С. 296-324.
73. Марков Х.М. Простаноиды и сердце // Пат. физиология и эксперим. терапия. – 1987. – вып. 6. – С. 6-13.
74. Маршанский В.Н., Новгородов С.А., Ягужинский Л.С. Влияние специфических ингибиторов дыхательной цепи и АТФ-синтетазы на транспорт ионов в митохондриях, индуцированный неферментативными перекисными реакциями // Биофизика. – 1983. - Т. 28. - вып. 5. - С. 830-834.
75. Маслов Л.Н., Крылатов А.В., Лишманов Ю.Б. Антиаритмическое действие агонистов μ-опиатных рецепторов при адреналовых аритмиях: роль вегетативной нервной системы // Бюлл. экспер. биол. и мед. - 1996. – № 7. - С.25-27.
76. Маслов Л.Н., Лишманов Ю.Б., Нарыжная Н.В. Об участии различных типов опиатных рецепторов в механизме стрессорного повреждения сердца // Физиологический журнал им. И.М.Сеченова. – 1996. – Т. 82. - № 5-6. – С. 53-58
77. Маслов Л.Н., Лишманов Ю.Б., Шекели Й.И. К механизму антиаритмического действия агонистов и антагонистов опиоидных рецепторов // Бюлл. экспер. биол. и мед. -

1993. – Т. 122. - № 8. - С. 169-171.

78. Маслов Л.Н., Нарыжная Н.В., Барбараш Н.Л., Лишманов Ю.Б. Механизмы устойчивости сердца к стресс-индуцированным повреждениям // Российский физ. журнал. - 1997. - Т. 83. - № 3. - С. 43-50.

79. Маслова Л.В. , Лишманов Ю.Б., Смагин Г.Н. Участие опиоидных пептидов в регуляции биосинтеза миокардиального белка при стрессе и адаптации // Вопр. мед. химии. – 1991. – Т. 37. - № 1. – С. 63-65.

80. Машковский М.Д. Лекарственные средства. Том 2 М.:"Новая волна", 2000. - 608 с.

81. Меерсон Ф.З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. - М.: Медицина, 1984. - 268с.

82. Меерсон Ф.З., Заяц В.И., Пшенникова М.Г. Предупреждение нарушений сократительной функции неишемизированных отделов сердца при экспериментальном инфаркте миокарда с помощью β- эндорфина // Кардиология.- 1985. – Т. 25. - №7. – С. 102-106.

83. Меерсон Ф.З., Каган В.Е., Архипенко Ю.В. Предупреждение активации перекисного окисления липидов и повреждения антиоксидантных систем миокарда при стрессе и экспериментальном инфаркте // Кадиология. - 1981. - № 12. – С. 55-59.

84. Меерсон Ф.З., Капелько В.И. Современные представления о механизме сокращения и расслабления сердечной мышцы // Успехи физиол. наук.- 1978.- Т. 9.- № 2.- С. 21-41.

85. Меерсон Ф.З., Пшенникова М.Г. Стресс-лимитирующие системы организма и новые принципы профилактической кардиологии. - М.: Союзмединформ 1989. – 72с.

86. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К. Антиоксиданты и ингибиторы радикальных окислительных процессов // Успехи современной биологии. – 1993. – Т. 113. -№ 4. – С. 442-455.

87. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Реутов В.П. Оксид азота и NO-синтазы в организме при различных функциональных состояниях // Биохимия. – 2000. – Т. 65. – вып. 4. – С. 485-503.

88. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Сафина А.Ф. Механизмы развития окислительного стресса при ишемическом и реперфузионном повреждении миокарда // Успехи современной биологии. – 1997. – Т. 117. - № 3. – С. 362-373.

89. Метелица Д.И. Активация кислорода ферментными системами. – М.: Наука, 1982. – 256 с.

90. Мещеряков А.В., Рузайкина Т.И., Пиляева И.Е. Перекисное окисление липидов при операциях на открытом сердце // Анестезиология и реаниматология. – 1990. - № 1. – С 19-23.

91. Михайлова С.Д., Сторажиков Г.И., Бебякова Н.А., Семушкина Т.М. О роли блуждающих нервов в антиаритмическом эффекте DAGO при острой ишемии миокарда // Бюлл. экспер. биол. и мед. - 1997. – Т. 124. - № 10. – С. 377-379.

92. Михайлова С.Д., Васильева Т.В., Семушкина Т.М., Сторажиков Г.И. Роль симпатической нервной системы в протективном эффекте селективного агониста κ-опиатных рецепторов динорфина A_{1-13} на частоту развития сердечных аритмий при ишемии миокарда // Бюлл. экспер. биол. и мед. - 2000. – Т. 129. - № 6. – С. 34-36.

93. Нарыжная Н.В. Рецептор-опосредованныые механизмы влияния опиоидной системы на устойчивость сердца к стрессорным повреждениям. - Автореф. дис. ...канд. мед. наук. - Томск., 1998 - 20с.

94. Наумова А.В. Опиоидные механизмы крдиопротекторного действия экстракта родиолы и влияние лигандов опиатных рецепторов на устойчивость сердца к реперфузионному повреждению.- Автореф. дис. ...канд. мед. наук .- Томск., 1998 - 20с.

95. Небольсина Л.И. О взаимодействии простагландинов и симпатико-адреналовой системы // Пат.физиол. и экспер. тер. - 1988. - № 6. - С. 48-50.

96. Нейлер В.Г., Дейли М.Дж. Кальций и повреждение кардиомиоцитов / Физиология и патофизиология сердца. /Под ред. Н.Сперелакиса. В 2-х томах. - М.: Медицина. 1990. - Т. 1. - С. 556-578.

97. Николаева А.А., Николаева Е.И, Попова Л.В., Николаев К.Ю., Куроедов А.Ю., Евсеева О.И. Динамика адаптационных индексов, перекисное окисление липидов и антиоксидантная защита при нестабильной стенокардии // Кардиология . - 1997. - Т. 38. - № 7. - С. 16-20.

98. Павленко В.С., Хлыстов В.В., Усынин А.Ф., Слепушкин В.Д. Сравнительное изучение действия даларгина и обзидана на течение острого инфаркта миокарда в эксперименте // Патол. физиол. и экспер. терапия. - 1988. - № 6. - С. 13-15.

99. Плавинский С.М., Кузнецов А.С. Перекисное повреждение липопротеидов высокой плотности и их холестерин-акцепторная функция у пациентов с ИБС и здоровых лиц // Физиология человека. – 1997. – Т. 23. - № 1. – С. 103-107.

100. Пескин А.В. Взаимодействие активного кислорода с ДНК // Биохимия. - 1997. - Т.62. - Вып.12. - С. 1571-1578.

101. Поберезкина Н.Б., Осинская Л.Ф. Биологическая роль супероксиддисмутазы // Украинский биохимический журнал. – 1989. – Т. 61. - № 2. – С.14-27.

102. Полонский В.М., Ярыгин К.Н., Кривошеев И.Г. Место приложения (центральное или периферическое) противоязвенного действия синтетического аналога эндогенных опиоидов даларгина в экспериментальной модели цистеаминовых дуоденальных язв у крыс // Бюлл экспер биол мед . - 1987. - № 4. - С. 433-434.

103. Полумисков В.Ю., Конорев Е.А., Конорев Л.А. Сердечная недостаточность в остром периоде инфаркта миокарда. - М.: Медицина, 1987. - 98с.

104. Прокопьева В.Д., Лаптев Б.И., Афанасьев С.А. Защитное действие карнозина при гипоксии и реоксигенации изолированного сердца крысы // Биохимия. – 1992. – Т. 57.- вып. 9. – С.1389-1392.

105. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е., Косицын Н.С. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. – М.: Наука, 1998. – 159 с.

106. Рубин А.Б. Биофизика: В 2-х кн.: Кн.2 Биофизика клеточных процессов.- М.: Высш. шк. - 1987. - 295 с.

107. Рубцов Б.В., Клебанов Г.И., Заморин О.В., Владимиров Ю.А. Сравнение действия УФ-излучения и Fe^{2+}-индуцированного перекисного окисления липидов на мембраны саркоплазматического ретикулума // Известия АН СССР. Сер.: биология – 1984. - № 2. – С. 299-302.

108. Сазонтова Т.Г., Архипенко Ю.В., Меерсон Ф.З. Увеличение активности Na,K-АТФазы мозга крыс при стрессе // Бюл. Экспер. Биол и мед. – 1984. - № 5. – С. 556-558.

109. Тада М., Шикегава М., Нимура Й. Поглощение кальция саркоплазматическим ретикулумом, и его регуляция и функциональное значение. Физиология и патофизиология сердца. / Под ред. Н. Сперелакиса. В 2-х томах. – М.: Медицина, 1990. – Т. 1. – С. 381-417.

110. Тигранян Р.А., Вакулина О.П. Содержание опиоидных

пептидов в тканях крыс при длительном ограничении двигательной активности // Косм. биология. - 1984. – Т. 18. - № 6. – С. 83-85.

111. Ткачева Г.А., Балаболкин М.И., Ларичева И.П. Радиоиммунохимические методы исследования. – М: Медицина, 1983. – 191 с.

112. Федоров Н.А., Радуловацкий М.Г., Чехович Г.Е. Циклические нуклеотиды и их аналоги в медицине. – 1990. – М. Медицина, 191с.

113. Чернов Ю.Н., Васин М.В., Батищева Г.А. Патологическое изменение клеточных мембран при ишемической болезни сердца и возможные пути фармакологической коррекции // Эксперим. и клинин. фармакол. - 1992. - Т. 57. - № 4. - С 62-72.

114. Ягнатинская А.М. О биологической роли ксантиноксидазы // Успехи современной биологии. – 1985. – Т. 99. - № 1. – С. 38-51.

115. Baamonde A., Dauge V., Gacel G., Roques B.P. Systemic administration of (Tyr-D-Ser(O-Tert-Butyl)-Gly-Phe-Leu-Thr(O-Tert-Butyl), a highly selective delta opioid antagonist, induces mu receptor-mediated analgesia in mice // J. Pharmacol. Exp. Therap. - 1991. - Vol. 257. - № 2. - P. 767-773.

116. Baines C.P., Cohen M.V., Downey J.M. Signal transduction in ischemic preconditioning: The role of kinases and mitochondrial KATP channels // J. Cardiovasc. Electrophysiol – 1999. – Vol. 10. – P. 741-754.

117. Berliner J.A., Navab M., Fogelman A.M., Frank J.S., Demer L.L., Edwards P.A. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation and genetics // Circulation. - 1995. - Vol. 91. - P. 2488-2496.

118. Boarder M.R., McArdle W. Opioid peptides in human adrenal: partial characterisation and presence of adrenal

peptide E // J. Clin. Endocr. – 1985. - Vol. 61. - № 4. – P. 658-665.

119. Bolland J.L., Koch H.P. The course of antioxidant reaction in polyisoprenes and allied compounds. Part IX. The primary thermal oxidation product of ethyl linoleate // J. Chem. Soc. - 1945. - № 7. - P. 445-447.

120. Bricknell O.L., Daries P.S., Opie L.H. A relationship between adenosine triphosphate, glycolysis and ischaemic contracture in the isolated rat heart // J. Mol. Cell. Cardiol.- 1981.- Vol.13.- P.941-945.

121. Brown G.C. Reversible binding and inhibition of catalase by nitric oxide // Eur. J. Biochem. – 1995. – Vol. 232.- № 1.- P. 188-191.

122. Callewaert G., Cleemann L., Morad M. Epinephrine enhances Ca^{2+} current-regulated Ca^{2+} release and Ca^{2+} reuptake in rat ventricular myocytes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- 1988.- Vol.85.- P.2009-2013

123. Carvajal K., El Hafidi M., Banos G. Myocardial damage due to ischaemia and reperfusion in hypertriglyceridemic and hypertensive rats: participation of free radicals and calcium overload // J. Hypertens. - 1999. - Vol.17. - № 11. - P. 1607-1616.

124. Champion H.C., Kadowitz P.J. D-[Ala^2]-endomorphin2 and endomorphin2 have nitric oxide dependent vasodilatator activity in rats // Physiol. - 1998. – Vol. 274. - № 5. – P. 1690-1697.

125. Chatman J.C., Gilbert H.F., Radda G.K. The metabolic consequences of hydroperoxide perfusion on the isolated rat heat // Eur. J. Biochem. – 1989. – Vol.184. – P 657 – 662.

126. Chan P., Niu C.S., Tomlinson B., Hong C.T. Effect of trilinolein on superoxide dismutase activity and left ventricular pressure in isolated rat hearts subjected to

hypoxia and normoxic perfusion // Pharmacology. – 1997. - № 5. – P. 252-258.

127. Chen E.P., Bittner H.B., Davis R.D., Folz R.J., Van Trigt P. Extracellular superoxide dismutase transgene overexpression preserve postischaemic myocardial function in isolated murine hearts // Circulation. – 1996. - № 1. – P. 412-417.

128. Cherubini E., North R. Mu- and kappa-opioids inhibit transmitter release by different mechanisms // Proc. Nat. Acad. Sci USA. - 1985. - Vol.82. - N 6. - P. 1860-1863.

129. Cotton R., Giles M.G., Miller L. Show J.S., Timmas D. ICI 174,864: a highly selective antagonist for the opioid δ-receptor // Eur. J. Pharmacol. - 1984.- Vol.97.- P.331-332.

130. Cowan A., Zhu X.Z., Mosberg H.I., Omnoas J.R., Porreca F. Direct dependence studies in rats with agents selective for different types of opioid receptor // J. Pharmacol. Exp. Therap. - 1988. - Vol.246. - № 3. - P. 950-955.

131. Darius H., Osbonde J.A., Reibel D.K., Lefer A.M. Protective actions of stable prostacyclin analog in ischaemia induced membrane damage in rat myocardium // J. Moll. Cell. Cardiol. - 1987. - Vol. 19. - № 3. - P. 243-250.

132. Dauge V., Rossignol P., Roques B.P. Comparison of the behavioural effects induced by administration in rat nucleus accumbens or nucleus caudatus of selective μ - and δ-opioid peptides or kelatorphan an inhibitor of enkephalin-degrading-enzymes // Psychopharmacology. - 1988. – Vol. 96. – p. 343-352.

133. Dayton W.R., Schollmeyer J.V. Isolation from porcine cardiac muscle of a Ca^{2+}-activated protease that partially

degrades myofibrills // J. Moll. Cell. Cardiol. – 1980. – Vol. 12. – P. 533-552.

134. Delay-Goyet P., Zajac J.M., Rigaudy P, Foucaud B., Roques B.P. Comparative biding properties of linear and cyclic δ-selective enkephalin analogues: [^{3}H]-[D-Thr^2 ,Leu ^{5}]enkephalyl-Thr ^{6} and [^{3}H]-[D-Pen^2 ,D-Pen^5]enkephalin // FEBS Let. - 1985. - Vol. 183. – P. 439-443.

135. Dhalla N.S., Golfman L., Takeda S., Takeda N., Nagano M. Evidence for the role of oxidative stress in acute ischemic heart disease: A brief review // Can. J. Cardiol. – 1999. – Vol. 15. - № 5. – P. 587-593.

136. Dobashi K., Pahan K., Chahal A., Singh I. Modulation of endogenous antioxidant enzymes by nitric oxide in rat C6 glial cells // J. Neurochem. – 1997. – Vol. 68. - №5. - P. 1896-1903.

137. Doring H.J., Dehnert H. The Isolated Perfused Heart. According to Langendorff // Ed. By Dr. Christian Doring. Biomesstechnik-Verlag. 1988.

138. Eaton J.W. Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: Mysteries of the bestiary // J. Lab. and Clin. Med. – 1991. – Vol. 118. – P. 3-4.

139. Engler R., Gilpin E. Can superoxide dismutase alters infarct size? // Circulation. – 1987. –Vol. 79. – P. 277-285.

140. Fiorani M., Saltarelli R., De Sanctis R., Palma F., Ceccaroli P., Stocchi V. Role of dehydroascorbate in rabbit erythrocyte hexokinase inactivation induced by ascorbic acid/Fe(II) // Arch. Biochem. Biophys. - 1996. - Vol. 334. - P.357-361.

141. Fraioli F., Moretti C., Paolucci D., Alicicio E. Physical exercise stimulates marked concomitant release of beta-endorphin and ACTH in peripheral blood in man //

Experientia. - 1980. – Vol. 36. – P. 987-989.

142. Frederich T., Lichey J., Nigam S., Priesnitz V., Wegschieder K., Follow-up of prostaglandin plasma levels after acute myocardial infarction // American heart Journal. - 1985. - Vol.109. -№ 2. – P. 218-221.

143. Fryer R.M., Hsu A.K., Nagase H., Gross G.J. Opioid-induced cardioprotection against myocardial infarction and arrhythmias: mitochondrial versus sarcolemmal ATP-sensitive potassium channels // J. of Pharmacology and experimental therapeutics. - 2000. - Vol. 294. - № 2. - P. 451-457.

144. Gacel G., Fournie-Zaluski M-C., Roques B.P. D-Tyr-Ser-Gly-Phe-Leu-Thr, a highly preferential ligand for δ-opiate receptors // FEBS Letters. - 1980. - Vol.118. - № 2. - P. 245-247.

145. Garlid K.D., Paucek P., Yarov-Yarovoy V. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels: Possible mechanism of cardioprotection // Circ. Res. – 1997. – Vol. 81. – P. 1072-1082.

146. Gey K.F. Epidemiological correlations between poor plasma levels of essential antioxidants and the risk of coronary heart disease and cancer //Lipid-Soluble Antioxidants: Biochemistry and Clinical Applications. – Basel: Birkhauser Verlag, - 1992. – P. 442-456.

147. Gey K.F., Stahelin H.B., Eichholzer M. Poor plasma status of carotene and vitamin-C is associated with higher mortality from ischemic heart disease and stroke. - Basal prospective study // Clin. Investigator. – 1993. – Vol. 71. - № 3. – P. 3-6.

148. Givertz M.M., Colucci W.S. New targets for heart-failure therapy: endothelin, inflammatory cytokines, and

oxidative stress // Lancet. - 1998. - Vol. 352. - №1. - P. 34-38.

149. Griger M., Schulz S.T. Estimmund der superoxide dismutase in den erythrozyten beim glucose-6-phosphat dehydrogenase mandel // Folia hematol DR. - 1983. – Vol. 110. - № 3. – P. 427-436.

150. Guangqiu L., Chen Y., Saari J. T., Kang Y. J. Catalase overexpressing transgenic mouse heart is resistant to ischaemia-reperfusion injury // APStracts. – 1997. – Vol. 4. – P. H217- H217.

151. Halliwell B. Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimisation of nutritional antioxidant intake in humans // Free Radic. Res. - 1996. - Vol. 25. - P.57-74.

152. Han X., Shimoni Y., Giler W.R. An obligatory role for nitric oxide in autonomic control of mammalian heart rate // J. Physiol. (London), 1994. – Vol. 476. - № 2. –P. 309 – 314.

153. Handa B.K., Lane A.C., Lord J.A.H., Morgan B.A., Rance M.J., Smith C.F.C. Analogues of beta-LPH 61-64 possessing selective agonist activity at mu-opiate receptors // Eur. J. Pharmacol. - 1981. - Vol.706. - P. 531-540.

154. Haramaki N., Stewart D. B., Aggarwal S., Ikeda H. Networking antioxidants in the isolated rat heart are selectively depleted by ischaemia-reperfusion // Free Radic. Biol. Med. – 1998. – Vol. 25. - № 3. – P. 329-339.

155. Harrison D.G., Ohara Y. Physiologic consequences of increased vascular oxidant stresses in hypercholesterolemia and atherosclerosis: implications for impaired vasomotion // Am. J. Cardiol. - 1995. - Vol. 75. - P.63B-64B.

156. Hegstad A.C., Ytrehus K., Myklebus R., Jorgensen L. Reversible ultrastructural alterations in the myocytic

mitochondria of isolated rat hearts induced by oxygen radicals // Ultrastruct Patol. – 1997. – Vol. 21. - № 3. – P. 253-262.

157. Helle K. Pre- and postsinaptic effect of peptides in peripheral effector system // Acta neurol. Scand. - 1984. – Vol. 69. - № 5. - P. 334-336.

158. Herbaczynska-Cedro K., Gordon-Majszak W. Attenuation by prostacyclin of adrenaline-stimulated lipid peroxidation in the myocardium // Pharmacol. Res. Commun. – 1986. – Vol. 18. - № 4. – P. 321-332.

159. Herbert V., Shaw S., Jayatilleke E. Vitamin C-driven free radical generation from iron // J. Nutr. - 1996. - Vol. 126. - Suppl. 4. - P.1213-1220.

160. Hess M.L., Manson N.H. Molecular oxygen: Friend and Foe. The role of the oxygen free radical system in the calcium paradox, the oxygen paradox and ischemia/reperfusion injury // J. Mol. Cell. Cardiol. – 1984. - Vol. 16. - P. 969-985.

161. Hill M.F., Singal P.K. Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats // Am. J. Pathol. - 1996. - Vol. 148. - P.291-300.

162. Hochino T., Ohta V., Jshigino J. The effect of sulfhydryl compounds on the catalytic activity of Cu,Zn-superoxide dismutase purified from rat liver // Experientia. - 1985. – Vol. 41. - № 11. – P. 1416-1419.

163. Hodgros E.K., Fridovich I. The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: inactivation of the enzyme // Biochemistry. – 1975. – Vol. 14. - № 24. – P. 5294-5299.

164. Hokfelt T., Everitt B., Meister B., Melander T. Neurons with multiple messengers with special reference

to neuroendocrine systems // Recent. Progr. Harm. Res. - 1986. – Vol. 42. – P. 1-66.

165. Hoshida S., Ruzuya T., Fuji H. Subletal ischemia alters myocardial antioxidant activitet in canine heart // Amer. J. Physiol.- 1993. – Vol. 246. – P. H33-H39.

166. Huang X.D., Wong T.M. Morphine and (D-Ala^2,NMe-Phe^4,Gly-ol)-enkephalin increase the intracellular free calcium in isolated rat myocytes. Effect of naloxone or pretreatment with morphine // Life Sci.- 1991. - Vol. 48. - № 11. - P.1101-1107.

167. Imlay J.A., Linn S. DNA damage and oxygen radical toxicity. // Science. – 1988. – Vol. 240. – P. 1302-1309.

168. Jacson C.V., Mickelson J.K., Pope T.K., Rao P.S., Lucchesi B.R. O_2 free radical - mediated myocardial and vascular dysfunction // Amer. J. Physiol. – 1986. – Vol. 251. – P. H1225-1231.

169. Jaffe B.M. Berman H.R. Prostaglandin and prostaglandin metabolism // Methods of hormone Radioimmunoassay, New Yorc, 1979. – P. 19-42.

170. Jeroudi M.O., Triana F.J., Bharat S.P., Bolli R. Effect of superoxide dismutase and catalase, given separately, on myocardial "stunning" // Amer. J. Physiol. – 1990. – Vol. 253. – P. 889-901.

171. Jose Y.J., Berenice S.G., Cecilia V.R. Induction of antioxidant enzymes by dexamethasone in the adult rat lung // Life Science. - 1997. - Vol. 60. - P. 2059-2067.

172. Kanner J., Harel S., Granit R. Nitric oxide as an antioxidant // Arch. Biochem. Biophys. - 1991. – Vol. 289. - № 1. - P. 130-136.

173. Kako K.J. Free radical effects on membrane protein in myocardial ischemia-reperfusion injury // J. Mol. Cell. Cardiol. – 1987. – Vol. 19. – P. 209-211.

174. Keller G.-A. Warner T.G., Steimer K.S., Hallewell R.A.

Cu,Zn-superoxide dismutase is a peroxisomal enzyme in human fibroblasts and hepatoma cells // Proc. Natl. Acad. Dci. USA. – 1991. – Vol. 88. – P. 7381-7385.

175. Klee W., Streaty R. Opioid-dependent dual regulation of adenilat cyclase in a cell-free systems // Advances in cyclic nucleotide research. New York: Raven Press, - 1981. - Vol. 14. - P. 629-635.

176. Kobayashi T., Saito N., Takemori N. Ultrastructural localisation of superoxide dismutase in human skin // Acta Derm. and Venerol. – 1993. – Vol. 73. – P. 41-45.

177. Koerner J.E., Anderson B.A., Dage R.S. Protection against postischemic myocardial dysfunction in anestezed rabbits with scavengers of oxygen-derived free radicals – superoxide dismutase plus catalase, N-2-mercaptoropionyl glycine and captopril // J. Cardiovasc. Pharmacol. – 1991. – Vol. 17. – P. 185-192.

178. Koreh K., Myron L., Seligman, Eugene S.F., Harry B.D. Lipid antioxidant properties of naloxone in vitro // Biochemical and biophysical research communications. – 1981. – Vol. 102. - № 4. – P. 1317-1322.

179. Kukreja R. C., Okabe E., Schrier G.M., Hess M.L. Oxygen radical-mediated lipid peroxidation and inhibition of Ca^{2+} - ATPase activity of cardiac sarcoplasmic reticulum // Archives Biochem. And Biophys. - 1988. – Vol.261. - № 2. – P. 447-457.

180. Lacy F., O'Connor D.T., Schmid Schönbein G.W. Plasma hydrogen peroxide production in hypertensives and normotensive subjects at genetic risk of hypertension // J. Hypertens. - 1998. - Vol. 16. - № 3. - P. 291-303.

181. Lee A.Y.S., Wong T.M. Naloxone reduced release of creatin kinase in the isolated ischaemic rat heart // Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. - 1985. - Vol.179. - P.219-221.

182. Lee A.Y.S., Wong T.M. Effects of dynorphin 1-13 on cardiac rhythm and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) levels in the isolated perfused rat heart // Neuroscience Lett. - 1987. - V.80. - P. 345-352.

183. Liang B.T., Gross G.J. Direct preconditioning of cardiac myocytes via opioid receptors and K_{ATP} channels // Circ Res. - 1999. - Vol. 84. - P. 396-400.

184. Lin S.Y., Chang H.P. Induction of superoxide dismutase and catalase activity in different rat tissues and protection from UVB irradiation after topical application of Ginkgo biloba extracts // Methods. Find. Exp. Clin. Pharmacol. – 1997. - № 6. – P. 367-371.

185. Lucas D.T., Szweda L.I. Cardiac reperfusion injury: Aging, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction // J. Biol. Chem. - 1998. - Vol. 95. - P. 510-514.

186. Maggirwar S.B., Dhanraj D.N., Somani S.M., Ramkumar V. Adenosine acts as endogenous activator of the cellular antioxidant defense system // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1994. – Vol. 210. - № 2. – P. 508-515.

187. Marcengill M.B., Puri S., Puri S.K., Moharman A., Leonova E. Antioxidant effect of pyruvate in isolated rat hearts // J. Moll. Cell. Cardiol. - 1995. -№ 9. – P. 2059-2067.

188. Marklund S.L., Holme E., Hellner L. Superoxide dismutase in extracellular fluids // Clin. Chim. Acta. – 1982. – Vol. 126. – P. 41-51.

189. Marks A.R. Intracellular calcium-release channels: regulators of cell life and death // Amer. J. Physiol.- 1997. - Vol.272. - P. H597-H605.

190. Masanori K., Vijavan E., Narajan S.D. Mechanism for depression of heart sarcolemmal Ca^{2+} pump by oxygen free radicals // Amer. J. Physiol. – 1989. – Vol. 257. – P. 804- 811.

191. Masini E., Salvemini D., Ndisang J.F., Gai P., Berni L., Moncini M., Bainchi S., Mannaioni P.F. Cardioprotective activity of endogenous and exogenous nitric oxide on ischemia reperfusion injury in isolated guinea pig hearts // Inflamm Res. – 1999. – Vol. 48. - № 11. – P. 561-568.

192. Maslov L.N., Lishmanov Yu.B. The antiarrhythmic of D-Ala^2,Leu^5,Arg^6-enkephalin and its possible mechanism // Inter. J. Cardiology.- 1993.- Vol. 40.- № 1.- P.89-94.

193. Melin A.M., Peuchant E., Perromant A., Clerc M. In vitro influence of ascorbate on lipid peroxidation in rat testis and heart microsomes // Moll. Cell. Biochem. – 1997. –Vol. 169. - № 1-2. – P. 171-176.

194. Miki T., Cohen M.V., Downey J.M. Opioid receptors contributes to ischemic preconditioning through proteinkinase C activation in rabbits // Mol. Cell. Biochem. - 1998. - Vol. 186. - P 3-12.

195. Mirsa H.P., Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase // J. of biological chemistry. - 1972. – Vol. 247. - № 10. – P. 3170-3175.

196. Mohazzab-H K.M., Fayngersh R.P., Wolin M.S. Nitric oxide inhibits pulmonary artery catalase and H2O2-associate relaxation // Am. J. Physiol. – 1996. – Vol. 271. - № 5. – P. 1900-1906.

197. Moncada S., Vane J.R. Prostacyclin: its biosynthesis, actions and clinical potential // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. – 1981. - Vol. 294. – P. 305-329.

198. Mondola P., Annella T., Serz R. Secretion and increase of intracellular Cu,Zn-superoxide dismutase content in human neuroblastoma SK-N-BE cells subjected to oxidative stress // Brain Res. Bull. - 1998. - Vol. 45. - № 5. - P.517-520.

199. Nakaya H., Tohse N., Kanno M. Electrophysiological derangement induced by lipid peroxidation in cardiac tissue // Amer. J. Physiol. – 1987. – Vol. 253. – P. H1089-1097.

200. Nenseter M.S., Drevon C.A. Dietary polyunsaturates and peroxidation of low density lipoprotein // Current Opinion Lipidology. - 1996. - Vol. 7. - P.8-13.

201. O`Donell V.B., Chumpley P.H., Hogg N. Nitric oxide inhibition of lipid peroxidation: kinetics of reaction with lipid peroxil radicals and comparison with alpha-tocopherol // Biochemistry. - 1997. – Vol. 36. - № 49. – P. 15216-15223.

202. Opie L.H., Coetzee W.A., Dennis S.C., Thandroyen F.T. A potential role of calcium ions in early ischemic and reperfusion arrhythmias // Ann. N.Y. Acad. Sci.- 1988. - Vol.522. - P.464-477.

203. Oubidar M., Marie C., Mossiat C., Bralet J. Effect of increasing intracellular reactive iron level on cardiac function and oxidative injury in the isolated rat heart. // J. Moll. Cell. Cardiol. – 1996. – Vol. 28. - № 8. – P. 1769-1776.

204. Panczenko-Kresowska., Ziemlanski S., Rudnicki S., Wojtulewicz L., Przepiorka M. The influence of vitamin C and E or beta-carotene on peroxidative processes in persons with myocardial ischemia // Pol. Merkuriusz. Lek. – 1998. – Vol. 4. - № 19. – P. 12-15.

205. Parthasarathy S., Santanam N. Mechanism of oxidation, antioxidants and atherosclerosis // Current Opinion in Lipidology. - 1994. - Vol.5. - P.371-375.

206. Pelton J.T., Kazmierski W., Gulya K. Design and synthesis of conformationally constrained somatostatin analogues with high potency and specificity for mu opioid

receptors // J. Med. Chem. - 1986. – Vol. 29. – P. 2370-2375.

207. Pinkus R., Weiner L.M., Daniel V. Role of oxidants and antioxidants in the induction of AP-1, NF-kappa B and glutathione S-transferase gene expression // J. Biol. Client. - 1996. - Vol. 271. - № 23. - P. 13422-13429.

208. Popescu L.M., Panqiu C., Hinescu M., Nutu O. The mechanism of cGMF-induced relaxation in vascular smooth muscle // Eur. J. Pharmacol. – 1985. – Vol. 107. – P. 392 - 394.

209. Ratore N., John S., Kale M., Bhathagar D. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in isoproterenol induced oxidative stress in rat tissues // Pharmacol. Res. – 1998. – Vol. 38. - № 4. – P. 297-303.

210. Ravinder P., Curtis M.J. Effect of NO modulation on cardiac arrhythmias in the rat isolated heart // Circ. Res. – 1995. - № 77. – P. 984-992.

211. Richard V.J., Murry C.E., Jennings R.B., Reimer K.A. Therapy to reduced free radical during early reperfusion does not limit the size of myocardial infarcts caused by 90 minutes of ischemia in dogs // Circulation. – 1988. – Vol. 78. P. 473-480.

212. Richter C. Reactive oxygen and nitrogen species regulate mitochondrial Ca^{2+} homeostasis and respiration // Bioscience Rep. - 1997. - Vol. 17. - P. 53-66.

213. Rump A. F., Klaus W. Comparison of the cardioprotective efficacy of superoxide dismutase in single and a repetitive coronary occlusion model in rabbit hears // Arzneimittelforschung. – 1995. - № 45. – P. 1063-1066.

214. Sakagami T., Momose K., Takeda M. Relationship between ascorbyl radical intensity and apoptosis-inducing activity // Anticancer Res. - 1996. - Vol. 16. - P. 2635-2644.

215. Sakagami H., Satoh K., Sugaya K. et al. Effect of the type of serum in the medium on sodium ascorbate-induced cytotoxicity // Anticancer Res. - 1996. - Vol. 16. - P. 1937-1941.

216. Samson S.B., SARDJAN D.N., ROBERT W.M., Edward L.Y. Contraction-relaxation coupling: determination of the onset of diastole // Am. J. Physiol. – 1999. - Vol. 277. – P. 23-27.

217. Sargent C.A., Wilde W.M., Dzonczyk S., Murray H.N, Karnial A., Grover G.J. The effect of α2-adrenoreceptor antagonists in isolated globally ischemic rat hearts // Eur. J. Pharmacol. - 1994. - Vol. 261. - P.25-32.

218. Schiller P.W., Nguyen T.M.-D., Chung N.N. Peripheral antinociceptive effect of an extremely m-selective polar dermorphin analog (DALDA) // The International Narcotic Research Conference'89, Alan R. Liss. New York. - 1990. - P. 53-56.

219. Schiller P.W., Nguyen T.M.-D., Lemieux C. Two new families of opioid peptide analogs displaying extraordinary μ-receptor selectivity and preference for either peripheral or central sites // Advances in the Biosciences. Pergamon Press, London. - 1989. - Vol.75. - P. 85-88.

220. Schimke I., Schikora M., Meyer R., Dubel H.P., Modersohn D., Kleber F.X., Baumann G. Oxidative stress in the human heart is associated with changes in the antioxidative defense as shown after heart transplantation // Mol. Cell. Biochem. - 2000. - Vol. 204. - № 1-2. – P. 89-96.

221. Schneider R., Iscovitz H., Ilan Z., Bernstein K., Gros M., Iaina A. Oxygen free radical scavenger system intermediates in essential hypertensive patients before and immediately after sublingual captopril administration

// Isr. J. Med. Sci. - 1990. - Vol. 26. - № 9. - P. 491-495.

222. Schultz J.E.J., Hsu A.K., Gross G.J. Morphine mimics the cardioprotective effect of ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in the rat heart // Circ Res. - 1996. - № 78. - P. 1100-1104.

223. Schultz J.E.J., Hsu A.K., Nagase H., Gross G.J. TAN-67, a δ_1-opioid receptor agonist, reduces infarct size via activation of Gi/o proteins and KATP channels // Am. J. Physiol. -1998. - Vol. 274. - PH909-H914.

224. Scott M.D., Lubin B.H., Zuo L., Kuypers F.A. Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: Prominent importance of catalase // J. Lab. and Clin. Med. – 1991. –Vol. 118. – P. 7-16.

225. Sharp B.M., Keane W.F., Sun H.J., Gekker G., Tsukayama D., Peterson P.K. Opioid peptides rapidly stimulate superoxide production by polymorphnonuclear leukocytes and macrophages // Endocrinology. – 1985. – Vol. 117. - № 2. – P. 793-795.

226. Shi B. Clinical study on the relationship between erythrocyte ATPase activity and lipid peroxidation in essential hypertension // Chung Hua Hsin Hsueh Kuan Ping Tsa Chih. – 1993. – Vol. 21. - № 1. – P. 26-28.

227. Singal P.K., Khaper H., Palace V., Kumar D. The role of oxidative stress in the genesis of heart disease // Cardiovasc. Res. – 1998. – Vol. 40. – P. 426-432.

228. Singh N., Dhalla A.K., Seneviraine C., Singal P.K., Oxidative stress and heart failure // Mil. Cell. Biochem. - 1995. – Vol. 147. - № 1-2. - P. 77-81.

229. Shuter S.L., Bernier M., Davies M.J. Manipulation of myocardial alpha-tocopherol levels fails to affect reperfusion arrhythmias or functional recovery following

ischemic challenge in the rat heart // Basic Res. Cardiol. - 1989. – Vol. 84. - № 4. – P. 421-430.

230. Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance // J. Biol. Chem. – 1997. – Vol. 272. - №. 34. – P. 20963-20966.

231. Suzuki Y.J., Ford G.D. Inhibition of Ca^{2+} - ATPase of vascular smooth muscle sarcoplasmic reticulum by reactive oxygen intermediates // Amer. J. Physiol.- 1991. - Vol. 261. - P. H568 -H574.

232. Tada M., Hochiba S., Kusuya T., Inoue B., Minamino T., Abe H. Augmented thromboxsane A_2 generation and efficacy of its blockade in acute myocardial infarction // Int. J. Cardiol. – 1985. - № 8. – P. 301-312.

233. Tate D.J., Miceli M.V., Newsome D.A. Phagocytosis and H_2O_2 induce catalase and metaliothionein irene expression in human retinal pigment epithelial cells // Invest. Onithalmol. Vis. Sci. - 1995. - Vol. 36. - P.1271-1279.

234. The World Health Report, 1997: conquering suffering, enriching humanity. World Health Organisation. - Geneva. - 1997. - 39P.

235. Theres H., Wagner K.D., Schulz S., Strube S., Leiterer K.P., Romberg D., Gunther J., Scholz H., Baumann G., Schimke I. Oxygen radical system in chronic infarcted rat heart: the effect of combined beta blockade and ACE inhibition // J. Cardiovasc. Pharmacol. – 2000. – Vol.35. - №5. – P. 708-715.

236. Tripathi Y., Hengde B.M., Reghuveer C.V. Effect of superoxide dismutase and acidified sodium nitrite on infarct size following ischemia and reperfusion in dogs // Indian J. Physiol. Pharmacol. – 1997. – Vol. 41. - № 3. – P. 248-256.

237. Tsao L.I., Ladenheim B., Andrews A.M., Chiueh C.C., Cadet J.L., Su T.P. Delta opioid peptide [D-Ala^2,D-leu^5]-

enkephalin blocks the long-term loss of dopamine transporters induced by multiple administrations of methamphetamine: involvement of opioid receptors and reactive oxygen species // J. Pharmacol. Exp. Ther. - 1998. – Vol. 287. - № 1. – P. 322-331.

238. Ventura C., Lakatta E.G., Sisini A., Campus M.P., Capogrossi M.C. Leucine-enkephalin increases the level of inositol (1,4,5) triphosphate and releases calcium from an intracellular pool in rat ventricular cardiac myocytes // Boll. Soc. It. Biol. Sper. - 1991. - Vol. 67. - № 3. - P. 261-266.

239. Ventura C., Spurgeon H.A., Lakatta E.G., Capoglossi M.C. Specific opioid receptor agonist alter the twitch and cytosolic Ca^{2+} transport of rat myocytes // Circulation. - 1989. - Vol.80. - N4. - P.191-196.

240. Wagner B.A., Buettner G.R., Burns C.P. Vitamin E slows the rate of free radical-mediated lipid peroxidation in cells // Arch. Biochem. Biophys. – 1996. – Vol. 334. – P. 261-267.

241. Wanlinsky P., Smith J.B., Lefer A.M., Lebenthal V., UrbanP., Greenspon A., Goldberg S. Tromboxan A_2 in acute myocardial infarction //Am. Heat J. - 1984. - Vol. 108. – P. 866-868.

242. Ward C.A., Giles W.R. Ionic mechanism of the effects of hydrogen peroxide in rat ventricular myocytes // J. Physiol. (Lond.)- 1997. - V. 500. - P. 631-642.

243. Ward M.A., Lands W.E. Lipid peroxidation in relation to prostacyclin and thromboxsane pathophysilogy // Br. Med. Bull. – 1983. –Vol. 39. –№ 3. – P. 277-280.

244. Wendel A. Enzymes acting against reactive oxygen // Enzymes – Tools and Targets. - Basel: Karger, 1988. - P. 161-167.

245. Witting P.K., Upston J.M., Stocker R. Role of alpha-tocopheroxyl radical in the initiation of lipid peroxidation in human low-density lipoprotein exposed to horse radish peroxidase // Biochemistry. - 1997. – Vol.36. - № 6. – P. 1251-1258.

246. Wolff S.P., Dean R.T. Fragmentation of proteins by free radicals and its effect on their susceptibility to enzymic hydrolysis // Biochem. – 1986. – Vol. 234. – P. 399-403.

247. Wong T.M., Lee A.Y.S, Tai K.K. Effects of drugs interacting with opioid receptors during normal perfusion or ischemia and reperfusion in the isolated rat heart - an attempt to identify cardiac opioid receptor subtype(s) involved in arrhythmogenesis // J. Mol. Cell. Cardiol. - 1990. - Vol. 22. - P. 1167-1175.

248. Xia Q., Sheng J.Z., Tai K.K., Wong T.M. Effects of chronic U50,488H treatment on binding and mechanical responses of the rat hearts // J. Pharmacol. Exp. Ther. - 1994. - Vol. 268 - P. 930-934.

249. Xiao R-P., Spurgeon H.A., Capogrossi M.C., Lakatta E.G. Stimulation of opioid receptors on cardiac ventricular myocytes reduces L-type Ca^{2+} channel current // J. Mol. Cell. Cardiol. - 1993. - Vol.25. - P. 661-666.

250. Yagi K. A simple fluorimetric assay for lipoperoxide in blood plasma // Biochem. Medicine. – 1976. – Vol. 15. – P. 212-216.

251. Yang B.S., Mehta J.L. Inhibition of nitric oxide does not affect reperfusion-induced myocardial injury, but it prevents lipid peroxidation in the isolated rat heart // Life Sciences. – 1997. - Vol. 61. - № 3. – P. 229-236.