

На правах рукописи

**Горбунов  
Александр Сергеевич**

**Адаптивный феномен ишемического посткондиционирования  
сердца: значение опиоидных рецепторов, протеинкиназы С, Р13-киназы  
и  $K_{ATP}$ -каналов**

03.03.01 - физиология  
14.03.03 - патологическая физиология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Томск – 2013

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования Томский государственный педагогический университет

**Научные руководители:**

доктор биологических наук

Ласукова Татьяна Викторовна

доктор медицинских наук, профессор

Маслов Леонид Николаевич

**Официальные оппоненты:**

Доктор медицинских наук, профессор,  
профессор кафедры биофизики и  
функциональной диагностики ГБОУ  
ВПО СибГМУ Минздрава  
России

Ковалев Игорь Викторович

Доктор медицинских наук,  
заведующий отделом  
лекарственной токсикологии  
ФГБУ «НИИ фармакологии» СО РАМН

Чурин Алексей Александрович

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины» СО РАМН

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2013 г. в \_\_ часов на заседании диссертационного совета \_\_\_\_\_ Сибирского государственного медицинского университета (634050, г. Томск, Московский тракт, д. 2)

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России  
Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2013г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

Петрова Ирина Викторовна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность.** Одна из наиболее актуальных проблем современной физиологии и патофизиологии является изучение механизмов адаптации с целью разработки новых подходов к повышению устойчивости сердца к ишемическим и реперфузионным повреждениям. Это связано с тем, что основной причиной инвалидизации и смертности среди взрослого населения России и развитых стран является ишемическая болезнь сердца и, прежде всего, острый инфаркт миокарда (ОИМ) [Марков В.А. и др., 2011; Braunwald E., 2011]. На данном этапе единственным эффективным методом лечения ОИМ является реканализация инфаркт-связанной коронарной артерии [Марков В.А. и др., 2011; Braunwald E., 2011]. При ишемии-реперфузии необратимые повреждения кардиомиоцитов возникают слишком быстро. Так, по данным некоторых авторов, обширный очаг некроза формируется уже при 20-минутной экспериментальной коронароокклюзии и последующей реперфузии (3 ч) [Neckar J. et al., 2003]. В России среднее время поступления больного с ОИМ в стационар составляет 2,5 – 2,8 ч [Марков В.А. и др., 2011]. Для спасения жизни пациентов с ОИМ на догоспитальном этапе неоценимую помощь могло бы оказать применение препаратов, заметно повышающих устойчивость сердца к действию ишемии-реперфузии. К сожалению, таких лекарственных средств пока не существуют. Для создания подобных препаратов, необходимо изучение механизмов адаптационных феноменов, обеспечивающих устойчивость сердца к ишемии и реперфузии. К таким адаптивным феноменам следует отнести ишемическое пре- и посткондиционирование.

В 1986 г Murry и соавт. открыли адаптивный феномен, впоследствии названный «ишемическим преко́ндиционированием» [Murry С.Е. et al., 1986]. Физиологи установили, что четыре сеанса пятиминутной окклюзии коронарной артерии в сочетании с пятиминутными сеансами реперфузии непосредственно перед длительной ишемией позволяют уменьшить размер инфаркта миокарда сердца собаки в среднем на 75% [Yetgin T. et al, 2010; Turer A.T. и Hill J.A., 2010]. В 2003 г исследователи из группы J. Vinten-Johansen обнаружили [Zhao Z.Q. et al., 2003] ещё один адаптивный феномен. Оказалось, что сеансы кратковременной коронароокклюзии и реперфузии, повторяемые несколько раз сразу после прекращения длительной ишемии сердца, также оказывают кардиопротекторный эффект. Это явление получило название «ишемического посткондиционирования» [Zhao Z.Q. et al., 2003; Sorensson P. et al., 2010]. В обоих случаях речь идёт об адаптивном феномене, который реализуется на уровне сердца, поскольку преко́ндиционирование и посткондиционирование удаётся воспроизвести как *in vivo*, так и *in vitro*.

Позднее кардиопротекторный эффект ишемического посткондиционирования (ИП) был подтвержден независимыми исследователями на различных видах животных. Эксперименты проводились на собаках, кроликах, крысах, обезьянах, мышах, свиньях [Argaud L. et al.,

2005; 2008; Tong G. et al., 2010; Zhao Z.Q. et al., 2010]. Кроме того, клинические наблюдения, выполненные на пациентах с острым инфарктом миокарда, подтвердили существование феномена ишемического посткондиционирования у человека [Tarantini G. et al., 2010].

Наличие защитного эффекта посткондиционирования было зафиксировано не только в опытах *in vivo*, но и *in vitro* на изолированном сердце [Crisostomo P.R. et al., 2006] и изолированных кардиомиоцитах [Wang H.C. et al., 2006]. Так, в работе А. Tsang [Tsang A. et al., 2004] на изолированном сердце крысы было показано, что ишемическое посткондиционирование после 35-минутной ишемии способствовало уменьшению размера зоны инфаркта на 20%. В работе Н. Sasaki и соавт. [Sasaki H. et al., 2007] было установлено значительное сокращение продолжительности реперфузионных желудочковых аритмий после посткондиционирования.

Во время ишемии главной причиной гибели кардиомиоцитов является некроз, но после возобновления коронарной перфузии в клетках миокарда запускаются процессы, обуславливающие апоптоз клеток сердца [Mocanu M.M. et al., 2000]. В работе Y. Lu [Lu Y. et al., 2008] было установлено, что посткондиционирование позволяет уменьшить число кардиомиоцитов, погибших в результате апоптоза. Кардиопротекторные свойства ИП не ограничиваются только уменьшением области инфаркта миокарда и антиапоптотическим действием. Согласно данным А. Moriguchi и соавт. [Moriguchi A. et al., 2010], ИП позволяет ослабить реперфузионную контрактуру сердца, тем самым способствуя более полному восстановлению сократительной активности миокарда после ишемии. Кроме того, в ряде независимых работ был подтверждён положительный эффект посткондиционирования в отношении реперфузионной насосной функции сердца [Sasaki H. et al., 2007; Deyhimy D.I. et al., 2007], в уменьшении реперфузионного выброса из миокарда лактатдегидрогеназы, креатинфосфокиназы (КФК) и тропонина I [Borpassa J.C. et al., 2006] и восстановления функции эндотелия [Zhao J.L. et al., 2007].

Следует отметить, что до сих пор не существует общепринятой модели ИП, и каждый коллектив исследователей вырабатывает свою методику моделирования названного феномена, базируясь на собственных данных. Во многом неясным остаётся рецепторный и сигнальный механизм ишемического посткондиционирования.

**Цель:** Изучить роль опиоидных рецепторов, протеинкиназы С и  $K_{ATP}$ -каналов, PI3-киназы в механизме адаптивного феномена ишемического посткондиционирования изолированного перфузируемого сердца.

**Задачи исследования:**

1. Выполнить сравнительный анализ пяти моделей посткондиционирования и выбрать оптимальный для дальнейшего изучения.
2. Изучить роль опиоидных рецепторов в опосредовании толерантности сердца к ишемии и реперфузии при ишемическом посткондиционировании.

3. Исследовать роль протеинкиназы С в реализации кардиопротекторного эффекта адаптивного феномена посткондиционирования.

4. Оценить вклад  $K_{ATP}$ -каналов в кардиопротекторный эффект ишемического посткондиционирования.

5. Изучить значение Р13-киназы в механизме формирования кардиопротекторного эффекта адаптивного феномена посткондиционирования.

### **Научная новизна**

Впервые проведен сравнительный анализ кардиопротекторного эффекта ишемического посткондиционирования по пяти моделям.

Несомненную новизну представляют данные о роли  $\delta_1$ -опиоидных рецепторов в механизме адаптивного феномена посткондиционирования сердца.

Впервые показана роль  $\delta$ -изоформы протеинкиназы С в реализации кардиопротекторного эффекта адаптивного феномена посткондиционирования.

### **Научно-практическая значимость**

Теоретическая и практическая значимость работы заключается в том, что получены принципиально новые данные о механизме кардиопротекторного действия ишемического посткондиционирования. Полученные результаты могут быть востребованы кардиохирургическими клиниками, проводящими операции с использованием искусственного кровообращения, кафедрами и институтами, изучающими проблемы ишемических и реперфузионных повреждений сердца, фармацевтическими компаниями, разрабатывающими препараты для лечения заболеваний сердечнососудистой системы.

Кроме того, данные выполненной работы расширяют представления о взаимодействии опиоидных рецепторов сердца с внутриклеточными сигнальными системами в кардиомиоцитах при ишемическом посткондиционировании.

### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Установлено, что опиоидная система является одним из ключевых звеньев повышенной устойчивости сердца к действию ишемии и реперфузии при ишемическом посткондиционировании.

2. Кардиопротекторный эффект ишемического посткондиционирования реализуется при участии протеинкиназы  $S_{\delta}$ , Р13-киназы и  $K_{ATP}$ -каналов.

**Апробация работы:** Материалы диссертации представлены на конференциях: 6 российская конференция с международным участием «Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция» (Москва, 2011); V Всероссийская с международным участием школа-конференция (Москва, 2012); Российский национальный конгресс кардиологов (Санкт-Петербург, 2013).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 12 печатных работ, из них 9 работ в журналах списка ВАК, 3 публикации в материалах международных и российских конференций.

**Гранты.** 10-04-00288-а РФФИ Сигнальный механизм адаптивного феномена индуцированного опиоидами; 11-04-16115-моб\_з\_рос Участие в работе VI Российской конференции с международным участием «Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция»; 11-04-98004-р\_сибирь\_a Адаптивный феномен, индуцированный опиоидами: рецепторная природа и сигнальный механизм.

**Личный вклад автора.** Автором сформулированы цель, задачи исследования и основные положения, выносимые на защиту. Проведены в полном объеме экспериментальные исследования, изучены отечественные и зарубежные источники литературы, посвященные изучению гипоксии. Доля участия в сборе материала - 100%, в обработке материала – 100%, в обобщении и анализе материала 90%.

**Объем и структура работы.** Диссертация изложена на 127 страницах машинописного текста и состоит из введения, трех глав, заключения, выводов и списка литературы, включающего 197 источника, из них 29 отечественный и 168 иностранных. Диссертация иллюстрирована 1 таблицей и 25 рисунками.

## **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Эксперименты выполнены на крысах самцах линии Вистар массой 250-300 г. Все экспериментальные исследования были проведены на модели изолированного перфузируемого по методу Лангендорфа сердца крысы. На данной модели оценивали инотропные, кардиопротекторные эффекты ишемического посткондиционирования. Преимущество подобных исследований по сравнению с работами, выполняемыми *in vivo*, состоит в том, что миокард в такой модели выведен из-под влияния регуляторных систем целого организма. Это дает возможность обнаружить изменения биохимических процессов и сократительной функции, зависящие только от нарушений структуры и метаболизма миокарда. В данной работе использовали модель тотальной (глобальной) ишемии, позволяющей полностью прекратить поступление кислорода и питательных субстратов к клеткам сердца, а также отток продуктов метаболизма.

У наркотизированных эфиром крыс 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°C раствор Кребса-Хензелейта, после чего помещали в термостабилизированную увлажненную камеру и вводили канюлю в восходящую дугу аорты, через которую поступал изотонический раствор [Doring H.J. и Dehnert H., 1988]. В

работе использовали изотонический раствор Кребса-Хензелята следующего состава (в ммоль/л): NaCl – 120; KCl – 4,8; CaCl<sub>2</sub> – 2,0; MgSO<sub>4</sub> – 1,2; KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub> – 1,2; NaHCO<sub>3</sub> – 20; глюкоза – 10. Перфузионный раствор насыщали газовой смесью, содержащей 95% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub>. Для приготовления раствора Кребса-Хензелята использовали реактивы компаний «Sigma-Aldrich» (Сент-Луис, США) и «MP Biomedicals» (Ирвин, США).

Перфузию сердца проводили по методу Лангендорфа по открытому контуру [Doring H.J. и Dehnert H., 1988; Pepe S. et al., 1997]. Температура раствора была +37±0,5°С, перфузионное давление – 52 мм рт. ст., рН=7,4. Раствор Кребса-Хензелята и все реактивы готовились на деионизованной воде, которая подвергалась очистке на установке “Simplicity” компании «Millipore» (Франция).

Для регистрации параметров сократимости сердца в полость левого желудочка вводили катетер с латексным баллончиком, заполненным дистиллированной водой, объем которой был достаточным для создания конечного диастолического давления на уровне 10-15 мм рт. ст. Показатели насосной функции сердца измеряли в изоволюмическом режиме с помощью датчика давления SS13L (Biopac System Inc., Goleta, Калифорния, США), сопряженного с указанным баллончиком. Запись изменения давления в левом желудочке осуществляли с помощью аппарата для электрофизиологических исследований MP35 (Biopac System Inc., Goleta, США). Количественную обработку полученных данных осуществляли с помощью программного обеспечения INSTBSL-W компании Biopac System Inc., (Goleta, США).

В сериях экспериментов мы после периода адаптации сердца моделировали тотальную ишемию в течение 45 мин и заканчивали эксперимент 30 минутной реперфузией. В начале реперфузии моделировалось ишемическое посткондиционирование. Раствор Кребса-Хензелята с блокаторами перфузировали в первые 10 минут реперфузии. В контрольной серии по окончании 20-минутной адаптации сердца к условиям нормоксической перфузии его подвергнут 45-минутной тотальной ишемии и 30-минутной реперфузии. Ишемическое посткондиционирование моделировали с помощью нескольких сеансов ишемии на фоне реперфузии. Были использованы следующие модели посткондиционирования: (1) три сеанса реперфузии (10 секунд) и ишемии (10 секунд), цикл – 20 секунд; (2) шесть циклов реперфузии (10 секунд) и ишемии (10 секунд), цикл – 20 секунд; (3) три сеанса реперфузии (20 секунд) и ишемии (20 секунд), цикл – 40 секунд; (4) шесть циклов реперфузии (20 секунд) и ишемии (20 секунд), цикл – 40 секунд; (5) три сеанса реперфузии (30 секунд) и ишемии (30 секунд), цикл – 60 секунд. В первые 10 минут реперфузии сердце перфузировали раствором Кребса-Хензелята, содержащим блокаторы.

Ниже представлена таблица с распределением животных по сериям экспериментов.

## Распределение животных по сериям экспериментов

№ п/п	Название серий экспериментов	Число опытов
1	Контроль: Адаптация 20 минут + ишемия (45 минут)+ реперфузия (30 минут)	364
2	Нормоксическая перфузия 10 минут без препаратов	14
3	адаптация (20 минут) + ишемия (45 минут) + реперфузия (30 минут). В начале реперфузии проводилось ишемическое посткондиционирование: 3 эпизода (реперфузия 10 секунд + ишемия 10 секунд).	14
4	адаптация (20 минут) + ишемия (45 минут) + реперфузия (30 минут). В начале реперфузии проводилось ишемическое посткондиционирование: 6 эпизода (реперфузия 10 секунд + ишемия 10 секунд).	14
5	адаптация (20 минут) + ишемия (45 минут) + реперфузия (30 минут). В начале реперфузии проводилось ишемическое посткондиционирование: 3 эпизода (реперфузия 20 секунд + ишемия 20 секунд).	14
6	адаптация (20 минут) + ишемия (45 минут) + реперфузия (30 минут). В начале реперфузии проводилось ишемическое посткондиционирование: 6 эпизода (реперфузия 20 секунд + ишемия 20 секунд).	14
7	адаптация (20 минут) + ишемия (45 минут) + реперфузия (30 минут). В начале реперфузии проводилось ишемическое посткондиционирование: 3 эпизода (реперфузия 30 секунд + ишемия 30 секунд).	14
8	адаптация (20 минут) + ишемия (45 минут) + реперфузия (30 минут). В начале реперфузии проводилось ишемическое посткондиционирование: 3 эпизода (реперфузия 30 секунд + ишемия 30 секунд). Налоксон (300 нМ/л) перфузировали в течение 10 минут в начале реперфузии.	14
9	адаптация (20 минут) + ишемия (45 минут) + реперфузия (30 минут).. Налоксон (300 нМ/л) перфузировали в течение 10 минут в начале реперфузии.	14
10	адаптация (20 минут) + ишемия (45 минут) + реперфузия (30 минут). В начале реперфузии проводилось ишемическое посткондиционирование: 3 эпизода (реперфузия 30 секунд + ишемия 30 секунд). Норбиналторфимин (3 нМ/л) перфузировали в течение 10 минут в начале реперфузии.	14
11	адаптация (20 минут) + ишемия (45 минут) + реперфузия (30 минут). Норбиналторфимин (3 нМ/л) перфузировали в течение 10 минут в начале реперфузии.	14

12	адаптация (20 минут) + ишемия (45 минут) + реперфузия (30 минут). В начале реперфузии проводилось ишемическое посткондиционирование: 3 эпизода (реперфузия 30 секунд + ишемия 30 секунд). BNTX (1 нМ/л) перфузировали в течение 10 минут в начале реперфузии.	14
13	адаптация (20 минут) + ишемия (45 минут) + реперфузия (30 минут). BNTX (1 нМ/л) перфузировали в течение 10 минут в начале реперфузии.	14
14	адаптация (20 минут) + ишемия (45 минут) + реперфузия (30 минут). В начале реперфузии проводилось ишемическое посткондиционирование: 3 эпизода (реперфузия 30 секунд + ишемия 30 секунд). Налтриндол (30 нМ/л ) перфузировали в течение 10 минут в начале реперфузии.	14
15	адаптация (20 минут) + ишемия (45 минут) + реперфузия (30 минут).Налтриндол (30 нМ/л ) перфузировали в течение 10 минут в начале реперфузии.	14
16	адаптация (20 минут) + ишемия (45 минут) + реперфузия (30 минут). В начале реперфузии проводилось ишемическое посткондиционирование: 3 эпизода (реперфузия 30 секунд + ишемия 30 секунд). Налтрибен (1 нМ/л) перфузировали в течение 10 минут в начале реперфузии.	14
17	адаптация (20 минут) + ишемия (45 минут) + реперфузия (30 минут). Налтрибен (1 нМ/л) перфузировали в течение 10 минут в начале реперфузии.	14
18	адаптация (20 минут) + ишемия (45 минут) + реперфузия (30 минут). В начале реперфузии проводилось ишемическое посткондиционирование: 3 эпизода (реперфузия 30 секунд + ишемия 30 секунд). глибенкламид (10 мМ/л) перфузировали в течение 10 минут в начале реперфузии.	14
19	адаптация (20 минут) + ишемия (45 минут) + реперфузия (30 минут). глибенкламид (10 мМ/л) перфузировали в течение 10 минут в начале реперфузии.	14
20	адаптация (20 минут) + ишемия (45 минут) + реперфузия (30 минут). В начале реперфузии проводилось ишемическое посткондиционирование: 3 эпизода (реперфузия 30 секунд + ишемия 30 секунд). 5-Гидроксидеканоат (100 мМ/л) перфузировали в течение 10 минут в начале реперфузии.	14
21	адаптация (20 минут) + ишемия (45 минут) + реперфузия (30 минут). 5-гидроксидеканоат (100 мМ/л) перфузировали в течение 10 минут в начале реперфузии.	14
22	адаптация (20 минут) + ишемия (45 минут) + реперфузия (30 минут). В начале реперфузии проводилось ишемическое посткондиционирование: 3 эпизода (реперфузия 30 секунд + ишемия 30 секунд). Хелеритрин (5 мМ/л) перфузировали в течение 10 минут в начале реперфузии.	14
23	адаптация (20 минут) + ишемия (45 минут) + реперфузия (30 минут). Хелеритрин (5 мМ/л) перфузировали в течение 10 минут в начале реперфузии.	14

24	адаптация (20 минут) + ишемия (45 минут) + реперфузия (30 минут). В начале реперфузии проводилось ишемическое посткондиционирование: 3 эпизода (реперфузия 30 секунд + ишемия 30 секунд). Ротглерин (1 $\mu\text{M}/\text{л}$ ) перфузировали в течение 10 минут в начале реперфузии.	14
25	адаптация (20 минут) + ишемия (45 минут) + реперфузия (30 минут). Ротглерин (1 $\mu\text{M}/\text{л}$ ) перфузировали в течение 10 минут в начале реперфузии.	14
26	адаптация (20 минут) + ишемия (45 минут) + реперфузия (30 минут). В начале реперфузии проводилось ишемическое посткондиционирование: 3 эпизода (реперфузия 30 секунд + ишемия 30 секунд). Вортманнин (100 $\text{nM}/\text{л}$ ) перфузировали в течение 10 минут в начале реперфузии.	14
27	адаптация (20 минут) + ишемия (45 минут) + реперфузия (30 минут). Вортманнин (100 $\text{nM}/\text{л}$ ) перфузировали в течение 10 минут в начале реперфузии.	14

В проведенной работе было проведено 27 серий экспериментов и использовано 728 животных.

Запись параметров сократительной функции изолированного сердца производили в течение 10 секунд до моделирования ишемии и на 5-й, 15-й и 30-й минутах реперфузии. В начале реперфузионного периода осуществляли длинную запись в течение 10 минут.

Кривые сокращения сердца отображались в виде графиков на экране монитора компьютера в режиме реального времени и могли быть сохранены для дальнейшей обработки.

Характеристика измеряемых параметров сократимости изолированного сердца.

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

ДРЛЖ – давление, развиваемое левым желудочком изолированного сердца (мм рт. ст.) – вычисляется как разница между систолическим и диастолическим давлением [Sargent C.A. et al., 1994]. Данный показатель характеризует силу сокращений изолированного сердца. Уменьшение этого параметра при постишемической реперфузии является одним из показателей тяжести повреждения сердечной мышцы;

КДД – конечное диастолическое давление (выражали в % от исходного) служит для оценки степени расслабления миокарда и характеризует контрактуру сердца. Поскольку контрактура зависит от уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в миоплазме, то конечное диастолическое давление можно расценивать как косвенный показатель концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме кардиомиоцита [Капелько В.И. и Горина М.С., 1987; Капелько В.И. и др., 1988].

МСС – максимальная скорость сокращения (мм рт. ст./с) рассчитывается как максимум производной первого порядка от кривой развития давления в левом желудочке.

МСП – максимальная скорость расслабления (мм рт. ст./с) – характеризует состояние процесса расслабления миокарда. Кардиопротекторный эффект оценивали по уровню активности креатинфосфокиназы (КФК) в оттекающем от сердца перфузате.

Активность КФК в оттекающем от сердца перфузате определяли с использованием коммерческих энзиматических наборов фирмы "Analiticon Biotechnologies AG" (Германия).

Раствор Кребса-Хензелайта с блокаторами перфузировали в первые 10 минут реперфузии. Блокаторы представлены в таблице 2.

Таблица 2.

## Блокаторы, использованные в работе

Налоксон	Неселективный блокатор всех типов опиоидных рецепторов в конечной концентрации 300 нМ/л [Маслов Л.Н. и др., 2006; Munday M.K. et al., 2000].
ТИРР(ψ)	Блокатор δ-ОР в конечной концентрации 30 нМ/л [Schiller P. W. et al., 1993].
BNTX	блокатор δ <sub>1</sub> -ОР в конечной концентрации 1 нМ/л [Sanchez-Blazquez P. et al., 1999; Portoghese P.S. et al., 1992]
Налтрибен	Блокатор δ <sub>2</sub> -ОР в конечной концентрации 1 нМ/л [Sanchez-Blazquez P. et al., 1999]
СТАР	Блокатор μ-ОР, в конечной концентрации 100 нМ/л. [Лишманов Ю.Б. и др., 2003];
Норбинаторфин	Блокатор κ-ОР в конечных концентрации 3 нМ/л [Heijna M.H., et al., 1990].
Хелеритрина хлорид	Блокатор протеинкиназы С в конечной концентрации 5 μМ/л [Hedayati N. et al., 2003; Zhu Z., et al. 2000].
Вортманнин	Блокатор Р13-киназы в конечной концентрации 100 нМ/л. [Powis G. et al., 1994].
Глибенкламид	Блокатор сарколеммальных и митохондриальных К <sub>АТФ</sub> -каналов в конечной концентрации 10 μМ/л [Burley D.S., Baxter G.F., 2007; Nishida H., 2009].
5-гидроксидеканоат	Блокатор митохондриальных К <sub>АТФ</sub> -каналов в конечной концентрации 100 μМ/л [Burley D.S., Baxter G.F., 2007].

Анализ данных производился с помощью пакетов программы STATISTICA 6.0. Для выявления межгрупповых различий использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Статистически значимыми считались различия при  $p < 0,05$ . Результаты всех экспериментов приведены в

таблицах в виде  $X \pm m$ , где  $X$  – среднее,  $m$  – стандартная ошибка среднего,  $n$  – объем анализируемой подгруппы,  $p$  – достигнутый уровень значимости.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследования кардиопротекторного эффекта ишемического посткондиционирования было необходимо подобрать оптимальную модель с максимальным кардиопротекторным эффектом посткондиционирования. Были использованы пять моделей ишемического посткондиционирования: (1) три сеанса реперфузии (10 секунд) и ишемии (10 секунд), цикл – 20 секунд; (2) шесть циклов реперфузии (10 секунд) и ишемии (10 секунд), цикл – 20 секунд; (3) три сеанса реперфузии (20 секунд) и ишемии (20 секунд), цикл – 40 секунд; (4) шесть циклов реперфузии (20 секунд) и ишемии (20 секунд), цикл – 40 секунд; (5) три сеанса реперфузии (30 секунд) и ишемии (30 секунд), цикл – 60 секунд. Для того чтобы исключить возможность влияния на результаты экспериментов сезонных колебаний толерантности сердца к ишемии-реперфузии ежедневно проводили контрольный эксперимент (ишемия-реперфузия) и опыт по посткондиционированию.

Как показано на рис. 1, три сеанса реперфузии (10 секунд) и ишемии (10 секунд) не оказывали, по сравнению с контролем (ишемия и реперфузия без посткондиционирования), достоверного влияния на уровень КФК в перфузате, оттекающем от сердца. Не удалось добиться повышения толерантности сердца к патогенному действию реперфузии и с помощью шести циклов реперфузии и ишемии (РИ) продолжительностью по 20 секунд. Посткондиционирование с помощью трёх циклов РИ по 40 секунд вызывало снижение уровня КФК в перфузате на 19% по сравнению с контролем. При использовании шести сеансов РИ продолжительностью по 40 секунд удалось добиться снижения уровня КФК на 29% по отношению к группе контроля (рис. 1). Максимальный кардиопротекторный эффект посткондиционирования был зафиксирован при использовании трёх циклов реперфузии-ишемии по 60 секунд. В этом случае уровень КФК в перфузате был на 32% ниже, чем в контроле (рис. 1).

Как показано на рисунке 2, блокада ОР неселективным антагонистом опиоидных рецепторов налоксоном в конечной концентрации 300 нМ/л устраняла кардиопротекторный эффект ИП. Активность КФК в этом случае оказалась идентична показателю контрольной группы. Это говорит о том, что опиоидные рецепторы принимают участие в реализации кардиопротекторного эффекта посткондиционирования. Предварительная блокада  $\mu$ -ОР селективным блокатором СТАР в конечной концентрации 100 нМ/л не повлияла на кардиопротекторный эффект ИП. Следовательно,  $\mu$ -ОР не принимают участия в реализации кардиопротекторного эффекта ИП. Добавление в перфузионный раствор антагониста  $\kappa$ -ОР норбинаторфимина в конечной концентрации 3 нМ/л так же не сказалось на кардиопротекторном эффекте ИП. Следовательно,  $\kappa$ -ОР не участвуют в механизме

кардиопротекторного эффекта ИП. При использовании смешанного антагониста  $\delta_1$ - и  $\delta_2$ -рецепторов налтриндола в конечной концентрации 30 нМ/л защитный эффект ИП также не удалось выявить. Эти данные

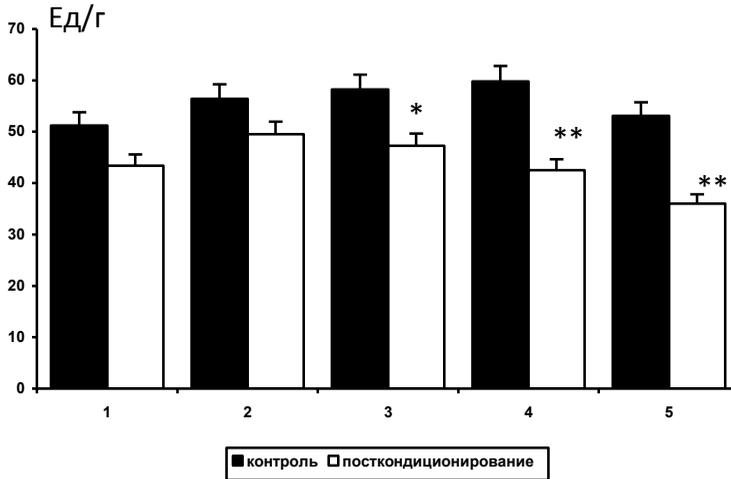


Рис. 1. Активность креатинфосфокиназы в перфузионном растворе после ишемического посткондиционирования: (1) три сеанса реперфузии (10 секунд) и ишемии (10 секунд), цикл – 20 секунд; (2) шесть циклов реперфузии (10 секунд) и ишемии (10 секунд), цикл – 20 секунд; (3) три сеанса реперфузии (20 секунд) и ишемии (20 секунд), цикл – 40 секунд; (4) шесть циклов реперфузии (20 секунд) и ишемии (20 секунд), цикл – 40 секунд; (5) три сеанса реперфузии (30 секунд) и ишемии (30 секунд), цикл – 60 секунд. Достоверность относительно аналогичных значений в контроле: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$

свидетельствуют о том, что  $\delta$ -ОР принимают участие в формировании кардиопротекторного эффекта ИП. Дельта-ОР подразделяются на два субтипа:  $\delta_1$ -ОР и  $\delta_2$ -ОР, и дальнейшие эксперименты позволили выявить роль этих субтипов в кардиопротекции. Оказалось, что на фоне блокады  $\delta_1$ -ОР селективным антагонистом BNTX в конечной концентрации 1 нМ/л толерантность сердца к патогенному действию реперфузии после посткондиционирования не проявлялась. Применение селективного антагониста  $\delta_2$ -рецепторов налтрибена в конечной концентрации 1 нМ/л не повлияло на кардиопротекторный эффект ИП. Полученные данные свидетельствуют о том, что в реализации кардиопротекторного эффекта ИП важную роль играют  $\delta_1$ -ОР.

В ходе проведенных исследований нами было показано, что блокада  $\delta_1$ -рецепторов устраняла кардиопротекторный эффект ИП, а блокада  $\delta_2$ -рецепторов не влияла на уровень креатинфосфокиназы в перфузате, оттекающем от сердца за весь период реперфузии, после посткондиционирования. Следовательно, в механизме толерантности сердца к повреждающему действию реперфузии после ишемического посткондиционирования определяющее значение принадлежит активации  $\delta_1$ -ОР.

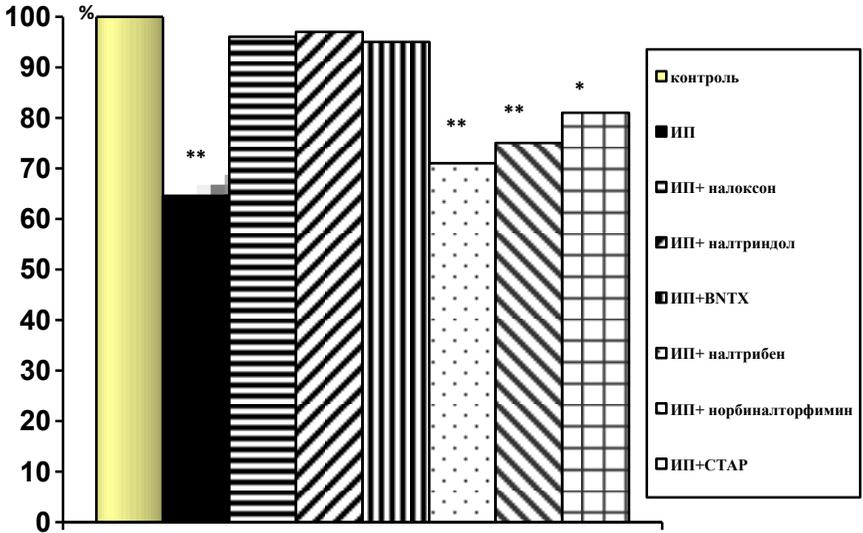


Рис. 2. Активность креатинфосфокиназы в перфузионном растворе после ишемического посткондиционирования и блокады опиоидных рецепторов. Достоверность относительно аналогичных значений в контроле: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$

В экспериментах на неадаптированных сердцах блокаторы ОР не оказывали достоверного влияния на уровень КФК в перфузате. Этот факт говорит о том, что эндогенные агонисты опиоидных рецепторов не участвуют в регуляции устойчивости сердца к действию ишемии и реперфузии, если эксперимент проводился на непосткондиционированных сердцах.

При сравнении параметров сократимости нам не удалось зарегистрировать достоверных отличий от контроля. Сами блокаторы ОР также не оказывали достоверного влияния на параметры сократимости сердца.

При исследовании роли протеинкиназы С (ПКС) мы получили следующие результаты (Рис. 3). При ингибировании всех изоформ

протеинкиназы С с помощью блокатора ПКС хелеритрина в конечной концентрации 5  $\mu\text{M}/\text{л}$  наблюдали устранение защитного эффекта ИП, что говорит об участии ПКС в реализации кардиопротекторного эффекта ИП. Полученные данные согласуются с данными литературы об участии этого фермента в формировании кардиопротекции при ишемическом посткондиционировании и других адаптивных воздействиях: адаптации к гипобарической гипоксии, ишемическом и фармакологическом прекондиционировании [Zatta A.J. et al., 2006, Neckar J. et al., 2005, Fryer R.M., 1999, 2001a]. Активация протеинкиназы С приводит к фосфорилированию огромного количества внутриклеточных белков [Dempsey E.C. et al., 2000]. Анализ данных литературы позволяет выделить несколько мишеней ПКС, это прежде всего, АТФ-зависимые  $\text{K}^+$ -каналы ( $\text{K}_{\text{АТФ}}$ -каналы) [Fryer R.M. et al., 2001]. Одним из наиболее важных эффектов ПКС является ее способность транслоцироваться в митохондрии и запускать регуляторный каскад, приводящий к активации митохондриальных АТФ-чувствительных  $\text{K}^+$ -каналов (мит $\text{K}_{\text{АТФ}}$ -каналов) [Cohen M.V. et al., 2007; Costa A.D. et al., 2006; Penna C. et al., 2006; 2007; Uecker M., 2003]. Дальнейшие исследования были направлены на изучение роли  $\delta$ -изоформы ПКС с помощью селективного блокатора ПКС- $\delta$  роттлерина в конечной концентрации 1  $\mu\text{M}/\text{л}$ . Как показано на рисунке 3, селективное ингибирование ПКС- $\delta$  также устраняло защитный эффект ИП. В экспериментах на изолированных сердцах, которые подвергали воздействию ишемии-реперфузии, без посткондиционирования блокаторы ПКС достоверных изменений уровня КФК в перфузате не вызывали (Рис. 3). При сравнении параметров сократимости не удалось зарегистрировать достоверные отличия от контроля. Блокаторы ПКС также не оказывали достоверных влияний на параметров сократимости. На основании полученных данных мы можем сделать вывод о том, что кардиопротекторный эффект ИП не проявляется на фоне блокады  $\delta$ -изоформы протеинкиназы С.

При исследовании роли Р13-киназы мы получили следующие результаты. Как показано на рисунке 4, блокада Р13-киназы с помощью вортманнина в конечной концентрации 100 нМ/л устраняла кардиопротекторный эффект ИП. Следовательно, Р13-киназа участвует в реализации кардиопротекторного эффекта ИП. Использование вортманнина, в экспериментах на сердцах, которые подвергали воздействию только ишемии-реперфузии, никак не повлияло на значение активности КФК. При сравнении параметров сократимости нам не удалось зарегистрировать достоверные отличия от контроля. Вортманнин не оказывал достоверных влияний на параметры сократимости, сердец, которые подвергали воздействию посткондиционирования или только воздействию ишемии-

реперфузии. На основании полученных данных мы можем сделать вывод о том, что кардиопротекторный ИП не проявляется на фоне блокады Р13-киназы. Следовательно, Р13-киназа является ключевым звеном в реализации кардиопротекторного эффекта ИП. Эти данные согласуются с данными литературы [Tsang A. et al., 2004].

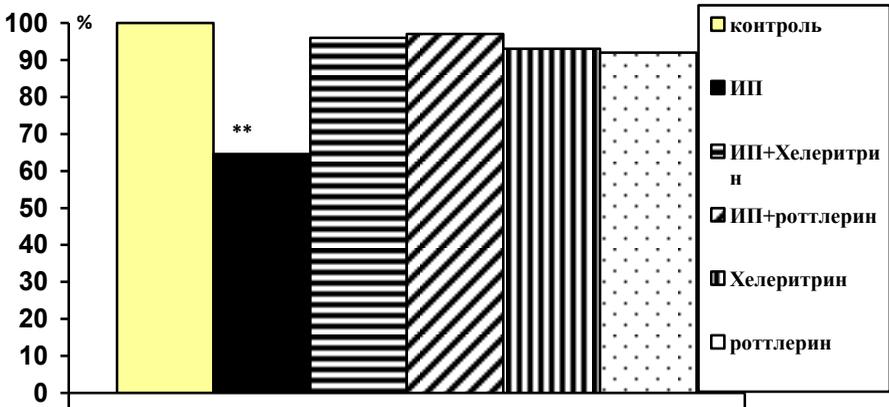


Рис. 3. Активность креатинфосфокиназы в перфузионном растворе после ишемического посткондиционирования и блокады ПКС.

Достоверность относительно аналогичных значений в контроле: \*\* -  $p < 0,01$

Изучение роли  $K_{ATP}$ -каналов в реализации устойчивости изолированного сердца к ишемическим и реперфузионным воздействиям дало следующие результаты. При ингибировании сарколеммальных и митохондриальных  $K_{ATP}$ -каналов глибенкламидом в конечной концентрации 10  $\mu\text{M}/\text{l}$  кардиопротекторный эффект ИП устранился, что свидетельствует о том, что  $K_{ATP}$ -каналы участвуют в формировании защитного эффекта посткондиционирования. Дальнейшие исследования были проведены с применением блокатора митохондриальных  $K_{ATP}$ -каналов 5-гидроксидекааноата (5-ГД) в конечной концентрации 100  $\mu\text{M}/\text{l}$ . Как показано на рисунке 5, 5-ГД также устранил кардиопротекторный эффект ИП. Следовательно, митохондриальные  $K_{ATP}$ -каналы принимают участие в механизме кардиопротекторного эффекта посткондиционирования. При сравнении параметров сократимости не удалось зарегистрировать достоверные отличия от контроля. Блокаторы  $K_{ATP}$ -каналов также не оказывали достоверного влияния на параметры сократимости изолированного сердца, которое подвергали воздействию

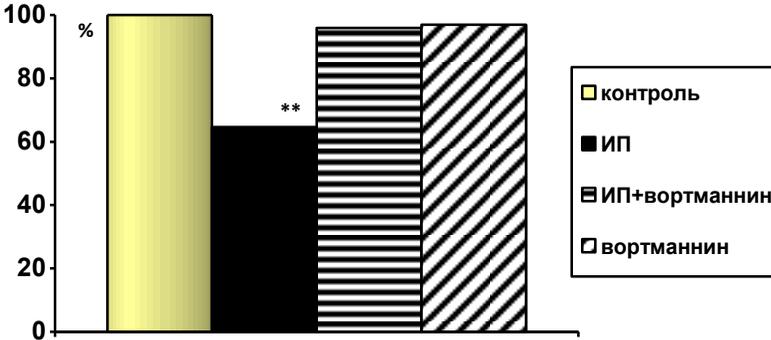


Рис. 4. Активность креатинфосфокиназы в перфузионном растворе после ишемического посткондиционирования и блокады P13-киназы вортманнином.

Достоверность относительно аналогичных значений в контроле: \*\* -  $p < 0,01$

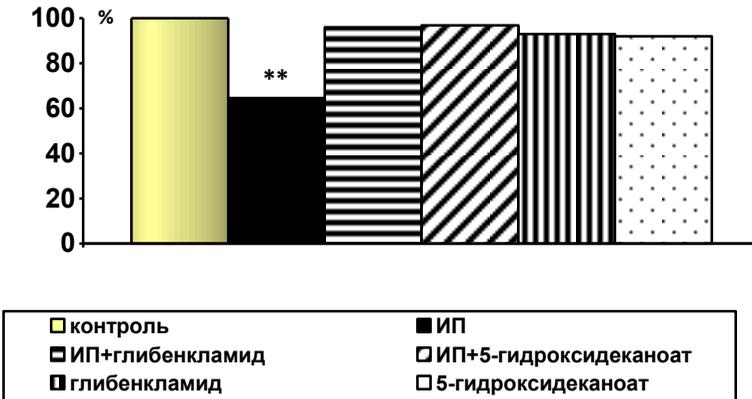


Рис. 5. Активность креатинфосфокиназы в перфузионном растворе после ишемического посткондиционирования и применения блокаторов  $K_{ATP}$ -каналов.

Достоверность относительно аналогичных значений в контроле: \* -  $p < 0,05$ ;

\*\* -  $p < 0,01$

посткондиционирования или только влиянию ишемии-реперфузии. По данным литературы митохондриальные  $K_{ATP}$ -каналы являются одним из конечных звеньев в цепи сигнальных событий во время посткондиционирования [Vinten-Johansen J., et al., 2005, Zhao Z.Q. и Vinten-Johansen J., 2006]. В экспериментах на изолированном сердце крысы нами

было показано, что неселективный ингибитор  $K_{ATP}$ -каналов глибенкламид и селективный блокатор мит $K_{ATP}$ -каналов 5-гидроксидеканоат полностью устраняют инфаркт-лимитирующий эффект посткондиционирования.

### **Заключение**

Изучение механизмов срочной и долговременной адаптации является одной из приоритетных задач физиологии. В экспериментах, выполненных нами на изолированном перфузируемом сердце мы провели сравнительный анализ следующих моделей: (1) три сеанса реперфузии (10 секунд) и ишемии (10 секунд), цикл – 20 секунд; (2) шесть циклов реперфузии (10 секунд) и ишемии (10 секунд), цикл – 20 секунд; (3) три сеанса реперфузии (20 секунд) и ишемии (20 секунд), цикл – 40 секунд; (4) шесть циклов реперфузии (20 секунд) и ишемии (20 секунд), цикл – 40 секунд; (5) три сеанса реперфузии (30 секунд) и ишемии (30 секунд), цикл – 60 секунд. Основным критерием для отбора модели являлся антинекротический эффект. По результатам исследования нами была выбрана пятая модель (три сеанса реперфузии (30 секунд) и ишемии (30 секунд), цикл – 60 секунд), который показал наиболее выраженную кардиопротекцию.

В 2005 г W.L. Chang и соавт. [Chang W.L. et al., 2005] обнаружили, что феномен посткондиционирования можно имитировать с помощью опиоидов. Так, внутривенная инъекция агониста всех типов ОР морфина в дозе 0,3 мг/кг, выполненная перед реперфузией, обеспечивала уменьшение размера инфаркта и супрессию реперфузионной аккумуляции нейтрофилов в миокарде [Chang W.L. et al., 2005]. Эти данные были подтверждены в 2007 г E.R. Gross и соавт. [Gross E.R. et al., 2007a; 2007b].

Однако конкретный тип ОР ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$ ), с активацией которого связан кардиопротекторный эффект морфина, оставался неизвестным. Кроме того, было не ясно, где в организме расположены опиоидные рецепторы, участвующие в регуляции устойчивости сердца к действию реперфузии.

Для выяснения роли отдельных типов опиоидных рецепторов в реализации кардиопротекторного эффекта ИП, мы провели серии экспериментов с блокаторами опиоидных рецепторов. В ходе проведенных исследований нами было показано, что блокада всех типов опиоидных рецепторов налоксоном устраняла кардиопротекторный эффект ИП. Блокада  $\delta_1$ -рецепторов с помощью BNTX устраняла кардиопротекторный эффект ИП, а блокада  $\delta_2$ -рецепторов налтрибеном не влияла на уровень креатинфосфокиназы в перфузате, оттекающем от сердца за весь период реперфузии, после посткондиционирования. Блокада  $\mu$ - и  $\kappa$ -ОР с помощью СТАР и норбиналторфимина соответственно не повлияла на кардиопротекторный эффект ИП. Следовательно, в механизме толерантности сердца к повреждающему действию реперфузии после ишемического посткондиционирования определяющее значение принадлежит активации кардиальных  $\delta_1$ -ОР.

Далее мы изучали внутриклеточные регуляторные механизмы кардиопротекторного эффекта ИП. При исследовании роли протеинкиназы С мы установили, что кардиопротекторный эффект ИП не проявляется на фоне блокады  $\delta$ -изоформы протеинкиназы С. Следовательно,  $\delta$ -изоформа протеинкиназы С является важным звеном в реализации кардиопротекторного эффекта ИП.

Ингибирование PI3-киназы устраняло кардиопротекторный эффект ИП. Следовательно, PI3-киназа является важным звеном реализации кардиопротекторного эффекта ИП. Изучение роли  $K_{ATP}$ -каналов в реализации устойчивости посткондиционированного изолированного сердца к ишемическим и реперфузионным воздействиям дало следующие результаты. В экспериментах на изолированном сердце крысы нами было показано, что неселективный ингибитор  $K_{ATP}$ -каналов глибенкламид и селективный блокатор мит $K_{ATP}$ -каналов 5-гидроксидеканоат полностью устраняют инфаркт-лимитирующий эффект посткондиционирования. Следовательно, мит $K_{ATP}$ -каналы являются важным звеном реализации кардиопротекторного эффекта ИП.

Таким образом, на основании полученных результатов мы можем заключить, что опиоидные рецепторы играют важную роль в опосредовании кардиопротекторного эффекта ИП, при этом нами доказано участие  $\delta_1$ -ОР, в то время как  $\delta_2$ -,  $\kappa$ - и  $\mu$ -ОР не принимают участие в реализации защитного эффекта посткондиционирования. В сигнальном механизме посткондиционирования задействованы: протеинкиназа С $\delta$  (собственные данные), PI3-киназа и мит $K_{ATP}$ -каналы (подтверждённые нами литературные данные). Полученные результаты представлены на рисунке 6.

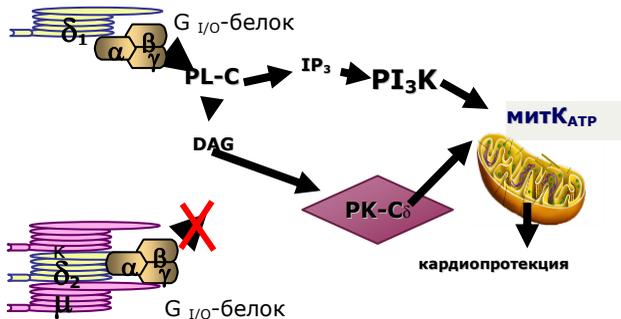


Рисунок 6. Гипотетическая схема участия опиоидных рецепторов и внутриклеточных сигнальных каскадов в механизме кардиопротекторного эффекта ишемического посткондиционирования.

Примечание: PL-C – фосфолипаза С; PK-C – протеинкиназа С; мит $K_{ATP}$  – митохондриальный  $K_{ATP}$ -канал; PI3K - PI3-Киназа.

## ВЫВОДЫ

1. Наиболее выраженный кардиопротекторный эффект оказывает посткондиционирование с использованием трех сеансов реперфузии (30 с) и ишемии (30 с).
2. Толерантность сердца к ишемии и реперфузии при ишемическом посткондиционировании реализуется через активацию  $\delta_1$ -опиоидных рецепторов.
3. В обеспечении кардиопротекторный эффект адаптивного феномена ишемического посткондиционирования принимает участие протеинкиназа С $\delta$ .
4. Р13-киназа участвуют в механизме формирования кардиопротекторного эффекта адаптивного феномена ишемического посткондиционирования.
5. Митохондриальные  $K_{ATP}$ -каналы играют ключевую роль в кардиопротекторном эффекте посткондиционирования.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ласукова Т.В. Внутриклеточные механизмы опиоидергической регуляции функции миокарда в условиях нормоксии и постишемической реперфузии./ Ласукова Т.В., Маслов Л.Н., Горбунов А.С., Цибульников С.Ю.// **Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова**- 2009.- Т. 95, № 4.- С. 376-386.
2. Ласукова Т.В. Роль внутриклеточного кальция и циклических нуклеотидов в реализации кардиопротекторного действия агонистов  $\delta_1$ - и  $\kappa_1$ -опиоидных рецепторов. / Ласукова Т.В., Маслов Л.Н., Низкодубова С.В., Горбунов А.С., Цибульников С.Ю. // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины**- 2009.- Т.147.- №.12.- С.636-639.
3. Ласукова Т.В. Роль мю-опиоидных рецепторов в регуляции устойчивости сердца к действию ишемии и реперфузии./ Ласукова Т.В., Маслов Л.Н., Низкодубова С.В., Горбунов А.С., Жан Е., Криг Т. // **Вестник ТГПУ**.- 2009.- Т.3.- №.81.- С.7-11.
4. Ласукова Т.В. Внутриклеточные механизмы, опосредующие кардиопротекторные эффекты  $\delta_1$ - и  $\kappa_1$ -опиоидных рецепторов./ Ласукова Т.В., Маслов Л.Н., Горбунов А.С. // **Сибирский медицинский журнал (Томск)**- 2010.- Т.25.- №2.- С.191-192.
5. Ласукова Т.В. Агонисты опиоидных рецепторов имитируют феномен «ишемического прекодиционирования» сердца: роль циклических нуклеотидов и  $Ca^{2+}$ -АТФ-азы саркоплазматического ретикулума./ Ласукова Т.В., Маслов Л.Н., Горбунов А.С. // **Вестник ТГПУ**.-2010.- Т.3.- №93.- С.64-69.

6. Горбунов А. С. Кардиопротекторный, инотропный и хронотропный эффекты ишемического посткондиционирования на модели изолированного сердца крысы./ Горбунов А. С., Ласукова Т.В., Маслов Л.Н., Лишманов Ю. Б. // **Сибирский медицинский журнал (Томск)**- 2011. - Т.26.- №3. - С. 125–129.

7. Маслов Л.Н. Инотропный и хронотропный эффекты ишемического посткондиционирования на модели изолированного сердца крысы./ Маслов Л.Н., Горбунов А.С., Ласукова Т.В., Лишманов Ю. Б.// **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины** - 2011 – Т. 152.- №12. – С. 627-631.

8. Нарыжная Н.В., Цибульников С.Ю., Горбунов А.С. (г. Томск) Исследование функционального состояния МПТ-поры и трансмембранного потенциала митохондрий миокарда при ишемии и реперфузии у крыс, адаптированных к хронической нормобарической гипоксии. Тезисы докладов 6 Российской конференции с международным участием «Гипоксия: МЕХАНИЗМЫ, АДАПТАЦИЯ, КОРРЕКЦИЯ» 11-13 октября 2011 года, г. Москва, Патогенез №3, 2011. с.50

9. Маслов Л.Н. Взаимодействие опиоидных рецепторов и внутриклеточных сигнальных систем в регуляции устойчивости сердца к действию ишемии и реперфузии. / Маслов Л.Н., Нарыжная Н.В., Цибульников С.Ю., Горбунов А.С., Ласукова Т.В. // Физиологии кровообращения. V Всероссийская с международным участием школа-конференция. 31 января – 3 февраля 2012. Сборник тезисов. Москва, 2012, 102-103.

10. Маслов Л.Н. Вазопротекторный эффект классического ишемического прекодиционирования. / Маслов Л.Н., Крылатов А.В., Горбунов А.С., Цибульников С.Ю., Семенцов А.С. // **Сибирский медицинский журнал (Томск)**- 2012.- Т. 27.- №1, С.9-17.

11. Маслов Л.Н. Роль протеинкиназ в формировании адаптивного феномена ишемического посткондиционирования сердца. / Маслов Л.Н., Мрочек А.Г., Щепёткин И.А., Хедрик Дж.П., Хануш Л., Барзах Е.И., Лишманов А.Ю., Горбунов А.С., Цибульников С.Ю., Байков А.Н. // **Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова** - 2013.- Т. 99.- № 4, С. 433-452.

12. Горбунов А. С. Кардипротекторный эффект ишемического посткондиционирования на модели изолированного сердца. Тезисы Российского национального конгресса кардиологов. 25 сентября-27 сентября, Санкт-Петербург, 2013, С. 153-154.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

**ОИМ** - острый инфаркт миокарда

**ИП** – ишемическое посткондиционирование

**КФК** – креатинфосфокиназа

**К<sub>АТФ</sub>-канал** - АТФ-зависимый K<sup>+</sup>-канал

**ЧСС** – частота сердечных сокращений

**ДРЛЖ** – давление, развиваемое левым желудочком

**КДД** – конечное диастолическое давление

**МСС** – максимальная скорость сокращения

**МСР** – максимальная скорость расслабления

**РИ** – реперфузия и ишемия

**ОР** – опиоидные рецепторы

**ПКС** – протеинкиназа С

**митК<sub>АТФ</sub>-каналы** – митохондриальные АТФ-чувствительные K<sup>+</sup>-каналы

**PI3-киназа** – phosphatidylinositol-3-киназа