

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
ТОМСКИЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

Цибульников

Сергей Юрьевич

Роль опиоидных рецепторов, протеинкиназы С, тирозинкиназ, PI3-киназы
и NO-синтаз в реализации кардиопротекторного эффекта адаптации
к непрерывной нормобарической гипоксии

03.03.01 - физиология

14.03.03 - патологическая физиология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор биологических наук
Ласукова Т.В.

доктор медицинских наук
Рыжкова Д.В.

Томск - 2013

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	6
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
1.1. Механизмы кардиопротекторного эффекта гипоксии	12
1.2. Патогенез ишемических и реперфузионных повреждений миокарда	23
1.3. Опиоидная система и ее роль в регуляции функции миокарда в норме и при патологии	33
1.4. Опиоидная система в процессах адаптации сердца	43
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	
2.1. Объект исследования	51
2.2. Характеристика методов исследования	53
2.2.1. Моделирование хронической непрерывной нормобарической гипоксии	53
2.2.2. Моделирование коронароокклюзии-реперфузии	53
2.2.3. Регистрация и оценка ишемических и реперфузионных нарушений сердечного ритма	54
2.2.4. Оценка ишемических-реперфузионных повреждений миокарда	54
2.2.5. Лабораторные методы исследования крови	55
2.2.6. Исследование гемодинамики	55
2.2.7. Определение содержания опиоидных пептидов в крови и ткани миокарда	56
2.3. Характеристика используемых фармакологических агентов	57
2.3.1. Антагонисты опиоидных рецепторов	57
2.3.2. Фармакологические инструменты для оценки вклада NO-синтазы, протеинкиназы С и тирозинкиназ в реализацию кардиотропного эффекта хронической непрерывной нормобарической гипоксии	60
2.4. Методы статистической обработки результатов	63
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	
3.1. Изменения показателей периферической крови у крыс, подвергшихся хронической непрерывной нормобарической гипоксии	64
3.2. Изменение уровня опиоидных пептидов у крыс, подвергнутых хронической непрерывной нормобарической гипоксии	65
3.3. Исследование гемодинамики	68
3.4. Влияние хронической непрерывной нормобарической гипоксии на частоту и характер нарушений сердечного ритма при коронароокклюзии и реперфузии	73

3.5. Кардиопротекторный эффект хронической непрерывной нормобарической гипоксии	77
3.5.1 Изучение роли опиоидных рецепторов в реализации кардиопротекторного эффекта хронической непрерывной нормобарической гипоксии	80
3.5.2 Изучение внутриклеточных регуляторных механизмов в кардиопротекторном эффекте хронической непрерывной нормобарической гипоксии	87
3.5.2.1 Изучение участия NO-синтазы в реализации кардиопротекторного эффекта хронической непрерывной нормобарической гипоксии	87
3.5.2.2 Изучение участия протеинкиназы С в реализации кардиопротекторного эффекта хронической непрерывной нормобарической гипоксии	90
3.5.2.3 Изучение участия тирозинкиназ в реализации кардиопротекторного эффекта хронической непрерывной нормобарической гипоксии	93
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	97
ВЫВОДЫ	102
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	103

Список сокращений

- АФК** – активные формы кислорода
- ДНК** – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ЗИ/ЗР** - соотношение зона инфаркта/ зона риска
- ЗН** - зоны некроза
- ЗР** - зона риска (зона гипоперфузии)
- индуцибельная **iNOS** inducible NO-synthase
- ИП** - ишемическое preconditioning (ischemic preconditioning)
- конститутивная **eNOS** endothelial NO-synthase
- КФК** – креатинфосфокиназа
- ЛДГ** – лактатдегидрогеназа
- МАПК** - Митоген-активируемые протеинкиназы
- МАПК** – митоген-активируемые протеинкиназы
- митоСОД** – митохондриальная супероксиддисмутаза
- НО-1** - индуцибельная гемоксигеназа
- ОИМ** - острый инфаркт миокарда
- ОП** - опиоидные пептиды
- ОР** - опиоидные рецепторы
- ПКС** – протеинкиназа С
- ПОЛ** – перекисное окисление липидов
- СПР** – саркоплазматический ретикулум
- ХННГ** – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия
- цАМФ** - циклический аденозин монофосфат
- цГМФ** - циклический гуанозин монофосфат
- ЧСС** - частота сердечных сокращений
- ADP** – аденозиндифосфат
- AIF** – апоптоз-индуцирующий фактор
- AMP** – аденозинмонофосфат
- ATP** – аденозинтрифосфат
- ERK1/2** (extracellular signal-regulated kinase) – киназа

Fas – маркер апоптоза

HIF-1 – hypoxia inducible factor – фактор, индуцируемый при гипоксии

ISAM – The International Society of Adaptive Medicine – Международное общество по адаптационной медицине

JNK – c-Jun N-terminal kinase – янус-киназа

Mcl-1 – Myeloid Cell Leukemia 1 – антиапоптотический белок

mPTP, MPT-пора – mitochondrial permeability transition pore – митохондриальные поры переменной проницаемости

NO[•] S-нитрозоглутатиона (GSNO)

PI3-киназа – инозитол-3-фосфат киназа

ROS – reactive oxygen species – активные формы кислорода

SERCA2a – Ca²⁺-АТРаза

Smac/DIABLO – проапоптотический митохондриальный белок

TNF- α – фактор некроза опухоли α

TUNEL – маркер апоптоза

XIAP – X-linked inhibitor of apoptosis – X-связанный ингибитор апоптоза

Введение

Актуальность. Проблема повышения устойчивости сердца к ишемическим и реперфузионным повреждениям все еще остается одной из наиболее актуальных проблем современной патофизиологии и кардиологии. Это связано с тем, что ишемическая болезнь сердца и, прежде всего, острый инфаркт миокарда (ОИМ) представляют собой одну из основных причин инвалидизации и смертности среди взрослого населения России и экономически развитых стран [Марков В.А. и др., 2011; Чазов Е.И., 2008; Braunwald E., 2011]. Единственным эффективным методом лечения ОИМ является реканализация инфаркт-связанной коронарной артерии [Марков В.А. и др., 2011; Чазов Е.И., 2008; Braunwald E., 2011]. К сожалению, необратимые повреждения кардиомиоцитов при ишемии-реперфузии возникают очень быстро. Между тем, в России среднее время поступления больного с ОИМ в стационар составляет 2,5 – 2,8 ч [Марков В.А. и др., 2011]. В этой ситуации неоценимую помощь в спасении жизни пациентов с ОИМ на догоспитальном этапе могло бы оказать применение препаратов, заметно повышающие устойчивость сердца к действию ишемии-реперфузии. К сожалению, такие лекарственные средства пока не существуют. В создании подобных препаратов существенная роль принадлежит изучению молекулярных механизмов адаптационных феноменов, повышающих устойчивость сердца к ишемии и реперфузии. К таким адаптивным феноменам следует отнести адаптацию к гипоксии

В 1952 г Г. Селье [Селье Г., 1960; Selye H., 1952] было показано, что адаптация к одному экстремальному воздействию может обеспечивать повышение толерантности организма и к другим экстремальным факторам, феномен получил название «перекрёстный эффект адаптации». Эти данные были подтверждены другими исследователями. Так, например, адаптация к иммобилизационному стрессу обеспечивает повышение устойчивости организма крыс к холоду [Kuroshima A. et al., 1984] и гипоксии [Меерсон Ф.З. и др. 1988]. Адаптация к иммобилизационному стрессу [Меерсон Ф.З. и др., 1988; Meerson F.Z. и Malyshev I.Yu., 1989] или холоду [Барбараш Н.А., 1996] повышает толерантность сердца к аритмогенному действию ишемии и реперфузии. Установлено, что адаптация к периодической гипоксии обеспечивает повышение толерантности сердца к

действию ишемии и реперфузии [Ding H.L. et al., 2004; Fitzpatrick C.M. et al., 2005; Kolar F. et al., 2005; Neckar J. et al., 2002; 2005]. Установлено, что адаптация крыс к хронической непрерывной нормобарической гипоксии (ХННГ) также оказывает инфаркт-лимитирующий эффект при коронароокклюзии и реперфузии *in vivo* [Neckar J. et al., 2003] и повышает устойчивость изолированного сердца к действию глобальной ишемии-реперфузии [Tajima M. et al., 1994].

Адаптация к гипоксии представляет особый интерес для врачей и исследователей, поскольку кардиопротекторный эффект этой адаптации сохраняется несколько дней [Дудко В.А. и Соколов А.А., 2000; Меерсон Ф.З. и Малышев И.Ю., 1993; Меерсон Ф.З. и Пшенникова М.Г., 1988]. Согласно данным С.М. Fitzpatrick и соавторов [Fitzpatrick C.M. et al., 2005], кардиопротекторный эффект адаптации к хронической гипоксии у новорожденных кроликов может сохраняться в течение 30 дней после последнего сеанса гипоксии, а по данным В. Ostadal и соавт. [Ostadal B. et al., 1995] защитный эффект адаптации к гипоксии может сохраняться в течение 4-х месяцев. Существует определенное сходство между отсроченной фазой ишемического прекондиционирования и феноменом адаптационной устойчивости сердца к ишемии и реперфузии. Исходя из литературных данных, мы предположили, что молекулярный механизм протекторного эффекта адаптации и механизм положительного эффекта действия отсроченного ишемического прекондиционирования (*second window*) может быть сходен [Beguin P.C. et al., 2005; Xi L. et al., 2002]. Так, например, P.C. Beguin и соавторы обнаружили, что сердца, изолированные у крыс, которых подвергли 4-х часовой непрерывной гипоксии и последующей нормальной оксигенации, через 24 ч после гипоксического воздействия становятся резистентными к ишемии-реперфузии *in vitro*. Этот эффект был устранен с помощью ингибирования NO-синтазы и блокады митохондриальных K_{ATP} -каналов [Beguin P.C. et al., 2005]. Сходные данные были получены L. Xi и соавторами [Xi L. et al., 2002]. Следует отметить, что NO-синтаза участвует в формировании отсроченной фазы ишемического прекондиционирования, а K_{ATP} -каналы играют важную роль в обеих фазах прекондиционирования [Yellon D.M. and Downey J.M., 2003]. Как при адаптации к гипоксии, так и в случае «второго окна» прекондиционирования,

появление необратимых повреждений кардиомиоцитов задерживается, сократимость миокарда в реперфузионном периоде улучшается, а частота возникновения ишемических и реперфузионных аритмий снижается. Однако адаптационная толерантность сердца к ишемии развивается на уровне целого организма, а феномен ишемического прекондиционирования может быть вызван с помощью кратковременной ишемии и реперфузии изолированного сердца. Следовательно, нельзя исключить возможность того, что рецепторный и сигнальный механизмы ишемического прекондиционирования и адаптации к гипоксии различны. Хорошо известно, что аденозин, опиоиды и брадикинин участвуют в механизме развития ишемического прекондиционирования [Маслов Л.Н. и др., 2006; Yellon D.M. and Downey J.M., 2003]. Эти соединения могут имитировать ишемическое прекондиционирование [Маслов Л.Н. и др., 2006; Yellon D.M. and Downey J.M., 2003]. В развитии отсроченной фазы ишемического прекондиционирования важную роль играет NO-синтаза и циклооксигеназа-2 [Yellon D.M. and Downey J.M., 2003]. Существуют данные о том, что в прекондиционировании важную роль играют протеинкиназа C, тирозинкиназы, ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase) – киназа, регулируемая внеклеточными сигналами, она же p42/44-киназа [Yellon D.M. and Downey J.M., 2003] и PI3-киназа (PI3, от phosphatidylinositol-3-kinase) [Ban K. et al., 2008; Yang X.M. et al., 2010].

Молекулярный механизм кардиопротекторного эффекта адаптации к ННГ остается изученным недостаточно. Российские физиологи установили, что антиаритмический эффект адаптации к периодической гипоксии связан с активацией опиоидных рецепторов [Лишманов Ю.Б., и др., 2003б]. Китайская группа получила данные о том, что активация NO-синтазы в кардиомиоцитах крыс, адаптированных к гипоксии, способствует улучшению сократимости сердца в реперфузионном периоде [Ding H.L. et al., 2004]. Сходные данные были получены другими исследователями [Fitzpatrick C.M. et al., 2005; Xi L. et al., 2002]. Установлено, что опиоидные рецепторы, протеинкиназа C, NO-синтаза играют важную роль в кардиопротекторном эффекте адаптации к периодической гипобарической гипоксии.

Таким образом, анализ литературных данных позволяет нам предполагать, что механизмы формирования отсроченного ишемического прекодиционирования и механизмы защитного действия адаптации к непрерывной нормобарической гипоксии могут иметь сходную природу.

Цель: Исследовать роль опиоидных рецепторов, протеинкиназы С, тирозинкиназ, PI3-киназы и NO-синтаз в реализации кардиопротекторного эффекта хронической непрерывной нормобарической гипоксии.

Задачи:

1. Изучить влияние хронической непрерывной нормобарической гипоксии на уровень опиоидных пептидов в миокарде и плазме крови у крыс.

2. Исследовать роль μ -, δ - и κ - опиоидных рецепторов в механизме формирования повышенной устойчивости миокарда к действию острой коронароокклюзии и реперфузии после воздействия хронической непрерывной нормобарической гипоксии.

3. Выяснить значение протеинкиназы С в опосредовании кардиопротекторного эффекта хронической непрерывной нормобарической гипоксии.

4. Изучить роль тирозинкиназ в механизме кардиопротекции при воздействии хронической непрерывной нормобарической гипоксии.

5. Определить, участвует ли PI3-киназа в кардиопротекторном эффекте хронической непрерывной нормобарической гипоксии.

6. Исследовать вклад NO-синтаз в кардиопротекторный эффект хронической непрерывной нормобарической гипоксии.

Научная новизна

Впервые выявлено, что хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия вызывает увеличение содержания эндогенных опиоидных пептидов в миокарде и плазме крови у крыс.

В настоящем исследовании впервые выяснена роль опиоидных рецепторов в устойчивости сердца к действию ишемии и реперфузии у крыс, подвергнутых хронической непрерывной нормобарической гипоксии.

Впервые изучена роль протеинкиназы С, тирозинкиназ, PI3-киназы в кардиопротекторном эффекте хронической непрерывной нормобарической гипоксии.

Впервые исследован вклад индуцибельной NO-синтазы в кардиопротекторный эффект хронической непрерывной нормобарической гипоксии.

Научно-практическая значимость

Результаты работы расширяют представления о роли опиоидных рецепторов и сопряженных с ними сигнальных путей в реализации повышения устойчивости сердца к действию ишемии и реперфузии.

Основные положения работы могут быть использованы в качестве теоретической основы для прикладных исследований в области создания принципиально новых фармакологических препаратов, обладающих кардиопротекторным действием.

По результатам работы была отправлена заявка на патент. Получена приоритетная справка.

Маслов Л.Н., Нарыжная Н.В., Цибульников С. Ю., Горбунов А.С. «Средство, увеличивающее устойчивость сердца к ишемическим-реперфузионным повреждениям» от 27.03.2012 №2012111891

Основные положения, выносимые на защиту:

В условиях хронической непрерывной нормобарической гипоксии повышается концентрация эндогенных опиоидных пептидов в миокарде и плазме крови у крыс.

Опиоидная система является одним из звеньев повышенной устойчивости сердца к действию ишемии и реперфузии в условиях хронической непрерывной нормобарической гипоксии.

Кардиопротекторный эффект хронической непрерывной нормобарической гипоксии реализуется при участии протеинкиназы С, тирозинкиназ, индуцибельной NO-синтазы.

Апробация работы: Материалы диссертации представлены на конференциях: XIV Всероссийская с международным участием конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Наука и образование» (Томск, 2010); Первая

Международная Научно-Практическая конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине» (Санкт-Петербург, 2010); 6 Российская конференция с международным участием «Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция» (Москва, 2011); Российский национальный конгресс кардиологов. (Москва, 2011); VII Сибирский физиологический съезд (Красноярск, 2012);

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 15 работ. Из них 7 работ в журналах списка ВАК, 8 – 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

12-04-91152-ГФЕН_a Молекулярные механизмы адаптационного феномена, вызванного хронической гипоксией

Автор выражает глубокую благодарность своим научным руководителям д.б.н. Т.В. Ласуковой и д.м.н. Д.В. Рыжковой, а также профессору Л.Н. Маслову, с.н.с. Н.В. Нарыжной, член-корр. РАМН Лишманову Ю.Б. за неоценимую помощь при работе над диссертационной работой.

ГЛАВА 1.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Механизмы кардиопротекторного эффекта гипоксии

Кардиопротекторный эффект адаптации к гипоксии был впервые открыт в 1958 году чешскими исследователями, которые показали, что сократительная активность правого желудочка изолированного миокарда крыс, пребывавших в условиях симулированной высокогорной гипоксии, соответствующей высоте 7000 м над уровнем моря, лучше восстанавливается после воздействия аноксии, чем у неадаптированных животных [Кореску М., 1958]. Позднее этим же коллективом ученых был обнаружен факт повышения устойчивости миокарда адаптированных крыс к ишемическому повреждению [Роура, О. 1966]. Следом было установлено, что сходный защитный эффект может быть достигнут относительно более короткими эпизодами гипобарической гипоксии по 4 - 6 ч в день в течение 24 - 42 дней [Meerson F.Z. 1973]. Кроме того, был выявлен антиаритмический эффект курса прерывистых гипоксических воздействий [Meerson F.Z. et al., 1987]. Впоследствии было обнаружено увеличение устойчивости изолированного миокарда к глобальной ишемии при адаптации крыс к условиям нормобарической гипоксии [Tajima M. et al., 1994].

К настоящему моменту принято считать, что процесс формирования адаптационной устойчивости организма к гипоксии последовательно проходит три ключевых этапа: острая реакция на гипоксию и запуск механизмов срочной адаптации; процесс переключения с механизмов срочной адаптации на длительную; активация транскрипционных факторов с формированием структурных элементов адаптации. Первая фаза (острая реакция на гипоксию) обеспечивается кислородными сенсорами клетки: предположительно это дыхательная цепь митохондрий, НАДФН-оксидаза, гемоксигеназа, пролил-4-гидроксилаза, митохондриальная моноаминоксидаза и NO-синтаза. Далее сигнал посредством выработки АФК передается на промежуточные звенья, в ряду которых регуляторные каскады фосфолипазы C, протеинкиназы C, NO-синтазы и 5'-аденозин монофосфат активируемой протеинкиназы [Ryan S. et al., 2007;

Semenza G.L., 2009]. Результатом запуска этих ферментных каскадов является активация таких транскрипционных факторов, как HIF-1 (hypoxia inducing factor), NFκB (nuclear factor κ B) и AP-1 (activating protein-1) [Ryan S. et al., 2007; Semenza G.L., 2009] и изменение энергетического метаболизма митохондрий через активацию митохондриальных ионных каналов.

На сегодня известно множество медиаторов и соответствующих им рецепторов, благодаря взаимодействию которых осуществляются различные специфические реакции. Однако ко многим действующим агентам как внешнего, так и внутреннего происхождения (в том числе к гипоксии), специфических рецепторов не обнаружено. Тем не менее, клеточный ответ на снижение концентрации кислорода формируется. При этом некоторые ткани организма (каротидные тела, легкие, хромоаффинная ткань надпочечников) специализированы как кислородные сенсоры [Ward J.P., 2008]. В то время как остальные ткани, в том числе кардиомиоциты, не являясь сенсорами, все же способны реагировать на выраженные изменения уровня кислорода.

Система кислородного сенсора должна обладать следующими свойствами: (а) способностью «чувствовать» концентрацию O_2 ; (б) вызывать внутриклеточный каскадный ответ на изменение уровня O_2 [Acker T. et al., 2006]. Кандидатами на роль кислородного сенсора в сердце являются: семейство ферментов НАДФН-оксидаз, компоненты митохондриальной цепи транспорта электронов, пролил-4-гидроксилаза, гемоксигеназа, митохондриальная моноаминоксидаза и NO-синтаза [Acker T. et al., 2006]. Все они являются гем-содержащими молекулами.

Вторичными мессенджерами при этом выступают АФК, усиление образования которых может происходить при снижении концентрации кислорода [Vanden Hoek T.L. et al., 1997; Krijnen P.A.J. et al., 2003; Stewart S. et al., 2009; Aldakkak M. et al., 2008; Borchi E. et al., 2009]. Передачу сигнала активными формами кислорода с сенсоров на АФК-зависимые ферменты принято называть редокс-сигнализацией.

Наряду с ферментами дыхательной цепи митохондрий НАДФН-оксидаза является важным поставщиком АФК в клетке. Показано, что как в миокарде у пациентов после инфаркта [Krijnen P.A.J. et al., 2003], так и при гипоксии

изолированных кардиомиоцитов [Borchi E. et al., 2009] увеличивается продукция АФК и НАДФН-оксидазная активность. Было обнаружено [Bell R.M. et al., 2005], что НАДФН-оксидаза играет важную роль в формировании ишемического preconditionирования, так как у трансгенных мышей, «нокаутированных» по NOX2 (β -цепь цитохрома b-245, который входит в структуру НАДФН-оксидазы, NOX - NADPH oxidase), этот феномен воспроизвести невозможно.

Цитохромы дыхательной цепи митохондрий являются кислород-чувствительными ферментами и основным источниками АФК в клетке [Vanden Hoek T.L. et al., 1997, Stewart S. et al., 2009]. Последние могут образовываться в различных участках дыхательной цепи митохондрий [Guzy R.D. et al., 2006; Lambert A. et al., 2004]. Во время ишемии происходит взрывоподобное увеличение продукции АФК компонентами электронно-транспортной цепи [Vanden Hoek T.L., et al., 1997]. При этом, как ни парадоксально, наибольшее содержание АФК наблюдается в миокарде при длительной (более 30 мин) ишемии, когда уровень кислорода в ткани миокарда чрезвычайно низок [Vanden Hoek T.L., et al., 1997; Guzy R.D. et al., 2006]. Предполагается, что во время гипоксии происходит увеличение количества восстановленных форм переносчиков дыхательной цепи (НАД, ФАД и коэнзим Q), которые подвергаются аутоокислению с образованием АФК даже при низких концентрациях O_2 [Guzy R.D. et al., 2006].

К сожалению, выявить роль ферментов дыхательной цепи митохондрий в формировании адаптационной устойчивости миокарда невозможно, поскольку блокада этих энзимов *in vivo* неизбежно приведет к катастрофическим последствиям, а животные, «нокаутированные» по ним, нежизнеспособны. Поэтому судить об их триггерной роли мы можем лишь косвенно, по образованию активных форм кислорода.

В ряду важных внутриклеточных сенсоров кислорода – пролил-4-гидроксилаза (синоним - эггнин-1). Механизм ее кислородно-сенсорной активности принципиально отличается от неспецифического реагирования дыхательной цепи. Проллил-4-гидроксилазу можно назвать своеобразным «рецептором кислорода», так как последний является одним из ее субстратов [Kaelin W.G., et al., 2008]. В условиях нормоксии пролил-4-гидроксилаза

расщепляет и инактивирует α -субъединицу фактора транскрипции HIF-1 [Bruick R.K., et al., 2001]. При хронической непрерывной гипоксии пролил-4-гидроксилаза теряет свою активность, α -субъединица HIF-1 транспортируется в ядро, где соединяется с α -субъединицей HIF-1 и обеспечивает изменение транскрипции миокардиального генома [Semenza G.L. 2009]. В случае прерывистой хронической гипоксии HIF-1 регулируется активными формами кислорода и протеинкиназой C как напрямую [Semenza G.L. 2009], так и через ингибирование пролилгидроксилазы [Yuan G. et al., 2005, 2008].

Было обнаружено, что А-изоформа MAO играет важную роль в повреждении миокарда, вызванном постишемической реперфузией [Di Lisa F. et al., 2009] и вовлекается в дезадаптивные изменения миокарда при гипертрофии и сердечной недостаточности [Kaludercic N et al., 2007] через механизм образования H_2O_2 [Bianchi P et al., 2005].

Гемоксигеназа является чувствительным к кислороду ферментом [Shibahara S. et al., 2007]. Одним из продуктов гемоксигеназной реакции является радикал оксида углерода (CO^{\bullet}), который выступает одним из важнейших медиаторов внутриклеточных процессов [Wu L., Wang R., 2005]. Так, например, CO^{\bullet} способствует реваскуляризации миокарда после инфаркта через активацию фактора транскрипции HIF-1 [Lakkisto P. et al., 2010]. Предварительная активация индуцибельной формы гемоксигеназы (HO-1, Heme oxygenase-1) способствует повышению устойчивости изолированного сердца к действию ишемии и реперфузии [Кукоба Т.В. и др., 2003]. Эта же изоформа фермента играет значительную роль в реализации ишемического и фармакологического отсроченного preconditionирования [Jancsó G. et al., 2007].

Индукцибельная форма гемоксигеназы выявляется в миокарде и легких у животных, адаптированных к гипоксии, но не обнаруживается в нормоксических условиях [Grilli A. et al., 2003; Han F. et al., 2005]. Важная роль этого кислород-чувствительного фермента в процессах адаптации к гипоксии подтверждается тем фактом, что у животных с гомозиготной делецией гена индуцибельной гемоксигеназы (HO-1), нарушен процесс адаптивного ремоделирования правого желудочка: при равной степени гипертрофии, у HO-1-дефицитных мышей более

выражена его дилатация, наблюдаются многочисленные инфаркты стенки, повышена интенсивность перекисного окисления липидов и выраженность окислительного стресса в целом [Yet S.-F. et al., 1999].

Помимо вазомоторных эффектов радикал оксида азота (NO^\bullet) в настоящее время открыто множество его внутриклеточных функций. Так, известно, что NO^\bullet может конкурентно ингибировать цитохромоксидазу [Poderoso J.J. et al., 1996]. Оксид азота способен активировать митохондриальные АТФ-чувствительные K^+ - каналы ($\text{K}_{\text{АТФ}}$ –каналы), предупреждать образование МРТ-пор (mitochondrial transition pore) и регулировать митохондриальный биогенез [Nisoli E.E. et al., 2003]. Оксид азота активирует растворимую гуанилатциклазу, что ведет к выработке цГМФ с последующей активацией протеинкиназы G и ее регуляторного каскада [Hare J.M., 2003].

Большинство исследований свидетельствуют о положительной роли NO^\bullet при ишемии сердца [Konorev E.A. et al., 1995; Pabla R. et al., 1996; Bell R.M., Yellon D.M. 2001]. Так, например, применение донора NO^\bullet S-нитрозоглутатиона (GSNO) при 35-минутной ишемии предотвращает постишемическую сократительную дисфункцию миокарда [Konorev E.A. et al., 1995]. Напротив, добавление ингибитора NOS - *N*_ω-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) приводит к усугублению контрактильной дисфункции миокарда после ишемии-реперфузии [Pabla R. et al., 1996]. Более поздние исследования показали важную роль NOS в реализации кардиопротекторного эффекта ишемического preconditionирования [Bell R.M., Yellon D.M. 2001].

В связи с этим, логично предположить важную роль NO в формировании адаптационных изменений миокарда. В первую очередь, необходимо было выяснить, является ли NO-синтаза триггером адаптации к гипоксии. На это указывают следующие факты: NO-синтаза является кислород-зависимым ферментом, а оксид азота, как уже упоминалось выше, участвует в регуляции выработки АФК, что вполне могло бы быть звеном редокс-сигнализации. Однако триггерная роль NO-синтазы в адаптации к гипоксии подвергается сомнению. На это указывает, во-первых, динамика содержания и активности этого фермента. Есть сообщения о снижении активности NO-синтазы и продукции оксида азота,

преимущественно на ранних сроках гипоксического воздействия (24-36 ч) [Ostergaard L. et al., 2007]. Кроме того, высокие концентрации оксида азота могут блокировать индуцированное гипоксией образование фактора транскрипции NF- κ B [Hagen, T. et al., 2003]. Работ, напрямую подтверждающих или опровергающих триггерную роль NO-синтазы и оксида азота, мы в литературе не обнаружили.

Исследования последних лет выявили ряд фактов, позволяющих предполагать важную роль NO-синтазы и продукции оксида азота в опосредование уже сформировавшихся адаптационных изменений в миокарде. Так, в крови у субъектов, подвергнувшихся длительному воздействию высокогорной гипоксии, увеличено содержание стабильных метаболитов NO[•] [Manukhina EB et al., 1999]. В ряде исследований подтверждено увеличение экспрессии генов, кодирующих NOS и повышение активности NOS в миокарде животных, адаптированных к гипоксии [Gonzales G.F. et al., 2005; Manukhina EB et al., 1999]. Установлено, что применение донора NO[•] - GSNO - у животных, подвергнутых адаптации к хронической гипоксии, не усиливает эффект адаптации в отношении сократительной функции, однако у неадаптированных особей GSNO способствует более полному восстановлению инотропной функции миокарда после ишемии-реперфузии [Zaobornyj T. et al., 2009]. Этот факт свидетельствует о том, что продукция эндогенного NO[•] у адаптированных крыс уже увеличена и молекулярные механизмы, запускаемые оксидом азота, уже активированы. Ингибиторы NOS полностью устраняют кардиопротекторный эффект хронической гипоксии, но не влияют на постишемическое восстановление функций у неадаптированных животных [Zaobornyj T. et al., 2009].

Следует отметить, что в сердце существуют два основных субтипа NOS: конститутивная eNOS (endothelial NO-synthase) и индуцибельная iNOS (inducible NO-synthase). Мнения ученых относительно роли этих субтипов в процессе адаптации к гипоксии разошлись. Так, одними авторами обнаружено, что при воздействии хронической гипобарической гипоксии увеличивается активность iNOS [Rouet-Benzineb P. et al., 1999], а так же возрастает содержание iNOS и кодирующей её мРНК [Grilli A. et al., 2003]. Однако в работах других исследователей описано увеличение активности eNOS при акклиматизации к

хронической гипоксии. Так, обнаружено, что адаптация кроликов к нормобарической гипоксии вызывает: подъем содержания мРНК, кодирующей eNOS, на 238%; активность eNOS возрастает в 3,3 раза, что ведет к увеличению образования нитритов, нитратов и цГМФ в миокарде [Baker J.E. et al., 1999]. Авторы предполагают, что эти изменения как-то связаны с увеличением устойчивости животных к гипоксии. К сожалению, экспериментов, в которых кардиопротекторные эффекты адаптации были бы исследованы на фоне селективного «выключения» того или иного субтипа NOS, до настоящего времени не проводилось.

На основании сказанного можно резюмировать, что в настоящий момент имеются веские основания предполагать важную роль NOS в реализации защитных механизмов адаптации к гипоксии, однако роль субтипов NOS остается неясной.

В данный момент принято считать, что активные формы кислорода являются важнейшим передаточным звеном сигнальной цепи, опосредующей внутриклеточные реакции в ответ на гипоксию [Сазонтова Т.Г. и др., 2008]. Обнаружено повышение их образования в кардиомиоцитах во время ишемии [Vanden Hoek T.L., et al., 1997; Stewart S. et al., 2009]. При этом АФК выступают важным фактором ишемического повреждения миокарда [Levrant J. et al., 2003] и аритмогенеза [Yang L. et al., 2010]. Так, показано, что ловушки свободных радикалов (reactive oxygen species scavenger), в частности, мелатонин (гормон, который является ловушкой OH^\bullet и других радикалов) и темпол (ловушка O_2^\bullet) снижают частоту возникновения и тяжесть реперфузионных аритмий [Szarszoł O. et al., 2003], либо задерживают их появление [Neckar J. et al., 2008]. Антиоксиданты оказывают кардиопротекторный эффект при острой коронароокклюзии [Евсевьева М.В. и др., 1989]. Вместе с тем, в последние годы появились публикации о том, что АФК могут выступать триггерами ишемического и фармакологического прекондиционирования [Tsutsumi Y.M. et al., 2007]. Во всех перечисленных исследованиях применение антиоксидантов значительно уменьшало или полностью предотвращало проявление кардиопротекции в ответ на прекондиционирующее воздействие.

Важная роль АФК как пускового механизма адаптации к гипоксии была доказана тем, что ловушки свободных радикалов предупреждают развитие антиаритмического эффекта адаптации к хронической гипоксии [Szarszoi O. et al., 2003], а ингибитор каталазы аминотриазол устраняет кардиопротекторный эффект гипоксической адаптации *in vitro* [Guo H.C. et al., 2009].

В ответ на генерацию АФК, происходящую в организме при длительном воздействии гипоксии, активируется система антирадикальной защиты, которая является одним из основных звеньев неспецифической резистентности организма. Так, после окончания серии адаптирующих сеансов гипоксии обнаруживается увеличение активности антиоксидантных ферментов - супероксиддисмутазы и каталазы [Guo H.C. et al., 2009]. Показана важная роль этих изменений в механизмах адаптационного ускорения постишемического восстановления насосной функции миокарда [Guo H.C. et al., 2009]. Выраженность окислительного стресса и индуцированное ишемией образование конечных продуктов перекисного окисления липидов в миокарде при этом оказываются сниженными [Guo H.C. et al., 2009]. Таким образом, АФК играют роль триггеров адаптации к гипоксии, но не участвуют в сигнальных механизмах сформировавшейся адаптационной устойчивости миокарда к последующей кратковременной ишемии.

Важно отметить, что АФК играют более значимую роль в формировании адаптационных изменений миокарда при действии прерывистой гипоксии, чем при непрерывном режиме гипоксической нагрузки [Меерсон Ф.З. и др., 1992]. Предположительно это может происходить из-за многократных периодов реоксигенации, которые сопровождаются генерацией АФК. В 1992 г Ф.З. Меерсоном и соавт. [Меерсон Ф.З. и др., 1992] показали, что лишь адаптация к периодической гипоксии увеличивает активность СОД и каталазы в сердце, печени и мозге, а в результате адаптации к непрерывной гипоксии в горах активность указанных ферментов антиоксидантной защиты снижалась.

На данный момент известно несколько чувствительных к АФК ферментов и структур: фосфолипаза С_γ, активируемая при увеличении содержания активных форм кислорода в клетке [Zhong H. et al., 2000]; пролил-гидроксилаза, активность

которой при повышении уровня АФК ингибируется [Yuan G. et al., 2005]; МРТ-пора [Crompton M. et al., 1988] и ряд ферментов.

Ключевым следствием стимуляции фосфолипазы С активными формами кислорода является синтез двух внутриклеточных мессенджеров: диацилглицерола и инозитол-1,4,5,-трифосфата (IP₃, inositol-1,4,5-triphosphate), последний участвует в формировании кардиопротекторного эффекта адаптации [Меерсон Ф. З., Копылов Ю. И. 1992]. Рецепторное взаимодействие IP₃ приводит к мобилизации внутриклеточного Ca²⁺, который вместе с диацилглицеролом активирует протеинкиназу С (ПКС).

Протеинкиназа С является ключевым ферментом кадиопротекторного эффекта ишемического прекондиционирования [Speechly-Dick M.E. et al., 1994]. Регуляторный и каталитический домены ПКС имеют цистеин-содержащие сайты и являются чувствительными для редокс-регуляции [Stabel S et al., 1991].

Увеличение общего содержания и активности ПКС в гипертрофированном правом желудочке крыс, адаптированных к нормобарической гипоксии, впервые обнаружили P. Rouet-Benzineb и соавт. в 1999 г [Rouet-Benzineb P. et al, 1999]. Несмотря на сообщения о том, что адаптация к гипобарической гипоксии увеличивает уровень протеинкиназы С только в правом желудочке [Rouet-Benzineb P. et al, 1999], Neckár J. и соавт. в 2005 г показали увеличение экспрессии и активности этой киназы и в левом желудочке сердца крыс, адаптированных к гипобарической гипоксии [Neckár J. et al., 2005]. При этом обнаружена неоднозначная роль различных субтипов ПКС: гипобарическая гипоксия в режиме 7,000 м - 8 ч/день, с общим количеством экспозиций 24 - 32 не влияла на ПКС-ε в цитозоле кардиомиоцитов, но экспрессия и количество ПКС-δ увеличивались. О важной роли протеинкиназы С свидетельствует и тот факт, что селективная блокада ПКС-δ с помощью роттлерина нивелирует кардиопротекторный эффект адаптации к гипобарической гипоксии [Hlaváčková M. et al., 2010, Neckár J. et al., 2005], а ингибирование ПКС-δ приводит к устранению кардиопротекторного эффекта адаптации к нормобарической гипоксии у новорожденных кроликов [Rafiee P., et al., 2002]. Возможно, у разных видов животных в адаптации к гипоксии играют роль разные изоформы ПКС. Важным регуляторным каскадом,

запускаемым протеинкиназой С, является активация факторов транскрипции. Протеинкиназа С активирует HIF-1 [Yuan G. et al., 2008]. Помимо этого, протеинкиназа С может напрямую ингибировать фермент, разрушающий HIF-1 - пролил-гидроксилазу [Yuan G. et al., 2005].

Одним из наиболее важных эффектов ПКС является ее способность транслоцироваться в митохондрии, и запускать регуляторный каскад, приводящий к активации митохондриальных АТФ-чувствительных K^+ -каналов (мито K_{ATP} -каналов) [Uecker M et al., 2003], с последующим увеличением устойчивости МРТ-поры. Этому регуляторному каскаду уделяется большое внимание во многих работах, посвященных ишемическому прекондиционированию и адаптации миокарда к гипоксии [Zhu W.-Zh. et al., 2006; Нарыжная Н.В., и др., 2009; Neckař et al. 2001,2002a,b]. Воздействие хронической гипоксии приводит к активации K_{ATP} -каналов в различных органах и тканях [Cameron J.S. and Baghdady R. 1994]. Показано, что умеренная хроническая гипоксия вызывает увеличение продукции белка SUR2A (регуляторная субъединица K_{ATP} -канала) и плотности этих каналов на мембранах кардиомиоцитов по механизму, независимому от HIF-1 α [Crawford R.M. et al., 2003]. Об их важной роли в адаптационной кардиопротекции свидетельствуют публикации об устранении кардиопротекторного и антиаритмического эффектов адаптации к гипоксии после блокады K_{ATP} -каналов [Neckař J. et al. 2001, 2002b, Нарыжная Н.В. и др., 2009]. При этом в ряде работ показано участие митохондриального пула этих каналов в кардиопротекции [Neckař J. et al. 2002b; Zhu et al. 2003]. Исследователями было обнаружено, что как 5-гидроксидеканоат, так и глибенкламид, предупреждают формирование антиаритмического действия адаптации к гипоксии, а диазоксид не проявляет своих антиаритмических свойств у адаптированных к гипоксии крыс (в отличие от неадаптированных) [Neckař J. et al. 2002b].

Активация K_{ATP} -каналов в условиях хронической гипоксии приводит к увеличению устойчивости пор, регулирующих проницаемость митохондрий (МРТ-пор), открытие которых ведет к набуханию митохондрий, разобщению окислительного фосфорилирования и выходу из митохондрий цитохрома С и белка AIF (apoptosis-inducing factor) [Kroemer G. et al., 2007]. Последние катализируют

превращение неактивной прокаспазы-9 в активную каспазу-9. Каспаза-9 катализирует превращение прокаспазы-3 в каспазу-3, что, в конечном итоге, ведёт к апоптозу. Обнаружена важная роль МРТ-пор в реализации эффектов ишемического и фармакологического preconditionирования [Sun Y. et al., 1996]. О важной роли МРТ-пор в процессе адаптации свидетельствуют данные W.-Zh. Zhu и соавт [Zhu W.-Zh. et al. 2006], показавших отсутствие кардиопротекторного эффекта адаптации к гипоксии на фоне активатора МРТ-пор атрактилозида.

МРТ-поры, регулирующие проницаемость митохондрий, могут модулироваться еще одними K^+ -каналом: Ca^{2+} -зависимыми K^+ -каналом митохондрий (BK_{Ca} Big-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel). Существование этих каналов на внутренней мембране митохондрий миокарда и кардиопротекторный эффект их активации обнаружены в 2002 г [Xu W. et al., 2002]. Митохондриальный BK_{Ca}-канал регулируется цАМФ-зависимой протеинкиназой А [Sato T. et al., 2005]. Обнаружено, что активатор BK_{Ca}-каналов NS-1619 имитирует preconditionирование [Cao C.M. et al., 2005; Stowe D.F. et al., 2006]. Открытие этих каналов сопровождается увеличением продукции $O_2^{\cdot -}$, который является медиатором кардиопротекторного эффекта NS-1619 [Stowe D.F. et al., 2006].

Митоген-активируемые протеинкиназы (МАПК) представляет собой семейство киназ, которое включает в себя JNK (c-Jun N-terminal kinase), p38-МАПК, Akt-киназу и ERK (extracellular signal-regulated kinase). МАПК активируются в ответ на различные стимулы, такие как окислительный стресс, активация G-связанных белков, ишемия [Michel M.C. et al., 2001]. Известно, что эти протеинкиназы играют важную роль в механизмах ишемического preconditionирования [Heidbreder M. et al., 2008].

Еще одним чувствительным звеном редокс-сигнализации является АМПК (5'AMP-activated protein kinase), которая также считается неспецифическим звеном реакции клетки на гипоксию. Она может быть активирована кальций-кальмодулин-зависимой киназой [Wong A.K. et al., 2009]. АМПК фосфорилирует α -субъединицу гамма рецептора коактиватора пероксисомного активатора пролиферации (PGC-1 α , Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α), известного как

«мастер регуляции митохондриального биогенеза», следствием этого является поддержание высокого уровня дыхания митохондрий [Athea Y. et al., 2007].

Подводя итог вышесказанному, нельзя не отметить тот факт, что поиск ключевых триггеров, запускающих процессы неспецифической защиты миокарда, и регуляторных каскадов, опосредующих действие этих триггеров при действии хронической гипоксии, в последние годы приобретает все больший интерес, а так же большинство предполагаемых механизмов изучены недостаточно. Так, например, нет ни одного факта, напрямую доказывающего роль кислородных сенсоров клетки в адаптационных процессах, поскольку исследования с хроническим блокированием НАДФН-оксидазы, гемоксигеназы, пролил-4-гидроксилазы, митохондриальной моноаминоксидазы на всем протяжении адаптации к гипоксии не проводились, а в случае дыхательной цепи митохондрий такие опыты невозможны

1.2. Патогенез ишемических и реперфузионных повреждений миокарда

Общеизвестно, что нарушение нормального функционирования кардиомиоцитов и последующая их гибель в период прекращения кровоснабжения миокарда происходит, главным образом, из-за недостаточности кислорода и энергетических субстратов. Недостаток кислорода и субстратов во время ишемии имеет три основных патофизиологических следствия: 1) перестройка энергетического метаболизма кардиомиоцитов, основным источником энергии которых в норме является β -окисление жирных кислот, на гликолитический путь [Lopaschuk G.D. et al., 2010]; 2) изменение работы ионных насосов, в том числе из-за нехватки АТФ, что ведёт к увеличению $[Ca^{2+}]_i$, $[Na^+]_i$ и отёку клеток [Ostadal B., Kolar F., 1999]; 3) повышение продукции активных форм кислорода (АФК) избыточно восстановленными цитохромами дыхательной цепи митохондрий [Loog G, et al., 2011]. Следует подробнее остановиться на этих моментах.

Основным следствием ишемии является недостаток кислорода, питательных веществ и снижение элиминации продуктов метаболизма из поражённого региона миокарда [Neely J.R. and Feuvray D. 1981]. Нехватка кислорода приводит к нарушению окислительного фосфорилирования и, соответственно, быстрому

снижению продукции АТФ за счет окисления жирных кислот и пирувата, при этом степень дефицита АТФ пропорциональна выраженности ишемии [Neely J.R. and Feuvray D. 1981]. Для компенсации энергетического дефицита в условиях ишемии активируется анаэробный путь окисления углеводов – гликолиз и гликогенолиз, что приводит к восстановлению пирувата до лактата лактатдегидрогеназой, с последующим накоплением лактата и протонов $[H^+]_i$, то есть к состоянию, известному как лактоацидоз [Robergs R.A. et al., 2004].

Гликолиз в отсутствие последующего аэробного окисления пирувата приводит лактоацидозу [Robergs R.A. et al., 2004]. Падение рН, вызывает активацию Na^+/H^+ -антипортера (NHE1, Na^+/H^+ exchanger, то есть обменник), что приводит к росту концентрации внутриклеточных ионов натрия ($[Na^+]_i$) [Williams I.A. et al., 2007]. Дополнительный рост $[Na^+]_i$ обуславливается ингибированием Na^+/K^+ -АТФазы из-за снижения внутриклеточной концентрации АТФ [Murphy E. et al., 1999].

В результате увеличения $[Na^+]_i$ происходит подъём $[Ca^{2+}]_i$ [Namekata I. et al., 2006], потому что Na^+/Ca^{2+} -антипортер (NCX, Na^+/Ca^{2+} exchanger), который обычно транспортирует Ca^{2+} из клетки, начинает транспортировать Ca^{2+} в клетку в обмен на внутриклеточный Na^+ . Этот процесс лежит в основе накопления Ca^{2+} в саркоплазме кардиомиоцитов во время ишемии, что является одним из наиболее важных факторов ишемического повреждения кардиомиоцитов [Namekata I. et al., 2006]. Вторым по значимости механизмом перегрузки кардиомиоцитов ионами кальция принято считать ингибирование захвата Ca^{2+} саркоплазматическим ретикулумом вследствие нарушения работы Ca^{2+} -АТФазы СПР (SERCA2a, sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 2a) – основного ионного насоса, обеспечивающего диастолическое снижение $[Ca^{2+}]_i$ в саркоплазме [Gillette P.C. et al., 1979]. Подобное снижение активности SERCA2a происходит: (1) из-за недостатка АТФ, как энергетического субстрата для SERCA2a; (2) дефосфорилирования белка фосфоламбана, являющегося в дефосфорилированном состоянии ингибитором SERCA2a [Shintani-Ishida K. and Yoshida K. 2011]; (3) повреждения SERCA2a Ca^{2+} -активируемыми протеазами [Pedrozo Z. et al., 2010]. Поврежденный SERCA2a не только снижает захват Ca^{2+} , но и способствует его

пассивной утечке из СПР [Okabe E. et al., 1989]. О важной роли дисфункции SERCA2a при ишемическом повреждении говорят данные, полученные N. Zhang и B. Zhu в 2010 г [Zhang N. and Zhu B. 2010]. Так, в опытах на изолированных кардиомиоцитах крыс ими было обнаружено значительное снижение экспрессии гена SERCA2a при моделировании гипоксии и реоксигенации *in vitro*. В то время как при гипоксии и реоксигенации на фоне ишемического прекондиционирования, обладающего кардиопротекторным действием, подобного изменения экспрессии SERCA2a не наблюдалось [Zhang N. and Zhu B. 2010]. В качестве ещё одного механизма ишемической перегрузки кардиомиоцитов Ca^{2+} рассматривают нарушение работы сарколеммальной Ca^{2+} -АТФазы. В физиологических условиях Ca^{2+} -АТФаза обеспечивает удаление около четверти ионов кальция из цитоплазмы кардиомиоцитов. Снижение ее активности и сродства к Ca^{2+} наблюдается уже после 15-минутной ишемии, что может обуславливать перегрузку саркоплазмы ионами кальция [Vrbjar N. et al., 1995].

Если во время ишемии внутриклеточный pH снижен, то во время реперфузии pH восстанавливается до нормального. Однако в начале реперфузии внутриклеточный pH остается сниженным, вследствие чего за счет обмена H^+ на Na^+ в цитоплазму продолжает поступать Na^+ через NHE1. Избыток Na^+ удаляется из саркоплазмы Na^+/K^+ -АТФазой и NCX (sodium/calcium exchanger, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -антипортер) в обмен на Ca^{2+} , что приводит к непродолжительному, но интенсивному увеличению $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и возникновению связанных с этим реперфузионных аритмий. В частности, показано, что избыточное накопление ионов Ca^{2+} в кардиомиоцитах вызывает задержанную постдеполяризацию, триггерную активность и, как следствие, появление жизнеугрожающих тахикардий [Kleber G. 1992]. В экспериментах с биолюминисцентным Ca^{2+} -зондом акварином обнаружено, что возрастание $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в кардиомиоцитах свыше 1,5 мкМ сопровождается возникновением фибрилляции желудочков [Kihara Y. and Morgan J.P. 1991]. В дальнейших исследованиях с использованием другого флюоресцентного Ca^{2+} -го зонда Indo-1 была также обнаружена обратная зависимость между $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и порогом фибрилляции желудочков [Zaugg C.E. et al., 1996]. Причиной этих событий является то, что при высокой $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в

кардиомиоцитах, происходит спонтанный, не обусловленный деполяризацией сарколеммы, выброс Ca^{2+} из СПР [Kihara Y. and Morgan J.P. 1991; Lakatta E.G. and Guarnieri T. 1993]. Подобные осцилляции Ca^{2+} могут вызывать задержанную постдеполяризацию и, как следствие - тахикардию и фибрилляцию желудочков [Lakatta E.G. and Guarnieri T. 1993]. Кроме того, перегрузка клеток сердца Ca^{2+} может способствовать замедлению проводимости и возникновению аритмий по типу re-entry [Kleber G. 1992].

В некоторых кардиомиоцитах $[\text{Ca}^{2+}]_i$ остается неизменно высокой на протяжении всей реперфузии. Нормализация $[\text{Ca}^{2+}]_i$ определяется содержанием АТФ в клетке, внутриклеточным уровнем Na^+ и степенью повреждения белков рианодинных рецепторов СПР (Ca^{2+} -каналы СПР) во время ишемии [Zucchi R. et al., 2001]. Своим названием эти рецепторы обязаны алкалоиду, выделенному из южно-американского растения *Ruana speciosa*. Этот алкалоид проявляет высокое сродство к Ca^{2+} -каналам СПР и вызывает высвобождение Ca^{2+} из СПР [Hille B., 1992]. Важная роль дисфункции СПР в реперфузионном повреждении и нарушении сократимости подтверждается тем, что усиление захвата Ca^{2+} саркоплазматическим ретикуломом через SERCA2a приводит к значительному улучшению постишемического восстановления сократимости миокарда и уменьшению размера инфаркта [del Monte F. et al., 2004]. Так, например, трансфекция рекомбинантного аденовирусного вектора SERCA2a в область верхушки миокарда за 2-6 дней до моделирования ишемии приводит к значительному улучшению постишемического восстановления сократимости миокарда, уменьшению размера инфаркта и снижению частоты возникновения аритмий [del Monte F. et al., 2004]. Трансфекцией принято называть внедрение в клетку чужеродной кольцевой ДНК, способной самостоятельно реплицироваться независимо от ДНК клетки-хозяина.

Таким образом, во время ишемии и реперфузии несколько патофизиологических путей приводят к существенному повышению $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Так, если в физиологических условиях в кардиомиоцитах диастолическое содержание Ca^{2+} составляет 10^{-7}M , то при ишемии/реперфузии диастолическая $[\text{Ca}^{2+}]_i$ может увеличиваться в 5 раз, что обеспечивает возникновение контрактуры, способствует

возникновению аритмий и необратимых повреждений кардиомиоцитов [Нейлер В.Г. и Дейли М.Дж., 1990; Сперелакис Н. 1990а; Namekata I. et al., 2006; Kihara Y. and Morgan J.P. 1991].

В некоторой степени компенсировать повышенную концентрацию $[Ca^{2+}]_i$ в саркоплазме позволяет захват этого иона митохондриями. Захват Ca^{2+} митохондриями происходит через Ca^{2+} -переносчик, который использует для этого энергию трансмембранного потенциала митохондрий ($\Delta\psi$) [Gunter T.E. et al. 1990]. Таким образом, для транспорта Ca^{2+} в митохондрии не нужна энергия АТФ. Митохондриальный Ca^{2+} -переносчик ингибируется рутением красным и его производными. Вход Ca^{2+} в митохондрии через Ca^{2+} -переносчик сопровождается падением $\Delta\psi$. Таким образом, во время ишемии при ингибировании транспорта электронов из-за недостатка кислорода можно ожидать, что захват Ca^{2+} митохондриями приведет к падению $\Delta\psi$, ограничивая тем самым дальнейший захват митохондриями Ca^{2+} . Однако большинство исследований свидетельствует об увеличении уровня митохондриального Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_m$) во время ишемии [Griffiths E.J. et al., 1998; Namekata I. et al., 2006; Ruiz-Meana M. et al., 2006]. Причина этого парадоксального эффекта в том, что в регулирование $[Ca^{2+}]_m$ в митохондриях при ишемии включается Na^+/Ca^{2+} -обменник (митохондриальный NCX, mNCX) [Griffiths E.J. et al., 1998]. Митохондриальный NCX является основным каналом, через который Ca^{2+} выходит из митохондрий [Gunter T.E. et al., 1990]. Этот ионный канал чувствителен к концентрации Na^+ в митохондриальном матриксе [Gunter T.E. et al., 1990]. При ишемии из-за снижения градиента pH между митохондриальным матриксом и саркоплазмой происходит инверсия работы митохондриального NHE, ионы Na^+ поступают внутрь митохондрий и происходит их избыточное накопление в митохондриальном матриксе [Takeo S. and Tanonaka K. 2004]. Повышение митохондриальной концентрации Na^+ индуцирует инверсию работы mNCX, что приводит к возрастанию $[Ca^{2+}]_m$ [Griffiths E.J. et al., 1998]. Доказательством этому служат эксперименты E.J. Griffiths и соавт. [Griffiths E.J. et al., 1998], которые наблюдали отсутствие роста $[Ca^{2+}]_m$ во время ишемии при ингибировании mNCX селективным ингибитором этих каналов клоназепамом [Griffiths E.J. et al., 1998]. Эти данные свидетельствуют о том, что mNCX во время ишемии способствует

аккумуляции митохондриями Ca^{2+} . Во время реперфузии происходит восстановление градиентов $[\text{Na}^+]$ и pH. При этом ингибирование mNCX, в противоположность ишемии, приводит к возрастанию $[\text{Ca}^{2+}]_m$, что свидетельствует о восстановлении нормальной работы mNCX, при которой ионы Ca^{2+} удаляются из митохондрий, то есть инверсии работы mNCX во время реперфузии не наблюдается [Griffiths E.J. et al., 1998]. Тот факт, что блокирование mNCX в периоды ишемии и реперфузии приводит к разнонаправленному изменению $[\text{Ca}^{2+}]_m$ говорит о том, что в эти промежутки времени в зависимости от $[\text{H}^+]_i$ ток Ca^{2+} через mNCX направлен в противоположные стороны.

Захват Ca^{2+} митохондриями является естественным механизмом, позволяющим компенсировать прогрессирующее нарастание Ca^{2+} -перегрузки цитоплазмы во время ишемии. Установлено, что транспорт Ca^{2+} в митохондрии снижает синтез АТФ [Peng C.F. et al., 1976], усугубляя тем самым энергетический дефицит. Однако искусственное замедление захвата Ca^{2+} митохондриями путем блокирования митохондриального Ca^{2+} -унипорта рутением красным во время ишемии приводит к усилению реперфузионного повреждения кардиомиоцитов [Ruiz-Meana M. et al., 2006], где унипорт — транспорт одного вещества в одном направлении. Вместе с тем, обнаружена связь между кардиопротекторной активностью некоторых соединений, таких как диазоксид или ингибитор сарколеммального NCX (SEA0400), и их способностью снижать $[\text{Ca}^{2+}]_m$ [Murata M. et al., 2001; Namekata I. et al., 2006]. Это связано с тем, что во время реперфузии $[\text{Ca}^{2+}]_m$ достигает максимума, который, по данным E.J. Griffiths и соавт. [Griffiths E.J. et al., 1998], составляет 0,3-0,4 мкМ. Повышение этого уровня способствует усугублению повреждающего действия ишемии и последующей реперфузии [Griffiths E.J. et al., 1998]. Это пороговое значение обусловлено наличием в митохондриях МРТ-пор, чувствительных к $[\text{Ca}^{2+}]_m$ [Halestrap A.P. et al., 2010]. Эта пора, встроенная во внутреннюю и внешнюю мембрану митохондрий, обеспечивает проницаемость мембран для ионов и некоторых белков [Kroemer G. et al., 2007; Halestrap A.P. et al., 2010]. Она закрыта в физиологических условиях. До настоящего времени молекулярная структура МРТ-пор полностью не раскрыта и между исследователями ведется оживленная дискуссия относительно её строения.

Вместе с тем, охарактеризованы два мембранных компонента МРТ-поры и несколько регуляторных белков, непосредственно связанных с образованием МРТ-пор. По мнению проф. А.Р. Halestrap, мембранно-связанными субъединицами МРТ-поры являются адениннуклеотидтранслоказа и фосфатный канал [inorganic phosphate carrier (PiC)] [Halestrap A.P. et al., 2010]. До недавнего времени одной из мембранно-связанных структурных единиц считали и потенциал-зависимый анионный канал VDAC (voltage-associated anion channel порин) [Szabó I. and Zoratti M. et al., 1993]. Однако А. Krauskopf и соавт. [Krauskopf A. et al., 2006] опровергли это предположение, показав возможность образования МРТ-пор в митохондриях у VDAC1-нокаутных мышей. Регуляторные белки, связанные с МРТ-порами: циклофилин D – протеин митохондриального матрикса, являющийся мишенью для ингибитора МРТ-пор циклоспорина А; гексокиназа II; креатинкиназа; антиапоптотический белок Bcl-2 (**B** cell lymphoma 2) и проапоптотический белок Bax [Kroemer G. et al., 2007; Halestrap A.P. et al., 2010]. Гексокиназа II, креатинкиназа, Bcl-2 и Bax определяют переход МРТ-поры в открытое или закрытое состояние [Kroemer G. et al., 2007; Halestrap A.P. et al., 2010].

Большинство авторов свидетельствуют о том, что МРТ-поры остаются закрытыми в период ишемии и открываются лишь при наступлении реоксигенации [Halestrap A.P. et al., 2010]. Предполагается, что во время реперфузии открытие МРТ-поры тормозят протоны [Cohen M.V. et al., 2007]. Основными условиями, необходимыми для открытия МРТ-поры является повышение $[Ca^{2+}]_m$ и чрезмерная выработка АФК [Halestrap A.P. et al., 2010]. Как мы уже упоминали выше, во время реперфузии Ca^{2+} -перегрузка кардиомиоцитов и продукция АФК усиливаются, поэтому основной причиной гибели клеток миокарда становится апоптоз [Halestrap A.P. et al., 2010].

Важнейшей функцией МРТ-поры является инициирование апоптоза и некроза при их открытии. Таким образом, состояние МРТ-поры считается «точкой принятия решений» - пока клетка в состоянии сопротивляться ишемии, пора остается закрытой. Открытие МРТ-пор и последующее критическое падение трансмембранного потенциала митохондрий рассматривается как «точка

невозврата» - считают, что процесс апоптоза при этом становится необратимым [Halestrap A.P. et al., 2010].

Открытие МРТ-поры сопровождается набуханием митохондрий [Lee G.J. et al., 2011], что приводит к разрыву внешней митохондриальной мембраны, быстрому угнетению всех митохондриальных функций, выходу в цитоплазму цитохрома *c*, ряда проапоптотических белков и иницированию апоптоза или некроза. Путь клеточной гибели при открытии МРТ-поры зависит от исходного энергетического статуса клетки, поскольку помимо проапоптотических факторов процесс образования апоптосом требует наличия АТФ. Кроме того, открытие МРТ-поры вызывает дополнительный выход Ca^{2+} в саркоплазму уже перегруженных кальцием кардиомиоцитов, что усиливает контрактуру [Ruiz-Meana M. et al., 2007].

Прямое ингибирование открытия МРТ-пор с помощью циклоспорина А, который связывается с циклофилином D, ограничивает размер инфаркта, что впервые было показано в 1991 г. W. Nazareth и соавт. [Nazareth, W. et al., 1991]. Ограничение ишемического-реперфузионного повреждения при таких воздействиях как пре- и посткондиционирование, адаптация к гипоксии, связано с ингибированием открытия МРТ-пор [Zhu W.-Zh. et al. 2006]. В 2000 г. E.J. Griffiths и соавт. [Griffiths E.J. et al., 2000] в опытах на изолированных кардиомиоцитах показали, что ингибитор МРТ-поры циклоспорин А в концентрации 1 μ М защищает клетки от действия гипоксии и реоксигенации. Выживаемость клеток, в среду инкубации которых был добавлен циклоспорин, оказалась в 3 раза выше, чем без применения этого препарата, при этом $[Ca^{2+}]$ в митохондриях выживших кардиомиоцитах была выше, чем в контроле (гипоксия-реоксигенация без циклоспорина). Эти факты говорят о негативной роли открытия МРТ-поры в формировании ишемического-реперфузионного повреждения.

В данный момент принято считать, что активные формы кислорода являются внутриклеточными сигнальными молекулами [Зенков Н.К. и др., 2001]. Основным источником АФК в клетке является дыхательная цепь митохондрий [Зенков Н.К. и др., 2001]. В физиологических условиях 1-2% молекул кислорода превращаются в супероксидный анион-радикал ($O_2^{\bullet-}$) [Chance B. al., 1979]. Семейство ферментов супероксиддисмутаза, которые имеют в своем активном центре ионы меди, магния

или никеля, превращают O_2^{\bullet} в перекись водорода [Зенков Н.К. и др., 2001]. Следом за этим каталаза или глутатионпероксидаза катализируют превращение H_2O_2 в воду [Зенков Н.К. и др., 2001].

Продукция АФК во время ишемии происходит, несмотря на низкое содержание кислорода [Vanden Hoek T.L. et al., 1997; Stewart S. et al., 2009]. При этом, как ни парадоксально, наибольшее содержание АФК наблюдается в миокарде при длительной (более 30 мин) ишемии [Vanden Hoek T.L. et al. 1997]. Дело в том, что даже при длительной и глубокой ишемии уровень кислорода в миокарде никогда не падает ниже 4 мм рт. ст. В 1997 г Т.Л. Vanden Hoek и соавт. [Vanden Hoek T.L. et al. 1997] провели интересный эксперимент. Они с помощью «ловушек» кислорода (система аскорбат 200 мкМ + аскорбат оксидаза 1 U/мл или дитионит натрия 10 мМ) снизили уровень O_2 в суспензии изолированных кардиомиоцитов до 2,5 мм рт. ст. Оказалось, что такое воздействие улучшает выживаемость клеток и постишемическое восстановление сократимости, а образование АФК при этом снижено в 1,8-2 раза, что бесспорно свидетельствует о важной роли АФК в патогенезе ишемического-реперфузионного повреждения сердца. Наибольшего значения уровень АФК достигает в периоде реперфузии, когда восстанавливается процесс аэробного дыхания митохондрий и дыхательная цепь митохондрий генерируют такое количество O_2^{\bullet} , которое способно вызвать повреждение кардиомиоцитов [Loog G. et al., 2011].

Активные формы кислорода могут образовываться в различных участках электроннотранспортной цепи митохондрий, в том числе в комплексе I (НАДН-Q-редуктаза) [Lambert A. et al., 2004] и в комплексе III (коэнзим Q-цитохром C-редуктаза, которая включает цитохромы b_1 , b_2 и C) [Guzy R.D. et al., 2006]. В ряде работ [Lambert A. et al., 2004; Chen Q. et al., 2007] показано, что ингибирование электроннотранспортной цепи *in vitro* ротеноном или амобарбиталом приводит к снижению выработки АФК и значительному уменьшению ишемических и реперфузионных повреждений миокарда. Общеизвестно, что ротенон и амобарбитал блокируют передачу электронов с комплекса I на коэнзим Q, который является связующим звеном между комплексом I и комплексом III. Это свидетельствует о важной роли комплекса III или комплекса IV

(цитохромоксидаза, которая включает цитохром а и а₃) в продукции АФК дыхательной цепью во время ишемии-реперфузии. Недавними исследованиями показана важная роль повреждения цитохрома С в генерации АФК [Pasdois P. et al., 2011]. В физиологических условиях окисленный цитохром С выступает в качестве альтернативного акцептора O₂[•], который генерируется в дыхательной цепи убисемихиноном (сводный радикал убихинона). Убихинон (ubiquitous - вездесущий) синоним коэнзима Q. Во время ишемии поврежденный цитохром С, находясь в восстановленном состоянии, не способен акцептировать O₂[•] [Pasdois P. et al., 2011]. В этом случае супероксиддисмутаза катализирует превращение O₂[•] в кислород и H₂O₂. Это подтверждается повышением во время ишемии количества H₂O₂ [Pasdois P. et al., 2011]. Подобный подъем уровня H₂O₂ может быть устранён с помощью экзогенного цитохрома С [Pasdois P. et al., 2011].

Перекись водорода обладает токсичным действием, поскольку окисляет сульфгидрильные и метильные группы белков [Chance B. et al., 1979]. Кроме того, при взаимодействии H₂O₂ с металлами, обладающими переменной валентностью, образуется гидроксильный радикал (ОН[•]), запускающий процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) в мембранах кардиомиоцитов [Bolli R. et al., 1991]. Свободные радикалы (O₂[•] и ОН[•]) – молекулы с высокой реакционной способностью, содержащие непарный электрон, наличие которого обуславливает выраженную способность вызывать неспецифическое повреждение почти всех компонентов клетки. Особенно подвержены такому повреждению полиненасыщенные жирные кислоты, что способствует активации ПОЛ, значительно нарушающего свойства мембран [Bolli R. et al., 1991].

В пользу участия АФК в патогенезе ишемического-реперфузионного повреждения миокарда и аритмогенеза говорят следующие факты: «ловушки» свободных радикалов, в частности, мелатонин и имитатор супероксиддисмутазы темпол снижают частоту возникновения и тяжесть реперфузионных аритмий [Yang L. et al., 2010], а применение антиоксидантов оказывает выраженный кардиопротекторный эффект при острой коронароокклюзии [Levrant J. et al., 2003].

1.3 Опиоидная система и ее роль в регуляции функции миокарда в норме и при патологии

Опиоидная система представлена в организме опиоидными рецепторами (ОР), опиоидными пептидами, которые являются эндогенными агонистами данных рецепторов, а также ферментами, осуществляющими синтез и гидролиз опиоидных пептидов [Dhawan B.N. et al., 1996; Панченко Л.Ф. и др., 1999]. Основоположник современной классификации опиоидных рецепторов W. Martin и соавт. предлагает называть опиоидами как агонисты, так и антагонисты ОР [Martin W. et al., 1976]. В организме человека и животных идентифицированы только агонисты ОР.

Опиоидные рецепторы представляют собой липопротеидные комплексы, локализованные преимущественно на цитоплазматических мембранах клеток-мишеней, сопряженные с G-белками [Levac B.A. et al., 2002]. Они способны стереоспецифически взаимодействовать с L-изомером налоксона [Dhawan B.N. et al., 1996]. Именно по этой причине при анализе рецепторной специфичности фармакологического действия различных соединений принято исходить из того, что эффект какого-либо лиганда ОР устраняется предварительным введением налоксона.

В настоящее время доказано наличие гетерогенности опиоидных рецепторов. Впервые гипотезу о существовании нескольких типов ОР выдвинул W.R. Martin [Martin W. et al., 1976]. К настоящему времени известно несколько основных типов опиоидных рецепторов:

- μ -ОР, наибольшим сродством к которым обладают морфин, эндоморфины, β -эндорфин;
- δ -ОР, лигандами которых являются эндогенные энкефалины и синтетические аналоги энкефалинов;
- κ -ОР, наиболее селективно избирательно взаимодействующие с динорфином, неозндорфином, кетациклазоцином, бремасоцином, U-50488;
- ORL1-ОР, взаимодействующие с ноцицептином и не связывающиеся с налоксоном [Dhawan B.N. et al., 1996].

Наибольшая плотность ОР отмечается в структурах мозга, ответственных за проведение и восприятие боли: задние рога спинного мозга, серое вещество

околоводопроводного пространства, ядра таламуса, а также гипоталамус и некоторые отделы лимбической системы [Elde R. et al., 1995]. Кроме этого, ОР локализируются в стволовой части мозга, что определяет их участие в регуляции работы жизненно важных центров, прежде всего, продолговатого мозга. Следует отметить их наличие в железах внутренней секреции, многих других органах, в частности миокарде [Dhawan B.N. et al., 1996; Zhang W.M. et al., 1996].

С помощью методов молекулярной биохимии и гистохимических исследований было обнаружено, что различные субтипы ОР располагаются на плазматической мембране и широко представлены в продолговатом, промежуточном и среднем мозге, мозжечке, мосту, корковом веществе, а также в спинном мозге [Elde R. et al., 1995]. Так, было выявлено, что μ -, κ - опиоидные рецепторы располагаются в стенке желудочно-кишечного тракта, при этом наибольшая концентрация представлена в начальных отделах кишечника, тогда как δ -опиоидные рецепторы располагаются преимущественно в нейронах мезентерических и субмукозных узлов [Brown D.R. et al., 1998; Eguchi M. et al., 2004].

Эндогенными агонистами ОР являются опиоидные пептиды: энкефалины, эндорфины, эндоморфины, динорфины, ноцицептин [Dhawan B.N. et al., 1996].

Эндоморфины являются лигандами μ -опиоидных рецепторов, а ноцицептин – агонистом ORL1-рецепторов. Другие эндогенные лиганды могут взаимодействовать с несколькими ОР. Большинство опиоидных пептидов проявляют более высокое сродство к какому-то определенному типу рецепторов. Так, энкефалины являются преимущественными агонистами δ -опиоидных рецепторов, но могут активировать и μ -опиоидные рецепторы, а динорфины являются преимущественными κ -агонистами, но могут стимулировать μ - и δ -опиоидные рецепторы [Лишманов Ю.Б., Маслов Л.Н., 2004].

Эндогенные агонисты ОР синтезируются из высокомолекулярных предшественников. Так, эндорфины образуются при энзиматическом гидролизе проопиомеланокортина, энкефалины – из проэнкефалина, а динорфины, неоэндорфины и лей-энкефалин – из продинорфина [Dhawan B.N. et al., 1996; Martin W. et al., 1976; Younes A. et al., 2000]. Синтез эндогенных опиоидных пептидов,

являющихся, как и все регуляторные пептиды, секретлируемыми продуктами, происходит путем посттрансляционного процессинга белковых предшественников [Панченко Л.Ф. и др.,1999; Younes A. et al., 2000]. Секретлируемые белково-пептидные продукты синтезируются на мембраносвязанных полисомах эндоплазматического ретикулума [Панченко Л.Ф. и др.,1999; Younes A. et al., 2000].

Основными известными эффектами в спектре биологической активности опиоидных пептидов можно считать участие энкефалинов и эндорфинов в регуляции болевых рефлексов, деятельности сердечно-сосудистой, дыхательной и эндокринной систем, функций желудочно-кишечного тракта, поведения и психоэмоциональных процессов [Лишманов Ю.Б. и Маслов Л.Н. 2004; Маслов Л.Н. и др., 2009, 2010; Fryer R.M. et al., 2001; Zatta A.J. et al., 2008]. Такое многообразие эффектов, выявленное у эндогенных опиоидных пептидов объясняется полиморфизмом опиоидных рецепторов, а также широкой распространенностью их как в центральной нервной системе, так и в периферических органах и тканях.

Энкефалины, β -эндорфин, динорфины были обнаружены в миокарде млекопитающих [Ventura C. et al., 1992]. Содержание мРНК, определяющей структуру проэнкефалина, в кардиомиоцитах значительно превосходит аналогичный показатель, характерный для ткани головного мозга и надпочечников [Springhorn J.P. и Claucomb W.C., 1992].

Первые сведения о позитивном влиянии агонистов ОР в отношении скорости репаративных процессов в сердечной мышце при экспериментальном инфаркте миокарда отмечены в работах Афонской и соавт. [Афонская Н.А. и др.,1986]. В опытах с введением даларгина кроликам на фоне острой ишемии миокарда было установлено, что этот опиоид стимулировал рост капилляров, пролиферацию клеточных элементов, образование коллагена и миофибробластов, а также способствовал более полноценному рубцеванию и ускорению заживления [Афонская Н.А. и др.,1986]. Позднее эти данные нашли свое подтверждение в опытах Г.Ф. Дворцина (1990) [Дворцин Г.Ф. 1990]. Кроме того, согласно результатам Золоева с соавт. [Золоев Г.К. и др., 1985; 1987], введение животным с экспериментальным инфарктом миокарда опиоидных пептидов - лей-энкефалина,

мет-энкефалина, β -эндорфина и даларгина способствовало существенному снижению активности маркерных ферментов повреждения сердечной мышцы (КФК – креатинфосфокиназа, ЛДГ – лактатдегидрогеназа) в плазме крови. Приведенные данные о стимуляции даларгином репаративных процессов в сердце при экспериментальном инфаркте миокарда согласуются с результатами исследований, проведенных в нашей лаборатории, в которых была доказана способность даларгина стимулировать биосинтез белка в миокарде при его стрессорном повреждении [Лишманов Ю.Б. и Маслов Л.Н., 1994]. Было показано, что введение агониста периферических δ -ОР DALDA предупреждает выброс катехоламинов из надпочечников и адренергических терминалей сердца, что проявлялось снижением стресс-индуцированного повреждения кардиомиоцитов [Маслов Л.Н. и Нарыжная Н.В., 1997; Нарыжная Н.В. и Маслов Л.Н., 1998; Маслов Л.Н. и Лишманов Ю.Б., 1996]. Установлено также профилактическое “антиоксидантное” действие синтетических аналогов энкефалинов на модели окислительного стресса *in vitro* [Реброва Т.Ю. и др., 2001].

Дальнейшие исследования ученых, были направлены на изучение кардиопротекторных свойств лигандов ОР, выявление рецепторной принадлежности и механизмов этих эффектов. Некоторые авторы пришли к заключению, что цитопротекторными свойствами обладают лиганды δ -ОР [Aitchison K.A. et al., 2000; Fryer R.M. et al., 2000; 2001; Schultz J.E. et al., 1996; Takasaki Y. et al., 1999]. На изолированных кардиомиоцитах Y. Takasaki с соавт. также обнаружил цитопротекторный эффект δ -агониста Met⁵-энкефалина [Takasaki Y. et al., 1999]. На модели коронароокклюзии и реперфузии изолированного сердца крыс Aitchison с соавт. также был установлен защитный эффект другого неселективного δ -агониста [Aitchison K.A. et al., 2000]. В лаборатории проф. G.J. Gross впервые было доказано, что решающая роль в реализации кардиопротекции принадлежит периферическим δ_1 -ОР [Fryer R.M. et al., 2000; 2001; Schultz J.E. et al., 1996]. Эти исследователи получили результаты о том, что активация периферических δ_1 -ОР с помощью предварительного введения их селективного непептидного агониста TAN-67 способствует ограничению зоны некроза при экспериментальной коронароокклюзии [Fryer R.M. et al., 2000; 2001; Schultz J.E. et al., 1996].

В 1986г. исследователи открыли феномен ишемического прекондиционирования (ИП ischemic preconditioning) [Murry C.E. et al., 1986]. Суть этого феномена сводится к тому, что после одного или нескольких сеансов кратковременной ИР миокард становится устойчивым к действию длительной ишемии с последующей реперфузией. К сожалению, протекторный эффект ИП сохраняется только в течение 2 – 3 ч после прекондиционирования. Через сутки наблюдается повторное повышение толерантности к ИР, которое назвали отсроченным прекондиционированием (delayed preconditioning) [Yellon D.M. и Baxter G.F., 1995]. В 2003г. обнаружили феномен, названный «ишемическим посткондиционированием» (ischemic postconditioning). Оказалось, что 3 цикла кратковременной реперфузии и ишемии после снятия лигатуры с коронарной артерии способны эффективно уменьшить соотношение зона инфаркта/область риска (ЗИ/ОР) [Zhao Z.Q. et al., 2003]. В 1995г. получили данные о том, что инфаркт-лимитирующий эффект ИП не проявляется в условиях блокады опиоидных рецепторов, а год спустя этот же коллектив исследователей обнаружил, что морфин проявляет кардиопротекторные свойства [Schultz J.E. et al., 1996]. В 2005г. впервые получили данные о том, что опиоидные рецепторы могут участвовать в посткондиционировании сердца [Kin H. et al., 2005]. В экспериментах на крысах было показано, что внутривенное введение за 5 мин до реперфузии неселективного антагониста ОР налоксона устраняет инфаркт-лимитирующий эффект посткондиционирования. Оказалось, что инфаркт-лимитирующий эффект морфина не проявляется в условиях блокады μ -ОР, δ -ОР или κ -ОР [Wu S. et al., 2004]. Следовательно, все 3 субпопуляции рецепторов участвуют в реализации кардиопротекторного эффекта морфина. Китайские физиологи подтвердили инфаркт-лимитирующий эффект морфина [Lu Y. et al., 2011].

Антиаритмический эффект ОП. Локализация опиоидных рецепторов центральной нервной системе и в миокарде предполагает их участие в регуляции деятельности сердечно-сосудистой системы за счет модуляции состояния ОР. Данная регуляция осуществляется на двух уровнях: центральном и периферическом. Известно, что активация центральных μ_1 -ОР вызывает у экспериментальных животных

тахикардию, а μ_2 -ОР, напротив, снижение частоты сердечных сокращений [Paakkari P. I. et al., 1992].

Известно, что активация центральных ОР лигандами данных рецепторов, проникающими через гематоэнцефалический барьер, снижает частоту возникновения нарушений ритма сердца на моделях адреналовых и дигоксиновых аритмий [Rabkin S.W. 1989;1992,1993]. Кроме того, установлено, что активация периферических μ -, δ - и κ -рецепторов повышает электрическую стабильность сердца в условиях острой ишемии/реперфузии [Лишманов Ю.Б. и др., 1995; 1997; 1998; Маслов Л.Н. 1991; 1993; 1996; Нарыжная Н.В., 2011], а также на других моделях экспериментальных аритмий [Лишманов Ю.Б. и Маслов Л.Н., 2002; Лишманов Ю.Б. и др., 2003а; 2003б; 2003с; Нарыжная Н.В., 2011].

Исследования рецепторной специфичности антиаритмического действия активации ОР с помощью высокоселективных агонистов данных рецепторов выявили следующее: селективные агонисты δ_2 -ОР дельторфин II и дельторфин D способны снижать частоту возникновения желудочковых аритмий при коронароокклюзии и реперфузии, а селективная блокада δ_2 -рецепторов привела к исчезновению антиаритмического эффекта дельторфина II [Маслов Л.Н. и Лишманов Ю.Б., 2004; Maslov L.N. et al., 2009]. Кроме того, есть основания полагать, что активация κ_1 -опиоидных рецепторов повышает толерантность сердца к аритмогенному действию кратковременной ишемии и реперфузии [Угдыжекова Д.С. и др., 2001].

Результаты исследований ряда авторов свидетельствуют, что опиоидные рецепторы расположены непосредственно на сарколемме клеток миокарда [Zhang W.M., et al., 1997]. Их активация сопровождается снижением амплитуды сокращений изолированных кардиомиоцитов, повышением активности фосфолипазы C и уровня инозитолтрифосфата, уменьшением активности аденилатциклазы, что обеспечивает истощение запасов кальция в саркоплазматическом ретикулуме и падение амплитуды сокращений [Ventura C., et al., 1992; Ventura C., et al., 1991]. Но в литературе существует также мнение, что кардиальные опиоидные рецепторы расположены, главным образом, пресинаптически на симпатических и парасимпатических терминалях. Результаты

исследований свидетельствуют, что кардиотропные эффекты опиоидных пептидов обнаруживаются в экспериментах на изолированном сердце только при стимуляции симпатических и парасимпатических нервов, иннервирующих сердечную мышцу [Illes P. et al., 1987]. Функциональная значимость этих рецепторов определяется ингибированием выброса норадреналина и ацетилхолина из вегетативных нервных терминалей, расположенных в миокарде [Покровский В.М. и соавт., 1996]. Причем подавление высвобождения ацетилхолина связывают с активацией μ -ОР [Patel H.J. et al., 1997], а норадреналина – со стимуляцией δ -ОР [Fuder H. et al., 1986].

Интотропные эффекты. Сократительная способность миокарда составляет основу насосной функции сердца. Циклическое чередование сокращения и расслабления миокардиальных клеток обеспечивается согласованной работой системы ионного транспорта [Капелько В.И. и Горина М.С., 1987; Капелько В.И. и др., 1996; Marks A.R., 2003], в которой основную роль играют ионы кальция. Система транспорта кальция локализована в структурах сарколеммы, саркоплазматического ретикулума (СПР) и митохондрий [Капелько В.И. и Горина М.С., 1987; Капелько В.И. и др., 1988; 1996; Marks A.R., 2003]. Проникновение кальция в клетку происходит главным образом во время деполяризации сарколеммы. Этот процесс реализуется с помощью электрогенного «медленного» Ca^{2+} -тока и с помощью другого механизма – через обмен с внутренним Na^+ в соотношении $3 \text{Na}^+ : 1 \text{Ca}^{2+}$ [Niggli E., 1999]. Помимо внеклеточного кальция, источником Ca^{2+} , активирующего миофибриллы, является также кальций, освобождающийся из СПР [Zucchi R. et al., 2001]. Кальций, проникающий в миоплазму при возбуждении, способен связываться различными структурами, причем наряду с миофибриллами высоким сродством к кальцию отличаются и другие белки - Ca^+ -АТФ-аза саркоплазматического ретикулума, киназа фосфорилазы, митохондрии отличаются большой кальциевой емкостью [Капелько В.И. и Горина М.С., 1987; Капелько В.И. и др., 1996; Крутецкая З.И. и др., 2003].

Интересным аспектом регуляции концентрации свободного кальция в клетках является наличие постоянных флуктуаций ионов Ca^+ в миоплазме, которые представляют собой колебания [Ca^+]; в миоплазме отдельных клеток и связаны с

наличием запасов кальция в СПР [Marks A.R., 2003; Zucchi R. et al., 2001]. Снижение $[Ca^{2+}]_i$ в миоплазме обусловлено как связыванием его с миофибриллами, так и поглощением структурами СПР [Крутецкая З.И. и др., 2003; Marks A.R., 2003; Zucchi R. et al., 2001]. Расслабление протекает уже при крайне низком уровне миоплазматического кальция. Доказано, что расслабление и удаление кальция из миофибрилл не только взаимосвязаны, но именно удаление кальция из миофибрилл обычно сопровождается их расслаблением и этот процесс является регулятором скорости расслабления [Marks A.R., 2003; Zucchi R. et al., 2001].

Наконец, транспорт ионов Ca^{2+} в кардиомиоцитах зависит от адекватного энергоснабжения. Энергия АТФ необходима для функционирования Ca^{2+} -АТФ-азы саркоплазматического ретикулума, для кальмодулин-зависимой и α -АМФ-зависимой протеинкиназы, киназы гликогенфосфорилазы и косвенно – для Na^{+} - Ca^{2+} -обмена через поддержание высокого Na^{+} -градиента Na^{+} - K^{+} -АТФ-азой [Hansford R. G., 1994].

Одни из первых экспериментов, посвященные изучению инотропных эффектов опиоидов на сердце, были проведены в 1985 г коллективом ученых, возглавляемых проф. С. Ventura [Clo C. et al., 1985]. Эти авторы исследовали действие морфина, мет- и лей-энкефалина на частоту и силу сокращения изолированного перфузируемого сердца крыс. Согласно их данным, под воздействием морфина происходит резкое замедление частоты и постепенное снижение силы сердечных сокращений. Эффект мет-энкефалина оказался аналогичным, а после 10-минутной перфузии лей-энкефалином наблюдалась даже асистолия сердца [Clo C. et al., 1985]. Но поскольку этими исследователями не проводились эксперименты, направленные на изучение рецепторной специфичности обнаруженных инотропных эффектов неселективных агонистов ОР, оставалось неизвестным значение того или иного типов ОР в их реализации. Кроме того, другими учеными зарегистрированы и прямо противоположные эффекты лигандов ОР. Так, в экспериментах, выполненных на изолированных кардиомиоцитах, было показано, что неселективный агонист μ - и δ -ОР D-Ala²-Leu-enkephaline способствует увеличению амплитуды сокращений, причем эффект блокируется налоксоном [Huang X.D. et al., 1991]. Имеются данные и об

отсутствии какого-либо инотропного эффекта у неселективного агониста δ -ОР DADLE [Aitchison K.A. et al., 2000]. Исследованиями проф. С. Ventura с соавт. (1992) установлено дозозависимое снижение силы сокращений кардиомиоцитов левого желудочка крыс после 10-мин перфузии агонистами мю-, дельта- и каппа-ОР [Ventura C. et al., 1992]. Однако нельзя не отметить тот факт, что выраженность обнаруженных этими исследователями эффектов исследуемых лигандов несколько различались. Так, смешанные агонисты мю- и дельта-ОР лей- и мет-энкефалин способствовали монотонному снижению амплитуды сокращений, в то время как селективный каппа-агонист U-50,488H оказал 2-х фазный эффект, поскольку отрицательному инотропному действию этого лиганда предшествовало повышение силы сокращений изолированных кардиомиоцитов [Ventura C. et al., 1992]. Кроме того, агонист κ -ОР способствовал снижению диастолической длины венстрикулоцитов [Ventura C. et al., 1992]. Наконец, «отмывка» препаратов кардиомиоцитов от мет-энкефалина и лей-энкефалина делала необратимым отрицательный инотропный эффект этих эндогенных лигандов ОР, в то время как аналогичный эффект U-50,488H оказался обратим в концентрациях выше 10^{-5} М [Ventura C. et al., 1992]. Все инотропные эффекты исследуемых лигандов ОР устранялись после применения налоксона, являющегося неселективным блокатором мю- и дельта-ОР и Mg 1452, избирательно блокирующего каппа-ОР [Ventura C. et al., 1992].

В 2009 г были опубликованы результаты экспериментов, выполненных на изолированном перфузируемом сердце крысы [Mourouzis I. et al., 2009]. Морфин (1 мкМ/л) приносили в перфузионный раствор во время реперфузии. Морфин снижал выброс лактатдегидрогеназы в оттекающий от сердца перфузат, но не влиял на реперфузионное ДРЛЖ.

Синтетические агонисты опиоидных рецепторов. К настоящему времени синтезировано большое количество селективных и неселективных лигандов ОР. Одним из представителей последней группы соединений является даларгин. Препарат имеет наибольшее сродство к μ -ОР, но взаимодействует также с δ - и κ -ОР ($K_i = 108$ нМ) [Коробов Н.В., 1988; Маслов Л.Н. и др., 2005].

В экспериментах гораздо удобнее пользоваться селективными агонистами, потому что с их помощью можно ответить на вопрос: с каким типом ОР связан тот или иной наблюдаемый эффект? Так, высокой селективностью к μ -ОР обладает DAMGO ($K_i=109$ нМ) [Llobell F. и Laorden L., 1995].

За немногим исключением, большинство агонистов δ -рецепторов являются пептидами, синтезированными на основе энкефалинов, а также опиоидных пептидов, выделенных из кожи лягушек. Так, в 1989 г из эпидермиса амфибий были выделены пептиды, названные дельторфином [Kreil G. et al., 1989], дерморфином [Lazarus L.N. et al., 1989], и дельторфином А [Lazarus L.N. et al., 1994]. Два других пептида, изолированных из кожи лягушек *Phyllomedusa bicolor*, дельторфин I (называемый также дельторфином С) и дельторфин II (дельторфин В), являются не только самыми селективными из известных δ_2 -лигандов, но и проявляют в 10-200 раз большую аффинность к опиоидным рецепторам, чем синтетические аналоги энкефалинов [Lazarus L.N. et al., 1994]. Представители пептидов, выделенных из кожи лягушек рода *Phyllomedusa*, тропные к морфиновым рецепторам (μ -ОР), были названы "дерморфинами, то есть "морфинами, выделенными из кожи" (от латинского *dermos* - кожа) [Lazarus L.N. et al., 1989, 1994]. Все опиоидные пептиды лягушек во втором положении содержат D-аминокислоты (D-аланин или D-метионин), что обеспечивает их устойчивость к энзиматическому гидролизу и, соответственно, высокую биологическую активность *in vivo* [Lazarus L.N. et al., 1989, 1994]. Это свойство правовращающих аминокислот используется на практике при синтезе энзиморезистентных и высокоактивных *in vivo* пептидных агонистов δ -ОР, например, DPDPE, обладающего большей аффинностью к δ_1 -ОР [Toth G. et al., 1990].

К настоящему времени известно большое количество селективных агонистов κ -ОР, одним из представителей которых является (\pm)-U-50,488, имеющий непептидную природу ($K_i = 120.8$ нМ) [Gallian J.J. et al., 1984]. (\pm)-U-50,488 – смесь право- и левовращающих изомеров, причем (-)-U-50,488 проявляет высокое сродство к κ_1 -ОР, а его энантиомер не способен взаимодействовать с опиоидными рецепторами [Pugsley M.K. et al., 1992a].

Селективными агонистами ноцицептиновых рецепторов в организме является Orphanin FQ ($K_i = 8.6$ нМ, он же - ноцицептин) и его производные [Wang Y.Q. et al., 1999].

Одним из наиболее распространенных способов определения селективности и специфичности эффектов, присущих агонистам опиоидных рецепторов, является применение антагонистов указанных рецепторов. Наиболее часто в экспериментах для этого используют антагонист ОР налоксон. Однако группой ученых под руководством проф. М.К. Pugsley показано наличие у налоксона антиаритмического эффекта [Pugsley M.K. et al., 1992a], поэтому применение налоксона для оценки рецепторной природы антиаритмических эффектов опиоидов представляется недостаточным и не вполне корректным. В связи с этим, для блокады ОР наиболее обоснованным, на наш взгляд, является использование нескольких антагонистов опиоидных рецепторов, например, налтрексона и налтрибена.

BNTX (7-Benzylidenenaltrexone maleate) имеет наибольшее сродство к δ_1 -ОР ($K_i = 100$ нМ) [Sofuoglu M., 1991; Liu H. et al., 2001], в то время как налтрибен (17-(Cyclopropylmethyl)-6,7-didehydro-3,14 β -dihydroxy-4,5 α -эпоху-6,7-2',3'-benzo[b]furanomorphinan mesylate) уже в минимальных концентрациях ингибирует δ_2 -ОР ($K_i = 0.8$ нМ) [Sofuoglu M., 1991].

Наряду с вышеперечисленными агонистами и антагонистами ОР в арсенале современных фармакологов имеется достаточное количество неселективных и селективных лигандов опиоидных рецепторов различной химической природы, но останавливаться на их подробной характеристике мы не будем.

1.4 Опиоидная система в процессах адаптации сердца

На сегодняшний день известно, что адаптация организма, например, с помощью курса кратковременных иммобилизаций, гипоксии, физической нагрузки или путем введения фитоадаптогенов, способствует уменьшению степени стресс-индуцированных повреждений сердца при последующем более сильном и длительном стрессе [Лишманов Ю.Б. и др., 1997; Лишманов Ю.Б. и Маслов Л.Н., 1994; Меерсон Ф.З. и Пшенникова М.Г., 1988], увеличению толерантности

миокарда к повреждающему и аритмогенному действию адrenomиметиков [Лишманов Ю.Б. и др., 1998], ишемии и реперфузии [Asemu G. et al., 1999]. По мнению проф. Ф.З. Меерсона, значительная роль в реализации этого феномена принадлежит активации так называемых стресс-лимитирующих систем [Меерсон Ф.З. 1984; Меерсон Ф.З., Пшенникова М.Г., 1988], в число которых входит и эндогенная опиоидная система. Основанием для такого предположения явился факт увеличения в процессе адаптации содержания эндогенных энкефалинов и эндорфинов в различных органах и тканях (в крови, головном мозге, надпочечниках, миокарде) [Лишманов Ю.Б. и др., 1992б; Лишманов Ю.Б. и др., 1998б; Лишманов Ю.Б., Маслов Л.Н., 1994]. Более того, радиолигандные методы исследования позволили обнаружить изменение представительства и аффинности самих опиоидных рецепторов при адаптации к умеренным стрессорным воздействиям [Варфоломеев С.О., 1986]. Физиологическое значение этих изменений стало понятным лишь после проведения ряда исследований, показавших, что блокада опиоидных рецепторов у адаптированных животных устраняет антигипоксический, антиаритмический и кардиопротекторный эффекты, сформировавшиеся в ходе адаптации к гипоксии, стрессу и при курсовом введении фитоадаптогенов [Mayfield K.P. и D'Alecy L.G., 1994; Лишманов Ю.Б. и др., 1998б].

В 1992 г Томские исследователи изучали эффект адаптации к холоду, физическим нагрузкам, сочетанию холода и физических нагрузок на уровень опиоидных пептидов в органах и тканях [Лишманов Ю.Б. и др., 1992в]. Оказалось, что адаптация к холоду способствует увеличению уровня β -эндорфина в плазме крови, гипофизе и гипоталамусе крыс, при этом уровень энкефалинов в миокарде оставался неизменным. Тренировки физическими нагрузками также не влияли на содержание энкефалинов в сердце, но обеспечивали увеличение уровня β -эндорфина в гипоталамусе и плазме крови [Лишманов Ю.Б. и др., 1992в]. Сочетание плавания и холода способствовало увеличению уровня β -эндорфина в гипофизе, гипоталамусе и плазме крови, содержание мет-энкефалина в миокарде увеличивалось почти в 2 раза, а уровень лей-энкефалина оставался неизменным [Лишманов Ю.Б. и др., 1992в].

Адаптация крыс к стрессу с помощью серии коротких иммобилизаций по схеме, предложенной Ф.З. Меерсоном [Меерсон Ф.З. и Пшенникова М.Г., 1988], приводила к увеличению уровня β -эндорфина в плазме крови, гипофизе и гипоталамусе [Лишманов Ю.Б. и Маслов Л.Н., 1994;]. У адаптированных животных уровень лей-энкефалина был повышен в крови, надпочечниках и миокарде. Содержание мет-энкефалина в крови и надпочечниках не претерпело существенных изменений [Лишманов Ю.Б. и Маслов Л.Н., 1994].

Обнаружено, что адаптация крыс к периодической гипобарической гипоксии приводила к увеличению уровня мет-энкефалина в гипоталамусе [Лишманов Ю.Б. и др., 1998а].

В 1996 г была произведена попытка выяснить роль эндогенных опиоидов в антиаритмическом эффекте адаптации с помощью коротких иммобилизаций [Маслов Л.Н. и др., 1996б; Лишманов Ю.Б. и др. 1996б; 1996в]. Аритмии воспроизводили с помощью инъекции адреналина или CaCl_2 . Оказалось, что адаптация полностью устраняет аритмогенный эффект адреналина и ослабляет аритмогенный эффект CaCl_2 . В условиях блокады ОР налоксоном антиаритмический эффект адаптации выявить не удалось [Маслов Л.Н. и др., 1996б; Лишманов Ю.Б. и др. 1996б]. Селективный антагонист δ -ОР налтриндол не влиял на адаптационное увеличение толерантности к аритмогенным факторам [Лишманов Ю.Б. и др. 1996б; Маслов Л.Н. и др., 1996б]. Налоксон обладает наибольшим сродством к μ -ОР, его использовали в малой дозировке. Эти факты позволили предполагать, что антиаритмический эффект адаптации связан с активацией μ -ОР. Метилналтрексон (блокатор ОР, непроникающий через ГЭБ) на модели адреналин-индуцированных аритмий ослаблял антиаритмический эффект адаптации, но не устранял его полностью [Лишманов Ю.Б. и др., 1996г]. Следовательно, есть основание утверждать, что антиаритмический эффект адаптации к стрессу частично обусловлен оккупацией периферических опиоидных рецепторов эндогенными агонистами.

В 2001 г обнаружили [Нарыжная Н.В. и др., 2001а], что адаптация крыс с помощью коротких иммобилизаций в течение 12 дней увеличивает устойчивость сердца к аритмогенному действию кратковременной коронароокклюзии (10 мин) и

реперфузии (10 мин). Этот антиаритмический эффект исчезал после применения налоксона и сохранялся на фоне блокады δ -ОР с помощью селективного δ -антагониста TIPP[ψ] [Нарыжная Н.В. и др., 2001a]. Позднее установили [Маслов Л.Н. и др., 2004], что антиаритмический эффект адаптации при использовании ишемии и реперфузии *in vivo* не проявлялся в условиях селективной блокады μ -ОР с помощью μ -антагониста СТАР. Названный эффект сохранялся после блокады κ -ОР норбинаторфиминном [Нарыжная Н.В., 2011].

Как известно [Dhawan V.N. et al., 1996], активация опиоидных рецепторов ведёт к ингибированию аденилатциклазы. Кроме того, было известно [Lubbe W.F. et al., 1992], что увеличение в миокарде уровня цАМФ при ишемии может способствовать возникновению желудочковых аритмий. Мы предположили [Нарыжная Н.В. и др., 2008], что у адаптированных к иммобилизационному стрессу крыс должен быть снижен уровень цАМФ. Функциональным антагонистом цАМФ является цГМФ [Goldberg N.D. и Haddock M.K., 1977], поэтому определяли уровень и этого циклонуклеотида. Уровень циклических нуклеотидов определяли в зоне ишемии и интактном миокарде после 10-минутной коронароокклюзии и после 10-минутной реперфузии [Нарыжная Н.В. и др., 2008]. Выяснилось, что после 10-минутной ишемии у неадаптированных крыс в зоне ишемии и в интактном миокарде происходит увеличение уровня цАМФ и цГМФ. Десятиминутная реперфузия сопровождается снижением уровня цАМФ до значений, характерных для интактных животных, а содержание цГМФ остаётся повышенным [Нарыжная Н.В. и др., 2008]. Несколько иная картина наблюдалась в экспериментах с адаптированными к иммобилизационному стрессу животными. У них в ответ на коронароокклюзию не отмечалось подъёма уровня цАМФ как в зоне ишемии, так и в интактном миокарде [Нарыжная Н.В. и др., 2008]. Увеличение уровня цГМФ в сердечной мышце после ишемии и реперфузии у них было аналогичным тому, что наблюдали у неадаптированных особей. Низкий уровень цАМФ в миокарде адаптированных крыс может иметь прямое отношение к антиаритмическому эффекту адаптации. Природа угнетения синтеза цАМФ остаётся не ясной, но представляется вполне вероятным, что продукцию цАМФ ингибируют эндогенные опиоиды, уровень которых увеличен у адаптированных особей.

В 1998 г опубликовали результаты экспериментов с крысами, адаптированными к периодической гипобарической гипоксии [Лишманов Ю.Б. и др., 1998а]. Крыс адаптировали в течение 45 дней по схеме, предложенной Ф.З. Меерсоном [Меерсон Ф.З. и Пшенникова М.Г., 1988]. Оказалось, что подобный метод адаптации повышает устойчивость сердца к аритмогенному действию адреналина. Антиаритмический эффект адаптации не проявлялся в условиях блокады опиоидных рецепторов налоксоном. Названный эффект исчезал после применения селективного антагониста μ -ОР СТАР, селективного ингибитора δ -ОР ICI 174.864 и селективного блокатора κ -ОР норбиналторфимина [Лишманов Ю.Б. и др., 1998а]. Осталось не ясным, почему все три субтипа ОР задействованы в антиаритмическом эффекте адаптации к гипоксии. В 2003 г установили [Лишманов Ю.Б. и др., 2003б], что адаптация крыс к периодической гипобарической гипоксии повышает устойчивость сердца к аритмогенному действию кратковременной коронароокклюзии (10 мин) и реперфузии (10 мин). Этот эффект не проявлялся в условиях селективной блокады δ -ОР с помощью δ -антагониста TIPP[ψ]. Адаптационное повышение устойчивости сердца к аритмогенному действию ишемии-реперфузии сохранялось в условиях селективной блокады κ -ОР или μ -ОР [Лишманов Ю.Б. и др., 2003б]. Следовательно, антиаритмический эффект адаптации к гипобарической гипоксии является следствием оккупации δ -ОР эндогенными опиоидами.

Протекторный эффект ИП сохраняется только в течение 2 – 3 ч после прекондиционирования. Через сутки наблюдается повторное повышение толерантности к ИП, которое назвали отсроченным прекондиционированием (delayed preconditioning) [Yellon D.M. и Baxter G.F., 1995].

Прошло 17 лет после открытия ИП, прежде чем были получены первые данные о том, что можно предупреждать реперфузионные повреждения сердца и в том случае, когда ишемия закончилась возобновлением коронарной перфузии. В 2003г. обнаружили феномен, названный «ишемическим посткондиционированием» (ischemic postconditioning) [Zhao Z.Q. et al., 2003]. Оказалось, что 3 цикла кратковременной реперфузии и ишемии после снятия лигатуры с коронарной

артерии способны эффективно уменьшить соотношение зона инфаркта/область риска (ЗИ/ОР) [Zhao Z.Q. et al., 2003].

В 2005 г впервые получили данные о том, что опиоидные рецепторы могут участвовать в посткондиционировании сердца [Kin H. et al., 2005]. В экспериментах на крысах ими было показано, что внутривенное введение за 5 мин до реперфузии неселективного антагониста ОР налоксона устраняет инфаркт-лимитирующий эффект посткондиционирования.

Таким образом, мы можем уверенно говорить об участии опиоидных рецепторов в процессах формирования устойчивости миокарда при кратковременных адаптирующих воздействиях.

Вместе с тем, еще проф. Ф.З. Меерсон в 1987 г внёс эндогенную опиоидную систему в список стресс-лимитирующих систем, опосредующих кардиопротекторный эффект долговременных адаптирующих воздействий [Меерсон Ф.З., 1987]. Это предположение было подтверждено дальнейшими опытами в ФГБУ НИИ кардиологии СО РАМН. Так, были проведены эксперименты, в которых у предварительно адаптированных крыс после фармакологического «выключения» опиоидных рецепторов оценивали степень стрессового и изадринового повреждения сердца и параллельное изменение уровня катехоламинов в ткани миокарда и надпочечников [Лишманов Ю.Б. и др., 2003а]. В ходе экспериментов были использованы два типа адаптирующих воздействий: кратковременные иммобилизации и периодическое воздействие гипоксии. В качестве экспериментальных моделей повреждения сердца были применены введение животным синтетического аналога катехоламинов изадрина или 24 ч иммобилизация [Лишманов Ю.Б. и др., 2003а].

Введение адrenomиметиков вызывает выброс норадреналина из симпатических нервных терминалей, и именно «вторичный выброс» эндогенных катехоламинов играет значительную роль в патогенезе изадринового повреждения сердца [Заводская И.С. и др., 1977]. У животных, прошедших курс предварительной адаптации, степень изадринового повреждения сердца оказалась значительно менее выраженной, чем у неадаптированных животных [Лишманов Ю.Б., 2003а].

При гистохимическом исследовании ткани миокарда было обнаружено, что оба вида адаптации способствуют сохранению катехоламинов в соответствующих структурах сердца при последующем введении изадрина. Следовательно кардиопротекторный эффект адаптации может реализоваться путем торможения «вторичного выброса» норадреналина из адренергических структур [Лишманов Ю.Б., 2003а]. Причиной такого «адреносберегающего» эффекта может служить супрессия выброса катехоламинов из адренергических структур эндогенными опиоидами [Caffrey J.L., 1984; Ventura C. et al., 1992].

Предварительная блокада опиоидных рецепторов налоксоном устраняла проявления кардиопротекторного эффекта адаптации при изадриновом повреждении. Инъекция налоксона нивелировала и «адреносберегающий» эффект обоих видов адаптации. В связи с чем участие μ - δ - и κ -опиоидных рецепторов детерминирует адаптационное повышение устойчивости миокарда к изадриновому повреждению. В пользу этого также свидетельствуют данные литературы об участии μ - δ - и κ -рецепторов в реализации антиаритмического эффекта адаптации [Лишманов Ю.Б. и др., 1998б; 1999а], исследованного на моделях адреналин- и CaCl_2 -индуцированных аритмий.

Таким образом, был подтвержден факт участия эндогенной опиоидной системы в реализации кардиопротекторного эффекта адаптации.

Далее в ФГБУ «НИИ Кардиологии» СО РАМН было проведено исследование опиоидергических механизмов защитного эффекта предварительной адаптации при моделировании стрессорного повреждения сердца. Оказалось, что у животных, прошедших курс предварительной тренировки при помощи серии коротких иммобилизаций, степень стресс-индуцированного повреждения значительно ниже, чем у животных группы стресс-контроля [Лишманов Ю.Б., 2003].

Однако дальнейшие исследования показали, что блокада центральных и периферических опиоидных рецепторов налоксоном или налтрексоном не приводит к устранению кардиопротекторных эффектов адаптации [Лишманов Ю.Б., 2003а].

В 1994 г японскими учеными было обнаружено увеличение устойчивости изолированного миокарда к глобальной ишемии при адаптации крыс к условиям нормобарической гипоксии [Tajima M. et al., 1994]. Литературные данные об участии опиоидной системы в ишемическом preconditionировании [Schultz J.E. et al., 1995; Guo H.T. et al., 2011] и адаптации к гипобарической гипоксии [Лишманов Ю.Б., 2003а; Нарыжная Н.В., 2011], позволяют предполагать, что адаптация к хронической гипоксии при нормальном атмосферном давлении также реализуется через активацию опиоидных рецепторов. Однако до настоящего времени остается неисследованным вклад ОР в кардиопротекцию при хронической нормобарической гипоксии, так же как и рецепторная специфичность этого феномена. Неизученными остаются и молекулярные механизмы, передающие протекторный сигнал с опиоидных рецепторов на внутриклеточные эффекторы. Поскольку ОР являются Gi/o-белок-связанными рецепторами, мы предположили, что эффекты активации опиоидных рецепторов при адаптации к хронической гипоксии могут быть связаны с активацией Gi/o-белок-активируемым сигнальным каскадом: протеинкиназа С, тирозинкиназы, Sarc/EGFR-киназы, PI3-киназа, NO-синтаза.

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объект исследования

Работа выполнена на крысах-самцах линии Вистар массой 250 – 300 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария. При проведении экспериментов мы руководствовались рекомендациями о гуманном отношении к лабораторным животным, изложенными в Приказе МЗ СССР за № 755 от 12 августа 1977 г. Все болезненные процедуры проводили на наркотизированных крысах. В таблице 1 представлено распределение животных по сериям экспериментов.

Таблица 1. Распределение животных по сериям экспериментов

№	Серия	Число наблюдений
1	Интактные животные	10
2	Контрольные животные, острая коронароокклюзия-реперфузия	280
3	ХННГ	10
4	ХННГ, острая коронароокклюзия-реперфузия	210
5	Блокада опиоидных рецепторов налтрексоном, острая коронароокклюзия-реперфузия	12
6	ХННГ, блокада опиоидных рецепторов налтрексоном, острая коронароокклюзия-реперфузия	12
7	Блокада δ -опиоидных рецепторов TIPP (ψ), острая коронароокклюзия-реперфузия	12
8	ХННГ, блокада δ -опиоидных рецепторов TIPP (ψ), острая коронароокклюзия-реперфузия	12
9	Блокада δ_1 -опиоидных рецепторов BNTX, острая коронароокклюзия-реперфузия	11
10	ХННГ, блокада δ_1 -опиоидных рецепторов BNTX, острая коронароокклюзия-реперфузия	11

	коронароокклюзия-реперфузия	
11	Блокада δ_2 -опиоидных рецепторов налтрибенном, острая коронароокклюзия-реперфузия	11
12	ХННГ, блокада δ_2 -опиоидных рецепторов налтрибенном, острая коронароокклюзия-реперфузия	11
13	Блокада μ -опиоидных рецепторов СТАР, острая коронароокклюзия-реперфузия	12
14	ХННГ, блокада μ -опиоидных рецепторов СТАР, острая коронароокклюзия-реперфузия	12
15	Блокада κ -опиоидных рецепторов норбиналторфимином, острая коронароокклюзия-реперфузия	14
16	ХННГ, блокада κ -опиоидных рецепторов норбиналторфимин, острая коронароокклюзия-реперфузия	14
17	Блокада Sarc/EGFR-киназы лавендустином, острая коронароокклюзия-реперфузия	12
18	ХННГ, блокада Sarc/EGFR-киназы лавендустином, острая коронароокклюзия-реперфузия	12
19	Блокада PI3-киназы вортманнином, острая коронароокклюзия-реперфузия	12
20	ХННГ, блокада PI3 киназы вортманнином, острая коронароокклюзия-реперфузия	12
21	Блокада протеинкиназы С хелеритрином, острая коронароокклюзия-реперфузия	12
22	ХННГ, блокада протеинкиназы С хелеритрином, острая коронароокклюзия-реперфузия	12
23	Блокада тирозинкиназы генистеином, острая коронароокклюзия-реперфузия	11
24	ХННГ, блокада тирозинкиназы генистеином, острая коронароокклюзия-реперфузия	11
25	Блокада NO синтазы L-NAME, острая коронароокклюзия-	12

	реперфузия	
26	ХННГ, блокада NO синтазы L-NAME, острая коронароокклюзия-реперфузия	12
27	Блокада iNO синтазы S-метилтиомочевины сульфатом, острая коронароокклюзия-реперфузия	12
28	ХННГ, блокада iNO синтазы S-метилтиомочевины сульфатом, острая коронароокклюзия-реперфузия	12

Примечание: ХННГ- хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия

Всего было проведено 28 серий экспериментов и использовано 798 животных.

Большие выборки наблюдений в 2 и 4 экспериментальных группах связаны с набором нормоксического контроля и адаптации к гипоксии каждый сезон, что было предпринято для избегания ошибок, связанных с сезонными колебаниями параметров.

2.2 Характеристика методов исследования

2.2.1 Моделирование хронической непрерывной нормобарической гипоксии

Животные постоянно находились в гипоксической камере при 12% O₂ и нормальном атмосферном давлении на протяжении 21 дня [Neckar J. et al. 2003]. Объем гипоксической камеры составил 1,5 м³, концентрацию O₂ поддерживали на уровне 11,75—12,25%, концентрацию CO₂ - на уровне 0,03% системой «Био-нова-204G4R1» (НТО Био-нова, Россия, г. Москва). Давление O₂ и CO₂ внутри камеры постоянно контролировали датчиками TCOD-IR и OLC 20 (Oldham, Франция), через блок управления MX32 (Oldham, Франция).

2.2.2 Моделирование коронароокклюзии-реперфузии

Во время проведения эксперимента животные находились под наркозом пентобарбитал натрия, в условиях искусственной вентиляции легких. Пентобарбитал натрия вводили внутривентрикулярно в дозе 60 мг/кг [Neckar J. et al. 2003]. Животных интубировали через трахеотомическое отверстие. Вентиляцию легких осуществляли комнатным воздухом с частотой дыхания 60 – 65 уд/мин с помощью модифицированного аппарата РО-6 (Петербург, Россия). Левостороннюю

торакотомию производили во втором межреберье на 2–3 мм кнаружи от грудины. В образовавшееся отверстие «вывихивали» сердце. Лигатуру накладывали на левую переднюю нисходящую коронарную артерию на 2 мм ниже предсердия и возвращали сердце обратно в грудную полость. Коронароокклюзию верифицировали по появлению эпикардального цианоза и подъему сегмента ST [Barrett T.D. et al., 2000; Fryer R.M. et al., 2000; Schultz J.E., 1997]. Ишемическое воздействие оказывали на протяжении 20 минут. Реперфузию осуществляли путем снятия лигатуры с коронарной артерии. Сердце реперфузировали в течение 180 мин [Neckar J. et al.2003]. Восстановление кровотока подтверждали появлением эпикардальной гиперемии [Barrett T.D. et al., 2000; Fryer R.M. et al., 2000; Schultz J.E., 1997]. Запись ЭКГ осуществляли во время периода ишемии и в течение 30 минут после возобновления коронарного кровообращения.

2.2.3 Регистрация и оценка ишемических и реперфузионных нарушений сердечного ритма

Регистрацию ЭКГ *in vivo* осуществляли во время периода ишемии и в течение 30 минут после возобновления коронарного кровообращения с помощью аппарата для электрофизиологических исследований MP35 (Biopac System Inc., Goleta, США). Запись и обработку полученных данных осуществляли с помощью программного обеспечения INSTBSL-W компании Biopac System Inc., (Goleta, США).

При оценке нарушений ритма сердца принимали во внимание только желудочковые формы аритмий:

- единичные желудочковые экстрасистолы (6 – 16 за 10 мин);
- множественные желудочковые экстрасистолы (более 16 за 10 мин или 3-4 следующих друг за другом преждевременных сокращения);
- желудочковая тахикардия (более 4 последовательных желудочковых экстрасистол);
- желудочковая фибрилляция.

2.2.4 Оценка ишемических-реперфузионных повреждений миокарда

После 20-минутной ишемии и 180-минутной реперфузии сердце выделяли и промывали физиологическим раствором через канюлированную аорту. Для

определения размера зоны риска (ЗР, зона гипоперфузии) осуществляли окраску сердца насыщенным раствором перманганата калия, перфузируя миокард через канюлированную аорту, правый желудочек удаляли и взвешивали. Срезы сердец толщиной в 1 мм производили перпендикулярно их продольной оси [Neckar J. et al. 2003]. Для определения зоны некроза (ЗН) срезы окрашивали 1% раствором 2,3,5-трифенил тетразолия хлорида (30 минут, 37°C) и помещали в 10% раствор формальдегида на 1 сутки. Краситель 2,3,5-трифенил тетразолия хлорид является индикатором жизнеспособной и нежизнеспособной ткани, он быстро восстанавливается дегидрогеназами, которые присутствуют в живом миокарде, поэтому ткань окрашивается в красный цвет. Поскольку нежизнеспособный, инфарцированный миокард не содержит дегидрогеназ, ткань сохраняет бледно розовую окраску. На следующий день после окрашивания срезы сканировали с обеих сторон (сканер HP Scanjet G4050), используя оригинальную прикладную программу. Зону риска и размер некроза определяли компьютеризированным планиметрическим методом. Величина очага инфаркта была выражена в процентах от зоны гипоперфузии.

2.2.5 Лабораторные методы исследования крови

Подсчет эритроцитов производили по унифицированной методике в счетной камере Горяева (1972). Принцип метода основан на подсчете эритроцитов под микроскопом в определенном количестве квадратов счетной сетки и пересчете на 1 мкл крови, исходя из объема квадратов и разведения крови [Меньшиков В.В. и др. 1987].

2.2.6 Исследование гемодинамики

Измерение артериального давления осуществляли прямым методом путем канюлирования правой сонной артерии. Для этого освобождали доступ к правой сонной артерии в районе прикрепления грудино-ключично-сосцевидной мышцы. Под артерию подводили две лигатуры, дистальную лигатуру затягивали. На артерию и близлежащие ткани накладывался зажим, на 1 см проксимальнее затянутой лигатуры, в образовавшемся пережатом участке артерии делали небольшое отверстие. В отверстие вводили специальный расширитель и канюлю. После этого расширитель убирали, и канюлю закрепляли в артерии при помощи

второй лигатуры. Канюлю соединяли с датчиком давления SS13L (Biopac System Inc., Goleta, Калифорния, США) и перистальтическим насосом Minipuls Evolution (Gilson inc., Middleton, США) для постоянной подачи физиологического раствора и предотвращения тромбообразования в канюле. Регистрация данных осуществляли с помощью аппарата для электрофизиологических исследований MP35 (Biopac System Inc., Goleta, США). Запись и обработку полученных данных осуществляли с помощью программного обеспечения INSTBSL-W компании Biopac System Inc., (Goleta, США).

2.2.7 Определение содержания опиоидных пептидов в крови и ткани миокарда

Исследование содержания опиоидных пептидов: мет-энкефалина, бета-эндорфина, эндоморфина-1 и эндоморфина-2 проводили спектрофотометрическим методом EIA-наборами фирмы Бахем: S-1170.0001 β -Endorphin (rat) - EIA Kit, S-1139.0001, Endomorphin-1 - EIA Kit, S-1419.0001 Met-Enkephalin - EIA Kit, S-1246.0001 Endomorphin-2 - EIA Kit (Bachem, Peninsula Laboratories, LLC, San Carlos, CA, USA).

Экстракцию опиоидных пептидов из крови и ткани миокарда проводили в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя наборов на селективных колонках SEP-COLUMN, содержащих сорбент C18, фирмы Бахем (Bachem, Peninsula Laboratories, LLC, San Carlos, CA, USA).

Для получения плазмы 2-6 мл крови собирали в пробирку с ЭГТА (в конечной концентрации 0,1%), центрифугировали 15 мин при 1500g при 4°C, собирали супернатант и хранили при -70°C до 30 дней. Для экстракции пептидов к 1 мл плазмы добавляли эквивалентный объем экстракционного буфера А, содержащего 1% трифлюороуксусной кислоты, перемешивали и центрифугировали при 6000g 20 минут при 4°C. Супернатант переносили в чистые пробирки, не захватывая осевшие частицы. Колонки SEP-COLUMN промывали 1 мл буфера В, содержащего 60% ацетонитрила и 1% трифлюороуксусной кислоты, затем трижды 3-мя мл Буфера А. После этого в колонки добавляли раствор плазмы, осторожно промывали колонки буфером А (дважды по 3 мл) и отбрасывали получившийся раствор. Элюировали пептиды медленно 3 мл буфера Б (однократно). Полученный

раствор пептидов высушивали с применением вакуума. Перед исследованием сухие пробы растворяли в 250 мл буфера EIA-набора.

Для экстракции опиоидных пептидов ткань миокарда забирали из зоны ишемии (100 мг), замораживали в жидком азоте и хранили до 30 дней. Замороженную ткань растирали в ступке с жидким азотом, смешивали с 2 мл буфера А и центрифугировали при 6000g 20 минут при 4°C. Супернатант переносили в чистые пробирки, не захватывая осевшие частицы. Далее экстрагировали пептиды аналогично протоколу для плазмы крови.

Принципом определения концентрации опиоидных пептидов EIA-наборами фирмы Бахем (Bachem, Peninsula Laboratories, LLC, San Carlos, CA, USA), является метод конкурентного связывания конъюгированных антител с пептидами исследуемых образцов и антисыворотки, связанной с биотинилированной меткой (Bt-tracer), способной взаимодействовать с стрептавидин-связанной пероксидазой хрена, которая образует растворимый окрашенный продукт, регистрируемый спектрофотометрически [Porstmann T. and Kiessig S.T., 1992].

Процедура анализа состояла из внесения стандартных или неизвестных (исследуемых) образцов, антисыворотки и Bt-трейсера на 96-луночный планшет с нанесенными антителами к пептидам, инкубирования в течение 2 часов при комнатной температуре, промывки и выявления окраски. Для выявления окраски в лунки планшета добавляли стрептавидин-связанную пероксидазу хрена, инкубировали 1 час при комнатной температуре, планшеты промывали, добавляли цветообразующий субстрат, останавливали реакцию 100 мл 2 N HCl и измеряли оптическую плотность на иммуноферментном автоматическом анализаторе АИФ-Ц-01С (Санкт-Петербург, Россия) при длине волны 450 нм. Концентрацию опиоидных пептидов определяли по калибровочной кривой, построенной с применением растворов с известной концентрацией пептидов.

2.3 Характеристика используемых препаратов

2.3.1. Антагонисты опиоидных рецепторов

Крысам контрольной группы за 25 мин до перевязки коронарной артерии внутривенно вводили 0,2 мл физиологического раствора.

Неселективный антагонист опиоидных рецепторов налтрексон (Рис. 2): (5 α)-17-(Cyclopropylmethyl)-4,5-epoxy-3,14-dihydromorphinan-6-one hydrochloride (Naltrexone) растворяли в 0,9% растворе NaCl и вводили внутривенно в дозе 5 мг/кг [Takemori E., 1992; Li J.G. et al., 1999]. Синтезирован в компании «Sigma-Aldrich» (St. Louis, США).

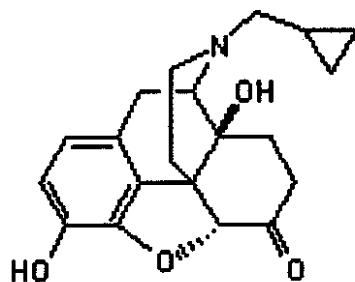


Рисунок 2. Неселективный антагонист опиоидных рецепторов налтрексон
 Блокатор δ -опиоидных рецепторов TIPP(ψ) (Рис. 3): (H-Tyr-TicP \square -[CH₂NH]-Phe-Phe-OH). Растворяли в 0,9% растворе NaCl, вводили внутривенно в дозе 0,5 мг/кг за 25 мин до коронароокклюзии [Schiller P.W. et al.,1993]. Синтезирован в компании “Multiple Peptide Systems”, (San Diego, США).

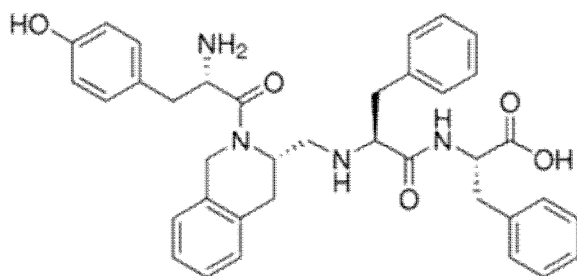


Рисунок 3. Блокатор δ -опиоидных рецепторов TIPP(ψ)

Селективный антагонист δ_1 -опиоидных рецепторов 7-Benzylidenenaltrexone maleate (BNTX) (Рис. 4) растворяли в 0,1 мл DMSO. Полученный раствор в объеме 10 ml добавляли к 1 мл 20%-раствора гидрохурпроуyl- β -cyclodextrin (200 мг гидрохурпроуyl- β -cyclodextrin растворяли в 1 мл H₂O). Вводили внутривенно в дозе 0,7 мг/кг за 25 минут до коронароокклюзии [Sofuoglu M. et al., 1991]. Синтезирован в компании Tocris Bioscience (Bristol, Великобритания).

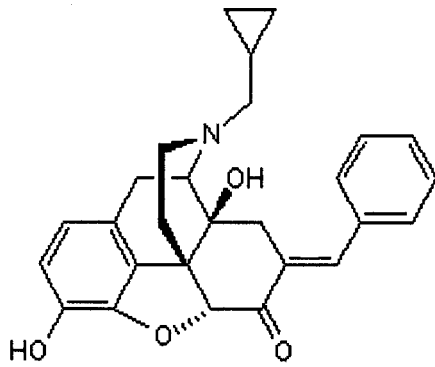


Рисунок 4. Селективный антагонист δ_1 -опиоидных рецепторов 7-Benzyldenaltrexone maleate (BNTX)

Селективный антагонист δ_2 -опиоидных рецепторов налтрибен (Рис. 5): $C_{26}H_{25}NO_4 \cdot CH_4O_3S \cdot xH_2O$ (Naltriбен) растворяли в 0,1 мл DMSO. Полученный раствор в объеме 10 μ л добавляли к 1 мл 20%-раствора гидрохурпропил- β -циклодекстрина (200 мг гидрохурпропил- β -циклодекстрина растворяли в 1 мл H_2O). Вводили внутривенно в дозе 0,3 мг/кг за 25 минут до коронароокклюзии [Sofuoglu M. et al., 1991]. Синтезирован в компании Tocris Bioscience (Bristol, Великобритания).

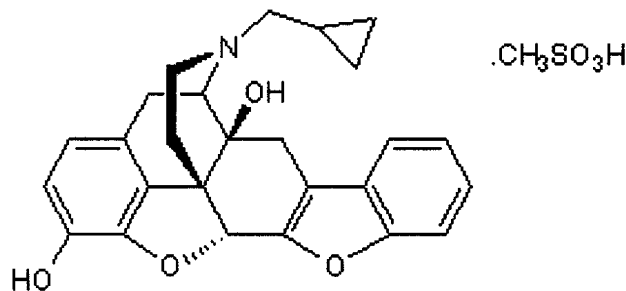


Рисунок 5. Селективный антагонист δ_2 -опиоидных рецепторов налтрибен
 Антагонист μ -опиоидных рецепторов СТАР (H-D-Phe-Cys-Тур-D-Трр-Arg-Thr-Pen-Thr-NH₂) (Рис. 6). Растворяли в 0,9% растворе NaCl, вводили внутривенно в дозе 0,1 мг/кг за 25 мин до ишемии [Abbruscato T.J. et al., 1997]; Синтезирован в компании “Multiple Peptide Systems”, (San Diego, США).

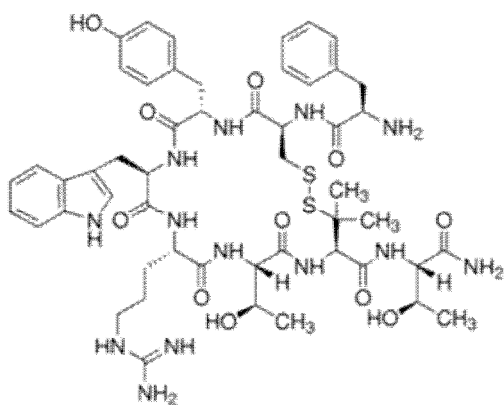


Рисунок 6. Антагонист μ -опиоидных рецепторов СТАР

Для инактивации κ -ОР использовали антагонист κ -опиоидных рецепторов норбиналторфимин (Рис. 7) [Portoghese P.S. et al., 1987], который растворяли в 0,9% растворе NaCl и вводили внутривенно в дозе 9 мг/кг за 90 минут до ишемического воздействия. Синтезирован в компании Research Triangle Institute (Research Triangle Park, США)

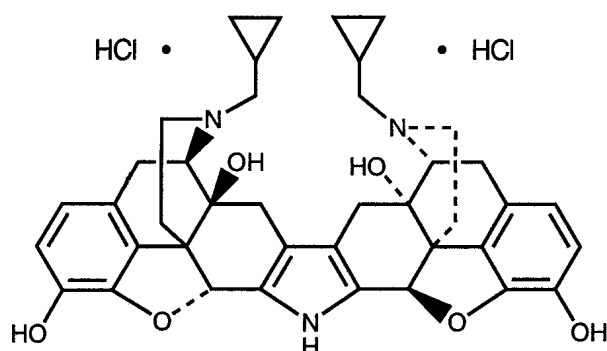


Рисунок 7. Антагонист κ -опиоидных рецепторов норбиналторфимин

2.3.2 Фармакологические инструменты для оценки вклада NO-синтазы, протеинкиназы C и тирозинкиназ в реализацию кардиотропного эффекта хронической непрерывной нормобарической гипоксии

Блокатор протеинкиназы C хелеритрина хлорид: 1,2-Dimethoxy-12-methyl[1,3]benzodioxolo[5,6-c]phenanthridinium chloride (Chelerythrine chloride) (Рис. 8) растворяли в 0,9% растворе NaCl, вводили внутривенно в дозе 5 мг/кг за 25 минут до ишемии [Fryer R.M., 1999]. Хелеритрин был синтезирован в LCLabs Company (Woburn, США).

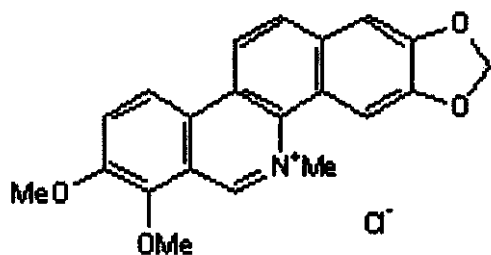


Рисунок 8. Блокатор протеинкиназы С хелеритрина хлорид

Блокатор PI3 киназы вортманнин (Wortmannin) (Рис. 9) растворяли в 0,1 мл DMSO. Полученный раствор добавляли к 1 мл 20%-раствора гидрохурпроуyl-β-cyclodextrin (200 мг гидрохурпроуyl-β-cyclodextrin растворяли в 1 мл H₂O). Вводили внутривенно в дозе 0,015 мг/кг за 25 минут до ишемии [Powis, G. et al., 1994]. Синтезирован в компании «Sigma-Aldrich» (St. Louis, США).

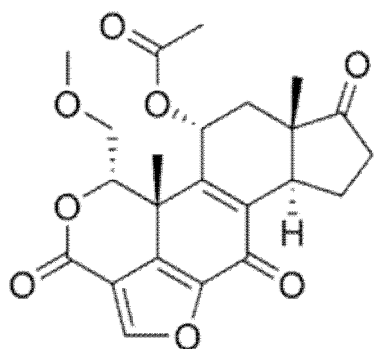


Рисунок 9. Блокатор PI3 киназы вортманнин (Wortmannin)

Ингибитор тирозинкиназы генистеин: 5,7-Dihydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one (Genistein) (Рис. 10). Генистеин растворяли в 0,1 мл DMSO. Полученный раствор добавляли к 1 мл 20%-раствора гидрохурпроуyl-β-cyclodextrin (200 мг гидрохурпроуyl-β-cyclodextrin растворяли в 1 мл H₂O). вводили внутривенно за 45 мин до моделирования ишемии в дозе 5 мг/кг [Fryer R.M. et al., 1999, 2000]. Генистеин и гидрохурпроуyl-β-cyclodextrin синтезированны компании Tocris Bioscience (Bristol, Великобритания).

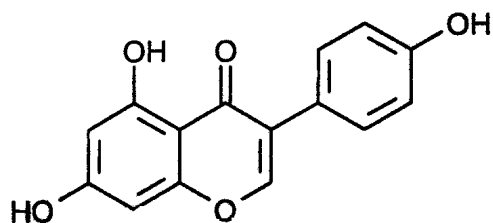


Рисунок 10. Ингибитор тирозинкиназы генистеин

Блокатор Src/EGFR-киназы лавендустин метил эфир (Lavendustin A methyl ester) 5-[[[(2,5-Dihydroxyphenyl)methyl][(2-hydroxyphenyl)methyl] amino]-2-hydroxybenzoic methyl ester) (Рис. 11). Растворяли в 0,1 мл DMSO. Полученный раствор добавляли к 1 мл 20%-раствора гидрохупропил-β-cyclodextrin (200 мг гидрохупропил-β-cyclodextrin растворяли в 1 мл H₂O). Вводили внутривенно в дозе 1мг/кг за 25 минут до ишемии [Намакава et al., 1999]. Синтезирован в компании Enzo Life Sciences Inc. (New York, США)

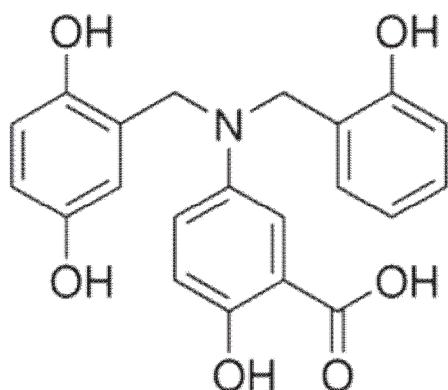


Рисунок 11. Блокатор Src/EGFR-киназы лавендустин метил эфир

Селективный ингибитор NO-синтазы L-NAME: N^G-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME hydrochloride) (Рис. 12) применяли в дозе 10 мг/кг, растворяли в 0,9% растворе NaCl, вводили внутривенно за 25 минут до коронароокклюзии [Hartman J.C., 1995; Fryer R.M. et al., 2000]. L-NAME был закуплен в компании ICN Biomedicals (Aurora, Ohio, США)

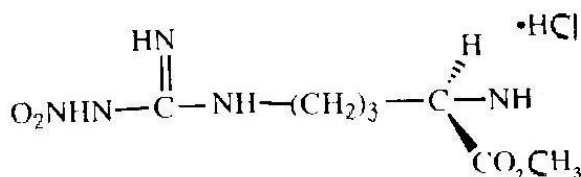


Рисунок 12. Селективный ингибитор NO-синтазы L-NAME

Блокатор индуцибельной NO-синтазы S-метилизотиомочевины сульфат: 2-Methyl-2-thiopseudourea hemisulfate salt S-Methyl-ITU (S-Methylthiourea sulfate) (Рис. 13). Растворяли в 0,9% растворе NaCl, вводили внутривенно, в дозе 3

мг/кг за 30 мин до ишемии [Jiang X. et al., 2004]. Синтезирован в компании «Sigma-Aldrich» (St. Louis, США).

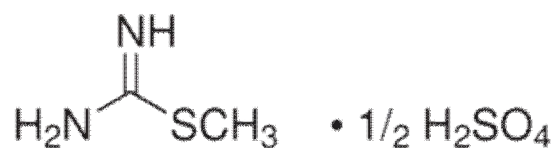


Рисунок 13. Блокатор индуцибельной NO-синтазы S-метилизотиомочевины сульфат

При выборе доз препаратов мы руководствовались полученными нами ранее результатами и данными других авторов [Maslov L.N. et al., 2009; Schiller et al., 1993].

2.4 Методы статистической обработки результатов

Статистическую обработку результатов производили в программе STATISTIKA 6.0 с помощью критериев χ^2 и Манна-Уитни. Данные о соотношении ЗН\ЗР выражены в процентах, остальные данные выражены в миллиграммах. Уровень достоверности $P < 0,01$.

ГЛАВА 3.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Изменения показателей периферической крови у крыс, подвергнутых хронической непрерывной нормобарической гипоксии

На сегодняшний день известно, что адаптация к состоянию гипоксии обеспечивает повышенную устойчивость сердца к повреждающему действию острой кислородной недостаточности. В частности, у адаптированных животных замедляется формирование необратимых изменений миокарда [Meerson F.Z., 1973; Neckar J., 2004] и увеличивается резистентность сердца к влиянию ишемии/реперфузии [Лишманов Ю.Б., 2004; Meerson F.Z., 1987; Neckar J., et al., 2003].

Были проведены исследования некоторых показателей периферической крови. Проведенные исследования показали, что у животных, подвергшихся непрерывной нормобарической гипоксии, достоверно увеличивается количество эритроцитов с 4,87 млн./мл до 7,09 млн./мл и концентрация гемоглобина со 150 г/л до 229 г/л (Табл. 2).

Таблица 2. Показатели периферической крови у крыс подвергнутых ХННГ.
(M ± SEM)

	Гемоглобин, г/л	Эритроциты (млн./мл)	Гематокрит
Контроль, n=17	150,22 ± 12,86	4,87 ± 0,61	0,4 ± 0,02
ХННГ, n=14	229,18 ± 40,63 P=0,0016	7,09 ± 0,88 P=0,000005	0,62 ± 0,03 P=0,0005

Примечание: p – уровень достоверности относительно группы контроля

Таким образом, полученные данные по показателям периферической крови подтверждают, что изменения гематокрита, повышение уровня гемоглобина и содержания эритроцитов так же характерно для животных в состоянии адаптации к гипоксии [Neckar J., et al., 2003].

3.2 Изменение уровня опиоидных пептидов у крыс подвергнутых хронической непрерывной нормобарической гипоксии¹

При исследовании содержания уровня опиоидных пептидов в плазме крови и ткани миокарда были получены следующие результаты.

У крыс подвергнутых хронической непрерывной нормобарической гипоксии наблюдалось достоверное увеличение уровня мет-энкефалина в плазме до 702 пг/мл, и ткани миокарда до 20 пг/мл по сравнению с интактными животными.

При воздействии ишемии/реперфузии мы наблюдали достоверное уменьшение уровня мет-энкефалина в плазме крови неадаптированных крыс с 527 пг/мл до 436 пг/мл в плазме крови и с 10 пг/мг до 1,5 пг/мг в ткани миокарда. Во время ишемии/реперфузии у животных с ХННГ уровень мет-энкефалина в плазме крови достоверно повышался, до 900 пг/мл, а в ткани миокарда наблюдалось умеренное снижение до 18,5 пг/мг по сравнению с исходными значениями у животных с ХННГ (табл. 3).

Уровень β -эндорфина в плазме крови животных, не подвергавшихся ХННГ во время ишемии/реперфузии, достоверно уменьшался с 994 пг/мл до 758 пг/мл в плазме крови и с 0,58 пг/мг до 0,18 пг/мг в ткани миокарда. У крыс с ХННГ гипоксии уровень β -эндорфина в плазме крови составлял 1044 пг/мл, а в ткани миокарда 0,64 пг/мг. Во время ишемии/реперфузии у животных с ХННГ уровень β -эндорфина в плазме крови был достоверно выше, чем в аналогичной группе интактных животных и составлял 1061 пг/мл, в ткани миокарда так же наблюдалось достоверное увеличение уровня β -эндорфина до 1,05 пг/мг по сравнению с контролем ХННГ (табл. 3).

Уровень эндоморфина-1 в плазме крови и ткани миокарда интактных животных во время ишемии/реперфузии не изменялся. У крыс подвергнутых хронической непрерывной нормобарической гипоксии наблюдался достоверный подъём уровня эндоморфина-1 в плазме крови до 7,49 пг/мл по сравнению с интактными животными, в ткани миокарда рост уровня эндоморфина-1 не

¹ – результаты получены совместно с с.н.с лаборатории экспериментальной кардиологии, к.м.н. Нарыжной Н.В.

наблюдался. Во время ишемии/реперфузии у животных с ХННГ уровень эндоморфина-1 в плазме крови достоверно повышался до 13,6 пг/мл, в ткани миокарда значительных изменений не наблюдалось (табл. 3).

Уровень эндоморфина-2 в плазме крови нормоксических животных во время ишемии/реперфузии достоверно снижался с 11,43 пг/мл до 6,87 пг/мл, в то время в ткани миокарда значительных изменений не наблюдалось. У крыс с ХННГ наблюдался достоверный подъём уровня эндоморфина-2 в плазме крови до 15,04 пг/мл по сравнению с интактными животными. В ткани миокарда крыс с ХННГ уровень эндоморфина-2 достоверно повышался до 0,258 пг/мл по сравнению с интактными животными. Во время ишемии/реперфузии у животных с ХННГ уровень эндоморфина-2 в плазме крови достоверно повышался до 20,6 пг/мл относительно аналогичной группы интактного контроля. В ткани миокарда наблюдался достоверный рост уровня эндоморфина-2, он составлял 0,464 пг/мг (табл. 3).

Полученные нами данные по изменению уровня опиоидных пептидов у крыс, подвергнутых хронической непрерывной нормобарической гипоксии, согласуются с более ранними данными, которые говорят о том, что при воздействии на животных стрессом увеличивается содержание в миокарде и крови эндогенных опиоидных пептидов [Лишманов Ю.Б., 1987]. Таким образом, есть основания полагать, что опиоидные пептиды (мет-энкефалин, β -эндорфин, эндоморфин-1, эндоморфин-2) могут принимать участие в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта хронической непрерывной нормобарической гипоксии.

Таблица 3. Содержание опиоидных пептидов в плазме крови и ткани миокарда крыс, подвергнутых ХННГ при коронароокклюзии-реперфузии ($M \pm SEM$).

Показатель	Нормоксия	Нормоксия Ишемия/реперфузия	ХННГ	ХННГ + ишемия/реперфузия
<u>Мет-энкефалин</u>				
Плазма крови, пг/мл	527,08 ± 29,32	436,39 ± 34,15 p1<0,02	702,89 ± 42,28 p1<0,01	898,79 ± 83,24 p2<0,01 p3<0,01
Миокард, пг/мг	10,42 ± 2,8	1,59 ± 0,14 p1<0,01	19,99 ± 2,92 p1<0,01	18,54 ± 3,39 p3<0,01
<u>β-эндорфин</u>				
Плазма крови, пг/мл	994,33 ± 39,7	758,51 ± 88,16 p1<0,05	1044,39 ± 43,16	1061,06 ± 78,15 p3<0,02
Миокард, пг/мг	0,58 ± 0,06	0,18 ± 0,02 p1<0,01	0,64 ± 0,065	1,05 ± 0,082 p2<0,01 p3<0,01
<u>Эндоморфин-1</u>				
Плазма крови, пг/мл	4,87 ± 0,42	4,53 ± 0,53	7,49 ± 0,24 p1<0,01	13,6 ± 1,94 p2<0,01 p3<0,01
Миокард, пг/мг	0,0048 ± 0,00034	0,0041 ± 0,00017	0,046 ± 0,0077	0,037 ± 0,0061
<u>Эндоморфин-2</u>				
Плазма крови, пг/мл	11,43 ± 0,96	6,87 ± 0,73 p1<0,01	15,04 ± 1,14 p1<0,01	20,6 ± 2,41 p2<0,01 p3<0,01
Миокард, пг/мг	0,022 ± 0,0015	0,015 ± 0,0067	0,258 ± 0,036 p1<0,001	0,464 ± 0,0439 p2<0,01 p3<0,01

Примечание: p1 – по отношению к интактным крысам, p2 – по отношению к группе ХННГ, p3 – по отношению к ишемии-реперфузии у интактных особей.

Количество наблюдений в каждой группе n=10.

3.3 Исследование гемодинамики

Как показано в таблице 4 введение антагонистов опиоидных рецепторов и ингибиторов различных киназ интактным крысам не оказывало влияние на изменение параметров гемодинамики в контрольных группах и у гипоксических крыс. Исключение составило введение блокатора NO-синтазы – L-NAME. Предварительное введение этого вещества оказывало гипертензивный эффект как у интактных крыс, так и у животных, подвергнутых хронической непрерывной нормобарической гипоксии. Гипертензивный эффект в обеих группах сохранялся и во время реперфузии до контрольных значений.

Повышение давления в связи с предварительной блокадой NO-синтазы являлось ожидаемым, поскольку NO является вазодилататором [Rees D.D., et al., 1990].

В качестве контрольной группы мы использовали интактных животных, не подвергавшихся воздействию хронической гипоксии. Как видно из таблицы 5 до начала ишемии-реперфузии АД составляло в среднем 145,8 мм.рт.ст., а ЧСС составляло в среднем 376 ударов в минуту. Острая ишемия не вызывала изменений частоты сердечных сокращений (ЧСС), ЧСС в среднем составляло 376 ударов в минуту. Во время острой ишемии происходило недостоверному снижению артериального давления с 145,8 мм.рт.ст. до 128,9 мм.рт.ст. Во время реперфузии уровень артериального давления восстанавливался до исходных значений и составлял 140,5 мм.рт.ст., в то время как ЧСС составляло 366 ударов в минуту (табл. 5).

Таким образом, хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия не оказывала значимого влияние на уровень артериального давления и ЧСС, как исходно, так и при коронароокклюзии и реперфузии (табл. 5).

Таблица 4. Влияние фармакологических агентов на уровень артериального давления и ЧСС у интактных крыс при 20-минутной коронароокклюзии и 180-минутной реперфузии. (M ± SEM)

	Уровень артериального давления мм.рт.ст.			ЧСС уд./мин		
	Исходный уровень АД	Последняя минута ишемии	30 минута реперфузии	Исходный уровень ЧСС	Последняя минута ишемии ЧСС	30 минута реперфузии ЧСС
Контроль n=21	145,8 ± 2,4	128,9 ± 2	140,5 ± 3,8	376,1 ± 2,1	375,1 ± 2,5	366,5 ± 2,5
Норбиналторфимин 9 мг/кг n =14	141,8 ± 2,4	129,1 ± 2,4	143,4 ± 3,1	373,2 ± 1,9	376,3 ± 3,1	367,2 ± 1,8
Налтрексон 5 мг/кг n =12	143,5 ± 3,4	129,7 ± 2,3	138,5 ± 2,9	372,5 ± 2,7	377,1 ± 3,6	369,9 ± 4,1
ТИРР 5 мг/кг n =12	142,7 ± 3,5	129,2 ± 2,3	142,4 ± 2,8	372,4 ± 4,6	374,7 ± 8,3	369,2 ± 4,8
Налтрибен 0,3 мг/кг n =11	143,8 ± 3,4	128,6 ± 3,6	139,1 ± 4,3	377,8 ± 6,3	371,6 ± 7,2	376,8 ± 1,6
ВНТХ 0,7 мг/кг n =11	145,6 ± 1,8	127,8 ± 1,9	139,5 ± 2,6	372,6 ± 5,6	377,7 ± 2,7	373,6 ± 8,1
СТАР 0,5 мг/кг n =12	140,1 ± 4,4	126,9 ± 4,2	138,5 ± 2,9	373,7 ± 2,8	371,8 ± 6,3	368,4 ± 4,5
Хелеритрин 5 мг/кг n =12	146,3 ± 2,6	130,9 ± 2,3	137,1 ± 6,2	377,3 ± 8,2	377,3 ± 6,8	364,8 ± 4,8
Генистеин 5 мг/кг n =11	141,2 ± 4,7	130,1 ± 4,4	139,9 ± 4,7	371,5 ± 2,5	373,8 ± 2,7	364,8 ± 5,8
Лавендустин 1 мг/кг n =12	142,8 ± 5,2	126,9 ± 2,7	143,6 ± 2,9	374,7 ± 3,8	378,4 ± 8,5	363,8 ± 4,7
Вортманнин 0,015 мг/кг n =12	149,1 ± 5,4	131,7 ± 4,1	146,9 ± 4,7	372,8 ± 7,6	378,3 ± 8,2	367,8 ± 3,8
L-NAME 10 мг/кг n =12	204, 4 ± 3,5 *	163,6 ± 1,8 *	166,2 ± 2,5 *	384, 6 ± 5,2	389,6 ± 3,8	357,1 ± 3,7
S-метилизотиомочевина 3 мг/кг n =12	144,4 ± 3,7	129,3 ± 5,2	143,9 ± 4,3	378,2 ± 8,3	378,4 ± 7,4	367,5 ± 8,2

Примечание: *p<0,05-достоверность по отношению к группе контроля

Таблица 5. Влияние фармакологических агентов на уровень артериального давления и ЧСС у крыс, подвергнутых хронической нормобарической гипоксии (21 день, 12% O₂) при 20-минутной коронароокклюзии и 180-минутной реперфузии (M ± SEM)

	Уровень артериального давления мм.рт.ст.			ЧСС уд./мин		
	Исходный уровень АД	Ишемия	Реперфузия	Исходный уровень ЧСС	Ишемия ЧСС	Реперфузия ЧСС
Контроль n =21	145,8 ± 2,4	128,9 ± 2	140,5 ± 3,8	376,1 ± 2,1	375,1 ± 2,5	366,5 ± 2,5
ХННГ n =20	143,8 ± 4,4	129,7 ± 2	138,5 ± 2,9	373,6 ± 7,3	377,9 ± 5,3	376,4 ± 4,2
ХННГ + Норбиналторфимин 9 мг/кг n =14	144,8 ± 3,4	127,7 ± 4,3	143,5 ± 2,5	378,4 ± 3,7	368,4 ± 7,4	367,8 ± 1,7
ХННГ + налтрексон 5 мг/кг n =12	143,5 ± 3,4	127,4 ± 4,7	134,6 ± 4,6	376,8 ± 8,4	369,4 ± 8,3	371,7 ± 7,3
ХННГ + ТИРР 5 мг/кг n =12	142,7 ± 3,5	125,7 ± 2,3	139,3 ± 5,7	372,5 ± 6,3	373,7 ± 7,3	369,5 ± 3,7
ХННГ + Налтрибен 0,3 мг/кг n =11	143,8 ± 3,4	128,5 ± 6,3	134,6 ± 3,7	372,6 ± 8,3	378,5 ± 7,4	370,3 ± 5,6
ХННГ + BNTX 0,7 мг/кг n =11	145,6 ± 1,8	125,7 ± 5,2	142,6 ± 4,6	375,3 ± 6,7	379,3 ± 8,4	368,5 ± 4,4
ХННГ + СТАР 0,5 мг/кг n =12	143,8 ± 4,4	128,4 ± 3,6	140,3 ± 5,6	374,7 ± 4,7	378,4 ± 6,3	372,7 ± 6,3
ХННГ + хелеритрин 5 мг/кг n =12	146,2 ± 6,7	125,7 ± 2,6	145,3 ± 5,7	374,6 ± 4,8	378,3 ± 7,3	368,4 ± 3,8
ХННГ + генистеин 5 мг/кг n =11	143,6 ± 4,6	125,9 ± 5,8	141,7 ± 4,6	372,5 ± 7,3	379,3 ± 7,3	373,6 ± 3,7
ХННГ + лавендустин 1 мг/кг n =12	143,6 ± 7,2	130,6 ± 7,9	138,4 ± 6,3	373,6 ± 7,2	369,4 ± 7,3	375,9 ± 7,4
ХННГ + вортманнин 0,015 мг/кг n =12	142,5 ± 5,3	130,4 ± 8,0	139,3 ± 5,7	374, 2 ± 7,8	381,7 ± 5,8	367,4 ± 7,4
ХННГ + L-NAME	208,6 ± 4,8 *	165,8 ± 3,6 *	165,3 ± 5,3 *	384, 6 ± 5,2	389,6 ± 3,8	357,1 ± 3,7

10 мг/кг n =12						
ХННГ + S-метилзотиомочевина 3 мг/кг n =12	140,3 ± 3,9	128,3 ± 5,2	138,4 ± 4,6	375,1 ± 4,1	369,4 ± 6,2	369,3 ± 4,8

Примечание: * $p < 0,05$ - достоверность по отношению к группе контроля
ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия

3.4 Влияние хронической непрерывной нормобарической гипоксии на частоту и характер нарушений сердечного ритма при коронароокклюзии и реперфузии

Как показано в таблицах 6 и 7 введение антагонистов интактным животным и крысам, адаптированным к хронической нормобарической гипоксии, и не оказывало влияния на частоту возникновения ишемических-реперфузионных аритмий.

В качестве контрольной группы мы использовали интактных животных, не подвергавшихся воздействию хронической гипоксии. При воздействии острой ишемии в фазу 1а мы не наблюдали антиаритмического эффекта хронической непрерывной нормобарической гипоксии (табл. 7).

Как показано в таблице 7, в контрольной группе животных моделирование острой 20-минутной ишемии в фазу 1а (первые 10 минут) вызывало следующие нарушения сердечного ритма: у 100% животных мы наблюдали возникновение множественных желудочковых экстрасистол, которые переходили в желудочковые тахикардии и фибрилляцию желудочков в 95% и 76% случаев, соответственно, с последующим восстановлением синусного ритма.

В фазу 1б (10-20 минуты ишемии) вызывало следующие нарушения сердечного ритма: у 76% животных мы наблюдали возникновение множественных желудочковых экстрасистол, которые переходили в желудочковые тахикардии и фибрилляцию желудочков в 57% и 48% случаев, соответственно. У 24% животных контрольной группы желудочковых нарушений сердечного ритма не отмечалось (табл. 7).

В 30-минутном реперфузионном периоде у 5% контрольных животных при восстановлении кровотока наблюдались множественные желудочковые экстрасистолы. Тахикардия и фибрилляция желудочков не наблюдалась (табл. 7).

У крыс, прошедших курс хронической непрерывной нормобарической гипоксии, отмечалась схожая картина: как показано в таблице 7, в группе гипоксических животных моделирование острой 20-минутной ишемии в фазу 1а (первые 10 минут) вызывало следующие нарушения сердечного ритма: у 90% животных мы наблюдали возникновение множественных желудочковых экстрасистол, которые переходили в желудочковые тахикардии и фибрилляцию

желудочков в 85% и 65% случаев, соответственно, с последующим восстановлением сердечного ритма. У 10% животных желудочковых нарушений сердечного ритма не отмечалось.

В фазу 1б (10-20 минуты ишемии) вызывало следующие нарушения сердечного ритма у гипоксических крыс: у 85% животных мы наблюдали возникновение множественных желудочковых экстрасистол, которые переходили в желудочковые тахикардии и фибрилляцию желудочков в 65% и 60% случаев, соответственно. У 15% животных контрольной группы желудочковых нарушений сердечного ритма не отмечалось (табл. 7).

В 30-минутном реперфузионном периоде у 30% контрольных животных при восстановлении кровотока наблюдались множественные желудочковые экстрасистолы. Тахикардия и фибрилляция желудочков не наблюдалась. Достоверных различий по частоте встречаемости нарушений ритма между группами контроля и хронической непрерывной нормобарической гипоксии обнаружить не удалось (табл. 7).

Таблица 6. Эффект фармакологических агентов на характер нарушений сердечного ритма при 20-минутной коронароокклюзии и 30-минутной реперфузии у крыс

группа	ИШЕМИЯ								Реперфузия			
	Фаза 1а (1-10 минута)				Фаза 1б (10-20 минута)				БЖА	МЖЭ	ЖТ	ЖФ
	БЖА	МЖЭ	ЖТ	ЖФ	БЖА	МЖЭ	ЖТ	ЖФ				
Контроль n=20	0 (0)	20 (100)	2 (95)	16 (76)	5 (24)	16 (76)	12 (57)	10 (48)	20 (95)	1 (5)	0 (0)	0 (0)
Норбиналторфимин 9 мг/кг n=13	3 (28)	10 (71)	8 (54)	5 (36)	9 (71)	4 (28)	3 (21)	2 (14)	12 (92)	1 (7)	0 (0)	0 (0)
Налтрексон 5 мг/кг n=12	1 (8)	11 (92)	8 (67)	6 (50)	1 (8)	11 (92)	7 (58)	5 (42)	12 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
ТИРР 5 мг/кг n=12	1 (8)	11 (92)	9 (75)	4 (33)	0 (0)	12 (100)	8 (67)	5 (42)	6 (50)	6 (50)	0 (0)	0 (0)
Налтрибен 0,3 мг/кг n=11	1(9)	10 (91)	8 (73)	3 (27)	0 (0)	11 (100)	7 (64)	5 (46)	9 (82)	2 (18)	0 (0)	0 (0)
VNTX 0,7 мг/кг n=11	1 (9)	10 (91)	8 (73)	3 (27)	0 (0)	11 (100)	7 (64)	5 (46)	9 (82)	2 (18)	0 (0)	0 (0)
СТАР 0,5 мг/кг n=12	2 (14)	12 (86)	11 (79)	7 (50)	2(14)	12 (86)	11 (79)	6 (43)	14 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Хелеритрин 5 мг/кг n=12	1 (8)	11 (92)	9 (75)	4 (33)	0 (0)	12 (100)	8 (67)	5 (42)	6 (50)	6 (50)	0 (0)	0 (0)
Генистеин 5 мг/кг n=11	1 (9)	10 (91)	8 (73)	3 (27)	0 (0)	11 (100)	7 (64)	5 (46)	9 (82)	2 (18)	0 (0)	0 (0)
Лавендустин 1 мг/кг n=12	0 (0)	12 (100)	7 (58)	4 (33)	0 (0)	12 (100)	8 (67)	5 (42)	9 (75)	3 (25)	0 (0)	0 (0)
Вортманнин 0,015 мг/кг n=12	1 (8)	11 (92)	9 (75)	3 (25)	1 (8)	11 (92)	8 (67)	5 (42)	10 (83)	2 (17)	0 (0)	0 (0)
L-NAME 10 мг/кг n=12	1 (8)	11 (92)	10 (83)	4 (33)	0 (0)	12 (100)	8 (67)	5 (42)	12 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
S-метилизотиомочевина 3 мг/кг n=12	1 (8)	11 (92)	9 (75)	4 (33)	0 (0)	12 (100)	8 (67)	5 (42)	8 (66)	4 (44)	0 (0)	0 (0)

Таблица 7. Влияние фармакологических агентов на частоту и характер нарушений сердечного ритма при 20-минутной коронароокклюзии и 30-минутной реперфузии у крыс, после курса ХННГ

группа	ИШЕМИЯ								Реперфузия			
	Фаза 1а (1-10 минута)				Фаза 1б (10-20 минута)							
	БЖА	МЖЭ	ЖТ	ЖФ	БЖА	МЖЭ	ЖТ	ЖФ	БЖА	МЖЭ	ЖТ	ЖФ
Контроль n =21	0 (0)	21(100)	20(95)	16(76)	5 (24)	16 (76)	12(57)	10(48)	20 (95)	1 (5)	0(0)	0(0)
ХННГ n =20	2(10)	18(90)	17(85)	13(65)	3(15)	17(85)	13(65)	12(60)	14(70)	6(30)	1(5)	1(5)
ХННГ + Норбиналторфимин 9 мг/кг n =14	4(28)	10(71)	8(54)	5(36)	10(71)	4(28)	3(21)	2(14)	13(92)	1(7)	0(0)	0(0)
ХННГ + налтрексон 5 мг/кг n =12	1(8)	11(92)	8(67)	6(50)	1(8)	11(92)	7(58)	5(42)	12(100)	0(0)	0(0)	0(0)
ХННГ + ТИРР 5 мг/кг n =12	1(8)	11(92)	9(75)	4(33)	0(0)	12(100)	8(67)	5(42)	6(50)	6(50)	0(0)	0(0)
ХННГ + Налтрибен 0,3 мг/кг n =11	1(9)	10 (91)	8 (73)	3(27)	0(0)	11(100)	7(64)	5(46)	9(82)	2(18)	0(0)	0(0)
ХННГ + ВNTX 0,7 мг/кг n =11	1(9)	10 (91)	8 (73)	3(27)	0 (0)	11(100)	7 (64)	5 (46)	9 (82)	2 (18)	0(0)	0(0)
ХННГ + СТАР0,5 мг/кг n =14	2(14)	12 (86)	11(79)	7 (50)	2 (14)	12 (86)	11(79)	6 (43)	14(100)	0 (0)	0(0)	0(0)
ХННГ + хелеритрин 5 мг/кг n =12	1 (8)	11 (92)	9 (75)	4 (33)	0 (0)	12(100)	8 (67)	5 (42)	6 (50)	6 (50)	0(0)	0(0)
ХННГ + генистеин 5 мг/кг n =11	1 (9)	10 (91)	8 (73)	3 (27)	0 (0)	11(100)	7 (64)	5 (46)	9 (82)	2 (18)	0(0)	0(0)
ХННГ + лавендустин 1 мг/кг n =12	0 (0)	12(100)	7 (58)	4 (33)	0 (0)	12(100)	8 (67)	5 (42)	9 (75)	3 (25)	0(0)	0(0)
ХННГ + вортманнин 0,015 мг/кг n =12	1 (8)	11 (92)	9 (75)	3 (25)	1 (8)	11 (92)	8 (67)	5 (42)	10 (83)	2 (17)	0(0)	0(0)
ХННГ + L-NAME 10 мг/кг n =12	1 (8)	11 (92)	10(83)	4 (33)	0 (0)	12(100)	8 (67)	5 (42)	12(100)	0 (0)	0(0)	0(0)
ХННГ + S-метилизотиомочевина 3 мг/кг n =12	1 (8)	11 (92)	9 (75)	4 (33)	0 (0)	12(100)	8 (67)	5 (42)	8 (66)	4 (44)	0(0)	0(0)

3.5 Кардиопротекторный эффект хронической непрерывной нормобарической гипоксии ²

Острая коронароокклюзия во всех сериях экспериментов вызывала образование зоны гипоперфузии (зона риска, ЗР) размером 37,3-45,4% от массы левого желудочка без достоверных различий между группами. Одинаковая величина зоны риска указывает на воспроизводимость результатов и отсутствие изменения коллатерального кровотока под влиянием использованных воздействий и препаратов. Поскольку проведение исследований заняло значительный промежуток времени (с октября 2009 г. по ноябрь 2011 г.) во избежание погрешностей контрольные опыты проводили параллельно к каждой серии экспериментов. Из таблиц 8 и 9 видно, что у животных контрольной группы после окончания реперфузии зона некроза составляла 56,5% и 43,84% от массы зоны риска для сезонов 2009-2010 и 2011 гг. соответственно. Несмотря на то, что сезонные изменения величины зон некроза не были статистически значимым, дальнейшие расчеты мы проводили относительно соответствующих контрольных значений.

Под действием хронической нормобарической гипоксии у крыс значительно возрастала масса правого желудочка, с 207 ± 15 мг в контрольной группе, до $256 \pm 12,6$ мг у адаптированных животных, то есть прирост массы составил 20% ($p < 0,05$) (табл. 8).

Исследования показали, что зона некроза у крыс, подвергнутых хронической гипоксии, составляла от 16,6 (сезон 2011 г.) до 20,4% (сезон 2009-2010 гг.) от зоны риска, что достоверно ($p < 0,01$) отличалось от показателей соответствующих контрольных групп (таблицы 8 и 9). Следовательно, при воздействии ХННГ соотношение зоны некроза к зоне риска уменьшалось на 36% по отношению к контролю. Интересно отметить, что, несмотря на сезонные колебания абсолютных показателей, относительное снижение повреждения миокарда у гипоксических крыс оставалось неизменным (в 2,6 – 2,7 раза, табл. 8 и 9). Эти результаты свидетельствуют о том, что хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия оказывает выраженный инфаркт-лимитирующий эффект (Рис. 14, 15).

² – результаты получены совместно с с.н.с лаборатории экспериментальной кардиологии, к.м.н. Нарыжной Н.В.

Таблица 8. Влияние ХННГ на размер зоны некроза при 20-минутной коронароокклюзии и 180-минутной реперфузии у крыс (M±SEM).

Сезон 2009-2010гг.

Группа	n	МПЖ, мг	МЛЖ, мг	Зона риска, мг	Зона некроза, мг	ЗН/ЗР (%)
Контроль	15	207 ± 15,0	861,9 ± 44,9	337,5 ± 27,6	142,3 ± 21,2	56,5 ± 2,9
ХННГ	18	256,1 ± 12,8 P<0,05	760,5 ± 28,2	360,4 ± 23,6	142,9 ± 23,5	20,4 ± 1,7 P<0,01

Примечание: ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия
 МПЖ – масса правого желудочка, МЛЖ – масса левого желудочка,
 ЗН/ЗР – соотношение массы зоны некроза к массе зоны риска.
 p – уровень достоверности относительно группы контроля

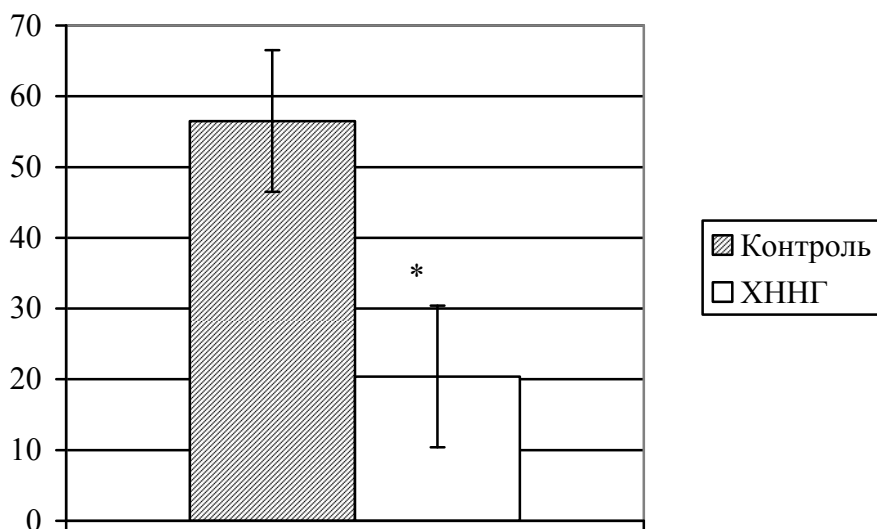


Рисунок 14. Влияние ХННГ на размер зоны некроза при 20-минутной коронароокклюзии и 180-минутной реперфузии у крыс (M±SEM). Сезон 2009-2010 гг.

Примечание: * p<0,01 - достоверность относительно группы контроля
 ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия

Таблица 9. Влияние ХННГ на размер зоны некроза при 20-минутной коронароокклюзии и 180-минутной реперфузии у крыс (М ± SEM). Сезон 2010-2011 гг.

Группа	n	МПЖ, мг	МЛЖ, мг	Зона риска, мг	Зона некроза, мг	ЗН/ЗР (%)
Контроль	14	178,9± 15,4	869,2 ± 34,7	322,3 ± 29,1	141,3 ± 22,1	43,84 ± 4,6
ХННГ	14	287,38 ± 9,1 P<0,05	843,14 ± 38,3	356,6 ± 25,3	52,65 ± 7,1	16,6 ± 2,3 P<0,01

Примечание: ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия
МПЖ – масса правого желудочка, МЛЖ – масса левого желудочка, ЗН/ЗР – соотношение массы зоны некроза к массе зоны риска.

p – уровень достоверности относительно группы контроля;

P1– уровень достоверности относительно группы адаптированных животных, критерий Манна-Уитни.

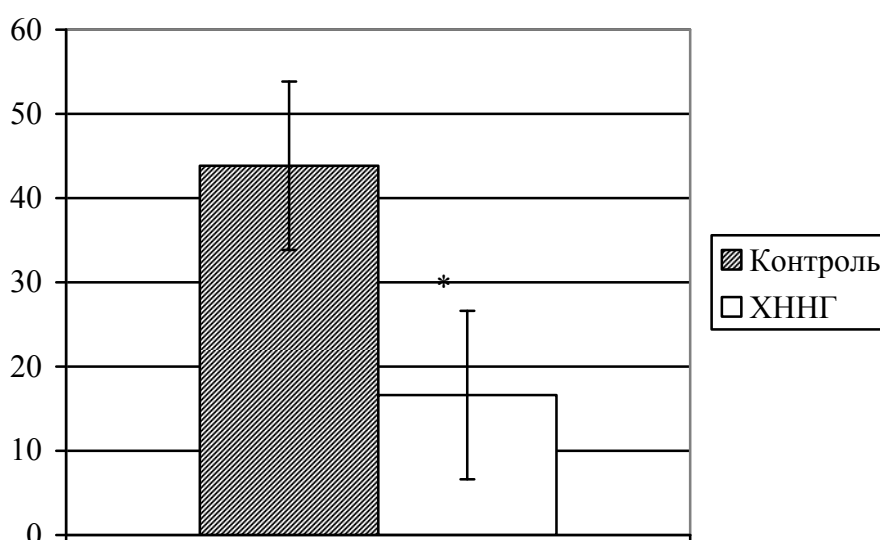


Рисунок 15. Влияние ХННГ на размер зоны некроза при 20-минутной коронароокклюзии и 180-минутной реперфузии у крыс (М ± SEM). Сезон 2010-2011 гг.

Примечание: * - достоверность относительно группы контроля

ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия

Таким образом, в наших исследованиях был подтвержден известный факт о том, что хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия способствует увеличению устойчивости сердца к повреждающему действию ишемии и реперфузии [Tajima M, 1994, Neckar J. et al., 2003]. При этом гипертрофия правого желудочка у крыс, подвергнутых хронической гипоксии, обнаруживается в

большинстве исследований и является показателем приспособления организма к условиям гипоксии [Neckar J., et al., 2004]. Как было показано выше, воздействие гипоксии сопровождалось изменениями гематокрита, повышением уровня гемоглобина и содержания эритроцитов, что так же характерно для животных в состоянии адаптации к гипоксии [Neckar J., et al., 2003]. Таким образом, в результате адаптирующего воздействия были достигнуты основные значимые параметры адаптации к гипоксии: ремоделирование миокарда, изменение состава крови и кардиопротекция, исследованию механизмов которой и посвящена настоящая диссертационная работа.

3.5.1 Изучение роли опиоидных рецепторов в реализации кардиопротекторного эффекта хронической непрерывной нормобарической гипоксии

Как показано в таблице 10, введение антагонистов опиоидных рецепторов интактным животным не оказывало кардиопротекторного эффекта.

Блокада ОР неселективным антагонистом налтрексоном в дозе 5 мг/кг, проведенная за 25 мин до коронароокклюзии у гипоксических крыс приводила к увеличению индекса зона некроза/зона риска (ЗН/ЗР) с 20,4% до 52,8%, что оказалось идентично показателю контрольной группы (табл. 11). Следовательно, блокада всех типов ОР устраняет кардиопротекторный эффект хронической непрерывной нормобарической гипоксии. Как видно из таблицы 11, блокада δ -ОР селективным антагонистом TIPP(ψ) в дозе 0,5 мг/кг за 25 мин до ишемии приводила к увеличению соотношения ЗН/ЗР более чем на 30% по отношению к таковым показателям группы гипоксических животных. В результате, соотношение ЗН/ЗР оказалась равной таковой в контрольной группе. Эти данные свидетельствуют о том, что δ -ОР принимают участие в формировании кардиопротекторного эффекта гипоксии. Дельта-ОР подразделяются на два субтипа: δ_1 -ОР и δ_2 -ОР, и дальнейшие эксперименты позволили выявить роль этих субтипов в адаптационной кардиопротекции. Оказалось, что на фоне блокады δ_1 -ОР селективным антагонистом BNTX в дозе 0,7 мг/кг, размер зоны некроза относительно показаний гипоксических животных не изменялся, то есть защитный эффект хронической непрерывной нормобарической гипоксии сохранялся. В то

время как «выключение» δ_2 -ОР селективным блокатором этого субтипа ОР налтрибеном в дозе 0,3 мг/кг приводило к увеличению соотношения ЗН/ЗР с 20,4% у гипоксических животных до 54,9%, этот показатель не имел достоверных отличий от группы нормоксического контроля (табл. 11). Полученные данные свидетельствуют о том, что в реализации кардиопротекторного эффекта хронической нормобарической гипоксии важную роль играют δ_2 -, но не δ_1 -ОР. Предварительная блокада μ -ОР селективным блокатором СТАР в дозе 0,1 мг/кг за 25 минут до коронароокклюзии приводила к увеличению соотношения ЗН/ЗР на 28%, что также указывало на устранение кардиопротекторного эффекта ХННГ (Рис. 16). Этот факт говорит о том, что μ -ОР также участвуют в адаптационной устойчивости сердца к ишемии и реперфузии. Предварительное введение антагониста κ -ОР норбиналторфимина в дозе 9 мг/кг за 90 мин до ишемии не изменяла соотношения ЗН/ЗР у гипоксических особей. Следовательно, κ -ОР не принимают участия в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта хронической непрерывной нормобарической гипоксии (Рис. 16).

Таблица 10. Влияние блокады опиоидных рецепторов на размер зоны некроза при 20-минутной коронароокклюзии и 180-минутной реперфузии у неадаптированных крыс ($M \pm SEM$).

Группа	n	МПЖ, мг	МЛЖ, мг	Зона риска, мг	Зона некроза, мг	ЗН/ЗР (%)
Контроль	15	207 ± 15,0	861,9 ± 44,9	337,5 ± 27,6	142,3 ± 21,2	56,5 ± 2,9
Налтрексон 5 мг/кг	12	210,5 ± 14,5	838,8 ± 26,4	376,5 ± 21,1	198,9 ± 23,7	52,8 ± 5,7
ТИРР (ψ) 0,5мг/кг	13	206,2 ± 13,6	837,4 ± 39,8	372,9 ± 17,5	209,1 ± 13,8	56,1 ± 4,1
Налтрибен 0,3 мг/кг	11	205,3 ± 17,1	845,5 ± 38,4	266,4 ± 24,3	146,6 ± 18,4	54,9 ± 4,1
ВНТХ 0,7 мг/кг	11	206,6 ± 17,8	857,4 ± 24,2	293 ± 33,6	144,4 ± 5,9	49,2 ± 3,07
СТАР 0,1 мг/кг	12	307,5 ± 18,8	846,8 ± 36,7	369,6 ± 32,5	181,7 ± 36,9	49 ± 9,3
Норбиналто рфимин 9 мг/кг	12	200,1 ± 16,3	855,7 ± 37,8	312,9 ± 50,9	150,5 ± 9,5	48 ± 3,8

Примечание: МПЖ – масса правого желудочка, МЛЖ – масса левого желудочка, ЗН/ЗР – соотношение массы зоны некроза к массе зоны риска.

Таблица 11. Влияние блокады опиоидных рецепторов на размер зоны некроза при 20-минутной коронароокклюзии и 180-минутной реперфузии у крыс, после курса ХННГ ($M \pm SEM$).

Группа	n	МПЖ, мг	МЛЖ, мг	Зона риска, мг	Зона некроза, мг	ЗН/ЗР (%)
Контроль	15	207 ± 15,0	861,9 ± 44,9	337,5 ± 27,6	142,3 ± 21,2	56,5 ± 2,9
ХННГ	18	256,1 ± 12,8 P<0,05	760,5 ± 28,2	360,4 ± 23,6	142,9 ± 23,5	20,4 ± 1,7 P<0,01
ХННГ + налтрексон 5 мг/кг	12	277,5 ± 12,5 P<0,05	828,8 ± 26,1	376,5 ± 21,1	198,9 ± 23,7	52,8 ± 5,7 P1<0,01
ХННГ + ТИРР (ψ) 0,5мг/кг	13	293,2 ± 12,6 P<0,05	831,4 ± 32,8	372,9 ± 17,5	209,1 ± 13,8	56,1 ± 4,1 P1<0,01
ХННГ + налтрибен 0,3 мг/кг	11	275,3 ± 7,1 P<0,05	885,5 ± 37,4	266,4 ± 24,3	146,6 ± 18,4	54,9± 4,1 P1<0,01
ХННГ + ВНТХ 0,7 мг/кг	11	276,6 ± 7,8 P<0,01	848,4 ± 24,2	293 ± 33,6	34,4 ± 5,9	13,6± 3,07 P<0,01
ХННГ + СТАР 0,1 мг/кг	12	307,5 ± 8,8 P<0,05	896,8 ± 33,7	369,6 ± 32,5	181,7 ± 36,9	49 ± 9,3 P1<0,01
ХННГ + норбиналто рфимин 9 мг/кг	12	240,1 ± 11,3 P<0,05	805,7 ± 35,8	312,9 ± 50,9	50,5 ± 9,5	18,7 ± 3,8 P<0,01

Примечание: ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия
 МПЖ – масса правого желудочка, МЛЖ – масса левого желудочка, ЗН/ЗР –
 соотношение массы зоны некроза к массе зоны риска.

p – уровень достоверности относительно группы контроля;

P1– уровень достоверности относительно группы адаптированных крыс, критерий
 Манна-Уитни.

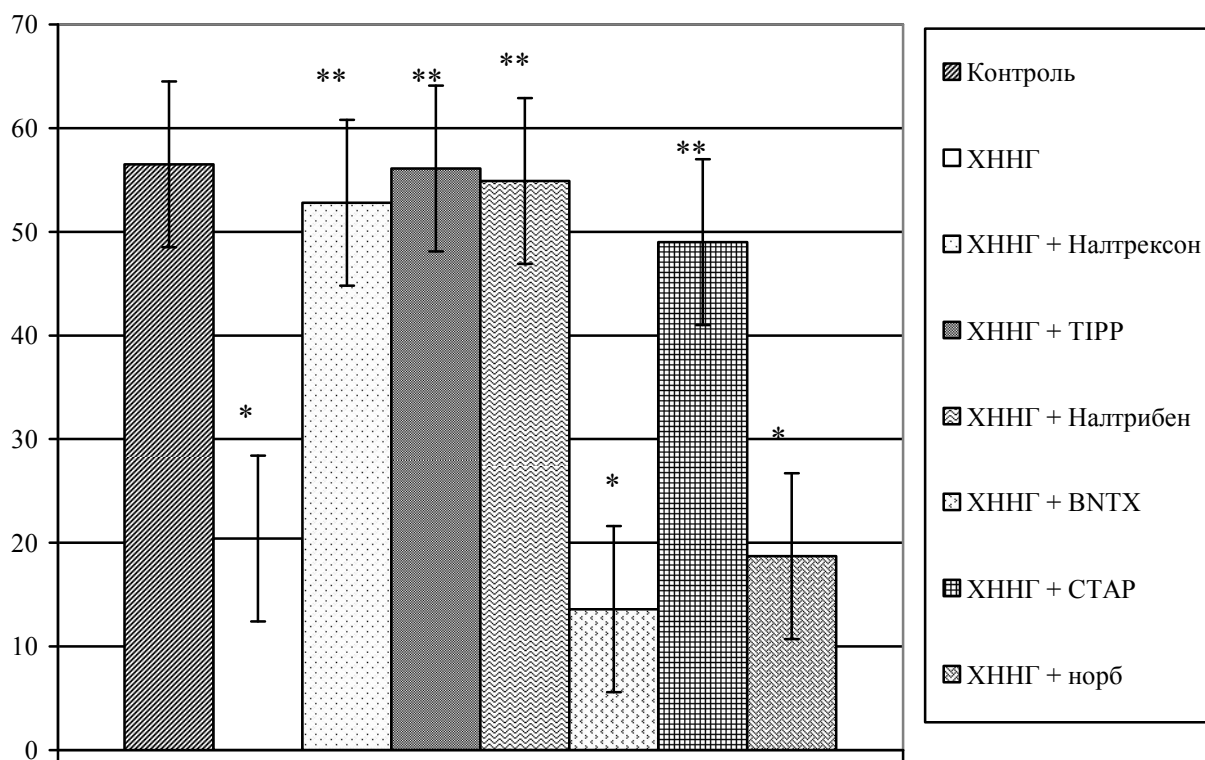


Рисунок 16. Влияние блокады опиоидных рецепторов на размер зоны некроза при 20-минутной коронароокклюзии и 180-минутной реперфузии у крыс после курса адаптации к непрерывной нормобарической гипоксии

Примечание: ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия

* $p < 0,01$ - достоверность относительно группы контроля,

** $p < 0,01$ - достоверность относительно группы адаптированных крыс

Выяснение роли опиоидной системы в кардиопротекторном эффекте хронической гипоксии показало, что блокада ОР полностью устраняла кардиопротекторный эффект, формирующийся при этом воздействии. Этот факт доказывает наше предположение об участии эндогенной опиоидной системы в формировании повышенной устойчивости миокарда к ишемии/реперфузии у животных, прошедших курс предварительного воздействия хронической гипоксии. Опиоидная система была названа в числе стресс-лимитирующих систем, опосредующих адаптивные реакции, еще в 80-е годы профессором Ф.З. Меерсоном [Меерсон Ф.З., 1986]. С тех пор проведено множество работ, доказывающих участие тех или иных субтипов опиоидных рецепторов в формировании кардиотропных эффектов краткосрочной или долговременной адаптации. Так, например, обнаружено участие ОР в кардиопротекторном эффекте ишемического пре- и посткондиционирования [Schultz J.E.J., et al., 1998, Guo H.T. et al., 2011],

антиаритмическом эффекте адаптации к высокогорной гипоксии или стрессу [Нарыжная Н.В., 2011], защитном эффекте растительных адаптогенов [Лишманов Ю.Б., Маслов Л.Н. 1994]. При этом показано, при различных видах неспецифических адаптирующих воздействий, защитный эффект опосредуется через активацию различных типов ОР. При ишемическом прекондиционировании это δ_1 - [Schultz J.E.J., 1998], антиаритмический эффект при адаптации к периодической гипобарической гипоксии опосредуется через δ -ОР, а при адаптации к стрессу – через μ -ОР [Нарыжная Н.В., 2011]. Вместе с тем, вопрос о рецепторной специфичности участия опиоидной системы в кардиопротекторном эффекте адаптации к нормобарической гипоксии оставался открытым. В последующих опытах мы провели исследование роли различных субтипов ОР в реализации кардиопротекторного эффекта путем поочередного ингибирования различных типов ОР селективными антагонистами. Данные о полном устранении инфаркт-лимитирующего эффекта хронической непрерывной нормобарической гипоксии при селективной блокаде δ -ОР свидетельствуют о ключевой роли этого рецепторного пула в реализации вышеуказанного эффекта. Это согласуется с ранее полученными данными об участии δ -ОР в механизме реализации ишемического прекондиционирования и адаптации к гипобарической гипоксии [Schultz J.E.J. et al., 1998]. Однако дальнейшие опыты показали, что селективная блокада δ_2 -ОР, но не δ_1 -ОР приводит к исчезновению кардиопротекторного эффекта ХННГ. В 2009 г в опытах на крысах с 45-минутной коронароокклюзией и 2-часовой реперфузией и предварительным введением дельторфин II было показано, что селективный δ_2 -агонист дельторфин II в дозе 0,12 мг/кг способен уменьшать соотношение ЗИ/ОР. Инфаркт-лимитирующий эффект дельторфина II сохранялся после инъекции антагониста δ_1 -ОР BNTX, но не проявлялся после блокады δ_2 -ОР налтрибеном [Maslov L.N. et al., 2009]. Не удалось выявить этот эффект после блокады периферических ОР налоксона-метиодидом (5 мг/кг). Следовательно, повышение толерантности сердца к действию ИР после инъекции дельторфина II являлось результатом активации периферических δ_2 -ОР.

Известно, что в условиях ишемического прекондиционирования важную роль в кардиопротекции играют δ_1 -ОР [Schultz J.E.J. et al., 1998]. Так же имеются данные, что агонисты δ_1 -ОР повышают выживаемость крыс в условиях острой

гипоксии [Mayfield K.P. et al., 1994]. Сопоставление этих данных говорит о различиях в механизмах реализации эффектов ишемического preconditionирования и адаптации к хронической нормобарической гипоксии.

Данные об устранении кардиопротекторного эффекта хронической непрерывной нормобарической гипоксии при селективной блокаде μ -ОР являются аргументом в пользу значимой роли этого пула опиоидных рецепторов в реализации кардиопротекторного эффекта адаптации. Эти результаты выглядят логичными, если принять во внимание тот факт, что эндогенные энкефалины и β -эндорфин обладают высоким сродством как к μ -, так и к δ -опиоидным рецепторам [Dhawan B.N., 1996].

Информация полученная в ходе экспериментов с блокадой κ -ОР у адаптированных крыс говорит о том, что в механизме развития инфаркт-лимитирующего эффекта хронической непрерывной нормобарической гипоксии κ -ОР участия не принимают. Вместе с тем, в литературе есть данные об участии κ -ОР в механизмах защитного эффекта ишемического пре- и посткондиционирования [Valtchanova-Matchouganska A. et al., 2003; Guo H.T. et al., 2011]. В совокупности с данными о роли в защитном эффекте хронической гипоксии иного, чем при preconditionировании, субтипа δ -ОР, эти результаты указывают на существенные различия в механизмах кардиопротекции при ишемическом preconditionировании и адаптации к хронической нормобарической гипоксии.

В приведенных выше результатах мы можем видеть, что изменения, происходящие в опиоидной системе в процессе адаптации к хронической нормобарической гипоксии и приводящие к увеличению устойчивости миокарда при последующем воздействии ишемии и реперфузии, так же как и при адаптации к стрессу увеличивается содержание в миокарде и крови эндогенных опиоидных пептидов [Лишманов Ю.Б., 1987]. Помимо этого, возможно изменение аффинности и количества ОР, как это показано при хронических стрессовых нагрузках [Варфоломеев С.О. 1986]. Эти факты нуждаются в дальнейшем изучении.

Резюмируя результаты исследования рецепторной специфичности участия опиоидной системы в защитном эффекте адаптации к ХННГ от ишемического-реперфузионного повреждения, следует отметить, что и при пре- и посткондиционировании опиоидная система играет важную роль в адаптационной

защите миокарда, но ее эффекты реализуются через иные субтипы ОР. Это представляется возможным, если принять во внимание тот факт, что к настоящему времени неизвестны селективные эндогенные агонисты δ_1 - или δ_2 -ОР. Эндогенные опиоидные пептиды лей- и мет-энкефалины обладают сродством как к δ_1 - или δ_2 -ОР, так и к μ -ОР, поэтому защитные эффекты эндогенных опиоидов могут быть реализованы через любой из этих субтипов ОР. Мы можем предполагать, что, наряду с неспецифическим увеличением уровня эндогенных опиоидов, может происходить специфическое для каждого адаптирующего воздействия изменение рецепторного аппарата кардиомиоцитов, происходящее в различных ситуациях по отличающемся «сценариям».

3.5.2 Изучение внутриклеточных регуляторных механизмов в кардиопротекторном эффекте хронической непрерывной нормобарической гипоксии

3.5.2.1 Изучение участия NO-синтазы в реализации кардиопротекторного эффекта хронической непрерывной нормобарической гипоксии

Как показано в таблице 12, введение ингибиторов интактным животным не оказывало кардиопротекторного эффекта.

При исследовании роли NO-синтазы в кардиопротекторном эффекте хронической непрерывной нормобарической гипоксии, было обнаружено, что введение ингибитора этого фермента, блокирующего все типы NO-синтазы L-NAME в дозе 10 мг/кг, сопровождалось значительным увеличением размера зоны некроза по сравнению с гипоксическими животными контроля (табл. 13). При этом значение ЗН/ЗР оказалось на уровне крыс группы неадаптированного контроля (Рис. 17).

Таким образом, мы получили результаты, подтверждающие важную роль NO-синтазы в защитном действии хронической непрерывной нормобарической гипоксии. Эти данные согласуются с результатами исследований других авторов о важной роли NO-синтаз в формировании неспецифических защитных эффектов высокогорной гипоксии [Zaobornyj T. et al. 2009] и ишемического preconditionирования [Bell R.M. и Yellon D.M., 2001].

Между тем, известно, что NO-синтаза представлена в сердце несколькими субтипами и их участие в адаптационных процессах остается предметом исследования [Зенков Н.К. и др. 2001]. Так, ранее было обнаружено, что при моделировании неспецифической устойчивости миокарда путем ишемического preconditionирования, возрастает экспрессия гена индуцибельной формы NO-синтазы [Bencsik P. et al. 2010]. Другими авторами сообщается о важной роли эндотелиальной формы NO-синтазы в preconditionировании [Bell R.M. и Yellon D.M., 2001].

Таблица 12. Влияние блокады NO синтазы на размер зоны некроза при 20-минутной коронароокклюзии и 180-минутной реперфузии у неадаптированных крыс (M±SEM).

Группа	n	МПЖ, мг	МЛЖ, мг	Зона риска, мг	Зона некроза, мг	ЗН/ЗР (%)
Контроль	14	178,9± 15,4	869,2 ± 34,7	322,3 ± 29,1	141,3 ± 22,1	43,84 ± 4,6
L-NAME 10 мг/кг	12	172,4 ± 10,6	867,4 ± 34,3	331,7 ± 28,8	139,9 ± 24,1	42,1 ± 5,9
S- метилизотио мочевина 3 мг/кг	12	182,5 ± 12,7	869 ± 13,9	324,3 ± 24,9	158,3 ± 22,5	48,8 ± 6,3

Примечание: МПЖ – масса правого желудочка, МЛЖ – масса левого желудочка, ЗН/ЗР – соотношение массы зоны некроза к массе зоны риска.

Таблица 13. Влияние блокады NO синтазы на размер зоны некроза при 20-минутной коронароокклюзии и 180-минутной реперфузии у крыс после курса ХННГ (M±SEM).

Группа	n	МПЖ, мг	МЛЖ, мг	Зона риска, мг	Зона некроза, мг	ЗН/ЗР (%)
Контроль	14	178,9± 15,4	869,2 ± 34,7	322,3 ± 29,1	141,3 ± 22,1	43,84 ± 4,6
ХННГ к гипоксии	14	287,38 ± 9,1 P<0,05	843,14 ± 38,3	356,6 ± 25,3	52,65 ± 7,1	16,6 ± 2,3 P<0,01
ХННГ + L-NAME 10 мг/кг	12	312,4 ± 10,6 P<0,05	867,4 ± 34,3	299,7 ± 39,8	149,9 ± 25,1	50 ± 5,9 P1<0,01
ХННГ + S-метилизотио мочевины 3 мг/кг	12	352,5 ± 42,7 P<0,05	869 ± 13,9	381,3 ± 34	188,5 ± 21,2	50,2 ± 6,3 P1<0,01

Примечание: ХННГ- хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия
МПЖ – масса правого желудочка, МЛЖ – масса левого желудочка, ЗН/ЗР – соотношение массы зоны некроза к массе зоны риска.

p – уровень достоверности относительно контроля;

P1– уровень достоверности относительно группы адаптированных крыс, критерий Манна-Уитни.

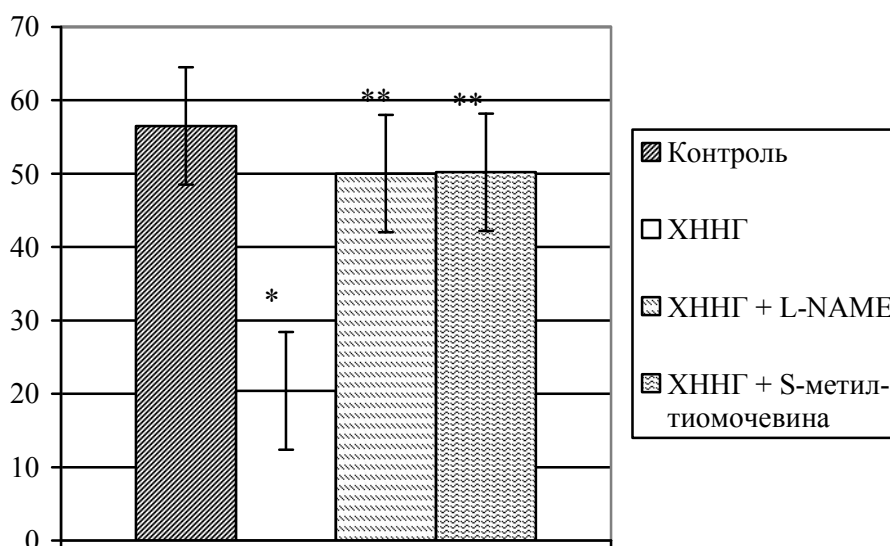


Рисунок 17. Влияние блокады NO синтазы на размер зоны некроза при 20-минутной коронароокклюзии и 180-минутной реперфузии у крыс после курса адаптации к непрерывной нормобарической гипоксии

Примечание: ХННГ- хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия

* p<0,01 - достоверность относительно группы контроля

** p<0,01- достоверность относительно адаптированных крыс.

Предварительное введение селективного ингибитора индуцибельной формы NO-синтазы S-метилизотиомочевины сопровождалось значительным (в 3 раза) увеличением размера зоны некроза по сравнению с гипоксическими животными (табл. 13). При этом значение ЗН/ЗР оказалось на уровне крыс группы неадаптированного контроля (Рис. 17).

Таким образом, наши исследования показали, что на фоне ингибирования индуцибельной изоформы синтазы оксида азота кардиопротекторный эффект хронической нормобарической гипоксии не проявляется (табл. 13). Эти данные свидетельствуют о важной роли индуцибельного пула NO-синтазы в защитном эффекте адаптации. Роль эндотелиальной NO-синтазы остается неизученной. Группа аргентинских авторов под руководством проф. Т. Zaobornyj [Gonzales G.F. et al., 2005] не обнаружила в цитоплазме кардиомиоцитов подвергнутых хронической гипоксии крыс увеличения содержания эндотелиальной NO-синтазы, в то время как представительство индуцибельной NO-синтазы значительно возросло по сравнению с неадаптированными животными. На основании этих данных мы можем предположить, что эндотелиальная NO-синтаза не участвует в защитном эффекте ХННГ, однако этот факт нуждается в подтверждении. Влияние NO-синтазы на повреждение кардиомиоцитов при ишемии может опосредоваться через активацию оксидом азота митохондриальных АТФ-чувствительных K^+ -каналов, как это показано для гипобарической гипоксии [Fitzpatrick С.М., 2005].

3.5.2.2 Изучение участия протеинкиназы С в реализации кардиопротекторного эффекта хронической непрерывной нормобарической гипоксии

Как показано в таблице 14, введение ингибитора интактным животным не оказывало кардиопротекторного эффекта.

При исследовании роли протеинкиназы С мы получили следующие результаты. Ингибирование протеинкиназы С хелеритрином в дозе 5 мг/кг приводило в увеличению зоны некроза у гипоксических крыс до уровня неадаптированных животных (с 16,6% в случае ХННГ до 55% в группе «ХННГ +хелеритрин») (табл. 15).

Таблица 14. Влияние блокады протеинкиназы С на размер зоны некроза при 20-минутной коронароокклюзии и 180-минутной реперфузии у неадаптированных крыс (M±SEM).

Группа	n	МПЖ, мг	МЛЖ, мг	Зона риска, мг	Зона некроза, мг	ЗН/ЗР (%)
Контроль	14	178,9± 15,4	869,2 ± 34,7	322,3 ± 29,1	141,3 ± 22,1	43,84 ± 4,6
Хелеритрин 5 мг/кг	12	180,4 ± 11,6	867,5 ± 31,3	329,4 ± 28,7	153,7 ± 23,1	46,6 ± 5,1

Примечание: МПЖ – масса правого желудочка, МЛЖ – масса левого желудочка, ЗН/ЗР – соотношение массы зоны некроза к массе зоны риска.

Таблица 15. Влияние блокады протеинкиназы С на размер зоны некроза при 20-минутной коронароокклюзии и 180-минутной реперфузии у крыс после курса ХННГ (M±SEM).

Группа	n	МПЖ, мг	МЛЖ, мг	Зона риска, мг	Зона некроза, мг	ЗН/ЗР (%)
Контроль	14	178,9± 15,4	869,2 ± 34,7	322,3 ± 29,1	141,3 ± 22,1	43,84 ± 4,6
ХННГ к гипоксии	14	287,38 ± 9,1 P<0,05	843,14 ± 38,3	356,6 ± 25,3	52,65 ± 7,1	16,6 ± 2,3 P<0,01
ХННГ + хелеритрин 5 мг/кг	12	310,4 ± 11,6 P<0,05	865,4 ± 32,3	299,7 ± 39,8	183,5 ± 25,1	55 ± 6,1 P1<0,01

Примечание: ХННГ- хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия
МПЖ – масса правого желудочка, МЛЖ – масса левого желудочка, ЗН/ЗР – соотношение массы зоны некроза к массе зоны риска.

p – уровень достоверности относительно группы контроля;

P1– уровень достоверности относительно группы адаптированных крыс, критерий Манна-Уитни.

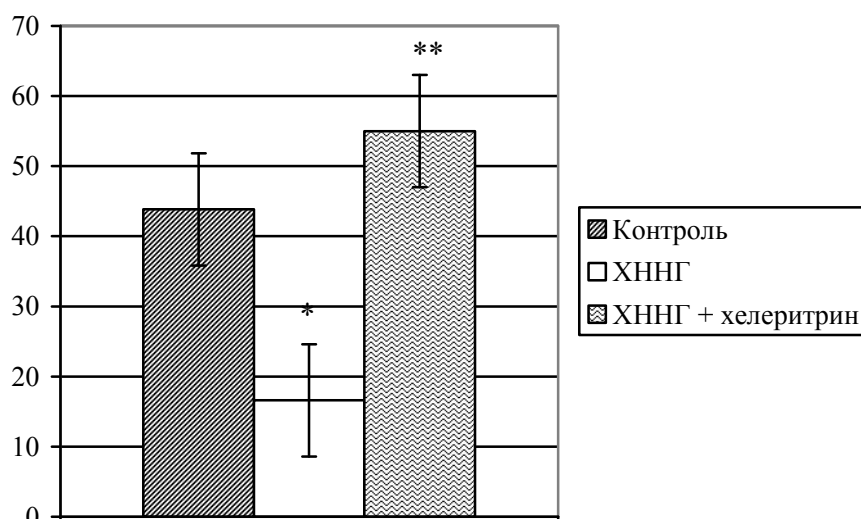


Рисунок 18. Влияние блокады протеинкиназы С на размер зоны некроза при 20-минутной коронароокклюзии и 180-минутной реперфузии у крыс, после курса ХННГ

Примечание: ХННГ- хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия

* $p < 0,01$ - достоверность относительно группы контроля

** $p < 0,01$ - достоверность относительно группы крыс с ХННГ

На основании полученных данных мы можем сделать вывод о том, что кардиопротекторный эффект хронической непрерывной нормобарической гипоксии не проявляется на фоне блокады протеинкиназы С (Рис. 18). Эти данные согласуются с данными литературы об участии этого фермента в формировании кардиопротекции при других неспецифических адаптивных воздействиях: адаптации к гипобарической гипоксии, ишемическом и фармакологическом preconditionировании [Neckar J. et al., M 2005, Fryer R.M. et al., 1999, 2001]. На наш взгляд, протеинкиназа С играет роль ключевого фактора в формировании резистентности миокарда к ишемии-реперфузии, поскольку показана ее важная роль в кардиопротекции при большинстве видов адаптирующих воздействий [Kolar F. et al., 2004; Ping P. et al., 1999; Fryer R.M. et al., 1999]. Ее активация приводит к фосфорилированию огромного количества внутриклеточных белков [Dempsey E.C. et al., 2000]. Анализ данных литературы позволяет выделить несколько мишеней ПКС, которые участвуют в формировании адаптивной реакции сердца в ответ гипоксию: это, прежде всего, АТФ-зависимые K^+ -каналы (K_{ATP} -каналы) [Fryer R.M. et al., 2001], а также тирозинкиназы [Baines C.P. et al., 1998]. Одним из наиболее важных эффектов ПКС является ее способность транслоцироваться в митохондрии

и запускать регуляторный каскад, приводящий к активации митохондриальных АТФ-чувствительных K^+ -каналов (мито K_{ATP} -каналов) [Cohen M.V. et al., 2007; Costa A.D. et al., 2006; Penna C. et al., 2006; 2007; Uecker M., 2003] и ингибированию открытия МРТ-пор [Cohen M.V. et al., 2007; Costa A.D. et al., 2006; Penna C. et al., 2006; 2007].

О важной роли этого сигнального механизма в адаптационной кардиопротекции свидетельствуют публикации об устранении кардиопротекторного и антиаритмического эффектов гипоксии после блокады K_{ATP} -каналов [Нарыжная Н.В. и др., 2009, Baker J.E. et al., 1997] или при активации МРТ-пор у адаптированных крыс [Zhu W.-Zh. 2006].

3.5.2.3 Изучение участия тирозинкиназ в реализации кардиопротекторного эффекта хронической непрерывной нормобарической гипоксии

Как показано в таблице 16, введение ингибиторов интактным животным не оказывало кардиопротекторного эффекта.

Сходный эффект был обнаружен при ингибировании тирозинкиназ генистеином – размер зоны некроза в этой экспериментальной группе оказался на 70% больше, чем в группе гипоксических крыс с незаблокированными тирозинкиназами (Рис. 19). Однако, при введении ингибитора тирозинкиназ лавендустина, блокирующего только Src и EGFR (Src – Src-киназы, EGFR – epidermal growth factor receptor) [Williams-Pritchard G. et al., 2011, Ping P. et al., 1999], мы не обнаружили какого-либо влияния на размер зоны некроза у подвергнутых хронической непрерывной нормобарической гипоксии крыс. Аналогичные результаты мы получили при ингибировании PI3-киназы ее селективным блокатором вортманнином в дозе 0,015 мг/кг (табл. 17).

Таблица 16. Влияние блокады тирозинкиназ и Р13-киназы на размер зоны некроза при 20-минутной коронароокклюзии и 180-минутной реперфузии у неадаптированных крыс (M±SEM).

Группа	n	МПЖ, мг	МЛЖ, мг	Зона риска, мг	Зона некроза, мг	ЗН/ЗР (%)
Контроль	14	178,9± 15,4	869,2 ± 34,7	322,3 ± 29,1	141,3 ± 22,1	43,84 ± 4,6
Генистеин 5 мг/кг	11	178,4 ± 16,8	868,8 ± 26,6	333,2 ± 26,7	162,1 ± 11,2	48,6 ± 5,9
Лавендусти н	12	187,4 ± 11,2	856,8 ± 44,2	336,2 ± 28,9	145,1 ± 11,2	43,1 ± 3,8
Вортманнин 0,015 мг/кг	12	185 ± 23,4	867,3 ± 39,6	326 ± 27,1	151,3 ± 10,1	46,4 ± 4,1

Примечание: МПЖ – масса правого желудочка, МЛЖ – масса левого желудочка, ЗН/ЗР – соотношение массы зоны некроза к массе зоны риска.

Таблица 17. Влияние блокады тирозинкиназ и Р13-киназы на размер зоны некроза при 20-минутной коронароокклюзии и 180-минутной реперфузии у крыс, после курса ХННГ (M±SEM).

Группа	n	МПЖ, мг	МЛЖ, мг	Зона риска, мг	Зона некроза, мг	ЗН/ЗР (%)
Контроль	14	178,9± 15,4	869,2 ± 34,7	322,3 ± 29,1	141,3 ± 22,1	43,84 ± 4,6
ХННГ к гипоксии	14	287,38 ± 9,1 P<0,05	843,14 ± 38,3	356,6 ± 25,3	52,65 ± 7,1	16,6 ± 2,3 P<0,01
ХННГ + генистеин 5 мг/кг	11	278,4 ± 16,8 P<0,05	868,8 ± 26,6	273,2 ± 27,9	62,1 ± 11,2	28,4 ± 5,9 P1<0,05
ХННГ + лавендустин	12	237,4 ± 11,2 P<0,05	756,8 ± 44,2	273,2 ± 27,9	45,1 ± 11,2	16,5 ± 3,8
ХННГ + вортманнин 0,015 мг/кг	12	285 ± 23,4	867,3 ± 39,6	366 ± 47,1	81,3 ± 10,1	22,2 ± 4

Примечание: ХННГ- хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия МПЖ – масса правого желудочка, МЛЖ – масса левого желудочка, ЗН/ЗР – соотношение массы зоны некроза к массе зоны риска.

p – уровень достоверности относительно группы контроля;

P1– уровень достоверности относительно группы адаптированных крыс, критерий Манна-Уитни.

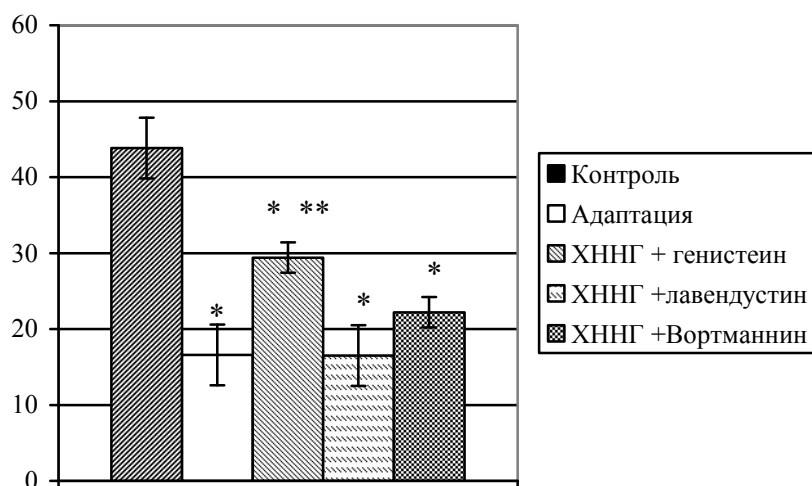


Рисунок 19. Влияние блокады тирозинкиназ и PI3-киназы на размер зоны некроза при 20-минутной коронароокклюзии и 180-минутной реперфузии у крыс, после курса адаптации к непрерывной нормобарической гипоксии.

Примечание: ХННГ- хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия

* - достоверность относительно группы контроля

** - достоверность относительно группы адаптированных крыс

Если роль K_{ATP} -каналов в адаптации к нормобарической гипоксии известна [Baker J.E. et al., 1997], то роль тирозинкиназ оставалась не исследованной. Наши последующие эксперименты были направлены на выявление роли тирозинкиназ и их субтипов в формировании кардиопротекции при хронической нормобарической гипоксии. Они показали, что при моделировании коронароокклюзии и реперфузии у адаптированных крыс на фоне ингибирования всех типов тирозинкиназ генистеином, кардиопротекторный эффект адаптации не проявлялся (табл.17). Это свидетельствует о важной роли этой группы киназ в защитном эффекте данного вида адаптации. Вместе с тем известно, что семейство тирозинкиназ представлено в клетке более чем 1000 ферментами [Neet K. et al., 1996]. По результатам исследований Ping P, et al., 1999 и Williams-Pritchard G. et al. 2011, в опосредовании кардиопротекторного эффекта ишемического и фармакологического preconditionирования играют важную роль Src-киназы и EGFR-тирозинкиназы [Williams-Pritchard G. et al., 2011, Ping P et al., 1999]. Однако, эксперименты, проведенные нами с селективным антагонистом Src/EGFR- субпопуляции тирозинкиназ лавендустином, не показали значимой роли этого фермента в опосредовании кардиопротекции при хронической нормобарической гипоксии. С

результатами этих экспериментов согласуются данные, полученные в исследованиях Fryer RM et al., (2001), которые обнаружили, что генистеин устраняет кардиопротекторное действие агонистов δ -ОР, а блокатор Src/EGFR-тирозинкиназ лавендустин не оказывает подобного эффекта [Fryer R.M. et al., 2001]. Эти результаты показывают, что в защитном действии как адаптации к хронической нормобарической гипоксии, так и агонистов δ -ОР принимают участие другие субтипы тирозинкиназ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Защита миокарда от ишемических-реперфузионных повреждений является одной из важнейших задач современной физиологии, фармакологии и кардиологии. Феномен повышенной адаптационной устойчивости сердца, возникающий под воздействием хронической гипоксии, был открыт еще в конце 50-х гг. прошлого столетия [Korecky M and Daum S. 1958] и не теряет актуальности до настоящего времени [Milano G. et al., 2010a,b; Borchert G.H., et al., 2011]. Это связано с возникновением длительной и стойкой толерантности сердца к действию ишемии-реперфузии, формирующейся при воздействии на организм гипоксии [Baker J.E. et al., 1999; Neckar J. et al., 2004].

Так, установлено, что воздействие на крыс хронической непрерывной нормобарической гипоксии оказывает инфаркт-лимитирующий эффект при коронароокклюзии и реперфузии *in vivo* [Neckar J. et al., 2003] и повышает устойчивость изолированного сердца к действию глобальной ишемии-реперфузии [Tajima M. et al., 1994].

Однако, роль опиоидной системы, рецепторная специфичность и киназный каскад, по средствам которого реализуется кардиопротекторный эффект хронической непрерывной нормобарической гипоксии, изучена недостаточно.

Были проведены исследования уровня гемоглобина и содержания эритроцитов. Проведенные исследования показали, что у животных, подвергшихся непрерывной нормобарической гипоксии, достоверно увеличивается количество эритроцитов и концентрация гемоглобина. Далее были проведены исследования уровня опиоидных пептидов в плазме крови и ткани миокарда. У крыс, подвергнутых воздействию хронической нормобарической гипоксии, наблюдалось достоверное увеличение уровня мет-энкефалина, β -эндорфина, эндоморфина-1, эндоморфина-2. Во время ишемии/реперфузии у гипоксических животных уровень опиоидных пептидов в плазме крови достоверно повышался.

Учитывая данные литературы, которые говорят о том, что при адаптации животных к стрессу увеличивается содержание в миокарде и крови эндогенных опиоидных пептидов [Лишманов Ю.Б. и др., 1987], появились основания полагать, что опиоидные пептиды (мет-энкефалин, β -эндорфин, эндоморфин-1,

эндоморфин-2) могут принимать участие в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта хронической непрерывной нормобарической гипоксии.

Для выяснения роли отдельных типов опиоидных рецепторов в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта хронической непрерывной нормобарической гипоксии, мы провели серии экспериментов по выявлению кардиопротекторного эффекта ХННГ в экспериментах с блокаторами опиоидных рецепторов. Блокада ОР неселективным антагонистом налтрексоном у гипоксических крыс приводила к увеличению индекса зона некроза/зона риска, следовательно, блокада всех типов ОР устраняла кардиопротекторный эффект хронической непрерывной нормобарической гипоксии. Блокада δ -ОР селективным антагонистом ТИРР[ψ] приводила к увеличению соотношения ЗН/ЗР. Это свидетельствовало о том, что δ -ОР принимают участие в формировании кардиопротекторного эффекта ХННГ. Дельта-ОР подразделяются на два субтипа: δ_1 -ОР и δ_2 -ОР, и дальнейшие эксперименты позволили оценить роль этих субтипов в адаптационной кардиопротекции. Оказалось, что на фоне блокады δ_1 -ОР селективным антагонистом ВНТХ индекс ЗН/ЗР у гипоксических животных не изменялся, то есть защитный эффект ХННГ сохранялся. В то время как «выключение» δ_2 -ОР селективным блокатором налтрибеном этого субтипа ОР приводило к увеличению соотношения ЗН/ЗР. Полученные данные свидетельствуют о том, что в реализации кардиопротекторного эффекта хронической непрерывной нормобарической гипоксии важную роль играют δ_2 -, но не δ_1 -ОР. Предварительная блокада μ -ОР селективным блокатором СТАР приводила к увеличению соотношения ЗН/ЗР, что также указывало на устранение кардиопротекторного эффекта ХННГ. Этот факт говорит о том, что μ -ОР также участвуют в адаптационной устойчивости сердца к ишемии и реперфузии. Предварительное введение антагониста κ -ОР норбиналторфимина не изменяла соотношения ЗН/ЗР у гипоксических особей. Следовательно, κ -ОР не принимают участия в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта хронической непрерывной нормобарической гипоксии. Таким образом, в механизме кардиопротекторного действия хронической непрерывной нормобарической гипоксии существенную роль играют δ_2 и μ -ОР.

Исходя из литературных данных [Beguin P.C. et al., 2005; Xi L. et al., 2002] мы предположили, что молекулярный механизм протекторного действия ХННГ и

механизм положительного эффекта действия отсроченного ишемического preconditionирования (second window) может быть сходен. Следующим этапом нашей работы стало изучение внутриклеточных регуляторных механизмов кардиопротекторного эффекта ХННГ. Ранее P.C. Beguin и соавторы обнаружили, что сердца, изолированные у крыс, которых подвергли 4-х часовой непрерывной гипоксии и последующей нормальной оксигенации, через 24 ч после гипоксического воздействия становятся резистентными к ишемии-реперфузии *in vitro* [Beguin P.C. et al., 2005]. Этот эффект был устранен с помощью ингибирования NO-синтазы. При исследовании роли NO-синтазы в кардиопротекторном эффекте хронической непрерывной нормобарической гипоксии, было обнаружено, что ингибирование этого фермента сопровождается значительным увеличением размера зоны некроза по сравнению с гипоксическими животными. Известно, что NO-синтаза представлена в сердце несколькими субтипами и их участие в адаптационных процессах остается предметом исследования [Зенков Н.К., и др., 2001]. Так, ранее было обнаружено, что при моделировании отсроченного ишемического preconditionирования, в миокарде возрастает экспрессия гена индуцибельной формы NO-синтазы [Bencsik P. et al., 2010]. Другие авторы сообщают о важной роли эндотелиальной формы NO-синтазы в preconditionировании [Bell R.M. et al., 2001]. Наши исследования показали, что предварительное введение селективного ингибитора индуцибельной формы NO-синтазы S-метилизотиомочевинины сопровождалось значительным увеличением размера зоны некроза по сравнению с гипоксическими животными. Это свидетельствует о существенной роли индуцибельной формы NO-синтазы в реализации кардиопротекторного эффекта хронической непрерывной нормобарической гипоксии.

Существуют данные о том, что в preconditionировании важную роль играют протеинкиназа C, тирозинкиназы и PI3-киназа [Ban K. et al., 2008; Yang X.M. et al., 2010].

При исследовании роли протеинкиназы C мы установили, что ингибирование протеинкиназы C приводило к увеличению зоны некроза у гипоксических крыс до уровня нормоксического контроля. Эти данные согласуются с данными литературы об участии этого фермента в формировании

кардиопротекции при других неспецифических адаптивных воздействиях: адаптации к гипобарической гипоксии, ишемическом и фармакологическом прекондиционировании [Neckar J.M. et al., 2005; Fryer R.M. et al., 1999, 2001].

При ингибировании тирозинкиназ генистеином – размер зоны некроза оказался на 70% больше, чем в группе гипоксических крыс с незаблокированными тирозинкиназами. При введении лавендустина, который является ингибитором тирозинкиназ Src и EGFR (Src – Src-киназы, EGFR – epidermal growth factor receptor) [Williams-Pritchard G. et al., 2011, Ping P. et al., 1999], мы не обнаружили какого-либо влияния на размер зоны некроза у подвергнутых хронической непрерывной нормобарической гипоксии крыс. Аналогичные результаты мы получили при ингибировании PI3-киназы вортманнином. Эти факты говорят о том, что в формировании кардиопротекции при воздействии хронической непрерывной нормобарической гипоксии тирозинкиназы играют существенную роль, но при этом обнаружено, что рецепторная тирозинкиназа EGFR, так же как и растворимая форма Src-киназы не участвуют в сигнальном каскаде кардиопротекции. PI3-киназа также не принимает участие в регуляции устойчивости миокарда к ишемическому-реперфузионному повреждению у гипоксических животных.

Эти данные показывают, что в механизмах кардиопротекции при ишемическом прекондиционировании и адаптации к хронической нормобарической гипоксии существуют значительные различия, поскольку рецепторная и растворимая тирозинкиназы, так же как и PI3-киназа играют важную роль в опосредовании защитного эффекта ишемического прекондиционирования.

Схематично механизм участия ОР и внутриклеточных сигнальных каскадов при воздействии хронической непрерывной нормобарической гипоксии представлен на схеме 1.

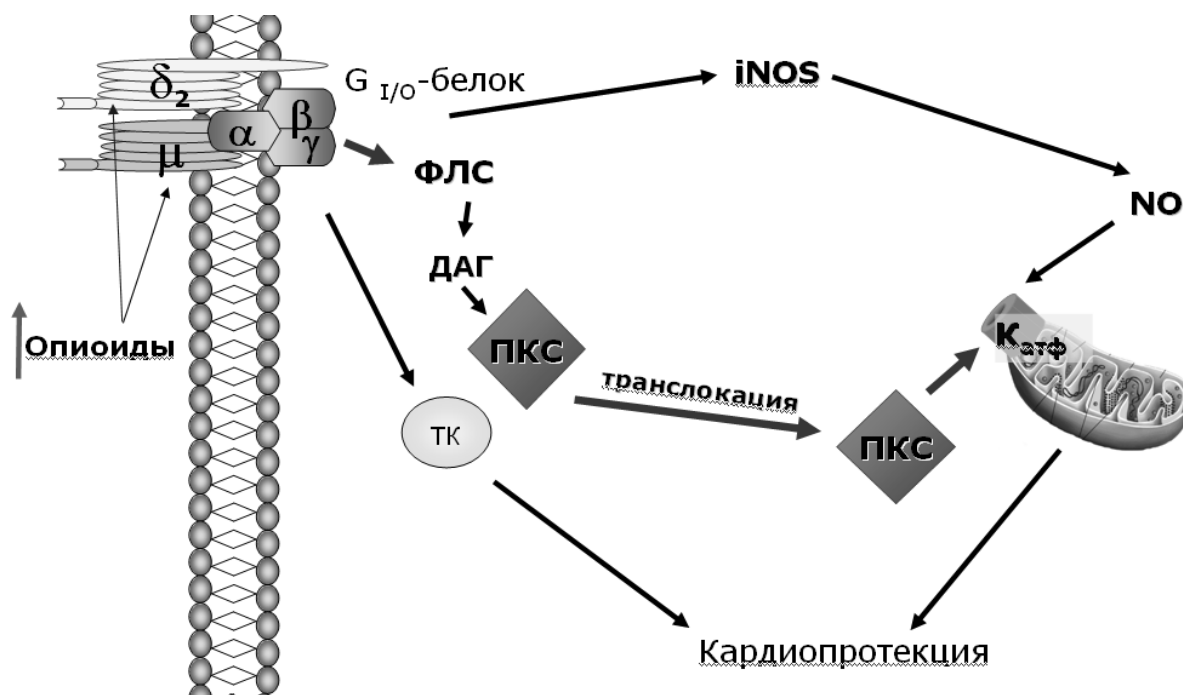


Рисунок 20. Гипотетическая схема участия опиоидных рецепторов и внутриклеточных сигнальных каскадов в механизме кардиопротекторного эффекта ХННГ.

Примечание: ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия
PL-C – фосфолипаза С; **PK-C** – протеинкиназа С; **TK** - тирозинкиназа; **K⁺_{АТФ}** – K_{АТФ}-канал; **NOS** – NO-синтаза.

Таким образом, на основании полученных результатов мы можем заключить, что опиоидные рецепторы участвуют в опосредовании кардиопротекторного эффекта хронической непрерывной нормобарической гипоксии, при этом доказано участие δ_2 - и μ -ОР, в то время как δ_1 - и κ -ОР не принимают участие в опосредовании инфаркт-лимитирующего эффекта ХННГ. В качестве сигнальных звеньев адаптационной кардиопротекции выступают протеинкиназа С, индуцибельная форма NO-синтазы и тирозинкиназы. При этом обнаружено, что рецепторная тирозинкиназа EGFR, так же как и растворимая Src-киназа не участвуют в сигнальном каскаде кардиопротекции. Киназа PI3 также не принимает участие в регуляции устойчивости миокарда к ишемическому-реперфузионному у крыс, подвергнутых воздействию хронической непрерывной нормобарической гипоксии.

Выводы

1. Хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия приводит к увеличению концентрации опиоидных пептидов (мет-энкефалин, β -эндорфин, эндоморфин-1, эндоморфин-2) в плазме крови и в ткани миокарда.
2. Повышение толерантности сердца к действию ишемии и реперфузии у крыс подвергнутых хронической непрерывной нормобарической гипоксии осуществляется через δ_2 - и μ -опиоидные рецепторы.
3. Кардиопротекторный эффект хронической непрерывной нормобарической гипоксии реализуется через активацию протеинкиназы С.
4. Кардиопротекторный эффект к действию ишемии-реперфузии в условиях хронической непрерывной нормобарической гипоксии зависит от активности тирозинкиназ.
5. Киназа PI3 не участвует в кардиопротекторном эффекте хронической непрерывной нормобарической гипоксии.
6. Кардиопротекторный эффект хронической непрерывной нормобарической гипоксии реализуется с участием индуцибельной формы NO-синтазы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Афонская Н.А. Влияние опиоидного пептида на заживление экспериментального инфаркта миокарда Афонская Н. А., Ильинский О.Б., Кондаленко В.Ф. и др. // Бюлл. эксперим. биол. мед. – 1986. – № 12. – С. 754–757.
2. Барбараш Н.А. Периодическое действие холода и устойчивость организма. // Успехи физиол. Наук.- 1996.- Т. 27, N4.- Р.116-132.
3. Варфоломеев С.О. Опиатные рецепторы у крыс с различной адаптацией к эмоциональному стрессу. // Клинические и орг. вопр. общей и судебной психиатрии, М.- 1986.- С. 76-80.
4. Дворцин Г.Ф. Кардиопротекторный эффект нового отечественного аналога эндогенных опиоидов при стрессе, вызванном тотальной ишемией миокарда, и некоторые его механизмы // Патол. физиол. эксп. тер. – 1990. – № 2. – С. 13–16.
5. Дудко В.А., Соколов А.А. Моделирование гипоксии в клинической практике .- Томск: СТТ.- 2000.- С.352.
6. Евсевьева М.В. Ограничение ишемического некроза с помощью антиоксиданта ионола. / М.В. Евсевьева, В.С. Шинкаренко, В.В. Диденко, Ф.З. Меерсон. // Бюл. экспер. биол. и мед. – 1989. – № 8. – С.152 – 154.
7. Зенков Н.К. Окислительный стресс: Биохимический и патофизиологический аспекты / Н.К. Зенков, В.З. Ланкин, Е.Б. Меньщикова // М.: МАИК “Наука/Интерпериодика”.- 2001.- С.343
8. Золоев Г.К. Влияние синтетического энкефалина даларгина на метаболические показатели у больных инфарктом миокарда Золоев Г. К., Слепушкин В. Д., Васильцев Я. С., Титов М. И. // Кардиология. – 1987. – № 2. – С.93–94.
9. Золоев Г.К. Влияние энкефалинов на метаболические показатели при экспериментальном инфаркте миокарда у крыс Золоев Г.К., Слепушкин В. Д., Титов М. И.// Кардиология. – 1985. – № 8. – С.72–74.

10. Капелько В.И., Горина М.С. Кальциевая регуляция сокращения и расслабления сердечной мышцы // Регуляция сократительной функции и метаболизма миокарда. – М.:Наука, 1987. – С.79–112.
11. Капелько В.М. Концентрация Ca^{2+} в миоплазме кардиомиоцитов и сократительная функция сердца на ранней стадии адриамициновой кардиомиопатии Капелько В. М., Виллиамс К., Морган Дж. П.// Кардиология. – 1996. – №12. – С.7-61.
12. Коробов Н.В. Даларгин – опиоидоподобный пептид периферического действия // Фармакол. и токсикол. – 1988. – № 4. – С.35–38.
13. Крутецкая З.И. Механизмы внутриклеточной сигнализации. / Крутецкая З.И., Лебедев О. Е., Курилова Л.С. –С-Пб. – Изд-во С-П ун-та.- 2003. – С.208.
14. Кукоба Т.В. Кардиопротекторный эффект индукции гемоксигеназы 1 геминном при ишемии- реперфузии изолированного сердца крысы. / Кукоба Т.В., Мойбенко О.О., Котсиоруба А.В.//Физиол. Журн. – 2003.- №49.- С.14-21.
15. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотницкая Р.П. и др., под ред. В.В. Меньшикова. // М.: Медицина.- 1987.- С.368
16. Ланкин В. Свободнорадикальные процессы при заболеваниях сердечнососудистой системы Ланкин В., Тихазе А.К., Беленков Ю.Н.// Кардиология. – 2000. – № 7. – С.48–61.
17. Лишманов Ю.Б. Активация μ -опиатных рецепторов как фактор повышения устойчивости сердца к ишемическим и реперфузионным повреждениям./ Лишманов Ю.Б., Маслов Л.Н., Наумова А.В., Богомаз С.А.// Рос. физиол. журн. – 1998. – Т.84, № 11. – С.1223 — 1230.
18. Лишманов Ю.Б. Роль опиатных рецепторов и АТФ-зависимых калиевых каналов митохондрий в формировании адаптационной устойчивости миокарда к аритмогенному действию ишемии и реперфузии. / Лишманов Ю.Б., Нарыжная Н. В., Крылатов А. В.и др.// Изв. РАН: Серия биологическая. – 2003а. – № 6. – С.720–727.
19. Лишманов Ю.Б. Роль периферических опиатных рецепторов μ - и дельта-типов в регуляции устойчивости сердца к аритмогенным воздействиям. /

- Лишманов Ю.Б., Крылатов А.В., Маслов Л.Н.// Рос. физиол. журн. – 1997. – Т.83, № 7. – С.80 – 87.
20. Лишманов Ю.Б. Экспериментальное изучение фармакологической активности лигандов опиатных рецепторов на модели адrenaловых аритмий. / Лишманов Ю.Б., Маслов Л.Н., Угдыжекова Д.С.// Эксп. клин. фармакология. – 1995. – Т.58, № 4. – С.26 – 28.
21. Лишманов Ю.Б., Маслов Л.Н. Опиатергическая регуляция состояния центральной гемодинамики// Патол. физиол. эксп. тер. – 2003с. – №1. – С.2–11.
22. Лишманов Ю.Б., Маслов Л.Н. Опиоидные нейропептиды, стресс и адаптационная защита сердца. // Томск. Изд-во Том. ун-та.- 1994. - С.352
23. Лишманов Ю.Б., Маслов Л.Н. Опиоидные пептиды и резистентность сердца к аритмогенным воздействиям//Бюлл. эксп. биол. мед. – 2004. – Т.138,№ 8. – С.124–131.
24. Лишманов Ю.Б., Маслов Л.Н. Эндогенная опиоидная система и устойчивость сердца к аритмогенным воздействиям //Кардиология. – 2002. – № 3. – С.51–57.
25. Лишманов Ю.Б. Опиоидергическое звено морфофункциональных изменений миокарда при стрессе и адаптации. – Томск. / Лишманов Ю.Б., Нарыжная Н.В., Маслов Л.Н. // «Красное Знамя».- 2003b. – С.224
26. Лишманов Ю.Б. Бета-эндорфин и стресс-гормоны плазмы крови при состояниях напряжения и адаптации. / Лишманов Ю.Б., Трифонова Ж.В., Цибин А.Н.// Бюл. эксперим. биологии и медицины.- 1987.- № 4.- С.422–424.
27. Марков В.А. Вчера, сегодня, завтра в диагностике и лечении острого инфаркта миокарда. / В.А. Марков, В.В. Рябов, И.В. Максимов, Е.В. Вышлов, С.В. Демьянов, А.Г. Сыркина, Н.В. Белокопытова, В.С. Шурупов, Э.О. Оюнаров, А.И. Максимов, А.Г. Васильев // Сиб. мед. жур. (Томск) 2011. – Т. 26, № 2, Выпуск 1– С.8–14.
28. Маслов Л.Н. Адаптация миокарда к ишемии. Первая фаза ишемического прекодиционирования. / Маслов Л.Н., Лишманов Ю.Б., Соленкова Н.В. // Успехи физиол. Наук.- 2006.- Т. 37, N3.- С.25-41.

29. Маслов Л.Н. Гетерогенность, альтернативный сплайсинг и олигомеризация μ -опиоидных рецепторов // Молекулярная медицина. – 2005. - № 4. – С.3-15.
30. Маслов Л.Н. Значение опиоидных рецепторов в регуляции толерантности сердца к патогенному действию длительной ишемии-реперфузии *in vivo*. / Маслов Л.Н., Барзах Е.И., Крылатов А.В., Браун С.А., Олтджен П.Р., Говиндашвами М, Чернышева Г.А., Соленкова Н.В., Лишманов А.Ю., Цибульников С. Ю., Криг Т., Жанг Е. // Росс. физиол. жур.- 2009.- Т. 95, №6.- С.563-572.
31. Маслов Л.Н. К механизму антиаритмического действия агонистов и антагонистов опиоидных рецепторов. / Маслов Л.Н., Лишманов Ю.Б., Шекели Й.И.// Бюл. эксперим. биол. мед. – 1993. – Т.122, № 8. – С.69 – 171.
32. Маслов Л.Н. Механизмы устойчивости сердца к стресс-индуцированным повреждениям. / Маслов Л.Н., Нарыжная Н.В., Барбараш Н.Л., Лишманов Ю.Б.// Рос. физиол. журн. – 1997. – Т.83, №3. – С. 43–50.
33. Маслов Л.Н. Новые подходы к профилактике и терапии ишемических и реперфузионных повреждений сердца при остром инфаркте миокарда. // Сиб. мед. жур. (Томск).- 2010.- Т.25, N2.- с. 17-24.
34. Маслов Л.Н. Об участии различных типов опиатных рецепторов в механизме стрессорного повреждения сердца. / Маслов Л.Н., Лишманов Ю.Б., Нарыжная Н.В.// Рос. физиол. журн. – 1996. – Т. 82, № 5, 6. – С. 53 – 58.
35. Маслов Л.Н. Об участии центральных и периферических мю- и дельта-опиатных рецепторов в механизмах антиаритмического действия энкефалинов. / Маслов Л.Н., Ю.Б. Лишманов // Бюл. эксперим. биол. мед. – 1991. – № 8. – С. 124 – 126.
36. Меерсон Ф. 3. Роль инозитолфосфатного цикла в кардиопротекторном эффекте адаптации к повторному стрессовому воздействию. / Меерсон Ф. 3., Копылов Ю. И. // Вопр. мед. химии.- 1993.- N2.- С. 6-13.
37. Меерсон Ф.3. Повышение резистентности сердца к аритмогенным факторам под воздействием адаптации организма к стрессорным воздействиям. / Меерсон Ф.3., Малышев И.Ю., Белкина Л.М., Салтыкова В.А. // Кардиология.- 1988.- N 1.- С. 70-74.

38. Меерсон Ф.З. Противоположное влияние адаптаций к периодической гипоксии на антиоксидантные ферменты. / Меерсон Ф.З., Архипенко Ю.В., Рожицкая И.И., Диденко В.В., Сазонова Т.Г. // Бюл. exper. биол. и мед.- 1992.- N7.-С. 14-15.
39. Нарыжная Н.В. К вопросу о рецепторной специфичности опиоидергического повышения электрической стабильности сердца при адаптации крыс к стрессу и гипобарической гипоксии. / Нарыжная Н.В., Маслов Л.Н., Таюрская А.С., Лишманов Ю.Б. // Сибирский медицинский журнал (г. Томск).- 2011.- Т.26, N4, выпуск 1.- С. 143-147.
40. Нарыжная Н.В. Роль периферических и центральных мю-опиатных рецепторов в модуляции адренергического повреждения при стрессе. / Нарыжная Н. В., Маслов Л. Н., Ревинская Ю. Г., Лишманов Ю. Б.// Рос. физиол. журн. – 1998. – Т. 84, № 8. – С. 791 – 797.
41. Нарыжная Н.В. Роль сарколеммальных и митохондриальных КАТФ-каналов в реализации кардиопротекторного и антиаритмического эффектов разных режимов гипобарической адаптации. / Нарыжная Н.В., Некар Я., Маслов Л.Н., Лишманов Ю.Б., Колар Ф., Ласукова Т.В. // Росс. физиол. журн.- 2009.- Т.95, N8.- С. 837-849.
42. Нейлер В.Г. Кальций и повреждение кардиомиоцитов. / Нейлер В. Г., Дейли М. Дж. // Глава 18. В кн. Физиология и патофизиология сердца: в 2 т., т.1: пер с англ. Под ред. Н. Сперелакиса.- 2-е издание, исправленное. М. Медицина.- 1990.- С.556—578.
43. Панченко Л.Ф. Метаболизм энкефалинов при различных функциональных и патологических состояниях организма. / Панченко Л.Ф., Митюшина Н.В., Фирстова Н.В., Генгин М.Т.// Вопр. мед. химии. – 1999. – № 4. – С. 277–289.
44. Покровский В.М. Об участии энкефалинов в регуляторной направленности вагусного влияния на сердечный ритм кошек в условиях залпового раздражения блуждающего нерва. / Покровский В.М., Чередник И.Л., Осадчий О.Е., Курзанов А.Н.// Рос. физиол. журн. - 1996. - № 4. - С. 108 - 114.
45. Реброва Т. Ю. Стимуляция δ - и μ -опиатных рецепторов и устойчивость изолированного сердца к окислительному стрессу: роль NO-синтазы. / Реброва

- Т. Ю., Маслов Л. Н., Лишманов А. Ю., Там С.В.//Биохимия. – 2001. – Т. 66, № 4. – С. 520–528.
46. Сазонтова Т.Г. Роль активных форм кислорода и редокс–сигнализации при адаптации к изменению содержания кислорода / Т.Г. Сазонтова, Н.А. Анчишкина, А.Г. Жукова, И.В. Бедарева, Е.А. Пылаева, Н.А. Кривенцова, А.А. Полянская, А.Р. Юрасов, Ю.В. Архипенко // Фізіол. журн. – 2008. – Т. 54, № 2.– С. 18–32.
47. Селье Г. Очерки об адапционном синдроме. / Пер. с англ. В.И. Кандрора, А.А. Рогова. Под ред. М.Г. Дурмишьяна. // М.: Медгиз.- 1960.- С.254.
48. Сперелакис Н. Электрические характеристики клеток в покое и поддержание распределения ионов. Глава 3. В кн. Физиология и патофизиология сердца: в 2 т., т.1: пер с англ. / Под ред. Н. Сперелакиса.- 2-е издание, исправленное. М. Медицина.-1990 а.- С.90—127.
49. Сперелакис Н. Медленный потенциал действия и свойства медленных каналов миокардиальных клеток. Глава 8. В кн. Физиология и патофизиология сердца: в 2 т., т.1: пер с англ. / Под ред. Н. Сперелакиса. 2-е издание, исправленное. М. Медицина.-1990 б.- С.241—277.
50. Угдыжекова Д.С. К вопросу о специфичности антиаритмического эффекта агонистов опиатных $\delta 1$ -рецепторов. / Угдыжекова Д.С., Маслов Л.Н., Крылатов А.В. и др.// Экспер. клин. фармакол. – 2001. – Т. 64, № 4. – С. 17–20.
51. Чазов Е.И. Как уменьшить смертность от сердечно–сосудистых заболеваний. // Тер. архив. – 2008. – Т. 80, № 8. С. – 11–16.
52. Abbruscato T.J. Blood-brain barrier permeability and bioavailability of a highly potent and mu-selective opioid receptor antagonist, CTAP: comparison with morphine. / Abbruscato T.J., Thomas S.A., Hruby V.J., Davis T.P.J. // Pharmacol. Exp. Ther. – 1997. – Vol. –280, N 1, P.402-409.
53. Acker T. The good, the bad and the ugly in oxygen-sensing: ROS, cytochromes and prolyl-hydroxylases. / Acker T., Fandrey J., Acker H. // Cardiovasc. Res. –2006. – Vol.- 71, N 2. – P.195-207.

54. Aitchison K.A. Opposing effects on infarction of delta and kappa opioid receptor activation in the isolated rat heart: implications for ischemic preconditioning. / Aitchison K.A., Baxter G.F., Awan M.M., Smith R.M., Yellon D.M., Opie L.H. *Basic // Res. Cardiol.* – 2000. – Vol.–95, N 1, P.1-10.
55. Aldakkak M. Inhibited mitochondrial respiration by amobarbital during cardiac ischaemia improves redox state and reduces matrix Ca²⁺ overload and ROS release. / Aldakkak M., Stowe D.F., Chen Q., Lesnefsky E.J., Camara A.K. // *Cardiovasc. Res.*– 2008. –Vol. –77.- N 2, P.406-415.
56. AtheaY. AMP-activated protein kinase alpha2 deficiency affects cardiac cardiolipin homeostasis and mitochondrial function. / AtheaY., Viollet B., Mateo P., Rousseau D., Novotova M, Garnier A., Vaulont S., Wilding J.R., Grynberg A, Veksler V., Hoerter J., Ventura-Clapier R. // *Diabetes.* – 2007.- Vol.-56, N 3, P.786–794.
57. Baines C.P. Protein tyrosine kinase is downstream of protein kinase C for ischemic preconditioning's anti-infarct effect in the rabbit heart / Baines C.P., Wang L., Cohen M.V.// *J. Mol. Cell. Cardiol.* -1998. - Vol.30, N 2. – P.383-392.
58. Baker J.E. Adaptation to chronic hypoxia confers tolerance to subsequent myocardial ischemia by increased nitric oxide production. / Baker JE, Holman P., Kalyanaraman B., Griffith O.W., Pritchard K.A., // *Ann. N.Y. Acad. Sci.*– 1999.- Vol.-874, P.236-253.
59. Baker J.E. K_{ATP} channel activation in a rabbit model of chronic myocardial hypoxia./ Baker J.E., Contney S.J., Gross G.J., Bosnjak Z.J. // *J Mol Cell Cardiol.*- 1997.-Vol.-29, P.845–848.
60. Ban K. Phosphatidylinositol 3–kinase gamma is a critical mediator of myocardial ischemic and adenosine–mediated preconditioning. / K. Ban, A.J. Cooper, S. Samuel, A. Bhatti, M. Patel, S. Izumo, J.M. Penninger, P.H. Backx, G.Y. Oudit, R.G. Tsushima // *Circ. Res* – 2008.– Vol. 103, N 6.– P. 643–653.
61. Beguin P.C. Acute intermittent hypoxia improves rat myocardium tolerance to ischemia. / Beguin P.C., Joyeux-Faure M., Godin-Ribuot D., Levy .P, Ribouot C.J. // *Appl. Physiol.*-2005.-Vol.-99, N 3, P.1064-1069.

62. Bell R.M. Pivotal role of NOX-2-containing NADPH oxidase in early ischemic preconditioning. / Bell R.M., Cave A.C., Johar S., Hearse D.J., Shah A.M., Shattock M.J. // *FASEB J.*- 2005.- Vol.- 14, P.2037-2039.
63. Bell R.M. The contribution of endothelial nitric oxide synthase to early ischaemic preconditioning. – the lowering of the preconditioning threshold. An investigation in eNOS knockout mice. / R.M. Bell, D.M.Yellon // *Cardiovascular Research.* – 2001. – Vol. 52.– P. 274–280.
64. Bencsik P. Role of iNOS and peroxynitrite-matrix metalloproteinase-2 signaling in myocardial late preconditioning in rats. / Bencsik P, Kupai K, Giricz Z, Görbe A, Pipis J, Murlasits Z, Kocsis GF, Varga-Orvos Z, Puskás LG, Csonka C, Csont T, Ferdinandy P. // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*- 2010.- Vol.- 299, N 2, P.H512-8.
65. Bianchi P. A new hypertrophic mechanism of serotonin in cardiac myocytes: receptor-independent ROS generation. / Bianchi P., Pimentel D.R., Murphy M.P., Colucci W.S., Parini A. // *FASEB J.*- 2005.- Vol.- 19, P.641–643.
66. Borchert G.H. Mitochondrial BKCa channels contribute to protection of cardiomyocytes isolated from chronically hypoxic rats. / Borchert G.H., Yang C., Kolar F. // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* - 2011.- Vol. 300, N 2, P. H507-H513.
67. Borch E. Role of NADPH oxidase in H9c2 cardiac muscle cells exposed to simulated ischaemia-reperfusion. / Borch E., Parri M., Papucci L., Becatti M., Nassi N., Nassi P., Nediani C. J. // *Cell. Mol. Med.*- 2009.- Vol. 13, N 8B, P.2724-2735.
68. Braunwald E. Clinical efforts to reduce myocardial infarct size – the next step. / E. Braunwald // *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* – 2011. – Vol. 16, N 3–4. – P. 349–353.
69. Brown D. R. Delta-opioid receptor mRNA expression and immunohistochemical localization in porcine ileum // *Dig. Dis. Sci.* – 1998. – Vol. 43. – P. 1402–1410.
70. Bruick R.K. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. / Bruick R.K., McKnight S.L. // *Science.*- 2001.- Vol.294, N 5545, P.1337-1340.

71. Cameron J.S. Role of ATP sensitive potassium channels in long term adaptation to metabolic stress. / J.S. Cameron, R. Baghdady // *Cardiovasc. Res.* – 1994. – Vol. 28 .– P. 788–796.
72. Cao C.M. Calcium-activated potassium channel triggers cardioprotection of ischemic preconditioning. / Cao C.M., Xia Q., Gao Q., Chen M., Wong T.M. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* - 2005. – Vol. 312, P. 644–650.
73. Chance B. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. / Chance B., Sies H., Boveris A. // *Physiological Reviews.*-1979.- Vol.59.- P.527–605.
74. Chen Q. Modulation of electron transport protects cardiac mitochondria and decreases myocardial injury during ischemia and reperfusion. / Chen Q., Camara A. K., Stowe D. F., Hoppel C. L., Lesnefsky E. J. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*-2007.- Vol.292.- P.137–147.
75. Clo C. Reduced mechanical activity of perfused rat heart following morphine or enkephalin peptides administration. / Clo C., Muscari C., Tantini B., Ventura C. // *Life Sci.* – 1985. – Vol. 37, N14. – P. 1327-1333.
76. Cohen M.V. The pH hypothesis of postconditioning. – staccato reperfusion reintroduces oxygen and perpetuates myocardial acidosis. / M.V. Cohen, X.M. Yang, J.M. Downey // *Circulation.* – 2007. – Vol. 115, N 14. – P.1895–1903.
77. Costa A.D. The mechanism by which the mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel opening and H₂O₂ inhibit the mitochondrial permeability transition. / A.D. Costa, R. Jakob, C.L. Costa, K. Andrukhiv, I.C. West, K.D. Garlid // *J. Biol. Chem.* – 2006. – Vol. 281, N 30. – P.20801–20808.
78. Crawford R.M. Chronic mild hypoxia protects heart-derived H9c2 cells against acute hypoxia/reoxygenation by regulating expression of the SUR2A subunit of the ATP-sensitive K⁺ channel. / Crawford R.M., Jovanovic S., Budas G.R., Davies A.M., Lad H., Wenger R.H., Robertson K.A., Roy D.J., Ranki H.J., Jovanovic A. // *J. Biol. Chem.*- 2003.- Vol. 278, N 33, P. 31444–31455.
79. Crompton M. Inhibition by cyclosporin A of a Ca²⁺-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. / Crompton M., Ellinger H., Costi A. // *Biochem. J.*- 1988.- Vol.255, N 1, P.357-360.

80. del Monte F. Abrogation of ventricular arrhythmias in a model of ischemia and reperfusion by targeting myocardial calcium cycling. / del Monte F., Lebeche D., Guerrero J. L., Tsuji T., Doye A. A., Gwathmey J. K., Hajjar R.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.-2004.-Vol.101.- P.5622–5627.
81. Dempsey E.C. Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses / E.C. Dempsey // Am J. Physiol. Lung Cell. Moll. Physiol. – 2000. – Vol. 279. – P. L429–L438.
82. Dhawan B.N. International union of pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. / B.N. Dhawan, F. Cesselin, R. Raghurir // Pharmacol. Rev. – 1996. – Vol. 48, N 4. – P.567–592.
83. Di Lisa F. Mitochondrial pathways for ROS formation and myocardial injury: the relevance of p66(Shc) and monoamine oxidase. / Di Lisa F., Kaludercic N., Carpi A., Menabo R., Giorgio M. // Basic Res. Cardiol.- 2009.- Vol.104, N 2, P.131-139.
84. Ding H.L. Intermittent hypoxia protects the rat heart against ischemia/reperfusion injury by activating protein kinase C. / Ding H.L., Zhu H.F., Dong J.W., Zhu W.Z., Zhou Z.N. // Life Sci.- 2004.- Vol. 75, N 21, P. 2587-2603.
85. Eguchi M. Recent advances in selective opioid receptor agonists and antagonists// Medical Research Rev. – 2004. – Vol. 24, N 2. – P. 182–212.
86. Elde R. Distribution of neuropeptide receptors. New views of peptidergic neurotransmission made possible by antibodies to opioid receptors. / Elde R, Arvidsson U, Riedl M, Vulchanova L, Lee JH, Dado R, Nakano A, Chakrabarti S, Zhang X, Loh HH, et al. Ann N Y// Acad Sci.- 1995.- Vol. 757, P.390-404.
87. Fitzpatrick C.M. Cardioprotection in chronically hypoxic rabbits persists on exposure to normoxia: role of NOS and K_{ATP} channels. / Fitzpatrick CM, Shi Y, Hutchins WC, Su J, Gross GJ, Ostadal B, Tweddell JS, Baker JE. // Am J Physiol Heart Circ Physiol.- 2005.- Vol. 288, P. H62–H68,
88. Fryer R.M. ERK and p38 MAP kinase activation are components of opioid-induced delayed cardioprotection. / Fryer R.M., Hsu A.K., Gross G.J. // Basic Res. Cardiol.- 2001.- Vol. 96, N 2, P. 136-142.

89. Fryer R.M. Essential activation of PKC- δ in opioid-initiated cardioprotection. / Fryer, R.M., Wang Y., Hsu A.K. // *Am. J. Physiol.* – 2001. – Vol. 280, N 3. – P.H1346 – H1353.
90. Fryer R.M. Importance of PKC and tyrosine kinase in single or multiple cycles of preconditioning in rat hearts / R.M. Fryer, J.E.J. Schultz, A.K. Hsu, G.J. Gross // *Am. J. Physiol.* – 1999. – Vol. 276. – P.H1229–H1235
91. Fryer R.M. Opioid-induced cardioprotection against myocardial infarction and arrhythmias. – mitochondrial versus sarcolemmal ATP-sensitive potassium channels. / R.M. Fryer, A.K. Hsu, H. Nagase, G.J. Gross // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2000. – Vol. 294, N 2. –P. 451–457.
92. Fuder H. On the opioid receptor subtype inhibiting the evoked release of 3H-noradrenaline from guinea-pig atria in vitro. / Naunyn-Schmiedeberg's Fuder H., Buder M., Riers H.D., Rothacher G. // *Arch. Pharmacol.* – 1986. – Vol. 332, № 2. – P. 148 – 155.
93. Gillette P.C. Myocardial depression after elective ischemic arrest. Subcellular biochemistry and prevention. / Gillette P.C., Pinsky W. W., Lewis R. M., Bornet E. P., Wood J. M., Entman M. L., Schwartz A. // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*-1979.- Vol.77.- N.4.- P.608—618.
94. Gonzales G.F. Heart mitochondrial nitric oxide synthase is upregulated in male rats exposed to high altitude (4,340 m). / Gonzales G.F., Chung F.A., Miranda S., Valdez L.B., Zaobornyj T., Bustamante J. Boveris A. // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*- 2005.- Vol. 288, P. H2568-2573.
95. Grilli A. Inducible nitric oxide synthase and heme oxygenase-1 in rat heart: direct effect of chronic exposure to hypoxia. / Grilli A., De Lutiis M.A., Patrino A., Speranza L., Gizzi F., Taccardi A.A., Di Napoli P., De Caterina R., Conti P., Felaco M. // *Ann. Clin. Lab. Sci.*- 2003.- Vol. 33, N 2, P.208-215.
96. Griffiths E. J. Mitochondrial calcium transporting pathways during hypoxia and reoxygenation in single rat cardiomyocytes. / Griffiths E. J., Ocampo C. J., Savage J. S., Rutter G. A., Hansford R. G., Stern M. D., Silverman H. S. // *Cardiovasc. Res.*-1998.-Vol.39.- P.423–433.

97. Gunter T.E. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. / Gunter T. E., Pfeiffer D. R. // *Am. J. Physiol.*-1990.- Vol.258.- P.755–C786.
98. Guo H.T. Endogenous κ -opioid peptide mediates the cardioprotection induced by ischemic postconditioning. / Guo HT, Zhang RH, Zhang Y, Zhang LJ, Li J, Shi QX, Wang YM, Fan R, Bi H, Yin W, Pei JM. // *J. Cardiovasc Pharmacol.*- 2011.- Vol. 58, N 2, P.207-15.
99. Guzy R.D. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. / Guzy R.D., Schumacker P.T. // *Exp Physiol.*- 2006.- Vol. 91, P. 807–819.
100. Hagen T. Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: effect on HIF-1 α . // Hagen T., Taylor C. T., Lam F. Moncada S. // *Science.*- 2003.- Vol. 302, P. 1975–1978.
101. Halestrap A.P. A pore way to die: the role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection. // *Biochem. Soc. Trans.*-2010.-Vol.38.- P.841–860.
102. Hamakawa T. Excitatory synaptogenesis between identified lymnaea neurons requires extrinsic trophic factors and is mediated by receptor tyrosine kinases. / Hamakawa T., Woodin MA, Bjorgum MC, Painter SD, Takasaki M, Lukowiak K, Nagle GT, Syed NI. // *J. Neurosci.*- 1999.- Vol. 19.- P. 9306-9312
103. Han F. Dynamic changes in expression of heme oxygenases in mouse heart and liver during hypoxia. / Han F., Takeda K., Yokoyama S., Ueda H., Shinozawa Y., Furuyama K., Shibahara S. // *Biochem. Biophys. Res Commun.*- 2005.- Vol. 338, N 1, P.653-659.
104. Hansford R. G. Physiological role of mitochondrial Ca²⁺ transport // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 1994. – Vol. 26. – P. 495–508.
105. Hare J.M. Nitric oxide and excitation-contraction coupling. // *J. Mol. Cell. Cardiol.*- 2003.- Vol. 35, P.719-729.
106. Hartman JC. The role of bradykinin and nitric oxide in the cardioprotective action of ACE inhibitors. // *Ann Thorac Surg.*- 1995.- Vol. 60, N 3, P.789-92.
107. Heidbreder M. Remote vs. ischaemic preconditioning: the differential role of mitogen-activated protein kinase pathways. / Heidbreder M., Naumann A., Tempel K., Dominiak P., Dendorfer A. // *Cardiovasc. Res.*- 2008.- Vol. 78, N 1, P.108–115.

108. Hille B. Ionic Channels of Excitable Membranes, 2nd edition. // Sinauer Associates.-1992.
109. Hlavackova M. Up-regulation and redistribution of protein kinase C- δ in chronically hypoxic heart. / Hlavackova M., Kozichova K., Neckar J., Kolar F., Musters R.J., Novak F., Novakova O. // Mol. Cell Biochem.- 2010.- Vol. 345, N 1-2, P.271-282.
110. Huang X.D. Morphine and (D-Ala²-NM-Phe⁴, Gly-ol)-enkephalin increase the intracellular free calcium in isolated rat myocytes.Effect of naloxone or pretreatment with morphine. / Huang X. D., Wong T. M.// Life Sci. – 1991. – Vol. 48, N11. – P.1101–1107.
111. Illes P. Sympathoinhibitory opiod receptors in the cardiovascular system. / Illes P., Bettermann R, Ramme D.// Brain Peptides and Catecholamines in Cardiovascular Regulation. – New York: Raven Press – 1987. – Vol. 4. – P. 169–184.
112. Jancso G. Expression and protective role of heme oxygenase-1 in delayed myocardial preconditioning. / Jancso G., Cserepes B., Gasz B., Benko L., Borsiczky B., Ferenc A., Kurthy M., Racz B., Lantos J., Gal J., Arato E., Sinayc L., Weber G., Roth E. // Ann. NY Acad. Sci.- 2007.- Vol. 1095, P.251-261.
113. Jiang X. Inducible nitric oxide synthase mediates delayed cardioprotection induced by morphine in vivo: evidence from pharmacologic inhibition and gene-knockout mice. / Jiang X., Shi E., Nakajima Y., Sato S. // Anesthesiology.- 2004.- Vol. 101, N 1, P. 82-88.
114. Kaelin W.G. Jr Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. / Kaelin W.G. Jr, Ratcliffe P.J. // Mol. Cell. - 2008. - Vol. 30, P. 393–402.
115. Kaludercic N. Monoamine oxidase A is upregulated in cardiac hypertrophy and is a major determinant of the transition from compensation to failure. / Kaludercic N., Feng N., Nagayama T., Bedja D., Carpi A., Vecoli C., Cormaci G., Gabrielson K., Kass D., Paolocci N., Di Lisa F. // Circ. Res.- 2007.- Vol. 101.- N 11, P.7.
116. Kihara Y. Intracellular calcium and ventricular fibrillation. Studies in the aequorinloaded isovolumic ferret heart. / Kihara Y., Morgan J. P. // Circ.-1991.- Vol.68.- P.1378—1389.

117. Kin H. Activation of opioid receptors mediates the infarct size reduction by postconditioning. / H. Kin, A.J. Zatta, R. Jiang, J.G. Reeves, J. Mykytenko, G. Sorescu, Z.Q. Zhao, N.P. Wang, R.A. Guyton, J. Vinten-Johansen // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2005. – Vol. 38. – N 5, P. 827.
118. Kleber G. The potential role of Ca²⁺ for electrical cell-to-cell uncoupling and conduction block in myocardial tissue.// *Basic Res Cardiol.*-1992.- Vol.87.- P.131—143.
119. Kolar F. and Ostadal B. Molecular mechanisms of cardiac protection by adaptation to chronic hypoxia. // *Physiol. Res.*- 2004.- Vol. 53, P. S3–S13.
120. Konorev E.A. S-nitrosoglutathione improves functional recovery in the isolated rat heart after cardioplegic ischemic arrest-evidence for a cardioprotective effect of nitric oxide. / Konorev E.A., Tarpey M.M., Joseph J., Baker J.E., Kalyanaraman B.J. // *Pharmacol. Exp. Ther.*- 1995.- Vol. 274, P.200-206.
121. Kopecky M., Daum S. Tissue adaptation to anoxia in rat myocardium (in Czech). // *Cs. Fysiol.*- 1958.-Vol. 7, P.518-521.
122. Krauskopf A. Properties of the permeability transition in VDAC1(-/-) mitochondria. *Biochim.* / Krauskopf A., Eriksson O., Craigen W. J., Forte M. A., Bernardi P.// *Biophys. Acta.*-2006.- Vol.1757, N.5-6.- P.590-595.
123. Kreil G. Deltorphin, a novel amphibian skin peptide with high selectivity and affinity for delta opioid receptors. / Kreil G., Barra D., Simmaco M., Erspamer V., Erspamer G.F., Negri L., Severini C., Corsi R., Melchiorri P.// *Eur. J. Pharmacol.* – 1989. – Vol. 162, N 1. – P. 123-8.
124. Krijnen P.A.J. Increased Nox2 expression in human cardiomyocytes after acute myocardial infarction. / Krijnen P.A.J., Meischl C., Hack C.E., Meijer C.J.L.M., Visser C.A., Roos D., Niessen H.W.M.// *J. Clin. Pathol.*- 2003.- Vol. 56, P.194–199.
125. Kroemer G. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. / Kroemer G., Galluzzi L., Brenner C. // *Physiol. Rev.*- 2007.- Vol. 87, N 1, P.99-163.
126. Kuroshima A. Cross adaptation between stress and cold in rats. / Kuroshima A., Habara Y., Uehara A., Murazumi K., Yahata T., Ohno T. // *Pflugers Arch.*- 1984.- Vol. 402, N 4, P.402-408.

127. Lakatta E.G. Spontaneous myocardial calcium oscillations: are they linked to ventricular fibrillation? / Lakatta E.G., Guarnieri T. // *J. Cardiovasc. Electrophysiol.*- 1993.- Vol.4.- P.473—489.
128. Lakkisto P. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide promote neovascularization after myocardial infarction by modulating the expression of HIF-1 α , SDF-1 α and VEGF-B. / Lakkisto P., Kyto V., Forsten H., Siren J.M., Segersvard H., Voipio-Pulkki L.M., Laine M., Pulkki K., Tikkanen I. // *Eur J Pharmacol.*- 2010.- Vol. 635, N 1-3, P.156-64.
129. Lambert A. Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I). / Lambert A., Brand M.D. // *J Biol. Chem.*- 2004.- Vol. 279, P.39414—39420,
130. Lazarus L.H. Dermorphin gene sequence peptide with high affinity and selectivity for μ -opioid receptors. / Lazarus L.H., Wilson W.E., de Castiglione R.D., Guglietta A. // *J. Biol. Chem.*- 1989.- Vol. 264, P.3047-3050.
131. Lazarus L.H. Frog skin opioid peptides: a case for environmental mimicry. / Lazarus L.H., Bryant S.D., Attila M., Salvadori S. // *Environ Health Perspect.* – 1994. – Vol. 102, N 8. – P. 648-54.
132. Lee G.J. Characterization of mitochondria isolated from normal and ischemic hearts in rats utilizing atomic force microscopy. / Lee G.J., Chae S. J., Jeong J. H., Lee S. R., Ha S. J., Pak Y. K., Kim W., Park H. K. // *Micron.*-2011.- Vol.42, N.3.- P.299—304.
133. Levac B.A. Oligomerization of opioid receptors: generation of novel signaling units. / Levac BA, O'Dowd BF, George SR. // *Curr Opin Pharmacol.*- 2002.- Vol. 2, N 1, P.76-81.
134. Levraut J. Cell death during ischemia: relationship to mitochondrial depolarization and ROS generation. / Levraut. J., Iwase H., Shao Z-H., Hock V.T.L., Schumacker P.T. // *Am. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2003. – Vol. 284. – P. 549–558.
135. Li J.G. ASP147 in the third transmembrane helix of the rat μ opioid receptor forms ion-pairing with morphine and naltrexone. / Li J.G., Chen C., Yin J., Rice K., Zhang Y., Matecka D., de Riel J.K., DesJarlais R.L., Liu-Chen L.Y. // *Life Sci.* – 1999. – Vol. 65, N 2. – P. 175-185.

136. Liu H. Role of opioid delta1 receptors, mitochondrial K(ATP) channels, and protein kinase C during cardiocyte apoptosis. / Liu H., Zhang H.Y., McPherson B.C, Baman T., Roth S., Shao Z., Zhu X., Yao Z.// J. Mol. Cell. Cardiol. – 2001. – Vol. 33, N 11. – P. 2007-14.
137. Llobell F. Characterization of the opioid receptor subtypes mediating the negative inotropic effects of DAMGO, DPDPE and U-50,488H in isolated human right atria strips. / Llobell F., Laorden L. // Neuropeptides. – 1995. – Vol. 29. – P. 115–119.
138. Loor G. Mitochondrial oxidant stress triggers cell death in simulated ischemia-reperfusion. / Loor G., Kondapalli J., Iwase H., Chandel N.S., Waypa G.B., Guzy R.D., Vanden Hoek T.L., Schumacker P.T. // Biochim. Biophys. Acta.-2011.-Vol. 1813, N.7.- P.1382—1394
139. Lopaschuk G. D. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. / Lopaschuk G. D., Ussher J. R., Folmes C. D., Jaswal J. S., Stanley W. C. // Physiol. Rev.-2010Vol.90, N.1.- P.207—258
140. Lu Y. Role of central and peripheral opioid receptors in the cardioprotection of intravenous morphine preconditioning. / Lu Y., Dong C., Yu J., Li L. Ir. // J. Med. Sci.- 2011.- Vol. 180, N 4, P.881-885.
141. Manukhina E.B. Production and storage of nitric oxide in adaptation to hypoxia. / Manukhina E.B., Malyshev I.Yu., Smirin B.V., Mashina S.Yu., Saltykova V.A., Vanin A.F. // NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry.- 1999.- Vol. 3, N 5, P.393–401.
142. Martin W.R. The effects of morphine- and nalorphine-like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. / Martin W.R., Eades C.E., Thompson J.A., Huppler R.E., Gilbert P.E.// J. Pharmacol. Exp. Ther. – 1976. – Vol. 197. – P. 517–532.
143. Maslov L.N. Activation of peripheral δ 2 opioid receptors increases cardiac tolerance to ischemia/reperfusion injury: Involvement of protein kinase C, NO-synthase, KATP channels and the autonomic nervous system. / Maslov L.N., Lishmanov Yu.B., Oeltgen P.R. et all. // Life Sci.- 2009.- Vol. 84, N 19-20, P. 657-663.

144. Mayfield K.P. Delta-1 opioid receptor dependence of acute hypoxic adaptation. / Mayfield K.P., D'Alecy LG. // J Pharmacol Exp Ther.- 1994.- Vol. 268, N 1, P.74-77.
145. Meerson F.Z. Adaptation to high altitude hypoxia as a factor preventing development of myocardial ischemic necrosis. / Meerson F.Z., Gomzakov O.A., Shimkovich M.V. // Am. J. Cardiol.- 1973. – Vol. 31, N 1, P.30-34.
146. Meerson F.Z. Prevention and elimination of heart arrhythmias by adaptation to intermittent high altitude hypoxia. / Meerson F.Z., Ustinova E.E., Orlova E.H. // Clin. Cardiol.- 1987.- Vol. 10, N 12, P.783-9.
147. Meerson F.Z., Malyshev I.Yu. Adaptation to stress increases the heart resistance to ischemic and reperfusion arrhythmias. // J. Mol. Cell. Cardiol.- 1989.- Vol. 21, P.299-303.
148. Michel M.C. Mitogen-activated protein kinases in the heart. / Michel M.C., Li Y., Heusch G. // Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.- 2001.- Vol. 363, P.245–266.
149. Milano G. Daily reoxygenation decreases myocardial injury and improves post-ischaemic recovery after chronic hypoxia. / G. Milano, A.F. Corno, M. Samaja, S. Morel, G. Vassalli, L.K. von Segesser // Eur. J. Cardiothorac Surg. – 2010. – Vol. 37, N 4. –P. 942–949.
150. Milano G. Phosphorylation of phosphatidylinositol–3–kinase–protein kinase B and extracellular signal–regulated kinases 1/2 mediate reoxygenation–induced cardioprotection during hypoxia. / G. Milano, L.K. von Segesser, S. Morel, A. Joncic, P. Bianciardi, G. Vassalli, M. Samaja // Exp. Biol. Med. , N Maywood. – 2010. – Vol. 235, N 3. – P. 401–410.
151. Mourouzis I. Morphine administration at reperfusion fails to improve postischaemic cardiac function but limits myocardial injury probably via heat-shock protein 27 phosphorylation. /Mourouzis I., Saranteas T., Perimenis P., Tesseromatis C., Kostopanagiotou G., Pantos C., Cokkinos D.V. // Eur. J. Anaesthesiol.- 2009.- Vol.26, N.7.- P.572-581.
152. Murata M. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels attenuate matrix Ca(2+) overload during simulated ischemia and reperfusion: possible mechanism of

- cardioprotection. / Murata M., Akao M., O'Rourke B., Marban E. // *Circ. Res.*-2001.-Vol.89.- P.891–898.
153. Murdock D.K. Electrophysiology of coronary reperfusion. A mechanism for reperfusion arrhythmias. / Murdock D.K., Loeb M.D.J.M., Euler D.E., Randall W.C.// *Circulation.* – 1980. – Vol. 61, N 1. – P. 175–182.
154. Murry C.E. Preconditioning with ischemia. – a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. / C.E. Murry, R.B. Jennings, K.A. Reimer // *Circulation.* – 1986. – Vol. 74, N 5. – P. 1124–1136.
155. Murphy E., Cross H., Steenbergen C. Sodium regulation during ischemia versus reperfusion and its role in injury. / Murphy E., Cross H., Steenbergen C. // *Circ. Res.*-1999.- Vol.84.- P.1469–1470.
156. Namekata I. Reduction by SEA0400 of myocardial ischemia-induced cytoplasmic and mitochondrial Ca²⁺ overload. / Namekata I., Shimada H., Kawanishi T., Tanaka H., Shigenobu K. // *Eur. J. Pharmacol.*- 2006.-Vol.543, P.108–115.
157. Nazareth W. Inhibition of anoxia-induced injury in heart myocytes by cyclosporin-A. / Nazareth W., Yafei N., Crompton M. // *J. Mol. Cell. Cardiol.*-1991.- Vol.23.- P.1351—1354.
158. Neckar J. Cardioprotective effect of chronic hypoxia is blunted by concomitant hypercapnia. / Neckar J., Szarszoi O., Herget J., Ostadal B., Kolar F. // *Physiol. Res.*- 2003.- Vol. 52, N 2, P.171-175.
159. Neckar J. Myocardial infarct size-limiting effect of chronic hypoxia persists for five weeks of normoxic recovery. / Neckar J., Ostadal B., Kolar F. // *Physiol Res.*- 2004.- Vol. 53, N 6, P.621-8.
160. Neckar J. Acute but not chronic tempol treatment increases ischemic and reperfusion ventricular arrhythmias in open–chest rats. / J. Neckar, B. Ostadal, F. Kolar // *Physiol. Res.* – 2008. – Vol. 57. – P. 653–656.
161. Neckar J. Antiarrhythmic effect of adaptation to high altitude hypoxia is abolished by 5–hydroxydecanoate. / J. Neckar, F. Papousek, B. Ostadal, O. Novakova, F.J. Kolar // *Mol. Cell. Cardiol.* – 2001. – Vol. 31. P. – A51.
162. Neckar, J. Effects of mitochondrial KATP modulators on cardioprotection induced by chronic high altitude hypoxia in rats. / J. Neckar, O. Szarszoi, L. Koten, F.

- Papousek, B. Ostadal, G.J. Grover, F. Kolar // *Cardiovasc. Res.* – 2002. – Vol. 55, N 3. – P. 567–575.
163. Neckar J. Increased expression and altered subcellular distribution of PKC–delta in chronically hypoxic rat myocardium. – involvement in cardioprotection. / J. Neckar, I. Markova, F. Novak, O. Novakova, O. Szarszoi, B. Ostadal, F. Kolar // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2005. – Vol. 288, N 4. – P. H1566–72.
164. Neely J. R. Metabolic products and myocardial ischemia. / Neely J. R., Feuvray D. // *Am. J. Pathol.*-1981.- Vol.102.- P.282–291.
165. Neet K. Vertebrate non-receptor protein-tyrosine kinase families. / Neet K, Hunter T. // *Genes Cells.*- 1996.- Vol. 1, P.147–169.
166. Niggli E. Regulatory function of Na-Ca exchange in the heart:milestones and outlook// *J. Memb. Biol.* – 1999. – Vol.168. – P. 107–130.
167. Nisoli E. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. / Nisoli E., Clementi E., Paolucci C., Cozzi V., Tonello C., Sciorati C., Bracale R., Valerio A., Francolini M., Moncada S., Carruba M.O. // *Science.*- 2003.- Vol. 299, P.896-899.
168. Okabe E. Possible mechanism responsible for mechanical dysfunction of ischemic myocardium: a role of oxygen free radicals. / Okabe E., Fujimaki R., Murayama M., Ito H. // *Jpn. Circ. J.*-1989.-Vol.53.- N.9.-P.1132—1137.
169. Ostadal B. Ontogenetic differences in cardiopulmonary adaptation to chronic hypoxia. / Ostadal B., Kolar F., Pelouch V., Widimsky J. // *Physiol. Res.*- 1995.- Vol. 44, N1, P.45-51.
170. Ostadal B. Cardiac Ischemia: From Injury to Protection. / Ostadal B., Kolar F. // Boston, Dordrecht, London: Kluwer Academic Publishers.-1999.
171. Ostergaard L. Diminished NO release in chronic hypoxic human endothelial cells. / Ostergaard L., Stankevicius E., Andersen M.R., Eskildsen-Helmond Y., Ledet Th., Mulvany M.J., Simonsen U. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*- 2007.- Vol. 293, P.H2894–H2903.
172. Paakkari P.I. Evidence for differential opioid mu1- and mu2-receptor-mediated regulation of heart rate in the conscious rat. / Paakkari P. I., Feuerstein G., Siren A.L.// *Neuropharmacol.* – 1992. – Vol. 31, N 8. – P. 777 – 827.

173. Pabla R. Nitric oxide attenuates neutrophil-mediated myocardial contractile dysfunction after ischemia and reperfusion. / Pabla R., Buda A.J., Flynn D.M., Blesse S.A., Shin A.M., Curtis M.J., Lefer D.J. // *Circ. Res.*- 1996.- Vol. 78, P.65-72.
174. Pasdois P. The role of oxidized cytochrome c in regulating mitochondrial reactive oxygen species production and its perturbation in ischaemia. / Pasdois P., Parker J. E., Griffiths E. J., Halestrap A. P. // *Biochemistry Journal.*-2011.- Vol.436.- P.493–505.
175. Patel H.J. Naloxone-insensitive inhibition of acetylcholine release from parasympathetic nerves innervating guinea-pig trachea by the novel opioid, nociceptin. / Patel H.J., Giembycz M.A., Spicuzza L. et al. // *Br. J. Pharmacol.* - 1997. - Vol. 120. - P. 735 – 736.
176. Peart J.N. Effect of exogenous kappa-opioid receptor activation in rat model of myocardial infarction. / Peart J.N., Gross E.R., Gross G.J. // *J. Cardiovasc. Pharmacol.*- 2004.- Vol. 43, N3, P.410-415.
177. Pedrozo Z. Calpains and proteasomes mediate degradation of ryanodine receptors in a model of cardiac ischemic reperfusion. / Pedrozo Z., Sánchez G., Torrealba N., Valenzuela R., Fernández C., Hidalgo C., Lavandero S., Donoso P. // *Biochim. Biophys. Acta.*-2010.-Vol.1802, N.3.- P.356—362.
178. Peng C.F. Alteration in calcium metabolism in mitochondria isolated from ischemic and reperfused myocardium. / Peng C.F., Murphy M. L., Kane J. J., Straub K. D. // *Recent Adv. Stud. Cardiac Struct. Metab.*-1976.- Vol.11.- P.533—538.
179. Penna C. Intermittent activation of bradykinin B₂ receptors and mitochondrial K_{ATP} channels trigger cardiac postconditioning through redox signaling. / C. Penna, D. Mancardi, R. Rastaldo, G. Losano, P. Pagliaro // *Cardiovasc. Res.* – 2007. – Vol. 75, N 1. –P.168–177.
180. Penna C. Post-conditioning induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism, mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel and protein kinase C activation. / C. Penna, R. Rastaldo, D. Mancardi, S. Raimondo, S. Cappello, D. Gattullo, G. Losano, P. Pagliaro // *Basic Res. Cardiol.* – 2006b. – Vol. 101, N 2. – P.180–189.

181. Ping P. Demonstration of selective protein kinase C-dependent activation of Src and Lck tyrosine kinases during ischemic preconditioning in conscious rabbits. / Ping P, Zhang J, Zheng Y, Li R, Dawn B, Tang X, Takano H, Balafanova Z, and Bolli R. // *Circ. Res.*- 1999.- Vol. 85, P.542–550.
182. Poderoso J.J. Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. / Poderoso J.J., Carreras M.C., Lisdero C., Riobo N., Schopfer F., Boveris A. // *Arch. Biochem. Biophys.*- 1996.- Vol. 328, P.85-92.
183. Porstmann T. and Kiessig S.T. Enzyme immunoassay techniques. An Overview. // *J. Immunol. Methods.*- 1992.- Vol.150, P. 5-21.
184. Poupa O. Acclimatization to simulated high altitude and acute cardiac necrosis. / Poupa O., Krofta K., Prochazka J., Turek Z. // *Federation Proc.*- 1966.- Vol. 25, P.1243-1246.
185. Powis G., et al., Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase.// *Cancer Res.*-1994.
186. Pugsley M.K. Antiarrhythmic effects of U-50,488H in rats subject to coronary artery occlusion. / Pugsley M.K., Penz W.P., Walker M.J., Wong T.M.// *Eur. J. Pharmacol.* - 1992a. – Vol. 212, N 1. – P. 15-19.
187. Rabkin S. W. Dynorphin A (1-13) in the brain suppresses epinephrine-induced ventricular premature complexes and ventricular tachyarrhythmias // *Regulatory Peptides.* – 1992. – Vol. 41. – P. 95–107.
188. Rabkin S.W. Effect of DAGO on epinephrine-induced arrhythmias in the rat and the interrelationship to the parasympathetic nervous system // *Life Science.* – 1989. – Vol. 45. – P. 1039 – 1047.
189. Rabkin S.W. Morphine and morphiceptine increase the threshold of epinephrine-induced cardiac arrhythmias in the rat through brain mu opioid receptors // *Clin. Experim. Pharmacol. Physiol.* – 1993. – Vol. 20. – P. 95 – 102.
190. Rafiee P. Activation of protein kinases in chronically hypoxic infant human and rabbit hearts. – Role in cardioprotection. / P. Rafiee, Y. Shi, X Kong., K.A. Pritchard Jr., J.S. Tweddell, S.B. Litwin, K. Mussatto, R.D. Jaquiss, J. Su, J.E. Baker // *Circulation.* – 2002. – Vol. 106. – P. 239–245.

191. Rees D.D. Characterisation of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo / D.D. Rees, R.M. Palmer, R. Schulz // *Br. J. Pharmacol.* – 1990. – Vol. 101, N3. – P.746–752.
192. Robergs R.A. Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. / Robergs R. A., Ghiasvand F., Parker D. // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*-2004.- Vol.287.- P.R502–R516.
193. Rouet–Benzineb P. Induction of cardiac nitric oxide synthase 2 in rats exposed to chronic hypoxia / P. Rouet–Benzineb, S. Eddahibi, B. Raffestin, M. Laplace, S. Depond, S. Adnot, B. Crozatier // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 1999. – Vol. 31. –P. 1697–1708.
194. Ruiz-Meana M. Mitochondrial Ca^{2+} uptake during simulated ischemia does not affect permeability transition pore opening upon simulated reperfusion. / Ruiz-Meana M., Garcia-Dorado D., Miro-Casas E., Abellan A., Soler-Soler J.// *Cardiovasc. Res.*-2006.- Vol.71.- P.715–724.
195. Ryan S. A critical role for p38 map kinase in NF–kappaB signaling during intermittent hypoxia/reoxygenation. / S. Ryan, W.T. McNicholas, C.T. Taylor // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2007. – Vol. 355. – P. 728–733.
196. Sato T. Mitochondrial Ca^{2+} -activated K^{+} channels in cardiac myocytes: a mechanism of the cardioprotective effect and modulation by protein kinase. / A. Sato T., Saito T., Saegusa N., Nakaya H. // *Circulation.*- 2005.- Vol. 111, P.198–203.
197. Schiller P.W. TIPP[ψ]: a highly potent and stable pseudopeptide δ opioid receptor agonist with extraordinary δ selectivity. / Schiller P.W., Weltrowska G., Nguyen T.M. et al. // *J. Med. Chem.* 1993. V. 36 (21). P. 3182-3187.
198. Schultz J.E. Morphine mimics the cardioprotective effect of ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in the rat heart. / Schultz J.E., Hsu A.K., Gross G.J. // *Circ. Res.*- 1996.- Vol. 78, N6, P.1100-1104.
199. Schultz J.E.J. Ischemic preconditioning and morphine-induced cardioprotection involve the delta (delta)-opioid receptor in the intact rat heart. / Schultz J.E.J., Hsu A.K., Gross G.J.J. // *Mol. Cell. Cardiol.*- 1997.- Vol. 29, N8, P. 2187-2195.

200. Schultz J.E.J. Ischemic preconditioning in the intact rat heart is mediated by δ 1- but not μ - or κ -opioid receptors. Schultz J.E.J., Hsu A.K., Gross G.J. // *Circulation*. 1998. V. 97. P.1282-1289.
201. Semenza G.L. Regulation of Oxygen Homeostasis by Hypoxia-Inducible Factor 1. // *Physiology*.- 2009.- Vol.24, P.97-106.
202. Shibahara S. Hypoxia and heme oxygenases: oxygen sensing and regulation of expression. / Shibahara S., Han F., Li B., Takeda K. // *Antioxid. Redox Signal.*- 2007.- Vol. 9, N12, P.2209-2225.
203. Shintani-Ishida K. Ischemia induces phospholamban dephosphorylation via activation of calcineurin, PKC- α , and protein phosphatase 1, thereby inducing calcium overload in reperfusion. / Shintani-Ishida K., Yoshida K. // *Biochim. Biophys. Acta.*-2011.-Vol.1812, N.7.- P.743—751.
204. Speechly-Dick M.E. Protein kinase C. Its role in ischemic preconditioning in the rat. / Speechly-Dick M.E., Mocanu M.M., Yellon D.M. // *Circ Res.*- 1994.- Vol.75, N3, P.586-90.
205. Springhorn J.P. Translation of heart proenkephalin mRNA and secretion of enkephalin peptides from cultured cardiac myocytes. / Springhorn J.P., Claucomb W.C.// *Am. J. Physiol.* – 1992 . – Vol. 63. – P. H1560–H1566.
206. Stabel S. Protein kinase C. / S. Stabel, P.J. Parker // *Pharmacol. Ther.* – 1991. – Vol. 51, N 1. – P. 71–95.
207. Stewart, S. Reversible blockade of electron transport with amobarbital at the onset of reperfusion attenuates cardiac injury. / S. Stewart, E.J. Lesnefsky, Q. Chen // *Transl Res.* – 2009. – Vol. 153, N 5. – P. 224–231.
208. Stowe D.F. Cardiac mitochondrial preconditioning by Big Ca²⁺-sensitive K⁺ channel opening requires superoxide radical generation. / Stowe D.F., Aldakkak M., Camara A.K., Riess M.L., Heinen A., Varadarajan S.G., Jiang M.T. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*- 2006.- Vol. 290, N1, P.H434-440.
209. Sun Y. B-type natriuretic peptide-induced cardioprotection against reperfusion is associated with attenuation of mitochondrial permeability transition. / Y. Sun, Y Zhang., M. Yan, Y. Wu, X. Zheng // *Biol. Pharm. Bull.* – 2009. – Vol. 32, N 9. – P. 1545–1551.

210. Szabó I. The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules. I. Binary structure and voltage dependence of the pore. / Szabó I., Zoratti M. // FEBS Lett.-1993.- Vol.330, N.2.- P.201—205.
211. Szarszoi O. The role of reactive oxygen species and nitric oxide in ischemia/reperfusion injury of chronically hypoxic rat heart. / O. Szarszoi, G. Asemu, B. Ostadal, F. Kolar // Eur. J. Heart Failure. – 2003. – Suppl. 2/1. – P. 53.
212. Tajima M. Acute ischemic preconditioning and chronic hypoxia independently increase myocardial tolerance to ischemia. / Tajima M., Katajose D., Bessho M., Ioyama S. // Cardiovasc. Res.- 1994.- Vol. 28, P.312–319.
213. Takasaki Y. Met5-enkephalin protects isolated adult rabbit cardiomyocytes via δ -opioid receptors. / Takasaki Y., Wolff R.A., Chien G.L., van Winkle D.M. // Am. J. Physiol.- 1999.- Vol. 277, N6 Pt 2, P.H2442-H2450.
214. Takemori A.E., Portoghese P.S. Selective naltrexone-derived opioid receptor antagonists // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. Annual Reviews Inc. – 1992. – Vol. 32. – P. 239-269
215. Takeo S. Na⁺ overload-induced mitochondrial damage in the ischemic heart./ Takeo S., Tanonaka K.// Can J Physiol Pharmacol.-2004.- Vol.82. N.12.-P.1033—1043.
216. Toth G. [D-Pen2, D-Pen5] enkephalin analogues with increased affinity and selectivity for μ opioid receptors. / Toth G., Kramer T.H., Knapp R. et al. // J.Med.Chem.- 1990.- Vol. 33, P.249-253.
217. Tsutsumi Y.M. Reactive oxygen species trigger ischemic and pharmacological postconditioning. – *In vivo* and *in vitro* characterization. / Y.M. Tsutsumi, T. Yokoyama, Y. Horikawa, D.M. Roth, H.H. Patel // Life Sci. – 2007. – Vol. 81, N 15. – P. 1223–1227.
218. Uecker M. Translocation of protein kinase C isoforms to subcellular targets in ischemic and anesthetic preconditioning. / M. Uecker, R.da Silva, T. Grampp, T. Pasch, M.C. Schaub, M. Zaugg // Anesthesiology. – 2003. – Vol. 99. – P. 138–147.
219. Valtchanova-Matchouganska A. Mechanisms of opioid delta (delta) and kappa (kappa) receptors' cardioprotection in ischaemic preconditioning in a rat model of myocardial infarction. / Valtchanova-Matchouganska A, Ojewole JA. // Cardiovasc J S Afr.- 2003.-Vol.14, N2, P.73-80.

220. Vanden Hoek T.L. Significant levels of oxidants are generated by isolated cardiomyocytes during ischemia prior to reperfusion. / Vanden Hoek T.L., Li C., Shao Z., Schumacker P.T., Becker L.B. // *J. Mol. Cell. Cardiol.*- 1997.- Vol.29, N9, P.2571-2583.
221. Ventura C. δ and μ opioid receptor stimulation affects cardiac myocyte function and Ca^{2+} release from an intracellular pool in myocytes and neurons. / Ventura C., Spurgeon H.A., Lakatta E.G., Guarnieri C., Capogrossi M.C. // *Circ. Res.* – 1992. – Vol. 70. – P. 66-81.
222. Vrbjar N. Influence of global ischemia on the sarcolemmal ATPases in the rat heart. / Vrbjar N., Dzurba A., Ziegelhoffer A. // *Mol. Cell. Biochem.*-1995.- Vol.147, N.1-2.- P.99—103.
223. Wang Y.Q. Effects of orphanin FQ on endomorphin-1 induced analgesia. / Wang Y.Q., Zhu C.B., Wu G.C., Cao X.D., Wang Y., Cui D.F. // *Brain Res* – 1999. – Vol. 835, N 2. – P. 241-246.
224. Ward J.P. Oxygen sensors in context. // *Biochim Biophys Acta.*- 2008.- Vol.1777, N1, P.1-14.
225. Williams I.A. The rise of $[\text{Na}^{+}]_{(i)}$ during ischemia and reperfusion in the rat heart—underlying mechanisms. / Williams I.A., Xiao X. H., Ju Y. K., Allen D. G. // *Pflugers Arch.*-2007.- Vol.454, N.6.- P.903—912.
226. Williams-Pritchard G. Essential role of EGFR in cardioprotection and signaling responses to A1 adenosine receptors and ischemic preconditioning. / Williams-Pritchard G, Knight M, Hoe LS, Headrick JP, Peart JN. // *Am J Physiol Heart Circ.Physiol.*-2011.-Vol.300, N6, P.H2161-8.
227. Wong A.K. AMP-activated protein kinase pathway: a potential therapeutic target in cardiometabolic disease. / Wong A.K., Howie J., Petrie J.R., Lang C.C. // *Clin. Sci (Lond).*- 2009.- Vol.116, N8, P.607-620.
228. Wu L. Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. / Wu L., Wang R.// *Pharmacol Rev.*- 2005.- Vol.57, N4, P.585-630.

229. Wu S. Role of opioid receptors in cardioprotection of cold-restraint stress and morphine. / Wu S., Wong M.C., Chen M., Cho C.H., Wong T.M. // *J. Biomed. Sci.*-2004.- Vol.11, N6, P.726-731.
230. Xi L. Evidence that NOS2 acts as a trigger and mediator of late preconditioning induced by acute systemic hypoxia. / Xi L., Tekin D., Gursoy E., Salloum F., Levasseur J.E., Kukreja R.C. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*- 2002.- Vol.283, N1, P.H5-H12.
231. Xu W. Cytoprotective role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in the cardiac inner mitochondrial membrane. / Xu W., Liu Y., Wang S., McDonald T., Van Eyk J.E., Sidor A., O'Rourke B. // *Science.*- 2002.- Vol.298, P.1029–1033,
232. Yang L. Mitochondrial oscillations and waves in cardiac myocytes. – insights from computational models. / L. Yang, P. Korge, J.N. Weiss, Z. Qu // *Biophys. J.* – 2010. – Vol. 98, N 8. – P. 1428–1438.
233. Yang X.M. Attenuation of infarction in cynomolgus monkeys. – preconditioning and postconditioning. / X.M. Yang, Y. Liu, N. Tandon, J. Kambayashi, J.M. Downey, M.V. Cohen // *Basic Res. Cardiol.* – 2010. – Vol. 105, N 1. – P. 119–128.
234. Yellon D.M. A “second window of protection” or delayed preconditioning phenomenon: future horizons for myocardial protection? / Yellon D.M., Baxter G.F. // *J. Mol. Cell. Cardiol.*- 1995.-Vol. 27, N4, P.1023-1034.
235. Yellon D.M. Preconditioning the myocardium. – From cellular physiology to clinical cardiology / D.M.Yellon, J.M. Downey // *Physiol. Rev.* – 2003. – Vol. 83. – P.1113–1151.
236. Yet S.-F. Hypoxia induces severe right ventricular dilatation and infarction in heme oxygenase-1 null mice. / Yet S.-F., Perrella M.A., Layne M.D., Hsieh C.-M., Maemura K., Kobzik L., Wiesel P., Christou H., Kourembanas S., Lee M.-E. // *J.Clin. Invest.* -1999.-Vol.103, P.R23–R29.
237. Younès A. Cardiac synthesis, processing, and coronary release of enkephalin-related peptides. / Younès A, Pepe S, Barron BA, Spurgeon HA, Lakatta EG, Caffrey JL. // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*- 2000.- Vol.279, N4, P.H1989-98.

238. Yuan G. Induction of HIF-1 α expression by intermittent hypoxia: involvement of НАДФН oxidase, Ca²⁺ signaling, prolyl hydroxylases and mTOR. / Yuan G., Nanduri J., Khan S., Semenza G.L., Prabhakar N.R. // J. Cell. Physiol.- 2008.- Vol.217, P.674–685.
239. Yuan G. Ca²⁺/calmodulin kinase–dependent activation of hypoxia inducible factor 1 transcriptional activity in cells subjected to intermittent hypoxia. / G.Yuan, J. Nanduri, C.R. Bhasker, G.L. Semenza, N.R. Prabhakar // J. Biol. Chem. – 2005. – Vol. 280. – P. 4321–4328.
240. Zaobornyj T. Mitochondrial nitric oxide metabolism during rat heart adaptation to high altitude: effect of sildenafil, L-NAME, and L-arginine treatments. / Zaobornyj T., Valdez L.B., Iglesias D.E., Gasco M., Gonzales G.F., Boveris A. // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.- 2009.- Vol.296, N6, P.H1741-7.
241. Zatta A.J. Evidence that cardioprotection by postconditioning involves preservation of myocardial opioid content and selective opioid receptor activation. / A.J. Zatta, H. Kin, D. Yoshishige, R. Jiang, N. Wang, J.G. Reeves, J. Mykytenko, R.A. Guyton, Z.Q. Zhao, J.L. Caffrey, J. Vinten–Johansen // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2008. – Vol. 294, N 3. –P. H1444–H1451.
242. Zaugg C.E. Importance of calcium for the vulnerability to ventricular fibrillation detected by premature ventricular stimulation: Single pulse versus sequential pulse methods. / Zaugg C. E., Wu S. T., Lee R. J., Buser P. T., Parmley W. W., Wikman-Coffelt J. // J. Mol. Cell. Cardiol.-1996.- Vol.28.- P.1059—1072.
243. Zhang N. The role of the rat sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase promoter in myocardial ischemia-preconditioning. / Zhang N., Zhu B.// Mol. Cell. Biochem.- 2010.-Vol.333, N.1-2.- P.311-321.
244. Zhang W.M. Multiplicity of kappa opioid receptor binding in the rat cardiac sarcolemma. / Zhang WM, Jin WQ, Wong TM. // J. Mol. Cell. Cardiol.- 1996.- Vol.28, N7, P.1547-54
245. Zhao Z.Q. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion. – Comparison with ischemic preconditioning. / Z.Q. Zhao, J.S. Corvera, M.E. Halkos, F. Kerendi, N.P. Wang, R.A. Guyton, J. Vinten–Johansen // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2003. – Vol. 285, N 2. –P. H579–H588.

246. Zhong H. Modulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression by the epidermal growth factor/ phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. / Zhong H., Chiles K., Feldser D., Laughner E., Hanrahan C., Georgescu M.M., Simons J.W., Semenza G.L. //Cancer Res.- 2000.- Vol.60, P.1541–1545.
247. Zhu H.F. ATP-dependent potassium channels involved in the cardiac protection induced by intermittent hypoxia against ischemia/reperfusion injury. / Zhu H.F., Dong J.W., Zhu W.-Zh., Ding H.L., Zhou Zh.-N. // Life Sci.- 2003.-Vol.73, N10, P.1275-1287.
248. Zhu W.-Zh. Intermittent high altitude hypoxia inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores against reperfusion injury / W.-Zh. Zhu, Y. Xie, L. Chen, H.-T. Yang, Zh.-N. Zhou // Journal of Molecular and Cellular Cardiology. – 2006. – Vol. 40. – P. 96–106.
249. Zucchi R. Modulation of sarcoplasmic reticulum function: a new strategy in cardioprotection? Zucchi R., Ronca F., Ronca-Testoni S. // Pharmacol. Therapeutics. – 2001. – Vol. 89. – P. 47–65.