

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ КАРДИОЛОГИИ»

На правах рукописи

Нарыжная

Наталья Владимировна

ОПИОИДНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ И ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ СИГНАЛЬНЫЕ
МЕХАНИЗМЫ, ОПОСРЕДУЮЩИЕ КАРДИОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ
АДАПТАЦИИ К ХРОНИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ

14.03.03 патологическая физиология
03.03.01 физиология

Диссертация
на соискание ученой степени доктора медицинских наук

Научные консультанты:

Доктор медицинских наук, профессор
Л.Н. Маслов

Доктор медицинских наук, профессор,
член-корреспондент РАН,
Ю.Б. Лишманов

Томск 2016 г.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	6
Глава 1 Обзор литературы	16
1.1 Патогенез повреждения миокарда во время ишемии и реперфузии	16
1.1.1 Основные проявления ишемического и реперфузионного повреждения миокарда	16
1.1.2 Патогенетические звенья ишемического-реперфузионного повреждения кардиомиоцитов	23
1.2 Кардиопротекторный эффект опиоидов и его механизмы	29
1.3 Неспецифическая (адаптационная) защита миокарда от повреждающего и аритмогенного действия ишемии-реперфузии	37
1.3.1 Кардиопротекторное действие кондиционирования и механизмы его реализации	38
1.3.2 Механизмы защиты миокарда при адаптации к гипоксии	43
1.3.3 Опиоидная система в процессах адаптации сердца	66
Заключение к обзору литературы	69
Глава 2 Материал и методы исследования	70
Глава 3 Результаты исследования и их обсуждение	96
3.1 Кардиопротекторный эффект хронической нормобарической гипоксии и его механизмы.....	96
3.1.1 Характеристика проявлений кардиопротекторного действия хронической нормобарической гипоксии	96
3.1.1.1 Инфаркт–лимитирующий эффект хронической непрерывной нормобарической гипоксии	96
3.1.1.2 Влияние хронической непрерывной нормобарической гипоксии на повреждение и сократительную функцию миокарда при тотальной ишемии-реперфузии изолированного сердца крысы.....	102

3.1.1.3 Изменение устойчивости изолированных кардиомиоцитов к аноксии-реоксигенации у крыс под влиянием хронической непрерывной нормобарической гипоксии	107
3.1.2 Исследование участия опиоидных рецепторов в механизме реализации кардиопротекторного эффекта хронической нормобарической гипоксии.....	111
3.1.2.1 Влияние хронической непрерывной нормобарической гипоксии на содержание опиоидных пептидов в крови и ткани миокарда крыс	111
3.1.2.2 Зависимость размера инфаркта при коронароокклюзии-реперфузии у крыс, подвергнутых хронической непрерывной нормобарической гипоксии, от активации опиоидных рецепторов ...	115
3.1.2.3 Влияние антагонистов опиоидных рецепторов на показатели сократительной функции миокарда и степень повреждения кардиомиоцитов при ишемии-реперфузии изолированного сердца крыс, подвергнутых воздействию хронической нормобарической гипоксии	119
3.1.2.4 Оценка участия опиоидных рецепторов в реализации цитопротекторного эффекта хронической нормобарической гипоксии	128
3.1.3 Изучение роли сопряженных с опиоидными рецепторами сигнальных систем в реализации кардиопротекторного действия хронической нормобарической гипоксии	136
3.1.3.1 Опосредование тирозинкиназами кардиопротекторного эффекта хронической непрерывной нормобарической гипоксии.....	137
3.1.3.2 Роль PI3-киназы в формировании инфаркт-лимитирующего и цитопротекторного действия хронической непрерывной нормобарической гипоксии	141
3.1.3.3 Участие протеинкиназы С в реализации	

кардиопротекторного влияния хронической нормобарической гипоксии	144
3.1.3.4 Выявление роли NO-синтазы в реализации защитного действия хронической непрерывной нормобарической гипоксии	149
3.1.3.5. Изменение размера инфаркта при коронароокклюзии-реперфузии под влиянием блокады АТФ-зависимых K ⁺ -каналов у крыс после хронической непрерывной нормобарической гипоксии....	153
3.1.3.6 Показатели энергетического метаболизма и функциональное состояние mPTP-пор митохондрий миокарда при ишемии–реперфузии у крыс, подвергнутых хронической непрерывной нормобарической гипоксии	155
3.1.3.7 Влияние антагонистов опиоидных рецепторов на показатели энергетического метаболизма и функциональное состояние mPTP-пор митохондрий миокарда крыс при воздействии хронической непрерывной нормобарической гипоксии	163
Обсуждение результатов главы 3.1	171
3.2 Антиаритмический эффект хронической прерывистой гипобарической гипоксии и его механизмы	188
3.2.1 Влияние хронической прерывистой гипобарической гипоксии на частоту возникновения нарушений ритма сердца и повреждение миокарда у крыс при ишемии и реперфузии	190
3.2.2 Участие опиоидных рецепторов в реализации антиаритмического эффекта хронической прерывистой гипобарической гипоксии	196
3.2.2.1 Изменение содержания предшественников мет-энкефалина и динарфина В в ткани мозга крыс при воздействии хронической прерывистой гипобарической гипоксии	196
3.2.2.2 Зависимость частоты возникновения ишемических и реперфузионных нарушений ритма у крыс, подвергнутых хронической прерывистой гипобарической гипоксии, от активации	

опиоидных рецепторов	198
3.2.3 Участие опиоидных рецепторов в реализации антиадренергического действия хронической прерывистой гипобарической гипоксии при формировании антиаритмического эффекта	198
3.2.3.1 Изменение содержания депонированных в миокарде и надпочечниках катехоламинов под влиянием хронической прерывистой гипобарической гипоксии. Значение опиоидных рецепторов.....	201
3.2.3.2 Влияние антагонистов опиоидных рецепторов на частоту возникновения адреналин-индуцированных нарушений ритма сердца у крыс, подвергнутых хронической прерывистой гипобарической гипоксии	203
3.2.4 Антиаритмическое действие ингибиторов энкефалиназ	205
Обсуждение результатов главы 3.2	208
Заключение	217
Выводы	227
Список сокращений	228
Список использованной литературы	232

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Сердечно-сосудистые заболевания остаются основной причиной смертности трудоспособного населения развитых стран [Чазов Е.И., 2008; Марков В.А. и др., 2011; Braunwald E. et al., 2011; Шальнова, С. А. и др., 2012]. В России гибель населения от болезней системы кровообращения составляет в структуре общей смертности 34% у мужчин и 39% у женщин [Бойцов С.А., Самородская И.В. 2014; Оганов Р.Г., 2002, 2015]. Основной причиной смертности и стойкой утраты трудоспособности у больных кардиологического профиля является ишемическая болезнь сердца, чреватая такими осложнениями как инфаркт миокарда, фатальные аритмии, сердечная недостаточность и гибель пациента [Сыркин А. С. 2003; Winkler C. et al., 2013; Chung H. et al., 2014; Braunwald E. 2015]. Как известно, основными патогенетическими факторами вышеназванных осложнений ишемической болезни сердца (ИБС) служат некроз и апоптоз кардиомиоцитов [Baines С.Р. 2011], поэтому профилактика ишемических и реперфузионных повреждений миокарда остается одной из наиболее актуальных проблем современной патофизиологии и кардиологии.

Предупреждение последствий острой и хронической ишемии миокарда включает в себя тромболитическую терапию, хирургическую и/или эндоваскулярную реваскуляризацию, а также медикаментозное лечение [Марков В.А. и др., 2011; Но Y.C. et al., 2014]. Результаты использования указанных методов в последние десятилетия впечатляют [Braunwald E. 2011; Газарян Г.А. и др., Поляков Р.С. и др., 2014; Чернявский А.М. и др., 2015; Mauri L. et al., 2015; Mega J. L. et al., 2015], однако эффективность традиционных способов лечения остаётся недостаточной [Braunwald E. 2015].

Исходя из вышесказанного, разработку способов повышения естественной устойчивости сердца к ишемии следует признать актуальной.

В 50-х годах прошлого столетия было установлено, что высокая толерантность миокарда к ишемии может быть достигнута с помощью хронического воздействия на организм умеренной гипобарической гипоксии [Кореску М., Daum S., 1958]. Эти данные были подтверждены и дополнены работами отечественного физиолога Ф.З. Меерсона [Меерсон Ф.З., 1986] и ряда

других исследователей [Wang Z., Si L.Y. 2013; Ma H.J. et al., 2014; Zhou J.J. et al., 2015].

В настоящее время ни у кого не возникает сомнений в том, что адаптация организма к изменяющимся условиям внешней среды является фундаментальным свойством живых организмов, изучению которого посвящено большое число научных исследований [Бернар К. 1878; Селье Г. 1960; Гаркави Л.Х. и др., 1990]. В частности, в последние годы внимание широкого круга ученых привлекает формирование адаптационной толерантности сердца к ишемии или стрессу после общего воздействия на организм хронической (более двух недель) умеренной гипоксии [Yuan G. et al., 2008; Wang Z., Si L.Y. 2013; Ma H.J. et al., 2014; Zhou J.J. et al., 2015; Лишманов Ю.Б. и др., 2003; Alanova P. et al., 2015; Waskova-Arnostova P. et al., 2013, 2014; Neckar, J. et al., 2013]. Однако механизмы, лежащие в основе указанного феномена, изучены явно недостаточно.

Исследование адаптации сердца к гипоксии проводится в двух направлениях. Первое из них включает в себя изучение острых и отсроченных реакций сердечно-сосудистой системы на курс гипоксии у здоровых волонтеров или пациентов кардиологического профиля при подъеме в горы или вдыхании воздушной смеси с пониженным содержанием кислорода [Закощиков К.Ф., Катин С.О., 2007; Barnholt K.E. et al, 2006; Pichon A. et al., 2013; West J.B. 2015; Simonson T.S. et al., 2015; Painschab M.S., et al., 2015]. Второй подход состоит в оценке влияния различных режимов адаптации к гипоксии на течение экспериментальных воздействий (коронароокклюзия и реперфузия, стресс, введение адреналина), индуцирующих повреждение миокарда и аритмии у животных [Meerson F.Z. et al., 1973, 1987; Merry T.L. et al., 2010; Milano G. et al., 2010а,б; Borchert G.H. et al., 2011; Wang Z., Si L.Y. 2013; Meng X.Y. et al., 2014; Jain K. et al., 2014; Ma H.J. et al., 2014; Murray A.J. 2015; Zhou J.J. et al., 2015].

В 1994 г в Японии на модели тотальной ишемии изолированного миокарда было впервые показано кардиопротекторное действие хронической нормобарической гипоксии [Tajima M. et al., 1994]. Дальнейшие работы показали, что такой способ адаптации сопровождается развитием выраженного инфаркт-лимитирующего эффекта [Neckar J. et al., 2003; Maslov L.N. et al., 2013]. Однако

механизмы, реализующие формирование адаптационной толерантности сердца к ишемии и реперфузии остаются во многом неясными.

Комплексные исследования процессов, лежащих в основе адаптации, позволили Ф.З. Меерсону, сформулировать положение о, так называемых, стресс-лимитирующих системах, активация которых способна повышать не только общую устойчивость организма к экстремальным воздействиям, но и резистентность сердца к ишемии-реперфузии [Меерсон Ф.З. 1986].

Фундаментальные исследования, проведенные в лаборатории экспериментальной кардиологии НИИ кардиологии Томского научного центра РАМН, показали, что к числу стресс-лимитирующих систем с полным основанием может быть отнесена эндогенная опиоидная система [Маслова Л.В. и др., 1989; Лишманов, Ю. Б. 1986; Лишманов, Ю. Б. и др., 1995; 1996; 1998; Маслов Л.Н. и др. 2001, 2003, 2009; Maslov L.N. et al., 2009, 2010; Ласукова Т. В. и др., 2014]. В пользу такой точки зрения говорят такие факты, как (1) возрастание уровня опиоидов в крови и тканях крыс при адаптации к стрессу [Маслова Л.В. и др., 1989]; (2) уменьшение чрезмерной реакции организма на экстремальные факторы под действием экзогенных опиоидов [Лишманов, Ю. Б. 1986; Лишманов, Ю. Б. и др., 1995; 1998]; (3) наличие кардиопротекторной, инфаркт-лимитирующей и антиаритмической активности у природных и синтетических лигандов опиоидных рецепторов [Лишманов Ю.Б. и др., 1986; Маслов Л.Н. и др. 2001, 2003, 2009; Maslov L.N. et al., 2009, 2010]. Об этом же свидетельствует и увеличение плотности опиоидных рецепторов на мембранах кардиомиоцитов и структур головного мозга у животных, адаптированных к стрессу [Варфоломеев С.О., 1986]. Участие опиоидных рецепторов в формировании кардиопротекторного влияния ишемического пре- или посткондиционирования [Heusch G., 2015; Fraessdorf J. et al., 2015], в том числе и на модели изолированного сердца [Karck M. et al., 2001; Ласукова Т. В. и др., 2014], подтверждает возможную роль опиоидной системы в адаптивных процессах на органном и клеточном уровнях.

В качестве важнейшего звена регуляторных функций организма современная физиология рассматривает каскад передачи сигнала с рецепторов на эффекторные структуры через систему внутриклеточных мессенджеров. В соответствие с этими представлениями, стимуляция опиоидных рецепторов может приводить к

активации внутриклеточного сигнального каскада, включающего в себя тирозинкиназы, PI3-киназу (инозитолтрифосфат-активируемая протеинкиназа), NO-синтазу (синтазу оксида азота), протеинкиназу C, митохондриальные АТФ-чувствительные K^+ -каналы (митоK_{АТФ}-каналы) и mPTP-поры (mitochondrial permeability transition pore) [Маслов Л.Н. и др., 2013]. Можно предполагать, что этот регуляторный механизм опиоидергической регуляции функционального состояния сердца реализуется и при хронической гипоксии. Обоснованность такой гипотезы подтверждается работами, проведенными в 2010-2015 гг. Так, рядом авторов было показано, что хроническая нормобарическая гипоксия вызывает увеличение количества активной формы протеинкиназы C [Holzerova K. et al., 2015], а также гексокиназы и фосфорилированной (активированной) Akt-киназы (киназа, выделенная из AKR thymoma cells) [Waskova-Arnostova P. et al., 2013; 2014], в миокарде экспериментальных животных. Одновременно с этим в кардиомиоцитах происходит активация синтеза противоапоптотических белков, ферментов антиоксидантной системы и энергетического метаболизма [Bohuslavova R. et al., 2010; Waskova-Arnostova P. et al., 2014; Chytilova A. et al., 2015]. Инфаркт-лимитирующий эффект хронической гипоксии не усиливается введением донора оксида азота [Alanova P. et al., 2015], что может косвенно свидетельствовать об участии этого вещества в указанном эффекте. Однако вовлечение этих процессов в реализацию кардиопротекторного эффекта хронической непрерывной нормобарической гипоксии (ХННГ) остаётся недоказанной, поскольку эксперименты с ингибиторами указанных ферментов до настоящего времени не проводились.

Учитывая непреложную роль дисфункции митохондрий в патогенезе повреждений миокарда при ишемии-реперфузии [Borutaite V. et al., 2013], а также участие опиоидов в обеспечении резистентности сердца к этим патогенным воздействиям [Маслов Л. Н. и др., 2009; 2013], целесообразным представляется изучение опосредующей роли опиоидных рецепторов в регуляции функционального состояния митохондрий миокарда при адаптации к гипоксии.

Наряду с некрозом миокарда, известным следствием его повреждения при ишемии и реперфузии является нарушение электрической стабильности сердца. В этой связи следует отметить, что профессором Ф.З. Меерсоном [Meerson F.Z. et al.,

1987] было продемонстрировано и антиаритмическое действие адаптации к гипоксии. Однако рецепторные и внутриклеточные механизмы реализации такого эффекта остаются практически не изученными.

В качестве подобного механизма можно рассматривать снижение активности симпатoadреналовой системы, на что указывает снижение чувствительности β -адренорецепторов миокарда к катехоламинам после адаптации крыс к хронической гипобарической гипоксии [Меерсон Ф.З. и др., 1991; Voelkel N.F. et al., 1981; Guan Y. et al., 2010]. При этом установлено, что опиоиды способны ингибировать выброс норадреналина из симпатических терминалей [Caffrey J.L., 1984; Bali A. et al., 2015; Mercadante S. et al., 2014; Leal A.K. et al., 2013] и экскрецию катехоламинов с мочой при острой ишемии миокарда [Алекминская Л.А. и др., 1986; Лишманов Ю.Б., Кондратьев Б.Ю., 1995]. В связи с этим можно предполагать, что снижение «адренореактивности» миокарда при адаптации к гипоксии связано с активацией опиоидных рецепторов. Однако эта гипотеза остается не подтвержденной.

На основании изложенных фактов нами была выдвинута концепция о том, одним из ключевых механизмов реализации кардиопротекторного, инфаркт-лимитирующего и антиаритмического эффектов адаптации к хронической гипоксии является активация опиоидной системы. Однако рецепторная природа участия опиоидов в формировании этих явлений остаётся неизученной, а локализация опиоидных рецепторов, сигнальные пути и внутриклеточные регуляторные механизмы, опосредующие защитные эффекты адаптации к гипоксии - неизвестными. Отсутствуют веские аргументы в пользу принципиальной возможности регулирования электрической стабильности сердца путём воздействия на уровень опиоидов в крови и тканях. Доказательство этих предположений и является целью настоящего исследования.

Цель исследования:

Изучить роль опиоидных рецепторов и связанных с ними сигнальных путей в реализации адаптационного повышения толерантности сердца к воздействию ишемии и реперфузии

Задачи исследования:

1. Выявить закономерности изменений уровня эндогенных опиоидов в крови и тканях при адаптации крыс к действию хронической гипоксии.
2. Исследовать вклад различных субтипов опиоидных рецепторов в реализацию кардиопротективного и антиаритмического действия хронической гипоксии.
3. Оценить роль сопряженных с опиоидными рецепторами внутриклеточных сигнальных систем в обеспечении кардиопротекции при адаптации к хронической гипоксии.
4. Определить влияние хронической непрерывной нормобарической гипоксии на функциональное состояние митохондрий миокарда в зависимости от активности опиоидных рецепторов.
5. Оценить вклад антиадренергического действия опиоидов в реализацию антиаритмического эффекта хронической прерывистой гипобарической гипоксии.
6. Доказать возможность увеличения устойчивости миокарда к аритмогенным воздействиям при повышении уровня опиоидных пептидов в организме.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Опиоидная система является одним из ключевых звеньев реализации кардиопротекторного действия хронической непрерывной нормобарической гипоксии и антиаритмического эффекта хронической прерывистой гипобарической гипоксии.
2. Кардиопротекторный эффект хронической непрерывной нормобарической гипоксии реализуется через активацию δ_2 - и μ -опиоидных рецепторов мембран кардиомиоцитов и связанных с ними тирозинкиназ, протеинкиназы $C\delta$, iNO-синтазы и митоK_{ATФ}-каналов, а также улучшение энергетического метаболизма митохондрий и увеличение устойчивости mPTP-пор к действию ишемии-реперфузии.
3. Антиаритмический эффект адаптации к прерывистой гипобарической гипоксии опосредуется через активацию экстракардиальных δ -опиоидных

рецепторов и обусловленное этим снижение выброса катехоламинов из надпочечников и симпатических терминалей миокарда.

4. Ингибирование энкефалиназ является перспективным патогенетически обоснованным подходом к разработке новых способов защиты миокарда при ишемии-реперфузии.

Научная новизна исследования. В представленной работе впервые обнаружено участие опиоидной системы в реализации кардиопротекторного действия хронической непрерывной нормобарической гипоксии и антиаритмического эффекта хронической прерывистой гипобарической гипоксии. Абсолютную новизну представляют результаты, показывающие повышение содержания опиоидных пептидов в крови и ткани миокарда у крыс, адаптированных к хронической непрерывной нормобарической гипоксии. Впервые определена рецепторная природа участия опиоидов в реализации кардиопротекторного действия ХННГ и антиаритмического эффекта ХППГ.

При выполнении диссертационной работы впервые выявлено, что в реализации инфаркт-лимитирующего, кардиопротекторного и цитопротекторного эффектов хронической непрерывной нормобарической гипоксии важную роль играет активация тирозинкиназ, протеинкиназы $C\delta$, iNO-синтазы (индуцибельной изоформы синтазы оксида азота), митоK_{ATФ}-каналов, увеличение устойчивости mPTP-пор к действию ишемии-реперфузии и улучшение энергетического метаболизма митохондрий.

Факт того, что антиаритмический эффект адаптации к прерывистой гипоксии при ишемии-реперфузии может быть осуществлен через активацию опиоидных рецепторов и последующее ограничение выхода катехоламинов из надпочечников и симпатических терминалей миокарда, обнаружен впервые.

Принципиально новым явилось обнаружение антиаритмического действия ингибиторов энкефалиназ.

Теоретическая и практическая значимость работы. Проведенное исследование раскрывает новые закономерности формирования защитных эффектов адаптации к гипоксии. В результате исследования разработана и обоснована концепция о взаимосвязи опиоидных рецепторов и внутриклеточных

механизмов в реализации кардиопротекторного действия хронической непрерывной нормобарической гипоксии. Обосновано предположение о зависимости «адреносберегающего» действия при формировании антиаритмического эффекта хронической прерывистой гипобарической гипоксии от активации опиоидных рецепторов. Предложен новый методологический и патогенетически обоснованный подход к разработке эффективных способов защиты миокарда при ишемии-реперфузии - инактивация ферментов катаболизма эндогенных опиоидных пептидов.

По результатам исследования получен патент РФ № 2488404 от 27 июля 2013 г «Средство, увеличивающее устойчивость сердца к ишемическим и последующим реперфузионным повреждениям».

Результаты исследования внедрены в курсы лекций для ординаторов НИИ кардиологии по специальностям кардиология, сердечно-сосудистая хирургия, анестезиология-реаниматология, функциональная диагностика, радиология, детская кардиология; аспирантов по специальностям сердечно-сосудистая хирургия, анестезиология-реаниматология, лучевая диагностика, лучевая терапия, патологическая физиология (Акт внедрения от 20 октября 2015 г).

Методология и методы исследования. Согласно поставленным задачам применены современные высокоинформативные методологические подходы, разработанные в НИИ кардиологии на основании анализа литературных источников. Объектами исследования явились белые конвенциональные аутбредные крысы Вистар, виварий НИИ кардиологии. Основной методический подход - экспериментальные исследования.

Степень достоверности и апробация результатов. Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом материала исследования, использованием современных методов и методологических подходов, высокотехнологического оборудования, адекватных критериев статистической обработки данных. Основные положения диссертации доложены на IV съезде физиологов Сибири (Новосибирск, 2002); VI Сибирском физиологическом съезде (Барнаул, 2008); V всероссийской конференции «Гипоксия, механизмы, адаптация, коррекция» (Москва, 2008), VI Российской

конференции с международным участием «Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция» (Москва, 2011); Российском национальном конгрессе кардиологов (Москва, 2011); V Всероссийской с международным участием школе-конференции Физиология кровообращения (Москва, 2012); конференции «Высокие технологии, исследования, образование в физиологии, медицине и фармакологии» (Санкт-Петербург, 2012); V съезде кардиологов Сибирского Федерального округа «Сибирская наука – Российской практике» (Барнаул, 2013); Российском национальном конгрессе кардиологов «Кардиология: от науки к практике», (Санкт-Петербург, 2013 г); VII съезде кардиологов Узбекистана, «Стратегические задачи снижения сердечно-сосудистой заболеваемости и смертности» (Ташкент, 2015 г.); Юбилейной научной сессии «От трансляционных исследований – к инновационной медицине» посвященной 35-летию ФГБУ «Северо-западный Федеральный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России (Санкт-Петербург, 2015); VI Всероссийской с международным участием школе-конференции «Физиология кровообращения» (Москва, 2016 г).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 26 печатных работ, из которых 21 статья в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ для публикации материалов диссертационных исследований на соискание ученой степени доктора медицинских наук, 3 статьи в международных высокорейтинговых журналах, один патент РФ на изобретение, материал диссертации использован при написании монографии [Лишманов Ю.Б. и соавт. 2003].

Работа проводилась при поддержке следующих грантов:

Грант РФФИ №11-04-98001 «Рецепторные и сигнальные механизмы протекторных эффектов хронической нормобарической гипоксии» (2011 – 2012, руководитель проекта);

Грант РФФИ №12-04-91152-ГФЕН «Молекулярные механизмы адаптационного феномена, вызванного хронической гипоксией» (2012 – 2013, участник проекта);

Грант РФФИ №13-04-98049 «Адаптивный феномен, вызванный хронической нормобарической гипоксией. Рецепторный механизм и сигнальные пути его реализации» (2013-2015, руководитель проекта);

Грант РФФИ №15-54-53003 ГФЕН «Роль опиоидных рецепторов и ассоциированных с ними сигнальных механизмов в позитивных и негативных эффектах адаптации к гипоксии» (2015-2016, участник проекта);

Грант ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2013 годы» государственный контракт от «28» октября 2011 г. № 11.519.11.2028 «Разработка на основе опиоидных пептидов нового лекарственного средства, повышающего адаптивные возможности организма» (2011-2013, участник проекта);

Грант ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009-2013 годы», соглашение на предоставление гранта от «14» ноября 2012 г. г. № 8827, «Разработка нового метода кардиопротекции с помощью гипоксического прекондиционирования» (2012-2013, участник проекта).

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 297 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы. Работа иллюстрирована 45 таблицами, 28 рисунками. Список литературы включает 595 источников (из них 75 отечественных и 520 зарубежных источников).

ГЛАВА 1

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Патогенез повреждения кардиомиоцитов во время ишемии и реперфузии

1.1.1 Основные проявления ишемического и реперфузионного повреждения миокарда

Термин ишемическое-реперфузионное повреждение сердца характеризует совокупность процессов, происходящих в миокарде при нарушении его кровообращения. Это, в первую очередь, повреждение и гибель кардиомиоцитов, сократительная дисфункция, эндотелиальная дисфункция, воспаление и нарушения ритма сердца. «Золотым стандартом» исследований ишемического-реперфузионного повреждения при коронароокклюзии и кардиопротекторных эффектов тех или иных воздействий принято считать оценку соотношения «зона некроза/зона риска» (ЗИ/ЗР), где зоной риска называют зону гипоперфузии в бассейне окклюзированной артерии [Маслов Л.Н. и др., 2013а]. Кроме того, в исследованиях *in vivo* и *in vitro* о степени повреждения судят по изменению параметров сократимости миокарда, выходу в перфузат или инкубационную среду ферментов лактатдегидрогеназы, креатинфосфокиназы или тропонинов [Маслов Л.Н. и др., 2012b; Borchert G.H. et al., 2011; Smith R. et al., 2013].

Исследователи выделяют три основных пути клеточной гибели: некроз, апоптоз и аутофагию [Baines C.P. 2011]. В 1972 году J.E.F.Кегг с соавторами впервые привели описание гибели клеток путем апоптоза, охарактеризовав его конденсацией и фрагментацией хроматина и уменьшением объема клетки [Кегг J.E.F. et al., 1972]. Как показано позднее, гибель клеток при апоптозе происходит путем образования апоптотических телец, которые содержат клеточные органеллы, без повреждения клеточной мембраны. Апоптотические тельца впоследствии фагоцитируются макрофагами, поэтому апоптоз не сопровождается воспалительной реакцией [Orogo A.M., Gustafsson A.B. 2013].

Инициация апоптоза происходит экстраклеточными либо внутриклеточными сигналами. Предполагается, что активация апоптоза внеклеточными факторами связана со стимуляцией TNF α -рецепторов и Fas-рецепторов циркулирующими в крови TNF α или Fas-лигандами, в свою очередь выделяемыми клетками-киллерами [Flaherty M.P. et al., 2008; Roberge S. et al.,

2014]. Fas-лиганды (FasL) представляют собой трансмембранные белки, конститутивно представленные на мембранах макрофагов, Т-лимфоцитов и эндотелиальных клеток [Ham O. et al., 2015]. В условиях активации матриксных металлопротеиназ (ММР-7), что в частности и происходит при ишемии-реперфузии, FasL отделяются от мембран и поступают в кровоток в растворимой (циркулирующей) форме (sFasL) [Musiał K., Zwolińska D. 2011]. В таком виде они становятся доступны для связывания с Fas-рецепторами. Апоптоз-индуцирующие рецепторы на поверхности клетки связаны с FADD - Fas-ассоциированным доменом (**Fas-associated death domain**), через который активируется несколько классов протеаз, из которых наиболее значимой для активации апоптоза является каспаза 8. Эта каспаза активирует эффекторные каспазы 3 и 7, непосредственно осуществляющие разрушение клетки при апоптозе [Zidar N. et al., 2007]. Вместе с тем существуют публикации отрицающие важность экстраклеточного пути запуска апоптоза в регуляции клеточной гибели при ишемии-реперфузии [Kristen A.V. et al., 2013].

В запуске внутриклеточного пути апоптоза ведущую роль отдают балансу про- и антиапоптотических белков. Это семейство белков Bcl-2 (B cell lymphoma 2), которые присутствуют на митохондриальной мембране. Белки этой группы Bax (Bcl-2 associated protein X), Bak (Bcl-2 homologous antagonist/killer), Bad (Bcl-2-associated death promoter), Bid (BH 3 interacting domain death agonist), Bnip3 (E1B 19K/Bcl-2-binding protein Nip3), BH3-only protein Bim являются проапоптотическими, сам Bcl-2, Bcl-xL (B cell lymphoma extra large) и Mcl-1 (myeloid cell leukaemia-1) - антиапоптотическими [Ong S.B., Gustafsson A.B. 2011; Huang C. et al., 2015]. Большинство из них ассоциированы с митохондриями, что указывает на важнейшую роль этих органелл в запуске внутриклеточного пути апоптоза. Увеличение экспрессии антиапоптотических белков или напротив, ингибирование проапоптотических приводит к уменьшению ишемического-реперфузионного повреждения сердца. Недавними работами показано, что в регуляции про-апоптотических факторов принимают участие молекулы микроРНК [Li X. et al., 2015; Liu Q. et al., 2015]. Рядом исследований показано, что изменение баланса про- и антиапоптотических факторов в сторону про-апоптотических приводит к увеличению проницаемости внешней митохондриальной мембраны

путем образования пор регулирующих проницаемость митохондрий (mPTP, mitochondrial permeability transition pore) либо Bax/Bak-пор [Ong S.B., Gustafsson A.B. 2011; Morciano G., et al., 2015]. Образование (открытие) MPT-пор сопровождается проникновением в митохондрии воды, их набуханием, разрывом внешней митохондриальной мембраны, падением трансмембранного потенциала. При этом цитохрома *c* и другие проапоптотические факторы: AIF1 (Apoptosis Inducing Factor - 1), Smac/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspase / Direct IAP Binding protein with low pI), Omi/HtrA2 (high temperature requirement protease A2), могут свободно выходить из митохондрий в цитоплазму. Bax/Bak-зависимое увеличение мембраной проницаемости митохондрий, так же как и в случае образования mPTP-поры, высвобождает цитохром *c* [Gustafsson A.B. 2007]. Цитохром *c* в цитозоле связывается и с адаптерным белком Apaf1 (apoptosis protease-activating factor 1), видоизменяется и образует апоптосому после присоединения молекулы АТФ [Mace P.D., Riedl S.J., 2010]. Далее реакция обретает каскадный характер: присоединение про-каспазы 9 и активация на апоптосоме каспазы 9, за чем следует усиление сигнала каспазами 3 и 7 [Movassagh M., Foo R.S., 2008]. Физиологическим ингибитором каспаз 3 и 7 является X- связанный ингибитор апоптоза (X-linked Inhibitor of Apoptosis protein, XIAP), усиление экспрессии которого ограничивает развитие апоптоза и некроза [Kim S.J. et al., 2011]. Однако в результате увеличения проницаемости митохондриальных мембран через mPTP-пора и Bax/Bak-поры могут выходить не только цитохром *c*, но и другие факторы, которые связывают и ингибируют XIAP. Это Smac/DIABLO и Omi/HtrA2 [Wang K. et al., 2013]. Таким образом, физиологическое торможение реакции апоптоза оказывается заблокированным. Активные каспазы 3 и 7 активируют каспаз-чувствительные ДНКазы (CAD/DFF40, эндонуклеаза G), которые ферментативно разрушают нити хроматина [Li L.Y. et al., 2001].

Ряд исследователей предполагают, что апоптоз на начальном этапе может быть обратим. Однако, по мнению большинства исследователей, при активации каспазы 3 и при падении трансмембранного потенциала митохондрий процесс апоптоза становится необратимым и приводит к гибели клетки [Baines C.P. 2011].

Некротическая гибель кардиомиоцита инициируется разрывом плазматической мембраны с последующим освобождением цитозольных компонентов, и сопровождается воспалительной реакцией [Festjens N. et al. 2006]. Патогенетическими факторами, опосредующие повреждение клеточной мембраны, являются увеличение внутриклеточного содержания ионов Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) [Mattiuzzi A. et al., 2015], чрезмерная выработка активных форм кислорода [Charlagorla P. et al., 2013], запуск перекисного окисления липидов [Cristescu S.M. et al., 2014], активация протеазы калпаина [Potz B.A. et al., 2015] и фосфолипазы А [Yoshikawa Y. et al., 2010]. Эти явления приводят к резкому нарушению ионного баланса, что влечет за собой отек и набухание кардиомиоцитов, приводящий к разрыву сарколеммы [Butler T.L. et al., 2009; Golstein P., Kroemer G. 2007], запуску апоптоза [Martindale J.J., Metzger J.M. 2014], повреждению белков цитоскелета и ионных каналов [Singh R.B., Dhalla N.S. 2010; Pedroso Z. et al., 2010; Shintani-Ishida K. et al., 2011].

В настоящее время третий путь клеточной гибели при ишемии-реперфузии, аутофагия, привлекает все более внимание исследователей. При физиологических условиях аутофагия нацелена на удаление поврежденных органелл, однако при широком распространении процесса аутофагии инициируется гибель клетки [Takagi H. et al., 2007]. Факторами, способствующими инициированию аутофагии при ишемии являются повышение концентрации внутриклеточного кальция [Hoyer-Hansen M. et al., 2007], увеличения уровня АМФ с последующей активацией АМФ-активируемой протеинкиназы [Ma M.Q. et al., 2015]. Центральным триггерным событием аутофагии является активация белков беклин-1 (beclin1) и Atg5 (autophagy-related protein 5) [Takagi H. et al., 2007; Ma X. et al., 2015].

Вклад аутофагии в ишемическое-реперфузионное повреждение остается дискуссионным. С одной стороны сформировалось мнение о благоприятном влиянии инициирования аутофагии при ишемии-реперфузии, об аутофагии как альтернативному, лучшему исходу относительно некроза и апоптоза [Takagi H. et al., 2007]. Сторонники этого мнения приводят в качестве главного аргумента факт усиления повреждения кардиомиоцитов при ингибировании аутофагии [Dosenko V.E. et al., 2006; Kanamori H., 2011]. Кроме того, обнаружено, что ингибирование экспрессии беклина-1, что снижает ишемическую и реперфузионную активацию

аутофагии, приводит к увеличению клеточной гибели [Takagi H et al., 2007]. Эти факты свидетельствуют о благотворной роли аутофагии. Однако, механизмы этого явления до сих пор неясны. Предполагают, что ингибирование аутофагии провоцирует возникновение апоптоза и некроза [Takagi H. et al., 2007]. Наиболее логичным объяснением положительной роли аутофагии при ишемии-реперфузии является более продолжительный периода обратимости процесса аутофагии, чем при формировании некроза или апоптоза; аутофагия, по мнению некоторых авторов не имеет так называемой «точки не возврата», после которой гибель клетки становится необратимой [Takagi H. et al., 2007, Dosenko V.E. et al., 2006; Kanamori H., 2011].

Показано, что путь клеточной гибели зависит от продолжительности ишемии. Так, кратковременная ишемия приводит в большей степени к индукции аутофагии и апоптоза, а длительная инициирует апоптотическую и некротическую гибель клеток без аутофагии [Loos B et al., 2011; Koshinuma S. et al., 2014]. Следует отметить, что ни на одной модели ишемии или ишемии-реперфузии невозможно добиться какого-либо одного типа клеточной гибели, неизбежно возникновение мозаичной картины из клеток, гибнущих по всем трем механизмам. Распределение клеток по типам гибели обычно связано со степенью ишемии в конкретной области. Так, например, распределение TUNEL-позитивных клеток (характерный маркер апоптоза) в зоне инфаркта наблюдается ближе к границам зоны инфаркта, где возможно сохранение некоторого кровоснабжения за счет коллатералей, в то время как в центре зоны гипоперфузии преобладают клетки, погибшие путем некроза [Tavernarakis N., 2007].

Все пути клеточной гибели тесно взаимосвязаны. Единой общей точкой инициирования клеточной гибели является увеличение концентрации ионов кальция (Ca^{2+}) [Hoyer-Hansen M. et al., 2007]. В последнее десятилетие в научной литературе появилось понятие некроптоза как варианта апоптотической гибели клетки [Jouan-Lanhouet S. et al., 2014].

Ишемия и последующая реперфузия миокарда характеризуются рядом симптомов, таких как нарушение сократительной функции миокарда, нарушения ритма сердца, эндотелиальная дисфункция (синдромом невосстановленного кровотока, no reflow), воспаление.

Нарушение сократительной функции миокарда явилось одним из первых патологических феноменов, отмеченных исследователями при острой ишемии-реперфузии [Tennant R., Wiggers C.J. 1935]. Оно проявляется снижением силы сокращения миокарда в систолу [Chung H. et al., 2014], диастолической дисфункцией [Thune J.J., Solomon S.D. 2006] и гемодинамически значимыми изменениями сердечного ритма [Dornbierer M. et al., 2012]. Важно отметить, что снижение сократительной функции сохраняется в течение нескольких часов после восстановления кровоснабжения миокарда [Kloner R.A. et al., 1998]. Это явление получило название «оглушения» миокарда, или «stunned myocardium» [Valdez L.B. et al., 2011]. О значимости контрактильной дисфункции в развитии инфаркта миокарда говорит множество клинических исследований в данной области [Ramos M. et al., 2008; Romero J. et al., 2013]. При этом показатели сократительной функции миокарда используют для оценки эффективности проведения соответствующей терапии [Petersen J.W. et al., 2011].

Основным фактором патогенеза сократительной дисфункции миокарда при острой ишемии-реперфузии признано нарушение кальциевого гомеостаза кардиомиоцитов [Bolli R., Marbán E. 1999]. Наиболее значимый вклад в нарушение сократимости при ишемии-реперфузии вносят три внутриклеточных патологических процесса: Ca^{2+} -перегрузка [Bolli R., Marbán E. 1999], снижение чувствительности миофиламентов к кальцию [Choi Y.H. et al., 2010] и разобщение возбуждения-сокращения по причине дисфункции саркоплазматического ретикулума (СПР) [Kumar S. et al., 2009].

В 80-х годах прошлого века была высказана гипотеза об участии активных форм кислорода (АФК) в развитии контрактильных нарушений при острой ишемии-реперфузии [Myers M.L. et al., 1985]. Эта гипотеза была подтверждена результатами многочисленных исследований, показавших значительное улучшение сократительной дисфункции на фоне применения прямых и непрямых антиоксидантов [Lim C.C. et al., 2009; Zhang X. et al., 2013].

Помимо двух общепризнанных гипотез есть данные об участии в генезе постишемического оглушения миокарда других патофизиологических факторов. Например, недавними работами показана важная патогенетическая роль протеаз (в том числе калпаина), активация которых приводит к разрушению белков

цитоскелета кардиомиоцитов [Takeshita D. et al., 2013]. Эти исследователи выявили значительное улучшение постишемической сократимости миокарда крыс при коронароокклюзии-реперфузии *in situ* на фоне применения селективного блокатора калпаина SNJ-1945 [Takeshita D. et al., 2013].

Нарушения ритма сердца являются одним из наиболее тяжелых проявлений острой ишемии-реперфузии. Частота их возникновения у больных инфарктом миокарда составляет около 20% [Winkler C. et al., 2013], в том числе реперфузионной фибрилляции желудочков (ФЖ) от 1 до 6%. При этом летальность, связанная с ФЖ, составляет 25—30% [Winkler C. et al., 2013].

Аритмии, возникающие на разных сроках ишемии и реперфузии, имеют различные механизмы формирования. Ишемию принято разделять раннюю (1) фазу, когда значительная часть кардиомиоцитов остается жизнеспособной (до 90 минут для человека) и позднюю (2) фазу (более 90 минут), когда в ишемизированном участке преобладают некротические изменения [Ravingerova T. et al., 1995]. Первая фаза в свою очередь подразделяется на 1a (первые 10 минут ишемии) и 1b (10-60 минут) стадии. Нарушения ритма на стадии 1a возникают по механизму «re-entry», в 1b фазу ишемии, позднюю (2) фазу и при реперфузии – как по механизму re-entry, так и при участии эктопического автоматизма [Efremidis M. et al., 2013].

Механизм формирования re-entry связан с задержкой возбуждения кардиомиоцитов в зоне ишемии, в результате чего происходит повторное вхождение одного и того же возбуждающего импульса в один регион и возникновение внеочередного импульса. Это становится возможным из-за нарушения ионного баланса в зоне ишемии [Efremidis M. et al., 2013] и нарушение проводимости межклеточных контактов [Sánchez J.A. et al., 2011]. Кроме того, возникновению re-entry способствует накопление внеклеточного K^+ в ткани миокарда, обусловленное интенсивным его оттоком из клеток во время ишемии и связанная с этим задержка желудочковой проводимости [Ravens U, Cerbai E. 2008]. Одним из наиболее значимых факторов развития желудочковых нарушений ритма является увеличение концентрации ионов Ca^{2+} в кардиомиоцитах, так как многочисленными исследованиями показан антиаритмический эффект блокаторов медленных Ca^{2+} -каналов [Yui H. et al., 2011].

Эктопическая активность кардиомиоцитов возникает в результате спонтанной диастолической деполяризации клеток проводящей системы (помимо синусового узла), которые обладают автоматическими свойствами (специализированные клетки проводящих путей в предсердиях, клетки около устья коронарного синуса и в створках трехстворчатого и митрального клапанов, клетки в нижней части атриовентрикулярного узла, пучок Гиса, обеих его ножек и их разветвлений, клетки сети Пуркинье) [Brooks A.G. et al., 2012]. Под влиянием разных факторов: изменение состава электролитов, рН, метаболитов, нервных импульсов, воспаления, гипоксии в заданной зоне изменяется проницаемость клеток для ионов калия и натрия, вследствие чего повышается степень спонтанной диастолической деполяризации. Механизмами возникновения эктопического автоматизма являются: изменение скорости диастолической деполяризации; изменение порогового потенциала; колебание потенциала покоя (или максимального диастолического потенциала). В результате возникают следующие нарушения ритма сердца: парасистолии, автоматическая пароксизмальная тахикардия, эктопические ускоренные ритмы, аритмии поздней фазы экспериментального ИМ (фаза 2) [Brooks A.G. et al., 2012].

1.1.2. Патогенетические звенья ишемического-реперфузионного повреждения кардиомиоцитов

Недостаток кислорода и энергетических субстратов, возникающий при ишемии, как известно, приводит к нарушению нормального функционирования кардиомиоцитов и их последующей гибели. Основные биохимические изменения, происходящие в клетках сердца при этом можно представить следующим образом: переключение энергетического метаболизма кардиомиоцитов с основного источника энергии в кардиомиоцитах в условиях нормоксии (окисления жирных кислот) на окисление углеводов [Lopaschuk G.D. et al., 2010]; нарушение электролитного гомеостаза клетки из-за дисфункции ионных каналов [Xin W. et al., 2011]; повреждение клеточных структур в результате гиперпродукции активных форм кислорода [Loor G. et al., 2011]; повреждение митохондрий неокисленными жирными кислотами [Rockenfeller P. et al., 2010].

Нехватка кислорода при ишемии обуславливает ингибирование дыхания клетки, что сопровождается быстрым снижением синтеза АТФ за счет окисления жирных кислот и пирувата. Для удовлетворения потребности клетки в макроэргах в условиях ишемии включается синтез АТФ за счёт анаэробного окисления углеводов, восстановление пирувата до лактата ферментом лактатдегидрогеназой, что приводит к накоплению лактата и протонов [Neely J.R., Feuvray D. 1981]. Падение внутриклеточного рН, наблюдаемое при ишемии кардиомиоцита, вызывает компенсаторную активацию Na^+/H^+ -антипортера (NHE1, sodium/hydrogen exchanger), направленную на удаление излишка протонов из клетки. Работа Na^+/H^+ -антипортера в свою очередь приводит к росту внутриклеточной концентрации ионов натрия ($[\text{Na}^+]_i$) [Williams I.A. et al., 2007]. Возрастание концентрации $[\text{Na}^+]_i$ способствует инверсии работы $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -антипортера (NCX, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger) и росту в кардиомиоцитах концентрации внутриклеточного кальция ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) [Namekata I. et al., 2006, Garcarena C.D. et al., 2013; Chen S., Li S. 2012]. Кроме того нарастанию $[\text{Ca}^{2+}]_i$ способствует нарушение работы Ca^{2+} -АТФазы СПР (SERCA2a, sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} atpase 2a) [Shintani-Ishida K., Yoshida K. 2011; Pedrozo Z. et al., 2010; Xin W. et al., 2011] и нарушение работы сарколеммальной Ca^{2+} -АТФазы [Vrbjar N. et al., 1995].

При наступлении реперфузии ионный гомеостаз клетки возвращается в исходное состояние. Однако восстановление достаточного снабжения клетки кислородом приводит к ряду последствий, усугубляющих ишемические повреждения кардиомиоцита в общем и ионный метаболизм в частности. Как было указано выше, внутриклеточный рН во время ишемии понижен, но постепенно восстанавливается во время реперфузии до нормального. Тем не менее, этого повышения оказывается недостаточно, и в начале реперфузии внутриклеточный рН остается сниженным, при этом в цитоплазму продолжает поступать Na^+ за счет обмена H^+ на Na^+ через NHE1 (Na^+/H^+ -exchanger), а избыток Na^+ элиминируется из саркоплазмы Na^+/K^+ -АТФ-азой и NCX в обмен на Ca^{2+} . Это приводит к непродолжительному подъёму $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и возникновению связанных с ним реперфузионных аритмий [Yui H. et al., 2011]. Таким образом, как можно видеть во время ишемии и реперфузии к повышению $[\text{Ca}^{2+}]_i$ приводят несколько патофизиологических путей.

Физиологическим ответом клетки, направленным на компенсацию повышенного содержания ионов $[Ca^{2+}]_i$ в саркоплазме является захват этого иона митохондриями. Ряд исследований свидетельствуют об увеличении уровня митохондриального Ca^{2+} во время ишемии, что обусловлено ингибированием электронно-транспортной цепи, снижением градиента рН и инверсией работы митохондриального протон-натриевого и Na^+/Ca^{2+} -обменников [Namekata I. et al, 2006; Ruiz-Meana M. et al., 2006]. Этот механизм обеспечивает возрастание концентрации $[Ca^{2+}]_i$ в митохондриях.

Транспорт и накопление ионов Ca^{2+} митохондриями позволяет в значительной степени компенсировать кальциевую перегрузку саркоплазмы при ишемии и снижает ишемическое-реперфузионное повреждение [Ruiz-Meana M. et al., 2006; Gomez L., et al., 2015]. Так, показано, что ингибирование захвата Ca^{2+} митохондриями путем блокирования Ca^{2+} -переносчика рутением красным во время ишемии приводит к усилению реперфузионного повреждения кардиомиоцитов [Ruiz-Meana M. et al., 2006]. Однако уровень митохондриального $[Ca^{2+}]_i$ имеет максимум, выше которого его избыток способствует усугублению повреждающего действия ишемии и последующей реперфузии. Этот максимум митохондриального $[Ca^{2+}]_i$ обусловлен наличием в митохондриях особых трансмембранных структур, пор регулирующих проницаемость митохондрий (mPTP) чувствительных к изменению концентрации митохондриального Ca^{2+} [Halestrap A.P., 2010; Morciano G. et al., 2014]. Названные поры mPTP (mitochondrial permeability transition pore) – встроенная во внутреннюю и внешнюю мембрану митохондрий белковая структура, реализующая при строго определенных условиях проницаемость мембран для ионов и некоторых белков [Halestrap A.P., 2010]. В условиях нормоксии и физиологического содержания ионов поры остаются закрытыми [Halestrap A.P., 2010; Morciano G. et al., 2014; Halestrap A.P., Richardson A.P. 2015]. До настоящего времени между исследователями ведется оживленная дискуссия относительно строения mPTP и молекулярная структура mPTP полностью не раскрыта. В данный момент охарактеризованы два основных мембранных компонента mPTP и ряд регуляторных белков, непосредственно связанных с образованием mPTP. Ведущей исследовательской группой, работающей в данной области, признана лаборатория под руководством А.Р. Halestrap из Бристольского

университета Великобритании. Эти ученые обнаружили, что основными мембранно-связанными субъединицами mPTP являются адениннуклеотид-транслоказа (ANT), фосфатный канал [inorganic phosphate carrier (PiC)] [Halestrap A.P., 2010] и предположительно потенциал-зависимый анионный канал VDAC (порин), участие которого в структуре mPTP остается дискуссионным [Krauskopf A. et al., 2006]. Кроме того с mPTP связаны ряд регуляторных белков: циклофилин D (CypD), протеин митохондриального матрикса - мишень для ингибитора mPTP-пор циклоспорина А; гексокиназа II; креатинкиназа; антиапоптотические белки семейства Bcl-2 и проапоптотического семейства Bax, киназа гликоген синтазы-3 β (GKS-3 β), роль которой в регуляции mPTP остается спорной [Halestrap A.P., 2010, 2014].

Считают, что mPTP закрыты в период ишемии и их открытие происходит лишь при наступлении реоксигенации [Halestrap A.P., 2010; Halestrap A.P., Richardson A.P. 2015; Ong S.B. et al., 2015c]. Открытие mPTP способствует входу в митохондрии воды, набуханию митохондрий [Lee G.J. et al., 2011] и ингибированию всех митохондриальных функций. При этом дополнительный выход Ca^{2+} через mPTP в саркоплазму уже перегруженных Ca^{2+} кардиомиоцитов усиливает сократительную дисфункцию [Ruiz-Meana M. et al., 2007]. Образование mPTP ведет к разобщению окислительного фосфорилирования и усугублению энергетического дефицита клетки [Halestrap A.P., 2010]. Наиболее важным событием, следующим за открытием mPTP является выход в цитоплазму цитохрома *c* и белка AIF (apoptosis-inducing factor) [Kroemer G. et al., 2007]. По мнению указанных исследователей, цитохром *c* участвует в формировании апоптосомы, обеспечивающей превращение активацию прокаспазы-9, которая в свою очередь опосредует превращение прокаспазы-3 в каспазу-3. При этом путь гибели клетки, следующий за открытием mPTP напрямую связан с исходным энергетическим статусом клетки, поскольку процесс образования апоптосом помимо проапоптотических факторов требует наличия достаточного количества АТФ и dАТФ [Kroemer G. et al., 2007]. Белок AIF участвует в конденсации хроматина и фрагментации ДНК [Kroemer G. et al., 2007]. Считают, что факт открытия mPTP и падение трансмембранного потенциала митохондрий является

«точкой невозврата», при этом процесс апоптоза становится необратимым [Halestrap A.P., 2010; Halestrap A.P., Richardson A.P. 2015].

В 1991 г W. Nazareth и соавт. первыми провели эксперименты с ингибированием открытия мРТР при экспериментальной коронароокклюзии с помощью циклоспорина А. Было обнаружено, что введение циклоспорина А способствует значимое ограничение размера ишемического некроза при последующей ишемии и реперфузии [Nazareth W. et al., 1991]. Позднее было обнаружено, что уменьшение ишемического-реперфузионного повреждения миокарда, в том числе сокращение размера некроза, наблюдаемое при таких воздействиях как ишемическое пре- и посткондиционирование [Cohen M.V., Downey J.M., 2011], фармакологическое прекондиционирование [Onishi A. et al., 2014], адаптация к прерывистой гипобарической гипоксии в значительной степени связана с замедлением открытия мРТР [Zhu W.-Zh. et al, 2006].

Накопление избыточного количества $[Ca^{2+}]_i$ в саркоплазме во время ишемии приводит к активации Ca^{2+} -зависимых ферментов: нуклеаз, фосфолипаз и протеаз. Активация фосфолипазы А является важным фактором ишемического-реперфузионного повреждения миокарда, вызывая повреждение фосфолипидов мембран [Saito Y. et al., 2012]. В результате активации фосфолипазы С и цистеин-протеазы калпаина, важная роль которых в формировании ишемического-реперфузионного повреждения миокарда продемонстрирована исследованиями с применением селективных ингибиторов этих ферментов [Potz B.A. et al., 2015; Yoshikawa Y. et al., 2010; Zheng D. et al., 2015], происходит инактивация антиапоптотический белка Bcl-xL [Nakagawa T., Yuan J., 2000], повреждение жизненно-важных для кардиомиоцита белков сарколеммальной Na^+/K^+ -АТФазы [Singh R.B., Dhalla N.S., 2010], SERCA2 и рианодинных рецепторов СРР [Pedrozo Z. et al., 2010], фосфоламбана [Shintani-Ishida K. et al., 2011] и белков цитоскелета [Papp Z. et al., 2000].

Генерация активных форм кислорода. Источником АФК в клетке является митохондриальная дыхательная цепь, НАДФН⁺-оксидаза, ксантин-оксидаза и некоторые другие внутриклеточные ферменты [Гривенникова В. Г., Виноградов А. Д. 2013; Guzy R.D., Schumacker P.T., 2006]. В физиологических условиях супероксидный анион-радикал ($O_2^{\bullet-}$) быстро утилизируется супероксиддисмутазами

до перекиси водорода и далее превращается в воду каталазой и глутатионпероксидазой [Гривенникова В. Г., Виноградов А. Д. 2013].

При ограничении поступления кислорода во время ишемии, генерация АФК, как ни парадоксально, не снижается, а возрастает, увеличиваясь по мере продолжительности ишемии [Stewart S. et al., 2009]. Однако большинство исследователей считают более важным событием в ишемическом-реперфузионном повреждении реперфузионный подъем АФК. Так, известно, с началом реперфузии, когда восстанавливается поступление кислорода и процесс дыхания митохондрий, происходит «взрывное» повышение $O_2^{\cdot-}$, способное вызвать повреждение кардиомиоцитов [Loor G. et al., 2011; Chouchani E.T., et al., 2014].

Участие АФК в патогенезе ишемического-реперфузионного повреждения миокарда доказано следующими экспериментами: применение антиоксидантов оказывает выраженный кардиопротекторный эффект при острой коронароокклюзии [Adluri R.S. et al., 2013], ловушка супероксида Mn(II)(4,10-диметил-1,4,7,10-тетраазоциклододекан-1,7-диацетат) повышает выживаемость клеток культуры кардиомиоцитов при аноксии-реоксигенации [Nistri S. et al., 2015]. Более того, свободнорадикальные «ловушки» (scavenger) мелатонин, темпол (имитаторы супероксиддисмутазы) снижают частоту возникновения и тяжесть реперфузионных аритмий [Yang L. et al., 2010], либо отсрочивают момент их наступления [Neckar J. et al., 2008].

Важную роль образования АФК электронно-транспортной цепью в патогенезе ишемических-реперфузионных повреждений показали исследования с применением ротенона и амобарбитала (ингибиторов электронно-транспортной цепи, блокируют передачу электронов с комплекса I на коэнзим Q) при аноксии-реоксигенации кардиомиоцитов *in vitro*. Подобное воздействие привело к снижению выработки АФК и значимому уменьшению повреждения кардиомиоцитов [Chen Q. et al., 2007; Aldakkak M. et al., 2008].

Увеличение продукции свободных радикалов ($O_2^{\cdot-}$ и OH^{\cdot}) вызывает перекисное окисление липидов (ПОЛ), значительно изменяющее свойства и нарушающему целостность мембран клетки [Меньщикова Е.Б. и др. 2006]; открытие mPTP-поры [Loor G., et al., 2011]. Образование пероксинитрита ($ONOO^{\cdot}$) при реакции супероксидного радикала и оксида азота сопровождается активацией

металлопротеиназы MMP-2 [Viappiani S. et al., 2009], что приводит к повреждению тропонина I, легких цепей миозина и белков цитоскелета [Sawicki G. et al., 2005; Chou H.C., Chan H.L. 2014]. Кроме вышеописанных явлений, повышение продукции активных форм кислорода приводит к окислению кардиолипина, протеолитической активации GSK-3 β и индукции TNF α -зависимого пути апоптоза [Shen J. et al., 2006; Viappiani S. et al., 2009; Halestrap A.P.; Kandasamy A.D. et al., 2009].

Резюмируя изложенное, можно сказать, что ишемическое снижение поступления кислорода и элиминации продуктов обмена, в совокупности с последующей реоксигенацией, влекут за собой нарушение метаболизма жирных кислот и ионного баланса, накопление в цитоплазме кардиомиоцитов ионов Ca²⁺, гиперпродукцию АФК, и следующую за этими событиями активацию протеаз, металлопротеаз, фосфолипазы А и С, нуклеаз, возникновение реперфузионной эндотелиальной дисфункции, индукцию воспалительного ответа и нарушения ритма сердца. Все эти события могут приводить к гибели кардиомиоцитов, тип которой предопределяется глубиной и продолжительностью ишемии.

1.2. Кардиопротекторный эффект опиоидов и его механизмы

В организме млекопитающих и человека опиоидная система представлена опиоидными рецепторами, эндогенными агонистами данных рецепторов - опиоидными пептидами, и ферментами, осуществляющими синтез и разрушение опиоидных пептидов [Cox B.M. et al., 2015].

Опиоидные рецепторы были открыты в 1973 г [Terenius L., 1973]. Опиоидный рецептор является липопротеидным комплексом, локализованным в цитоплазматической мембране клетки и характеризуются способностью связываться с L-изомером налоксона [Dhawan B.N. et al., 1996]. Исключением являются ORL1-рецептор (opioid receptor like), который не взаимодействует с налоксоном [Cox B.M. et al., 2015].

Гипотезу о гетерогенности опиоидных рецепторов выдвинул W.R. Martin в 1976 г [Martin W. et al., 1976]. Принято разделять опиоидные рецепторы на 4 основных типа: рецепторы с наибольшим сродством к морфину - μ -OP; рецепторы с наибольшим сродством к эндогенным энкефалинам и их синтетическим аналогам

- δ -OP; рецепторы с наибольшим сродством к динорфину - κ -OP; ORL1-рецепторы взаимодействующие с ноцицептином и не связывающиеся с налоксоном [Cox B.M. et al., 2015].

В миокарде представлены все субтипы OP, которые локализованы как на кардиомиоцитах [Sobanski P. et al., 2014], так и на симпатических нервных терминалях [Barron B.A., 2000].

Открытие эндогенных опиоидных пептидов произошло позже открытия опиоидных рецепторов, в 1975 г Hughes J. и соавторы обнаружили в экстракте головного мозга крыс пентапептиды, которые конкурировали с налоксоном за связь с опиоидными рецепторами [Hughes J. et al., 1975]. Эти вещества были названы мет- и лей-энкефалинами. В настоящий момент известно, что эндогенными агонистами OP являются энкефалины, эндорфины, эндоморфины, динорфины, ноцицептин [Cox B.M. et al., 2015]. Эндоморфины являются селективными агонистами μ -OP, ноцицептин – ORL1-рецепторов, а энкефалины, эндорфины и динорфины могут взаимодействовать с несколькими OP [Cox B.M. et al., 2015]. Энкефалины считают агонистами δ -опиоидных рецепторов, но эти пептиды могут активировать и μ -опиоидные рецепторы, при этом динорфины являются преимущественными κ -агонистами, но обнаружена их способность стимулировать μ - и δ -опиоидные рецепторы [Cox B.M. et al., 2015]. Такая низкая селективность эндогенных лигандов (за исключением эндоморфинов и ноцицептина), по мнению проф. Y. Feng, связана с несколькими факторами: все пептидные лиганды имеют N-терминальную аминокислоту тирамин, которая необходима для связывания с опиоидным рецептором; μ -, δ - и κ -OP имеют значительное сходство по молекулярной структуре и внутриклеточному сигнальному механизму; гетеродимерная трансактивация между опиоидными и неопиоидными рецепторами модифицирует и в значительной степени унифицирует клеточную реакцию в ответ на активацию OP [Feng Y. et al., 2012; Pasternak G.W., Pan Y.X. 2011].

В 90-е годы энкефалины, β -эндорфин, динорфины были обнаружены в миокарде млекопитающих [Ventura C. et al., 1992]. При этом содержание мРНК, кодирующей структуру проэнкефалина, в кардиомиоцитах значительно выше, чем в ткани головного мозга [Denning G.M. et al., 2008]. Более поздние исследования

подтвердили наличие в миокарде мет-энкефалина, бета-эндорфина и эндоморфинов [Maslov L.N. et al., 2013].

Метаболизм эндогенных агонистов ОР включает их синтез из высокомолекулярных предшественников путем посттрансляционного процессинга на мембраносвязанных полисомах эндоплазматического ретикулума [Younes A. et al., 2000]. Эндорфины синтезируются энзиматически при гидролизе проопиомеланокортина, предшественником энкефалинов является проэнкефалин, а динорфины, неоэндорфины и лей-энкефалин образуются из продинорфина [Dhawan B.N. et al., 1996; Martin W. et al., 1976; Younes A. et al., 2000]. Разрушение опиоидных пептидов происходит несколькими ферментами: аминопептидазой N, нейтральной эндопептидазой (энкефалиназой), дипептидилпептидазой-3, карбоксипептидазой А6 и ангиотензин-превращающим ферментом [Thanawala V. et al., 2008; Lyons P.J. et al., 2008]. Указанные ферменты являются потенциальными мишенями для фармакологического увеличения содержания опиоидных пептидов в тканях [Thanawala V. et al., 2008; Poras H. et al., 2015].

Впервые о кардиопротекторном эффекте опиоидов сообщили в 1985 г Г.К. Золоев и соавторы, которые обнаружили, что инъекция лей-энкефалина, мет-энкефалина, β -эндорфина или даларгина снижает активность КФК и ЛДГ в плазме крови крыс при острой коронароокклюзии, что свидетельствует о кардиопротекторном эффекте [Золоев Г.К. и др., 1985]. Эти данные были подтверждены той же группой авторов у пациентов при остром инфаркте миокарда [Золоев Г.К. и др., 1987].

Кардиопротекторный эффект морфина обнаружен на модели острой коронароокклюзии-реперфузии у крыс *in vivo* [Lu Y. et al., 2011] и в экспериментах при ишемии-реперфузии изолированного сердца [Mourouzis I. et al., 2009]. В недавних исследованиях было показано, что введение морфина после завершения операции с применением искусственного кровообращения имитирует посткондиционирование у человека [Zhang R. et al., 2013]. Применение агониста μ - и δ -опиоидных рецепторов даларгина у больных ИБС способствует повышению толерантности к физической нагрузке и вызывает антиангинальный эффект [Маслов Л.Н., и др. 2003, 2004с]. Эти факты способствуют широкому интересу

исследователей к кардиопротекторному эффекту опиоидов [Shen H. et al., 2012; Kim J.M. et al., 2011].

В 1989 году впервые было обнаружено, что агонисты опиоидных рецепторов, проникающие через гемато-энцефалический барьер, способны предупреждать нарушения сердечного ритма, возникающие при введении адреналина [Rabkin S.W. 1989]. Позднее было обнаружено, что при стимуляции периферических ОР может быть достигнут антиаритмический эффект на модели коронароокклюзии-реперфузии [Maslov L.N., Lishmanov Y.B. 1995], происходит повышение порога фибрилляции желудочков при постинфарктном кардиосклерозе [Маслов Л.Н., и др. 2001]. Обнаружено, что антиаритмическое действие опиоидов опосредовано через δ_2 -опиоидные рецепторы [Маслов Л.Н. и Лишманов Ю.Б., 2004a; Maslov L.N. et al., 2009]. В работах 2000-х годов доказано участие центральных κ_1 -опиоидных рецепторов в опиоидергическом повышении электрической стабильности миокарда при кратковременной ишемии и реперфузии [Угдыжекова Д.С. и др., 2001].

Сигнальный механизм кардиопротекторного эффекта опиоидов исследован достаточно широко. Так, принято считать, что активация опиоидных рецепторов через $G_{i/o}$ -белки приводит к ингибированию аденилатциклазы и активации фосфолипазы С [Fujita W., et al., 2014]. Данные о важной роли $G_{i/o}$ -белков были подтверждены в опытах на изолированном перфузируемом сердце с применением морфина [Peart J.N. и Gross G.J., 2011]. Работами последних лет обнаружено, что важным опосредующим звеном между опиоидными рецепторами, сопряженными с ними $G_{i/o}$ -белками и протеинкиназами является трансактивация (гетеродимеризация) ОР с EGFR- рецептором (рецептор к эндотелиальному фактору роста) [Förster K. et al., 2007; Fujita W., et al., 2014].

Упомянутая выше фосфолипаза С, активированная под действием ОР, синтезирует диацилглицеролы, которые являются прямыми активаторами протеинкиназы С [Williams-Pritchard G. 2011]. Установлено, что инфаркт-лимитирующий эффект опиоидов зависит от активации ПКС [Маслов Л.Н. и др., 2009a; Maslov L.N. et al., 2009]. Кардиопротекторный эффект опиоидов при коронароокклюзии-реперфузии предупреждался введением ингибитора Р13-киназы вортманнина [Wu X. et al., 2011]. Следовательно, мы можем предполагать, что Р13-киназа принимает участие в реализации кардиопротекторного эффекта опиоидов.

Однако более позднее исследование показало, что кардиопротекторный эффект морфина при ишемии-реперфузии изолированного сердца может реализоваться без участия PI3K/Akt-киназ [He S.F. et al., 2015].

При изучении механизма кардиопротекторного действия агониста δ_2 -рецепторов дельторфина II, было обнаружено, что антиаритмический и инфаркт-лимитирующий эффект названного пептида *in vivo* не проявляется, если крысе предварительно введен ингибитор NO-синтазы L-NAME [Maslov L.N. et al., 2009]. Проф. J. Pei и соавторы обнаружили, что инфаркт-лимитирующий эффект селективного κ_1 -агониста U-50488 так же не проявляется при блокаде NO-синтазы [Wu X. et al., 2011]. Ряд данных свидетельствуют о возможности участия тирозинкиназ, в частности, Src-киназы в реализации кардиопротекторного и антиаритмического эффекта опиоидов [Fryer R.M. et al., 2001; Maslov L.N. et al. 2009].

В опытах *in vivo* и *in vitro* показана зависимость инфаркт-лимитирующего эффекта морфина от выработки АФК, поскольку опиоид-связанной кардиопротекции при блокаде продукции АФК 2-меркаптопропионил глицином не обнаруживается [Gross G.J., Peart J.N. 2007; Xu J. et al., 2011].

В качестве конечных эффекторов кардиопротекторного действия опиоидов могут выступать mPTP-пора, митохондриальные АТФ-зависимые K^+ -каналы, митохондриальные Ca^{2+} -зависимые K^+ -каналы и транскрипционные факторы. Об этом свидетельствуют следующие факты. Впервые предположение о том, что mPTP-пора может опосредовать кардиопротекторный эффект опиоидов было выдвинуто в 2005 г группой исследователей под руководством проф. T.M. Wong [Сао С.М. et al., 2005a]. Эти ученые моделировали региональную ишемию и реперфузию в эксперименте на изолированном перфузируемом сердце крысы. При этом активация κ -ОР с помощью U-50488 способствовала уменьшению размера инфаркта, снижался выброс ЛДГ в перфузат, отекающий от сердца. Если же этот эксперимент был воспроизведен при добавлении открывателя mPTP-поры аттрактилозида, защитного эффекта U-50488 не наблюдалось. Более поздние исследования подтвердили роль mPTP-поры в кардиопротекторном эффекте опиоидов в экспериментах с морфином [Obame F.N. et al., 2008; Kim J.H. et al., 2011].

В опытах *in vivo*, проведенных под руководством проф. J.M. Pei, в 2009 г [Rong F. et al., 2009] обнаружили, что инфаркт-лимитирующий и антиапоптозный эффекты U-50488 сопровождаются снижением активности каспаз, усилением экспрессии Bcl-2 и снижением экспрессии Bax. Эти же эффекты U-50488 не удавалось воспроизвести при введении блокатора митоK_{ATФ}-каналов 5-гидроксидеканоата. Эти результаты позволяют думать о взаимодействии между митоK_{ATФ}-каналом и mPTP-порой таким образом, что открытие митоK_{ATФ}-канала препятствует открытию mPTP-поры. Подтверждением высказанной гипотезы стали данные о том, что агонист ОР ремифентанил оказывает инфаркт-лимитирующий эффект, усиливает экспрессию Bcl-2 и снижает экспрессию Bax [Kim H.S. et al., 2010]. Резюмируя сказанное, отметим, что в настоящее время исследователи склоняются к мнению о том, что mPTP-пора может быть конечным эффектором в механизме кардиопротекторного действия опиоидов.

Об участии K_{ATФ}-каналов в реализации защитного эффекта опиоидов при ишемии и реперфузии впервые сообщили проф. G.J. Gross и соавт. в 1996 г при исследовании кардиопротекторного эффекта морфина *in vivo* [Schultz J.E. et al., 1996]. Этими авторами было обнаружено, что в условиях блокады K_{ATФ}-каналов глибенкламидом кардиопротекторный эффект морфина не проявлялся [Schultz J.E. et al., 1996]. В экспериментах, проведенных в нашей лаборатории выявлено, что инфаркт-лимитирующий эффект дельторфина-II *in vivo* не обнаруживается после блокады митоK_{ATФ}-каналов 5-HD [Maslov L.N. et al., 2009]. Исследованиями последних лет обнаружено участие K_{ATФ}-каналов в кардиопротекции, индуцируемой широким спектром агонистов ОР [Wang Q. et al., 2014; Wu Y. et al., 2014].

Приведенные данные свидетельствуют о важной роли митоK_{ATФ}-каналов в инфаркт-лимитирующем, цитопротекторном и кардиопротекторном эффектах опиоидов при ишемии-реперфузии миокарда, в то время как вопрос об участии саркK_{ATФ}-каналов продолжает оставаться дискуссионным. Механизм участия K_{ATФ}-каналов в эффектах опиоидов остается неясным. Ряд исследователей полагают, что открытие митоK_{ATФ}-каналов имеет следствием усиление генерации АФК митохондриями, которые путем редокс-сигнализации запускают механизм повышения толерантности сердца к действию ИП [Williams-Pritchard G. et al., 2011].

В 2005 г группой исследователей под руководством проф. Т.М. Wong на модели изолированного сердца крысы, которое было подвергнуто воздействию локальной ишемии и реперфузии [Cao C.M. et al., 2005a], и на модели изолированных кардиомиоцитов, где воспроизводили гипоксию и реоксигенацию [Cao C.M. et al., 2003], было обнаружено, что агонист κ_1 -рецепторов U-50488 способствовал уменьшению индекса ЗИ/ОР и оказывал цитопротекторное действие, но эти эффекты не проявлялись при добавлении ингибитора митоВК_{Ca}-каналов паксиллина [Cao C.M. et al., 2005a]. На основании представленных данных можно с уверенностью говорить об участии митоВК_{Ca}-каналов в реализации кардиопротекторного эффекта опиоидов. В 2005 году Frassdorf J. и соавт. на модели острой коронароокклюзии-реперфузии *in vivo* обнаружили [Frassdorf J. et al., 2005], что введение морфина параллельно с наблюдаемой кардиопротекцией способствует фосфорилированию ингибиторной субъединицы NF κ B, что приводит к активации этого фактора транскрипции. Эти исследования позволяют предполагать транскрипционный фактор NF κ B в качестве одного из конечных эффекторов кардиопротекторного действия опиоидов.

Подводя итог сказанному, важно отметить, что агонисты опиоидных рецепторов обладают выраженными антиаритмическими и кардиопротекторными свойствами при острой ишемии и реперфузии миокарда, воспроизводимой как в исследованиях *in vivo*, так и на изолированном миокарде и кардиомиоцитах. Предполагаемый механизм кардиопротекторного действия опиоидов представлен на рисунке 1. Можно считать установленным фактом, что G_{i/o}-белки являются опосредующей структурой между ОР и протеинкиназами, которые обеспечивают внутриклеточную сигнализацию. В реализации кардиопротекторного эффекта агонистов опиоидных рецепторов принимают участие протеинкиназа C, PI3-киназа, Src-киназа и NO-синтаза. Предполагают, что внутриклеточными мессенджерами для передачи внутриклеточного протекторного сигнала выступают активные формы кислорода, а mPTP-пора, саркK_{ATP}-каналы и митоВК_{Ca}-каналы являются наиболее вероятными претендентами на роль конечного эффектора в опиоидном кондиционировании.

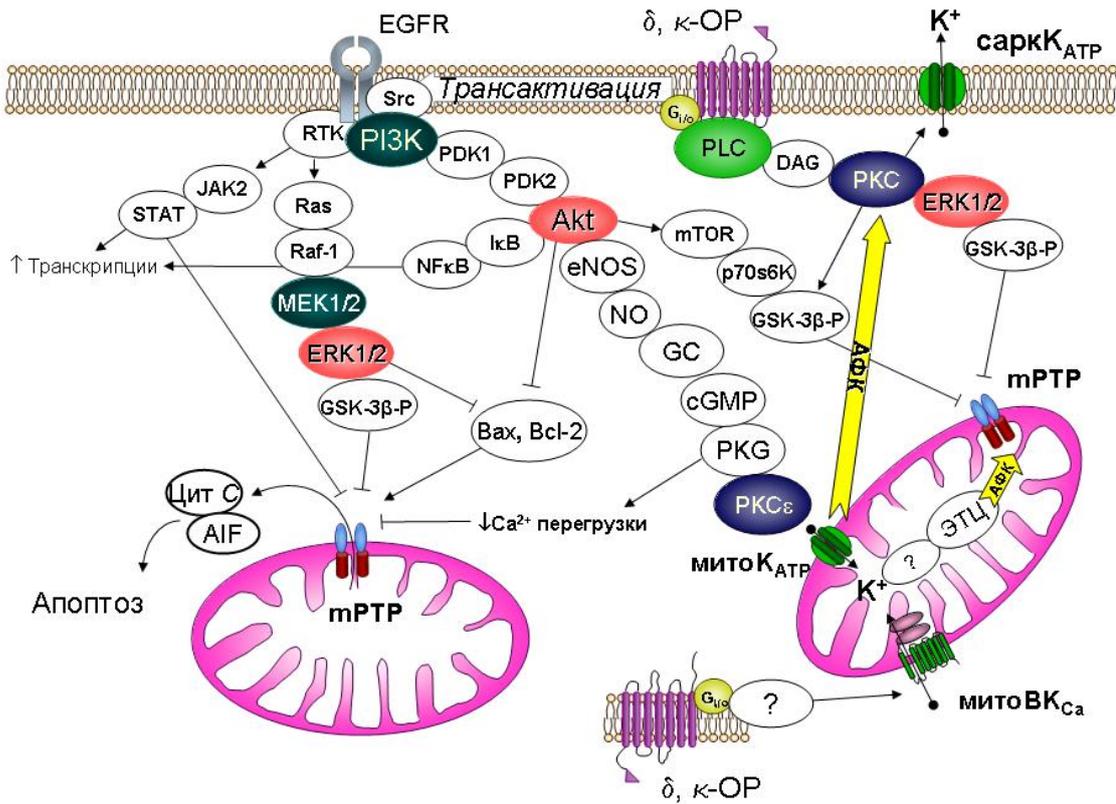


Рисунок 1 – Механизм кардиопротекторного действия опиоидов. Пояснения в тексте.

Примечания: **AIF** – фактор индукции апоптоза, apoptosis inducing factor; **Akt** – киназа, выделенная из **AKR thymoma cells**; **Bax** – Протеин, связанный с **Bcl-2**, **Bcl-2-associated X-protein**; **Bcl-2** – белок, выделенный из **B-cell lymphoma**; **EGFR** – рецептор эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor); **ERK1/2** – киназа, регулируемая внеклеточными сигналами; **GSK-3β-киназа** – киназа гликоген синтазы, glycogen synthase kinase 3β; **ЖАК-киназа** - от **Janus kinase**; **ЖНК-киназа** - c-Jun N-terminal kinase; **МЕК-киназа** - митоген-активируемая протеинкиназа, mitogen-activated protein kinase kinase; то есть киназа митогенактивируемых протеинкиназ, различают изоформы MEK-1 и MEK-2; **mPTP** – mitochondrial permeability transition pore; mTOR – рецептор рапамицина млекопитающих; **NOS** – эндотелиальная NO-синтаза; **p70s6K**– 70-kDA рибосомальная протеинкиназа **s6**; **РДК-киназа** – 3-phosphoinositide-dependent kinase; **РІЗ-киназа** – фосфоинозитол-3-фосфат-киназа; **РКГ** – протеинкиназа G; **РКС** - протеинкиназа C; **Raf-1** – серин/треонин киназа, протонкоген; **Ras** – мембраносвязанная ГТФаза; **РТК** – рецепторная тирозинкиназа; **Src-киназа** - от **sarcoma**; **СТАТ** – фактор активатор транскрипции (signal transduced and activator of transcription), **митокВК_{Ca}** – митохондриальный Ca²⁺-зависимый K⁺-канал большого проведения (big conductance); **митокАТФ-канал** – митохондриальный АТФ-чувствительный K⁺-канал; **ОР** – опиоидные рецепторы; **саркК_{АТФ}-канал** – сарколеммальный АТФ-чувствительный K⁺-канал; **ТК** – тирозинкиназа.

1.3 Неспецифическая (адаптационная) защита миокарда от повреждающего и аритмогенного действия ишемии-реперфузии

Началом изучения неспецифической (адаптационной) устойчивости организма к действию неблагоприятных факторов принято считать классические работы Г. Селье, который еще в 40-50 гг. прошлого столетия сформулировал основные положения адаптационной теории [Selye H., 1952]. В 1958 году чешскими исследователями было обнаружено, что восстановление силы сокращения правого желудочка изолированного миокарда крыс, адаптированных к хронической высокогорной (на «высоте» 7000 м над уровнем моря), происходит эффективнее, чем у неадаптированных животных [Korecky M., Daum S., 1958]. Несколькими годами позже этими учеными был обнаружен факт повышения устойчивости миокарда адаптированных к гипоксии крыс к ишемическому повреждению [Poupa O. et al., 1966]. Эти сообщения впервые показали кардиопротекторный эффект хронической гипоксии. Развитие этого направления исследований получило в СССР в работах советского физиолога Ф.З. Меерсона, которым был установлен сходный защитный эффект при адаптации крыс короткими эпизодами гипобарической гипоксии (по 4-6 ч в день в течение 24-42 дней) [Meerson F.Z. et al., 1973]. Немногим позднее показан антиаритмический эффект адаптации к прерывистой высокогорной гипоксии [Meerson F.Z. et al., 1987]. Уже в 90-е – 2000-е годы получило свое развитие исследование кардиопротекторного действия хронической нормобарической гипоксии, кардиопротекторный эффект которого был впервые обнаружен на модели глобальной ишемии изолированного миокарда в 1994 г [Tajima M. et al., 1994]. Защитный эффект адаптации к стрессу был выявлен в работах под руководством Ф.З. Меерсона [Меерсон Ф. З. и др., 1986]. В следующей главе мы более подробно остановимся на механизмах формирования адаптационной устойчивости миокарда к ишемии.

Вместе с этим, интерес исследователей вызывает состояние резистентности, вызванное не только длительной гипоксией. В 1986 г был открыт феномен гипоксического прекондиционирования [Murrey 1986], большой интерес к которому вызвал новую волну работ по изучению механизмов неспецифической резистентности миокарда к ишемии и реперфузии [Bulluck H, Hausenloy DJ. 2015;

Cai Z. et al., 2013; Churchill E.N. et al., 2010; Cohen M.V., Downey J.M. 2011; Gao C.J. et al., 2012]. В 1992 г профессор Н.Ф. Downey из Техаса впервые предложил использовать для защиты миокарда гипоксическое прекондиционирование [Shizukuda Y. et al., 1992], а в 2003 году был обнаружен кардиопротекторный эффект ишемического посткондиционирования [Zhao Z.Q. et al., 2003]. Кроме того, защитный эффект обнаружен при дистантном пре- и пост-кондиционировании, когда непродолжительная ишемия удаленного органа (конечности) вызывает повышение устойчивости миокарда к ишемическому или реперфузионному повреждению [Andreka G., et al., 2007; Moscarelli M. et al., 2015]. В совокупности весь спектр краткосрочных адаптивных воздействий, включая имитацию этих эффектов некоторыми фармакологическими препаратами, стали называть одним термином «кондиционирование». В связи с этим необходимо кратко остановиться на механизмах кардиопротекции при различных видах кондиционирования и адаптации к продолжительной гипоксии.

1.3.1. Кардиопротекторное действие кондиционирования и механизмы его реализации

В 1986 году американскими исследователями Мьюри и Дженнингсом [Murry S.E. et al., 1986] было обнаружено, что зона некроза (в соотношении к зоне риска), формирующаяся при 40-минутной ишемии и последующей реперфузии миокарда, может быть уменьшена в 4 раза путем предварительной тренировки миокарда 4 сеансами 5-минутной ишемии и 5 минутной реперфузии. Это явление было названо ишемическим прекондиционированием (ИП) и было смоделировано у многих видов млекопитающих, включая человека [Yellon D.M. et al., 1993]. Защитный эффект ишемического прекондиционирования представлен двумя фазами. Ранняя фаза, известная как классическое ИП, наблюдается непосредственно после окончания прекондиционирования и продолжается 2-4 часа. Отсроченная фаза, называемая «вторым окном прекондиционирования», начинается через 12-24 часа после ишемических тренировок и продолжается до 2-3 дней была открыта в 1993 г Marber и соавт. [Marber M.S. et al., 1993]. Классическое ИП реализуется за счет активации имеющихся защитных механизмов, защищая миокард от ишемического-реперфузионного некроза, но не оглушения [Hausenloy D.J., 2013]. Второе окно

ишемического preconditionирования реализуется за счет биосинтеза защитных факторов, в большей степени защищая миокард от оглушения, чем от некроза [Das D.K., Maulik N. 2006].

Ишемическое preconditionирование, так же как и другие виды кондиционирования, вовлекает в свой механизм ряд факторов, условно разделяющихся на три группы: триггеры, медиаторы и эффекторы. Сигнальный механизм ИП окончательно не изучен. Известно, что эпизоды ишемии вызывают выброс таких факторов, как брадикинин, аденозин и опиоиды [Yang X. et al., 2010]. Возможность активации RISK-каскада окситоцином и эритропоезином показана недавними исследованиями [Garg K. et al., 2010; Gonzalez-Reyes A. et al., 2015]. В ранней фазе ИП эти вещества связываются с их специфическими G-белок-сопряженными рецепторами, что приводит к передаче сигнала внутрь клетки [Headrick J.P. et al., 2012]. Выделяют два основных механизма внутриклеточной реализации экстраклеточного сигнала ишемического preconditionирования: RISK (**R**eperfusion-**I**nduced **S**alvade **K**inase), включающий фосфатидилинозитол-3-киназу, Akt-киназу (протеинкиназу B), киназу, регулируемую внеклеточный сигнал (ERK1/2) [Yao H. et al., 2014; Ong S.B. et al., 2015]. Эти киназы активируют киназу гликогенсинтазы-3 β (GSK-3 β), которая ингибирует открытие митохондриальных пор регулирующих проницаемость митохондрий (mPTP) [Gross E.R. et al., 2007a]. Второй путь, именуемый SAFE (**S**urvivor **A**ctivating **F**actor **E**nhancement), включает фактор некроза опухолей- α (TNF- α), JAK-киназу (**J**anus **k**inase), предположительно интерлейкин-6 [Penna C. et al., 2013] и передает сигнал на активатор транскрипции STAT-3 [Suleman N., et al., 2008, Lecour S., 2009]. Реализация этого сигнального пути так же приводит к ингибированию mPTP. В настоящее время поры регулирующие проницаемость митохондрий считают конечным эффектором preconditionирования [Penna C. et al., 2013]. Как уже было указано выше, ее открытие приводит к набуханию митохондрий, снижению продукции АТФ и разрушению митохондриальной мембраны [Halestrap A.P., Richardson A.P. 2015]. Кроме того, активация таких киназ, как протеинкиназа C и протеинкиназа G приводит к активации АТФ-зависимых K^+ -каналов митохондрий, которые так же как и mPTP претендуют на роль конечного эффектора preconditionирования [Hausenloy D.J., 2013]. Митохондриальные K_{ATP} -каналы стали одной из мишеней

для фармакологической имитации прекондиционирования, Mehmood A и соавт. успешно использовали активатор митоK_{ATФ}-каналов диазоксид для прекондиционирования стволовых клеток перед их имплантацией [Mehmood A., et al., 2015].

Механизм формирования протекции второго окна прекондиционирования отличен от механизма раннего ишемического прекондиционирования [Das D.K., Maulik N. 2006]. Стимуляция G-белок связанных рецепторов и сигнальных киназ (протеинкиназы C, G, митоK_{ATФ}-каналов) приводит к активации факторов транскрипции, таких как nFκβ (nuclear factor kappa beta) [Stein A.B. et al., 2007]. Этот транскрипционный фактор вызывает экспрессию белков, способствующих защите миокарда при ишемии-реперфузии [Stein A.B. et al., 2007]. Вместе с тем нельзя обойти вниманием работу Shi Z. и соавт, которые обнаружили, что ингибирование активации фактора nFκβ дегиброксиметилепоксикиномицином уменьшает ишемическое-реперфузионное повреждение трансплантируемого миокарда у мышей [Shi Z. et al., 2014]. Следовательно, вопрос об участии транскрипционных факторах в механизмах реализации ишемического повреждения миокарда или его предупреждения остается недостаточно изученным.

В 1993 году группа исследователей из Лос-Анжелеса в экспериментах на собаках обнаружила, что четырехкратное 5 минутное пережатие обводящей коронарной артерии приводит к значительному уменьшению некроза миокарда при последующем часовом лигировании левой нисходящей коронарной артерии [Przyklenk K et al., 1993]. Это явление получило название дистантное прекондиционирование (remote preconditioning). Более поздние исследования показали, что этот феномен может быть воспроизведен пережатием почечной или мезентеральной артерии, а так же путем пережатия предплечья [Andreka G., et al., 2007; Moscarelli M. et al., 2015]. Последние исследования сделали данный метод возможным для применения в клинической практике. Оказалось, что внутриклеточный механизм формирования дистантного прекондиционирования схож с таковым при классическом прекондиционировании [Moscarelli M. et al., 2015]. Однако остается спорным вопрос о путях передачи протекторного сигнала между прекондиционируемым и органом и миокардом.

Группой ученых под руководством проф. Vinten-Johansen J. из Атланты, США в 2003 году были впервые опубликованы данные, а возможности уменьшения размера реперфузионного некроза тремя циклами 30-секундного пережатия и следующей за ним 30-секундной реперфузии коронарной артерии, которые проводили уже после завершения 60-минутной ишемии в начале реперфузии [Zhao Z.Q. et al., 2003]. Это был первый опыт моделирования ишемического посткондиционирования, который был в последствие воспроизведен на различных видах животных [Pliodromitis E.K., et al., 2006; Xi L., et al., 2008].

Между протекторными механизмами пре- и пост-кондиционирования существует определенное сходство. Так, обнаружены триггерные факторы посткондиционирования – аденозин, брадикинин, опиоиды и их G-белок связанные рецепторы. Показано участие в пост-кондиционировании RISK-киназ, протеинкиназы С и SAFE киназ, NO-синтазы [Shimizu M. et al., 2009; Correa F. et al., 2015]. В качестве конечного эффектора, так же как и при ишемическом прекодиционировании, предполагают митоK_{ATP}-каналы, mPTP и активные формы кислорода [Hausenloy D.J. et al., 2009, Penna C. et al., 2013].

Поиск новых малоинвазивных способов кондиционирования миокарда привел ученых к открытию гипоксического прекодиционирования (ГП). В 1992 году в лаборатории профессора H.F. Downey в Техасе успешно провели кондиционирование миокарда при помощи его перфузии кровью с пониженным содержанием кислорода [Shizukuda Y. et al., 1992]. Оказалось, что подобная перфузия в течение 5-минут и последующая 10-минутная реоксигенация способствуют снижению размера инфаркта при последующей длительной ишемии в 3 раза. Последующие работы показали, что гипоксическое прекодиционирование может быть воспроизведено на культурах кардиомиоцитов и изолированном сердце путем прерывистого гипоксического воздействия, на целом организме – при действии нормобарической или гипобарической гипоксии. В том числе, ГП успешно применено у человека для кондиционирования миокарда перед кардиохирургическим вмешательством [Подоксенов Ю.К., и др. 2009]. Исследователи отметили срочный протекторный эффект ГП (раннее ГП), когда сразу же после воздействия гипоксии и реоксигенации удаётся добиться повышения толерантности к гипоксии [Khoury J. et al 2007; Lukyanova L.D. et al.,

2009], и отсроченный (поздний) эффект ГП, проявляющийся через 16 - 24 ч [Портниченко А.Г. и др., 2007; 2008a]. Для воспроизведения феномена ГП может быть использовано однократное воздействие на организм гипоксии продолжительностью 1 – 6 ч при концентрации кислорода 8 - 10% [Портниченко А.Г. и др., 2007; 2008a;], трёх [Khoury J. et al 2007] или 5 - 6 циклов гипоксии (2 – 10 мин) и реоксигенации (2 – 10 мин) [Lukyanova L.D. et al., 2009; Park A.M. et al., 2007] при концентрации кислорода во вдыхаемом воздухе 8 - 10%.

Доказано, что триггером ГП, так же как и в других способах кондиционирования являются аденозин [Heusch G. 2015]. Показано, что в реализации кардиопротекторного эффекта раннего ГП принимают участие RISK-киназы, такие как ПКС, Р13-киназа, Akt-киназа и NO-синтаза [Beguín P.C. et al., 2007; Портниченко А.Г. и др., 2013]. Отсроченное ГП вызывает протекцию миокарда посредством активации MEK1/2 киназы, ERK1/2, p38-киназы и iNOS [Beguín P.C. et al., 2007; Chen H.P. et al., 2007; Портниченко А.Г. и др.2008a], однако, участие Akt-киназы в позднем ГП не подтверждено [Beguín P.C. et al., 2007]. Возможно в реализации протекторного действия отсроченного ГП участвует транскрипционный фактор HIF-1 α и HIF-3 α [Gao C.J. et al., 2012, Portnychenko A.G. et al., 2008]. В 2007 г Н.Р. Chen и соавт. [Chen H.P. et al., 2007] в экспериментах на изолированных кардиомиоцитах показали, что ГП приводит к двукратному увеличению экспрессии NF κ B, что косвенно свидетельствует об участии этого транскрипционного фактора в защитном эффекте ГП.

В заключение обзора механизмов кардиопротекции при кондиционировании миокарда следует отметить, что исследователи единодушно признают важным событием этих процессов выработку активных форм кислорода. Это показано в многочисленных экспериментах, когда введение антиоксидантов и ловушек свободных радикалов при моделировании кондиционирования «отменяло» его протекторный эффект. Так, в настоящий момент не вызывает сомнения, что активные формы кислорода (АФК) играют важную роль в ишемическом и гипоксическом прекондиционировании [Yellon D.M. и Downey J.M., 2003]. Резюмируя изложенные факты, можно утверждать, что в настоящее время имеются эффективные способы предупреждения ишемического и/или реперфузионного повреждения миокарда, способные сокращать размер некроза в несколько раз.

Раскрытие внутриклеточных механизмов, приводящих к столь эффективной кардиопротекции, является важной задачей современной физиологии.

1.3.2 Механизмы защиты миокарда при адаптации к гипоксии

В данном разделе мы проанализировали имеющиеся данные о механизмах возникновения устойчивости миокарда к продолжительной экзогенной гипоксии. Процесс формирования адаптационной устойчивости организма к этому виду гипоксии традиционно принято разбивать на три последовательных этапа: срочная реакция на снижение содержания кислорода (или его давления) в окружающей среде; переключение с механизмов срочной адаптации на длительную; активация транскрипционных факторов и формирование «структурного следа адаптации». Первая фаза (острая реакция на гипоксию) обеспечивается кислородными сенсорами органного уровня (кислород-чувствительные клетки каротидного тела, легкие, хромафинная ткань надпочечников) и внутриклеточными кислородными сенсорами. Сенсоры органного уровня принимают участие в регуляции гемодинамических показателей, таких как артериальное давление, у особей после хронического гипоксического воздействия [Gao L. et al., 2012].

В настоящее время есть основания полагать, что внутриклеточными кислородными сенсорами являются дыхательная цепь митохондрий, НАДФН-оксидаза, гемоксигеназа, пролил-4-гидроксилаза, митохондриальная моноаминоксидаза и NO-синтаза. С них внутриклеточный сигнал посредством редокс-сигнализации (выработки активных форм кислорода) передается на промежуточные звенья, такие как фосфолипаза C, протеинкиназа C, NO-синтаза и 5'-аденозин монофосфат активируемая протеинкиназа. В результате работы этих ферментных каскадов происходит активация транскрипционных факторов: HIF-1, pFkβ и AP-1 [Semenza G.L.; 2009; Ryan S., 2007], изменение функционирования митохондриальных ионных каналов и mPTP, что приводит к улучшению энергетического метаболизма митохондрий и повышению их устойчивости к апоптоз-индуцирующим факторам. Далее механизмы формирования устойчивости к гипоксии будут изложены подробнее.

Пусковые (триггерные) механизмы адаптации к гипоксии. Кислородные сенсоры. Традиционной моделью взаимодействия вещество-сенсор принято

считать рецептор-лигандную модель. Известно множество медиаторов и соответствующих им рецепторов, благодаря взаимодействию которых осуществляются различные специфические реакции. Однако многие действующие агенты как внешнего, так и эндогенного происхождения, в том числе кислород, специфических рецепторов не имеют. Тем не менее, клеточный ответ на снижение концентрации кислорода формируется. При этом в организме существуют ткани - кислородные сенсоры: каротидные тела, легкие, хромаффинная ткань надпочечников, чрезвычайно чувствительные к гипоксии [Ward J.P., 2008]. Реакция этих тканей на гипоксию формирует срочную реакцию организма: учащение дыхания, активацию симпатической нервной системы, выброс эритропоэтина. В то же время остальные ткани, в том числе ткань миокарда, воспринимают более выраженные изменения уровня кислорода. Внутриклеточный кислородный сенсор должен обладать способностью «чувствовать»/«воспринимать» концентрацию O_2 и вызывать внутриклеточный ответ на изменение уровня кислорода [Acker et al. 2006; Hool L.C. 2014]. В настоящее время предполагают, что в роли кислородных сенсоров кардиомиоцита являются митохондриальная электроннотранспортная цепь, НАДФН-оксидазы, пролил-4-гидроксилаза, гемоксигеназа, митохондриальная моноаминоксидаза и NO-синтаза [Acker T. et al., 2006]. Как можно видеть, все эти ферменты являются гем-содержащими молекулами. Ниже мы подробнее остановимся на анализе информации о кислород-чувствительных внутриклеточных молекулах и их роли в адаптивном повышении устойчивости миокарда к ишемии-реперфузии.

Дыхательная цепь митохондрий. Как уже говорилось ранее, выявлено, что при дефиците кислорода происходит увеличение продукции АФК цитохромами дыхательной цепи митохондрий [Stewart S. et al., 2009]. Поэтому дыхательная цепь митохондрий может претендовать на роль триггера адаптации к гипоксии. Однако, до настоящего времени прямых доказательств участия цитохромов дыхательной цепи в иницировании адаптивных процессов в миокарде не получено. О триггерной роли АФК, выработанных на цитохромах электроннотранспортной цепи митохондрий, судят косвенно, по увеличению образования активных форм кислорода.

НАДФН-оксидаза является вторым по значимости поставщиком АФК в клетке после дыхательной цепи митохондрий. Показано, что при ишемии изолированных кардиомиоцитов происходит увеличение продукции АФК НАДФН-оксидазой [Borchi E. et al., 2009]. Роль НАДФН-оксидазы в защитном эффекте ишемического preconditionирования показана в экспериментах на мышах, нокаутированных по компоненту НАДФН-оксидазы NOX2. Вызвать кардиопротекцию с помощью ишемического preconditionирования у этого клона животных не удалось [Bell R.M. et al., 2005]. Сходные результаты были получены и в случае фармакологического preconditionирования [Das S. et al., 2006a,b]. Можно предположить, что выработка АФК НАДФН-оксидазой сносит определенный вклад в формирование адаптационной устойчивости миокарда к ишемии, однако в настоящее время этот факт остается недоказанным. Для проверки этой гипотезы необходимы эксперименты, в которых адаптацию к гипоксии смоделируют у нокаутированных по NOX2 животных.

Пролил-4-гидроксилаза (PHD, prolylhydroxylase domain). Среди внутриклеточных сенсоров кислорода пролил-4-гидроксилаза (синоним - эглин-1) занимает особое место, поскольку механизм ее способности реагировать на понижение содержания кислорода принципиально отличается от неспецифического реагирования дыхательной цепи и НАДФН-оксидазы. Кислород является субстратом пролил-4-гидроксилазы, поэтому ее можно назвать своеобразным «внутриклеточным рецептором кислорода» [Kaelin W.G. et al., 2008; Semenza G.L., 2014]. В условиях нормоксии, то есть в присутствии кислорода и достаточного количества α -кетоглутарата пролил-4-гидроксилаза расщепляет и инактивирует α -субъединицу фактора транскрипции HIF-1 [Semenza G.L., 2014]. При снижении содержания кислорода пролил-4-гидроксилаза теряет свою активность, α -субъединица HIF-1 транспортируется в ядро, где соединяется с β -субъединицей HIF-1 и обеспечивает изменение транскрипции ряда генов [Semenza G.L., 2009]. Подробнее роль транскрипционного фактора HIF-1 в формировании адаптационной устойчивости миокарда к гипоксии будет изложена ниже. В поддержку предположения о значимой роли пролил-4-гидроксилазы в процессах адаптационной защиты миокарда при ишемии можно привести следующие факты: крысы, гипоморфные по гену *Hif-p4h-2* (кодирующему пролил-4-гидроксилазу),

более устойчивы к действию острой ишемии/реперфузии, чем дикий тип [Hyvarinen J., 2010]. Помимо этого, ингибирование пролил-4-гидроксилазы приводит к уменьшению проявлений апоптоза кардиомиоцитов при острой ишемии-реперфузии [Xie L. et al., 2015].

К сожалению, до настоящего времени прямые доказательства участия пролил-4-гидроксилазы в запуске адаптивных изменений в миокарде при хронической гипоксии не получены.

Митохондриальная моноаминоксидаза (МАО). Впервые об изменении активности моноаминоксидазы при адаптации организма к экстремальным воздействиям сообщили еще в начале 90-х годов [Shatemirova K.K. et al., 1990]. В то время эти факты были истолкованы как изменение адренореактивности миокарда при адаптации к гипоксии. Позже была выявлена способность митохондриального пула МАО к выработке АФК [Ramsay R.R. et al., 1995]. Было обнаружено, образование АФК А-изоформой МАО играет важную роль в повреждении миокарда, вызванном постишемической реперфузией и в дезадаптивных изменениях миокарда при его гипертрофии и сердечной недостаточности [Kaludercic N. et al., 2011; Di Lisa F. 2009]. Недавно выдвинуто предположение об участии этого фермента в ишемическом прекодиционировании [Naumenko S.E. et al., 2010]. Однако, несмотря на имеющиеся данные, доказать участие моноаминоксидазы в запуске адаптационных процессов в миокарде не удалось.

NO-синтаза и оксид азота. При обсуждении механизмов адаптации миокарда к гипоксии, на наш взгляд важно рассмотреть систему «NO-синтаза (NOS) - оксид азота». Оксид азота (NO) является важным регулятором внутриклеточных функций. На сегодняшний момент известно, что NO-синтаза и NO вовлечены в регуляторный каскад RISK-киназ благодаря способности активировать растворимую гуанилатциклазу, что ведет к выработке цГМФ, с последующей активацией протеинкиназы С [Penna C. et al., 2013; Cohen M.V., Downey J.M. 2011]. Следствием этого является NO-зависимая активация митохондриальных K_{ATP} – каналов [Sasaki N.T. et al., 2000] и ингибирование mPTP-пор [Nisoli E.E., et al., 2003; Brookes P.S., et al., 2000]. Являясь низкомолекулярным веществом, NO вовлекается в различные внутриклеточные реакции: в субмикромольных

концентрациях он конкурирует с кислородом за места связывания в двухъядером центре, образованном цитохромом a_3^{2+} и Cu^{2+} цитохромоксидазы, тем самым может ингибировать цитохромоксидазу и регулировать выработку АФК ($O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot}) [Borutaite V. et al., 2013]; оксид азота способен ингибировать сарколеммальные Ca^{2+} -каналы L-типа и саркоплазматические рианодиновые рецепторы путем их S-нитрозилирования [Xu L., 1998]; при переизбытке в клетке супероксид аниона оксид азота образует с ним высокоактивный пероксинитрит, роль которого в механизмах редокс-сигналикации в последнее время привлекает внимание исследователей [Li J., et al., 2013].

К настоящему моменту сложилось устойчивое мнение о позитивном влиянии усиления выработки NO при ишемии-реперфузии [Bolli R. et al., 2001; Alánová P. et al., 2015]. Так, в экспериментах с применением донора NO S-нитрозоглутатиона (GSNO) при 35-минутной ишемии обнаружено, что в этой группе животных восстановление постишемической сократительной дисфункции миокарда происходило достоверно лучше, чем без применения GSNO [Konorev E.A. et al., 1995]. Донор оксида азота молсидомин снизил размер инфаркта при коронароокклюзии-реперфузии в опытах *in vivo* [Alánová P. et al., 2015]. Напротив, при ингибировании NO-синтазы препаратом N ω -nitro-methyl-ester (L-NAME) во время ишемии-реперфузии происходит усугубление сократительной дисфункции миокарда [Pabla R. et al., 1996]. Важная роль NOS в реализации кардиопротекторного эффекта кондиционирования доказана еще в начале двухтысячных годов [Bell R.M., Yellon D.M. 2003; Xi L. et al., 2002].

В настоящее время существует множество работ, демонстрирующих вовлечение NO-синтазы и оксида азота в формирование адаптационных изменений миокарда. В крови у субъектов, подвергнувшихся длительному воздействию высокогорной гипоксии, обнаружено увеличение содержания стабильных метаболитов NO [Доломан Л.Б., 2004; Alánová P. et al., 2015]. В миокарде животных, адаптированных к гипоксии выявлена гиперэкспрессия генов, кодирующих NOS, сопровождающаяся повышением активности этого фермента [Gonzales G.F. et al., 2005; Manukhina E. et al., 1999; Jung F. et al., 2000]. Предварительное введение донора NO (GSNO) животным, прошедшим курс адаптации к хронической гипоксии, не усиливает эффект адаптации в отношении

сократительной функции, в то время как у неадаптированных особей способствует улучшению восстановления инотропной функции миокарда после ишемии-реперфузии [Baker J.E. et al. 1999; Zaobornyj T. et al., 2009]. Этот факт свидетельствует о том, что при хронической умеренной гипоксии активированы молекулярные механизмы, запускаемые оксидом азота. Напротив, применение ингибиторов NOS нивелирует кардиопротекторный эффект у особей, адаптированных к хронической гипоксии, но не влияют на постишемическое восстановление функций у неадаптированных животных [Baker J.E. et al., 1999; Zaobornyj T. et al., 2009; Fitzpatrick C.M. et al., 2005]. Существуют данные, свидетельствующие о экстрамиокардиальных эффектах NO при адаптации к нормобарической гипоксии: содержание крыс 7 дней при 12%O₂ способствует снижению реакции АД и ЧСС на острую 8% гипоксию, и этот эффект оказался NO-зависимым, поскольку не проявлялся на фоне блокатора NO-синтазы [Walsh M.P. et al., 2006]. Интересные данные об участии оксида азота в реализации эффектов гипоксии были получены Индийскими исследователями в 2014 г [Jain K. et al., 2014]. Ими обнаружено, что популяция крыс разделяется по устойчивости к острой гипоксии на высокоустойчивых и низкоустойчивых животных. Эта дифференциация полностью коррелирует с выработкой в организме оксида азота [Jain K. et al., 2014].

Остается открытым вопрос, является ли NO-синтаза триггером адаптации. В пользу этой гипотезы говорит то, что оксид азота, как уже упоминалось выше, участвует в регуляции выработки АФК. Вместе с тем возможность триггерной активации адаптивных процессов в миокарде NO-синтазой сомнительна. Во-первых, при анализе исследования динамики изменений содержания и активности этого фермента можно видеть, что на ранних сроках гипоксического воздействия (24-36 ч) происходит снижение активности NO-синтазы и продукции оксида азота [Ryou M.G. et al., 2008; Ostergaard L. et al., 2007]. Повышение концентрации оксида азота может ингибировать образование фактора транскрипции HIF-1 α , индуцированное гипоксией [Hagen, T. et al., 2003]. Эти факты ставят под вопрос триггерную роль NO в процессах адаптации к гипоксии. Кроме того, не проводилось исследований, напрямую подтверждающих или опровергающих триггерную роль NO-синтазы и оксида азота в процессах формирования протекции

при хронической гипоксии. В связи с этим можно заключить, что NO-синтаза и оксид азота играют важную роль в опосредование уже сформировавшихся адаптационных изменений в миокарде, но, по-видимому, не являются триггером этого процесса.

Известно, что в кардиомиоцитах выделены эндотелиальная (конститутивная) eNOS, индуцибельная iNOS и нейрональная nNOS. В научной литературе существуют различные мнения об участии субтипов NO-синтазы в процессах адаптации к гипоксии. В одних исследованиях обнаружено увеличение активности iNOS при воздействии хронической гипобарической гипоксии [Kolar F., Ostadal B., 2004; Rouet-Benzineb P. et al., 1999], что сопровождается возрастанием синтеза кодирующей её мРНК [Jung F. et al., 2000; Grilli A. et al., 2003]. Другими авторами описано повышение содержания мРНК, кодирующей eNOS, и соответствующий этому подъем активности eNOS при акклиматизации к хронической гипоксии, что приводит к возрастанию в миокарде образования детектируемых нитритов, нитратов и цГМФ [Baker J.E. et al., 1999; Fitzpatrick C.M. et al., 2005]. Авторы вышеприведенных работ предполагают, что изменение содержания NO-синтазы связано с увеличением устойчивости животных к гипоксии. К сожалению, в настоящее время доказательств этому предположению нет, поскольку не проведены эксперименты с селективными блокаторами субтипов этого фермента.

Анализируя проблему участия оксида азота в процессах адаптации нельзя обойти вниманием работы Аргентинских исследователей, по мнению которых важную роль в процессах адаптации к гипоксии играет не только субтип NOS, но и ее внутриклеточная локализация [Zaobornyj T., Ghafourifar P. 2013].

Достаточно давно известно, что NO участвует в реализации различных защитных эффектов адаптации через изменение функционального состояния митохондрий [Nisoli E.E. et al., 2003; Miller M.W. et al., 2013]. Обнаружено, что помимо субсарколеммальной и цитоплазматической локализации eNOS может быть локализована в митохондриях, этот пул NOS получил название митохондриальной NO-синтазы (mtNOS) [Zaobornyj T., et al., 2009]. В последнее десятилетие исследованием этого фермента и его участия в физиологических и патологических состояниях, обусловленных гипоксией, активно проводит объединенная группа аргентинских и перуанских исследователей [Zaobornyj T., et

al., 2009; Gonzales G.F. et al, 2005]. Ими обнаружено, что при адаптации к высокогорной гипоксии (4340 m) на 70% увеличивается активность митохондриальной NOS [Zaobornyj T., et al., 2009; Gonzales G.F. et al, 2005]. Эти результаты позволяют предполагать, что этот фермент играет ключевую роль в формировании кардиопротекторного эффекта адаптации к хронической гипоксии. Однако в отсутствие селективных блокаторов mtNOS не возможно оценить ее роль в адаптационной кардиопротекции.

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 ее различных субтипов остается неясной.

Активные формы кислорода. Внутриклеточное образование активных форм кислорода в последние десятилетия является предметом оживленной дискуссии. В 80-90 годах выработку АФК считали исключительно патологической реакцией, приводящей к повреждению клеточных структур [Меерсон Ф.З. и др. 1981]. Действительно, обнаружено, что АФК выступают важным фактором ишемического повреждения миокарда [Levrant J. et al., 2003] и аритмогенеза [Yang L. et al., 2010]. Применение ловушки свободных радикалов - ROS scavenger (мелатонин) и имитатора супероксиддисмутазы (темпол) снизило частоту возникновения и тяжесть реперфузионных аритмий [Szarszoi O. et al. 2003], замедлило их формирование [Neckar J. et al., 2008]. Введение антиоксидантов оказало выраженный кардиопротекторный эффект при острой коронароокклюзии *in vivo* [Neckar J., et al., 2012] и при ишемии-реперфузии изолированного сердца *in vitro* [Guo H.C. et al., 2009]. Все эти факты свидетельствуют о негативной роли АФК в патогенезе ишемического-реперфузионного повреждения миокарда. Однако мнение ученых изменилось с накоплением знаний о механизмах развития кардиопротекции при кондиционировании миокарда, когда в начале 2000-х годов появилось множество публикаций о том, что АФК могут выступать триггерами ишемического, фармакологического и отсроченного прекодиционирования [Tsutsumi Y.M. et al., 2007; Khanna G. et al., 2008, Yin X. et al., 2012]. Во всех перечисленных исследованиях применение антиоксидантов значительно уменьшало или полностью предотвращало проявление кардиопротекции в ответ на

прекондиционирующее воздействие. В данный момент принято считать, что активные формы кислорода являются важнейшим передаточным звеном сигнальной цепи, опосредующей внутриклеточные реакции в ответ на гипоксию, это явление принято называть редокс-сигнализацией [Sazontova T.G. et al., 2008]. Эффекторным звеном для АФК могут выступать пролил-4-гидроксилаза [Semenza G. et al., 2014; Li Y.N. et al., 2014], фосфолипаза C_γ [Zhong H. et al., 2000], митохондриальные поры регулирующие проницаемость митохондрий [Hallestrap A. et al., 2010], протеинкиназа С и другие [Penna C. et al., 2013].

При исследовании роли АФК в защитных эффектах хронической гипоксии обнаружено, что применение ловушек свободных радикалов предупреждает развитие антиаритмического эффекта при этом адаптирующем воздействии [Szarszoi O. et al., 2003]. В экспериментах *in vitro* добавление ингибитора каталазы аминотриазола в перфузионный раствор маскирует проявление кардиопротекторного эффекта гипоксической адаптации [Guo H.C. et al., 2009]. Эти данные свидетельствуют о ключевой роли АФК как пускового механизма адаптации к гипоксии.

В ответ на массивную генерацию АФК при воздействии гипоксии, активируется система антирадикальной защиты клетки, которая при продолжительной умеренной гипоксии становится одним из основных звеньев неспецифической резистентности организма. Показано, что по окончании серии сеансов гипоксии увеличивается активность супероксиддисмутазы и каталазы, а ингибирование этих ферментов приводит к снижению протекторного эффекта адаптации к гипоксии [Guo H.C. et al., 2009]. Работами исследователей института физиологии г. Прага обнаружено увеличение активности супероксиддисмутазы ($Mn^{2+}SOD$) в митохондриях левого желудочка крыс, подвергнутых хронической прерывистой гипобарической гипоксии [Balková P et al., 2011]. При этом предварительное введение антиоксиданта N-ацетилцистеина предупреждало как увеличение экспрессии $Mn^{2+}SOD$, так и защитный эффект хронической гипоксии. Хроническая нормобарическая гипоксия, подобно ХПГГ, тоже приводит к увеличению содержания $Mn^{2+}SOD$ в миокарде [Chytilová A., et al., 2015]. Другие исследователи обнаружили снижение уровня окислительного стресса и образования конечных продуктов перекисного окисления липидов при ишемии в

миокарде морских свинок, подвергнутых курсу прерывистой гипобарической гипоксии [Guo H.C. et al., 2009]. Следовательно, мы можем говорить об антиоксидантном эффекте хронической гипоксии. Эти и другие многочисленные исследования подтверждают наш предположение о том, что активные формы кислорода по-видимому, играют роль триггеров при адаптации к хронической гипоксии, однако повышение выработки АФК при адаптирующих воздействиях впоследствии компенсируется и подавляется возросшим антиокислительным потенциалом клетки.

В некоторых работах отмечено различие в формировании антирадикальной защиты клетки между двумя методами адаптации к хронической гипоксии. В работах Ф.З. Меерсона показано, что выработка активных форм кислорода играет более значимую роль в формировании кардиопротекции при действии прерывистой гипоксии, чем при непрерывном режиме гипоксической нагрузки [Meerson F.Z. et al., 1992]. Предполагают, что это обусловлено многократным повторением периодов реоксигенации, которые сопровождаются супергенерацией АФК. Работами Ф.З.Меерсона и соавт., которые в последствии были продолжены под руководством проф. Ю.В. Архипенко, показано, что тренировочные сеансы периодической гипоксии увеличивает активность СОД и каталазы во внутренних органах, в то время как в результате непрерывной адаптации к гипоксии в условиях высокогорья снижается активность указанных ферментов антиоксидантной защиты [Меерсон Ф.З. и др., 1992]. Эти данные говорят о возможности реализации адаптационных процессов путем активации разных защитных механизмов. Так, по мнению проф. G. Semenza, при непрерывной гипоксии основным механизмом запуска протективных процессов является активация пролил-4-гидроксилазы, а прерывистая гипоксия опосредует свои эффекты в большей степени через механизм редокс-сигнализации [Semenza G., 2013].

На основании приведенных фактов очевидным является заключение о том, что роль кислородных сенсоров в протекторных эффектах краткосрочной и длительной адаптации к гипоксии исследована недостаточно. Важно отметить, что перечень кислородо-сенсорных систем клетки не ограничен приведенными выше. Изменять свою активность при действии гипоксии могут некоторые ионные

каналы [Hool L.C., 2014]. Однако их участие в механизмах формирования защитных эффектов хронической гипоксии не исследовано.

Киназные каскады, обуславливающие кардиопротекцию при адаптации к хронической гипоксии. Как упомянуто выше, в результате гипоксии происходит активация кислород-сенсорных систем и передача этого сигнала на эффекторные звенья путем редокс-сигнализации. На данный момент известно несколько чувствительных к АФК и другим свободным радикалам ферментов и структур – фосфолипаза C_7 , активируемая при увеличении содержания активных форм кислорода в клетке [Zhong H. et al., 2000], пролил-4-гидроксилаза, активность которой при возрастании АФК ингибируется [Yuan G. et al., 2005], mPTP [Crompton M. 1988] и другие.

Вследствие стимуляции фосфолипазы С активными формами кислорода происходит выработка инозитол 1,4,5,-трифосфата (IP3) и диацилглицерола (ДАГ). Его важную роль в формировании кардиопротекторного эффекта адаптации к гипоксии впервые была обнаружена еще в 1992 г в Институте Общей Патологии и Патофизиологии под руководством Ф.З. Меерсона [Kopylov Iu.N., Meerson F.Z., 1992]. Инозитол 1,4,5,-трифосфат активирует кальций-кальмодулин киназу (CamK), который вместе с диацилглицеролом индуцирует протеинкиназу С (ПКС) и 5'-аденозин монофосфат активируемую протеинкиназу. В свете современных представлений происходит запуск RISK-киназного каскада [Penna C. et al., 2013].

Протеинкиназа С является одним из наиболее важных белков, участвующих в защитных эффектах хронической гипоксии. Регуляторный и каталитический домены ПКС имеют цистеин-содержащие сайты и являются чувствительными для редокс-регуляции [Stabel S. et al., 1991]. Этот фермент активируется в ответ на острую гипоксию через редокс-сигнализацию АФК [Kolár F. et al., 2007] и является ключевым ферментом ишемического прекодиционирования [Churchill E. N. et al., 2010].

Впервые о значении ПКС в защитных эффектах хронической гипоксии сообщили Rouet-Benzineb et al. в 1999 г. Эти исследователи обнаружили увеличение общего содержания и активности ПКС в правом желудочке крыс, адаптированных к нормобарической гипоксии [Rouet-Benzineb P. et al, 1999]. Немногом позже Neckár J. и соавт. сообщили о том, что адаптация к

гипобарической гипоксии увеличивает уровень протеинкиназы С не только в правом желудочке, но и показали увеличение экспрессии и активности этой протеинкиназы и в левом желудочке сердца крыс, адаптированных к гипобарической гипоксии [Neckar J. et al., 2005]. К сожалению, до настоящего времени ведется дискуссия о роли различных субтипов ПКС: одними авторами обнаружено, что гипобарическая гипоксия в режиме 7,000 m - 8 ч/день, с общим количеством экспозиций 24-32 не влияла на ПКС-ε в цитозоле кардиомиоцитов, но экспрессия и фосфорилирование ПКС-δ увеличивались [Neckar J. et al., 2005, Hlavackova M. et al., 2010]. Эти же авторы показали, что блокада δ-субтипа ПКС нивелирует кардиопротекторный эффект адаптации к высокогорной гипоксии [Neckar J. et al., 2005, Hlavackova M. et al., 2010]. Другой группой исследователей обнаружено, что при ингибировании ПКС-ε происходит аннулирование кардиопротекторного эффекта адаптации к нормобарической гипоксии у новорожденных кроликов [Rafiee P. et al., 2002]. Роль ε типа ПКС в изменениях энергетического метаболизма кардиомиоцитов при хронической гипобарической гипоксии недавно обнаружили McCarthy J. и соавторы [McCarthy J. et al., 2011]. Возможно, у разных видов животных в адаптации к гипоксии играют роль разные изоформы ПКС.

Митоген-активируемые протеинкиназы. Митоген-активируемые протеинкиназы (МАПК) представляет собой семейство киназ, которое включает в себя стресс-активируемую протеинкиназу (SAPKs), c-Jun N-terminal киназу (JNKs), p38-МАПК (p38a, p38b, p38c, и p38d изоформы), Akt-киназу и протеинкиназу, регулируемую внеклеточными сигналами (ERKs). В совокупности эти киназы объединены в регуляторный каскад, именуемый RISK-киназами. МАПК могут быть активированы в ответ на различные стимулы, такие как окислительный стресс, активация G-связанных белков, происходящими при ишемии [Michel M.C. et al., 2001; Nishida 2000]. Известно, что RISK-киназы играют важную роль в механизмах ишемического preconditionирования [Heidbreder M. et al., 2008]. Практически для всех киназ этого семейства характерна активация путем фосфорилирования.

В работах Milano G. и соавт. обнаружено, при адаптации к непрерывной нормобарической гипоксии (10%O₂ – 14 дней) содержание активных JNKs и ERKs

не изменяется, однако увеличивается содержание фосфорилированной p38-киназы [Milano G. et al., 2010a]. Авторы сопоставляют подобные изменения с нарушением постишемической сократительной функции и ростом контрактуры миокарда. В случае, если хроническая гипоксия сопровождалась реоксигенацией по 1 часу ежедневно, то напротив, наблюдается повышение фосфорилированных JNKs и ERKs без изменения p38-киназы [Morel O.E. et al., 2006; Milano G. et al., 2010b]. Сходные результаты были получены в ходе независимых исследований, проведенных в Пражском институте Физиологии в 2006-2007 гг. [Strniskova M. et al., 2006; Ravingerová T. et al., 2007]. Оказалось, что при адаптации к хронической прерывистой гипобарической гипоксии в левом желудочке крыс увеличивается фосфорилирование p38-киназы и растворимой фракции Akt-киназы, а фосфорилирование растворимой ERK и JNKs оказалась сниженным по отношению к неадаптированным крысам [Strniskova M., et al., 2006]. Эти результаты позволяют предполагать важную роль p38-киназа и связанного с ней регуляторного каскада RISK-киназ в формировании кардиопротекции при хронической прерывистой гипоксии. Механизмом реализации этого эффекта может быть активация p38-киназой (в составе каскада RISK-киназ) факторов транскрипции HIF-1 и nFk β , как это показано при гипоксическом прекодиционировании [Ryan S. et al., 2007]. К сожалению, в настоящее время каскад RISK-киназ полностью не исследован, остается неясной роль фосфатидилинозитол-3-киназы, Akt-киназы, ERK1/2-киназы, GSK-3 β и конечных эффекторов RISK-каскада mPTP. Исследование киназ SAFE-регуляторного каскада (TNF- α , JAK-киназы, СТАТ-киназ и других) в кардиопротекторном эффекте хронической гипоксии не проводилось.

5'-аденозин монофосфат активируемая протеинкиназа является чувствительным звеном редокс-сигнализации. АМПК - 5'-аденозин монофосфат активируемую протеинкиназу считают неспецифическим звеном реакции клетки на гипоксию. Этот фермент может быть активирован кальций-кальмодулин киназой (CamK) при участии активных форм кислорода [Emerling V.M. et al., 2009; Wong A.K. et al., 2009], так и по независимому от АФК механизму [Merry T.L., 2010]. Механизм действия АМПК заключается в фосфорилировании альфа субъединицы гамма рецептора коактиватора пероксисомного активатора пролиферации (PGC-1 α), играющего важную роль в регуляции митохондриального дыхания [Jager S. et

al., 2007 Ramjiawan A., et al., 2013]. Следствием его фосфорилирования является поддержание высокого уровня дыхания митохондрий при ишемии [Athea Y. et al., 2007]. Включение AMPK в RISK-киназный каскад происходит через активацию eNOS. Обнаружено, что фармакологическое увеличение активности AMPK уменьшает повреждение миокарда при ишемии и реперфузии [Calvert J.W. 2008], способно предупреждать гипертрофию миокарда при тяжелой хронической гипоксии [Chan A.Y.M. et al., 2008], повышать устойчивость клеток в культуре к окислительному стрессу и хронической гипоксии [Hwang J.-T. et al., 2008]. При этом блокада AMPK усиливает гибель клеток при гипоксии [Borger D.R. et al., 2008]. Выявлено, что AMPK опосредует кардиопротекторный эффект ишемического preconditionирования, вовлекая в механизм своего действия сарколеммальные K_{ATP} -каналы [Sukhodub A. et al., 2007]. Гипотеза о важной роли AMPK в механизмах неспецифической резистентности подтверждена данными о том, что у нокаутированных по компонентам AMPK мышей preconditionирование смоделировать не удастся [Sukhodub A. et al., 2007]. Исследование роли этого фермента в процессе адаптации к хронической гипоксии реализовано работами на культуре раковых клеток, в которых показано повышение активности AMPK через 8-16 дней гипоксии [Borger D.R., et al., 2008].

Активация AMPK кардиомиоцитов связана с увеличением экспрессии гена и повышением выработкой этими клетками фактора миграции макрофагов. Эти данные были получены при хронической гипоксии, наблюдающейся при цианотических пороках сердца [Jian Z. et al., 2009]. Поскольку известно, что MIF регулирует фактор транскрипции HIF-1 [Oda S. et al., 2008], можно предположить его важную роль в процессах адаптации к хронической гипоксии. Однако до настоящего времени однозначного подтверждения этим предположениям не получено.

Митохондриальные АТФ-чувствительные K^+ -каналы и mPTP. Одним из претендентов на роль эффекторного звена кондиционирования и адаптации к хронической гипоксии принято считать митохондриальные АТФ-чувствительные K^+ каналы (мито K_{ATP} -каналы) [Zhu H.F. et al., 2003; Zhu W.-Zh. et al., 2006]. Обнаружено, что при воздействии хронической гипоксии происходит активация K_{ATP} -каналов в различных органах и тканях [Cameron J.S., Baghday R. 1994].

Умеренная хроническая гипоксия вызывает усиление продукции белка регуляторной субъединицы K_{ATP} -каналов SUR2A и плотности этих каналов на мембранах кардиомиоцитов [Crawford R.M. et al., 2003]. Невозможность воспроизведения кардиопротекторного и антиаритмического эффектов адаптации к гипоксии на фоне блокады K_{ATP} -каналов напрямую свидетельствует об их важной роли в адаптационной кардиопротекции [Neckář et al. 2001, 2002b, Zhu et al. 2003, Нарыжная Н.В. и др., 2009]. Большинство исследователей указывают на митохондриальный пул K_{ATP} -каналов в качестве эффектора кардиопротекторного эффекта. Так, в исследованиях группы ученых из института физиологии Чешской АН (г. Прага) показано, что при селективной блокаде мито K_{ATP} -каналов 5-гидроксидеканоатом улучшение постишемического восстановления сократимости миокарда, характерное для адаптации к хронической гипоксии, не проявляется [Neckář et al. 2002b]. Сходные результаты получены при изучении размера зоны ишемического некроза у крыс при адаптации к гипобарической гипоксии: антиаритмический эффект этого адаптирующего воздействия не проявлялся при введении блокатора K_{ATP} -каналов [Нарыжная Н.В. и др. 2009; Neckář et al. 2002b]. Эти данные подтверждены другими исследователями [Zhu et al. 2003]. Известно, что применение селективных активаторов мито K_{ATP} -каналов диазоксида или BMS-191095 способно уменьшать сократительную дисфункцию миокарда и размер зоны инфаркта, но этот эффект наблюдается только у неадаптированных крыс [Matejíková J. et al., 2010]. При этом указанный эффект не суммируется с кардиопротекторным действием адаптации к хронической гипоксии [Neckář et al. 2002]. Этими же исследователями было обнаружено, что диазоксид не проявляет своих антиаритмических свойств у адаптированных к гипоксии крыс [Neckář et al. 2002]. Все эти данные свидетельствуют о важной роли ATP -чувствительных K^+ -каналов митохондрий в формировании защитных эффектов хронической гипоксии.

Механизмы, приводящие к активации мито K_{ATP} -каналов в миокарде при хронической гипоксии остаются малоизученными. Наиболее вероятным является активация этих каналов протеинкиназой С [Huh J. et al., 2001; Neusch, G. 2015]. Активация мито K_{ATP} -каналов при адаптации к гипоксии приводит к увеличению устойчивости пор регулирующих проницаемость митохондрий (mPTP), при этом мессенджером в этой реакции выступают активные формы кислорода. О важной

роли МРТ-пор в процессе адаптации свидетельствуют данные Rudyk O.V. et al., 2004 и Zhu W.-Zh. et al., 2006, показавших отсутствие кардиопротекторного эффекта адаптации к гипобарической гипоксии на фоне активатора mPTP аттрактилозида [Rudyk O.V. et al. 2004; Zhu W.-Zh. et al. 2006].

Ca^{2+} -зависимые K^+ -каналы митохондрий (BK_{Ca}). Открытие пор, регулирующих проницаемость митохондрий (mPTP), может ингибироваться Ca^{2+} -зависимыми K^+ -каналами митохондрий (BK_{Ca}). Впервые кардиопротекторный эффект при активации BK_{Ca} обнаружен в 2002 году [Xu W. et al., 2002]. Эти K^+ каналы активируются цАМФ-зависимой протеинкиназой А [Sato T. et al., 2005] и их открытие сопровождается входом K^+ в митохондриальный матрикс, увеличением его объема, ускорением окислительного фосфорилирования, подъемом трансмембранного потенциала [Stowe D.F. et al., 2006].

Обнаружено, что активатор BK_{Ca} каналов NS-1619 имитирует кондиционирование [Cao S.M. et al. 2005b, Stowe D.F. et al., 2006], при этом эффект реализуется через активные формы кислорода [Borchert G.H. et al., 2013] и ингибирование образования mPTP [Cao S.M. et al. 2005b]. Выявлена важная роль BK_{Ca} каналов в процессах ишемического preconditionирования [Cao S.M. et al. 2005b]. Возможно, это связано с обнаруженным повышением выработки АФК активированной дыхательной цепью митохондрий при увеличении входящего K^+ тока, обнаруженное в условиях открытия BK_{Ca} [Stowe D.F. et al., 2006].

Недавними исследованиями, проведенными на изолированных кардиомиоцитах, показано, что ингибитора BK_{Ca} каналов, добавленный в инкубационную среду клеток животных, предварительно адаптированных к хронической нормобарической гипоксии, устраняет цитопротекторный эффект последней [Borchert G.H. et al., 2010]. Эти исследования дают бесспорные доказательства важной роли BK_{Ca} каналов в формировании повышенной адаптационной устойчивости миокарда к ишемии.

При исследовании механизмов устойчивости миокарда к ишемии-реперфузии под влиянием хронической нормобарической гипоксии обнаружено, что адаптация крыс к хронической нормобарической гипоксии вызывает увеличение содержания в миокарде фактора некроза опухолей ($\text{TNF}\alpha$), а ингибирование $\text{TNF}\alpha$ с помощью моноклональных антител приводит к «отмене»

инфаркт лимитирующего действия хронической гипоксии [Chytilová A. et al., 2015]. Эти данные на первый взгляд выглядели парадоксальными, поскольку известно о значимой роли $TNF\alpha$ в запуске внеклеточного механизма апоптоза [Flaherty M.P. et al., 2008]. Однако недавними исследованиями показана дифференцировка рецепторов TNF-рецепторов на 1 и 2 типы, стимуляция первого вызывает активацию апоптоза, а активация второго типа TNFR способствует выживаемости кардиомиоцитов при ишемии-реперфузии [Schulz R., Heusch G. 2009, Katare R.G. et al. 2010]. В соответствии с этим в работе Chytilová A. с соавторов (2015) обнаружено увеличение экспрессии гена, кодирующего рецептор TNFR2 в миокарде крыс, подвергнутых ХННГ [Chytilová A. et al., 2015].

Транскрипционные факторы. Как мы уже упоминали выше, процесс адаптации к условиям гипоксии можно разделить на 3 последовательных этапа. 1 этап – острая реакция на гипоксию, активация кислород чувствительных клеток каротидного тела, реакция ВНС, увеличение ЧСС, АД, стресс-реакция. Внутриклеточные реакции острой реакции на гипоксию включают перестройку с окисления жирных кислот на гликолиз, закисление саркомлазмы, увеличение внутриклеточного Ca^{2+} , повышение выработки АФК. Второй стадией реакции кардиомиоцита на гипоксию можно условно считать запуск регуляторных киназных каскадов, обеспечивающих неспецифическую защиту клетки: ПКС, МАП-киназы, ЕРК-киназы, NO-синтазы. Третья стадия характеризуется изменением транскрипционной активности кардиомиоцитов, происходящей под влиянием белков в совокупности именуемых «факторами транскрипции».

Стартом для развития этой области исследований явилось обнаруженное еще в 1969 выдающимся Советским физиологом Ф. З. Меерсоном увеличение биосинтетической активности миокарда в ответ на хроническое воздействие умеренной гипоксии. Еще в те далекие времена Феликс Залманович предположил важную роль этих процессов в кардиопротекции, сопровождающей гипоксическую адаптацию [Меерсон Ф.З. 1993]. Изучение этой проблемы активно ведется с тех пор и по настоящее время [Kumar G.K., 2008; Semenza G.L., 2013].

К сегодняшнему моменту известно множество факторов-активаторов транскрипции. Следует остановиться на некоторых из них, активация которых происходит в ответ на гипоксию. Это гипоксия-индуцируемые факторы семейства

HIF (hypoxia inducible factor), nFк β (nuclear factor kappa beta) и GATA [Semenza G.L. 2009; 2013, Ryan S., 2007; Greenberg H., 2006 Yuan G., 2004].

Первое сообщение о транскрипционном факторе HIF было опубликовано в 1993 г Wang G.L. и соавт., обнаружившими в экспериментах на культуре клеток Hep3В индукцию транскрипции эритропоэтина под воздействием белка HIF-1 [Wang G.L., Semenza G.L., 1993]. В настоящий момент изучено 3 представителя семейства транскрипционных факторов HIF. Наиболее исследован HIF-1.

HIF-1 состоит из двух субъединиц - HIF-1 α и HIF-1 β , именуемой так же ARNT (Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator). В условиях нормоксии α -субъединица HIF-1 гидроксيليруется кислород-чувствительным ферментом пролил-4-гидроксилазой (PHD) по остаткам пролила в положении Pro402 and Pro564, гидрокселированные участки распознаются и связывается белком pVHL (von-Hippel Lindau tumor suppressor) [Wolff M. et al., 2013], что приводит к протеосомальному расщеплению HIF-1 α [Semenza G.L. 2013]. Регуляция HIF-1 α осуществляется пролил-4-гидроксилазой (инактивирует HIF-1 α) [Semenza G.L. 2009, Yuan G., 2005, 2008], трансляция HIF-1 α может быть стимулирована MAP-киназным каскадом и RISK-киназным каскадом через активацию p70 S6 киназы (p70S6K) и блокирование eIF-4E связывающего белка рибосом, транслирующим HIF-1 α [Zhang Q.L. et al., 2013, Semenza G.L. 2009]. Показана активация HIF-1 протеинкиназой С [Yuan G. et al., 2008], которая помимо этого может напрямую ингибировать фермент, разрушающий HIF-1 - пролил-4-гидроксилазу [Yuan G. et al., 2005].

До недавнего времени β -субъединицу HIF-1 считали конститутивным белком, однако исследованиями последних лет обнаружено, что содержание HIF-1 β в клетках в условиях гипоксии снижено [Wolff M. 2009]. Однако роль этих изменений в патофизиологических либо защитных эффектах хронической гипоксии в настоящий момент не исследована.

При хронической непрерывной гипоксии пролил-4-гидроксилаза неактивна вследствие отсутствия ее основного субстрата – кислород; α -субъединица HIF-1 транспортируется в ядро, где соединяется с β -субъединицей HIF-1 и образовавшийся комплексный белок обеспечивает изменение транскрипционной активности миокардиального генома [Semenza G.L. 2009]. В случае прерывистой

хронической гипоксии HIF-1 регулируется активными формами кислорода и протеинкиназой С как напрямую [Semenza G.L. 2009], так и через ингибирование пролил-4-гидроксилазы [Yuan G. et al., 2005].

В настоящий момент выявлено более 100 генов, регулируемых HIF-1 [Semenza G.L. 2009]. В условиях адаптации к гипоксии HIF-1 регулирует транскрипцию следующих генов: VEGF (vascular endothelial growth factor), гемоксигеназы-1, эритропоэтина и его рецепторов; в левом желудочке: миозина (при этом усиливается транскрипция фетальной формы этого белка и супрессируется взрослая форма), кальмодулина и Ca-кальмодулинкиназы; JNKs (c-Jun N-terminal kinase); Akt-киназы; фетальной формы транспортера монокарбоксилатов (MCT); лактатдегидрогеназы; фетальной формы транспортера глюкозы (GLUT1); натрийуретического фактора предсердий [Yang C et al., 2014]. Известно о HIF-1-зависимом увеличении транскрипции iNOS в миокарде адаптированных к гипоксии крыс [Jung F. 2000].

Обнаружено, что HIF-1 участвует в формировании защитного эффекта ишемического preconditionирования [Cai Z. et al., 2013]. О важной роли HIF-1 в процессах адаптации говорят следующие факты: у гетерозиготных мышей с дефицитом по HIF1a не образуются ROS в ответ на хроническую прерывистую гипоксию [Peng, Y. J. et al., 2006], адаптивное увеличение транскрипции iNOS не возникает у мышей с делецией или мутацией по HIF1a [Jung F. 2000].

Nuclear factor kappa beta. Транскрипционный фактор нФкβ был открыт в конце 80-х годов как фактор, стимулирующий экспрессию иммуноглобулина В-лимфоцитами [Sen R., et al., 1986]. Представляет собой димер из двух молекул, находящийся в цитоплазме в неактивной форме. Активируется при фосфорилировании ингибирующей нФкβ субъединицы, что происходит в ответ на гипоксию, образование АФК, активацию ПКС, MAPK киназ, цитокинов [Valen G. et al., 2001]. Обнаружено, что нФкβ стимулирует транскрипцию генов COX-2 (циклооксигеназы-2); ICAM-2 (молекула межклеточной адгезии-2); интерлейкинов; индуцибельной NO-синтазы; TNF (фактора некроза опухолей); VCAM-1 (молекула адгезии сосудистых клеток-1). Подобные свойства нФкβ стимулировать транскрипцию факторов иммунного ответа, по-видимому, обуславливают его участие в реализации воспаления в миокарде при ишемии-реперфузии [Fitzpatrick

S.F., et al., 2011]. Вместе с тем обнаружено, что nFκβ опосредует повышение выживаемости кардиомиоцитов при ишемии, обусловленное ишемическим прекондиционированием [Heusch G. 2015], принимает участие в ранней и поздней фазе ишемического прекондиционирования [Zhao T.C., Kukreja R.C. 2002], участвует в отсроченном прекондиционировании, вызванном анестетиками [Qiao S. et al., 2013]

Интересные данные получены исследователями из Дюссельдофа (Германия). Они обнаружили, что отсроченное прекондиционирование, вызванное морфином, сопровождается усилением фосфорилирования ингибитора nFκβ, что соответствует увеличению активной формы nFκβ [Frassdorf J. et al., 2005].

В качестве механизмов влияния nFκβ на процессы формирования устойчивости миокарда к ишемии и последующей реперфузии можно предположить его способность активировать транскрипцию белков-ингибиторов апоптоза: IAP-1 (inhibitor of apoptosis protein-1) и XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) [Erl W. et al., 1999].

Прямых данных о роли nFκβ в формировании кардиопротекторного эффекта хронической гипоксии обнаружить не удалось. В работе Chytilová A. и соавторов указывается лишь на повышение экспрессии nFκβ в миокарде крыс после проведения хронической непрерывной гипоксии в течение 21 дня [Chytilová A. et al., 2015]. Несмотря на это, в обзорных статьях этот фактор указывается среди прочих, опосредующих плеiotропные эффекты хронической гипоксии. Это предположение выглядит обоснованным, учитывая имеющиеся факты о стимулировании nFκβ ангиогенеза при ишемии миокарда [Sasaki H., et al., 2001] и опосредование этим транскрипционным фактором эффектов SAFE-киназ [Gu Q. et al., 2011].

GATA-4. Транскрипционный фактор GATA-4 был найден в 1986 в эритроидных клетках куриных эмбрионов, затем в 1988 г обнаружен в эритроидных клетках человека [Evans T. et al., 1986]. Доказано, что белки семейства GATA играют регулируемую роль при формировании миокарда в онтогенезе. GATA-4 является цинк-содержащей молекулой, его принято считать одним из эффекторных звеньев реакции клетки на гипоксию. Активность GATA-4 регулируется АФК, ионами Ca^{2+} и эритропоэтином через RISK-киназный каскад

[Yuichiro J. et al., 2011; Jun J.H. et al., 2014]. В результате активации GATA-4 происходит увеличение экспрессии ангиотензиновых рецепторов IIa типа, тяжелых цепей бета-миозина, тропонинов, $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ обменника, натрий-уретического фактора предсердий, мозгового натрий-уретического фактора, эндотелина-1.

В 2004 году группа ученых из медицинского центра Джорджтаунского университета Вашингтона (США) обнаружила увеличение связывания GATA-4 в миокарде после ишемического preconditionирования [Suzuki Y.J. et al., 2004]. Немного позже в экспериментах с прерывистой гипоксией (5 циклов по 2 мин от 10 до 21% O_2) выявлено возрастание активности GATA-4 и транскрипции генов антиапоптотических белков Bcl-2 and Bcl-xL у кондиционированных животных и связывание GATA-4 с генами, кодирующими антиапоптотические факторы Bcl-2 и Bcl-xL [Park A.M. et al., 2006]. Однако связать эти два явления авторы не смогли, т.к. не обнаружили возрастания фосфорилированной (активной) формы GATA-4.

Резюмируя сказанное, можно предполагать, что GATA-4 является одним из перспективных кандидатов на роль транскрипционного фактора, участвующего в защитных эффектах хронической гипоксии, однако его значение в этом процессе остается неисследованным.

Изменение транскрипционной активности кардиомиоцитов при хронической гипоксии приводит к синтезу белков, участвующих в энергетическом метаболизме митохондрий [Лукьянова Г.Д., 2011, Waskova-Arnostova P., 2013, 2014, Semenza G. 2013]. Так, обнаружено увеличение экспрессии и трансляции креатинфосфокиназы и гексокиназы в миокарде крыс, тренированных как с помощью прерывистой, так и непрерывной хронической гипоксии [Waskova-Arnostova P. et al., 2014].

На рисунке 2 представлена возможная схема взаимодействия триггерных и сигнальных механизмов при хронической гипоксии. Первыми субстанциями, реагирующими на снижение содержания кислорода, являются гем-содержащие молекулы цитохромов дыхательной цепи митохондрий, НАДФН-оксидаза, гемоксигеназа, митохондриальная моноаминоксидаза и пролил-4-гидроксилаза. Далее сигнал путем редокс-сигналикации (выработки АФК) передается на промежуточные звенья. В настоящее время частично исследовано участие активных форм кислорода и регуляторных каскадов, запускаемых протеинкиназой С и NO-синтазой, в формировании кардиопротекторного эффекта адаптации к

гипоксии. Предполагается, что результатом запуска этих ферментных каскадов является активация транскрипционных факторов, таких как HIF-1, $\text{pFk}\beta$ и AP-1 [Semenza G.L., 2009; Ryan S., 2007] и изменение энергетического метаболизма митохондрий через активацию митохондриальных ионных каналов. В совокупности эти изменения обеспечивают адаптационное повышение устойчивости миокарда к последующей ишемии.

Однако, внимательно изучив вышеизложенные данные, нельзя не отметить тот факт, что большинство предполагаемых механизмов изучено 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. Данные об участии в адаптационной кардиопротекции регуляторных киназ единичны и противоречивы. Более того, практически не предпринимались попытки исследовать участие G-белок связанных рецепторов в указанных процессах.

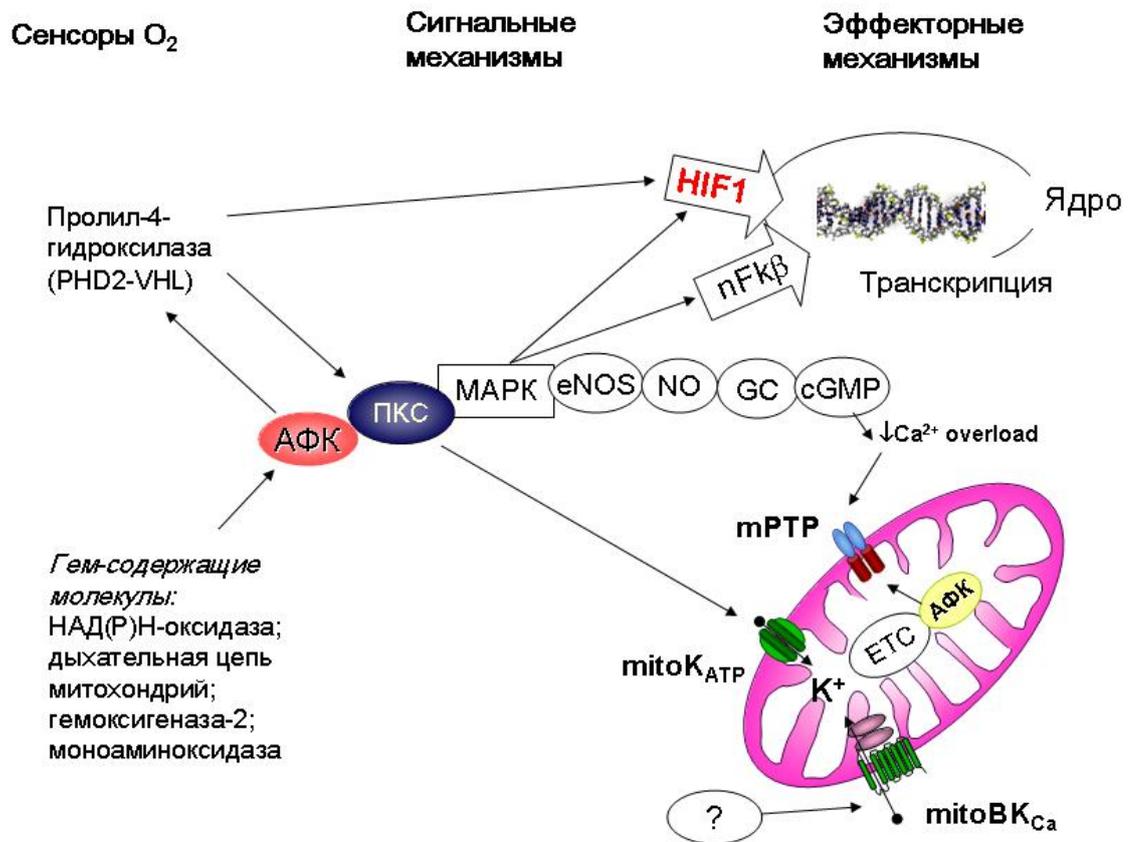


Рисунок 2 – Предполагаемый механизм кардиопротекторного действия адаптации к хронической гипоксии

Примечание. АФК – активные формы кислорода; ПКС – протеинкиназа *c*; MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа; eNOS – эндотелиальная синтаза оксида азота; GC – гуанилатциклаза, cGMP – циклический гуанозин моно фосфат; mPTP – пора, изменяющая проницаемость митохондрий; mitoK_{ATP} - АТФ-чувствительный калиевый канал митохондрий; mitoBK_{Ca} - митохонриальный кальций чувствительный калиевый канал большой проводимости; ETC – электронно-транспортная цепь митохондрий, HIF1 – гипоксия-индуцируемый фактор 1; nFкβ - ядерный фактор каппа бета.

1.3.1 Опиоидная система в процессах адаптации сердца

Еще в 80-е годы прошлого века было выдвинуто предположение о том, что защитные эффекты адаптирующих воздействий могут быть реализованы через, так называемые, «стресс-лимитирующие системы», к числу которых была причислена и эндогенная опиоидная система [Меерсон Ф.З., Пшенникова М.Г., 1988]. Поводом для такого предположения явились следующие факты: увеличение содержания эндогенных энкефалинов и эндорфинов в при состоянии адаптации в различных органах и тканях (в крови, головном мозге, надпочечниках, миокарде) [Маслова Л.В., Лишманов Ю.Б., 1989; Лишманов Ю.Б. и др., 1998б; Лишманов Ю.Б., Маслов Л.Н., 1994]. Так, курс адаптирующих сеансов стрессовых воздействий по схеме, предложенной Ф.З. Меерсоном, способствовал увеличению уровня β -эндорфина в плазме крови, гипофизе и гипоталамусе [Меерсон Ф.З. и Пшенникова М.Г., 1988, Лишманов Ю.Б., Маслов Л.Н., 1994]. Позже было обнаружено увеличение уровня мет-энкефалина в гипоталамусе при адаптации крыс к периодической гипобарической гипоксии [Лишманов Ю.Б. и др., 1998а]. В 1992 г было обнаружено, что адаптация к холоду приводит к увеличению уровня β -эндорфина в плазме крови, гипоталамусе и гипофизе крыс, однако содержание энкефалинов в миокарде остается неизменным. Изменения уровня энкефалинов в сердце после тренировок к физическими нагрузкам обнаружить не удалось, однако это адаптирующее воздействие обеспечивало увеличение уровня β -эндорфина в гипоталамусе и плазме крови [Лишманов Ю.Б. и др., 1992в]. Применение сочетанной нагрузки - плавания и холода – приводило к 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]. Помимо этого, методы радиолигандного анализа позволили обнаружить изменение плотности и аффинности самих опиоидных рецепторов при адаптации к умеренным стрессовым воздействиям [Варфоломеев С.О., 1986]. Все эти данные свидетельствуют о значительных изменениях, происходящих в эндогенной опиоидной системе в процессе формирования адаптации.

Физиологическое значение изменений содержания эндогенных опиоидов в крови и тканях адаптированных животных стало понятным несколько позднее,

после проведения экспериментов с блокированием опиоидных рецепторов. Эти исследования показали, что на фоне применения ингибиторов опиоидных рецепторов антигипоксический [Mayfield K.P. и D'Alecy L.G., 1994], антиаритмический и кардиопротекторный эффекты [Лишманов Ю.Б. и др., 1998б], сформировавшиеся в ходе адаптации к гипоксии или стрессу не проявляются.

В 1996 г на модели адреналиновых и CaCl_2 -индуцированных аритмий была выявлена роль эндогенных опиоидов в реализации антиаритмического эффекта адаптации к стрессу. Оказалось, что у животных, подвергнутых серии из коротких (адаптирующих) иммобилизаций, значительно ослаблен аритмогенный эффект адреналина и хлорида кальция, а частота встречаемости нарушений ритма сердца в ответ на введение этих аритмогенных препаратов значительно ниже, чем в контрольных группах [Маслов Л.Н. и др., 1996б; Лишманов Ю.Б. и др. 1996б; 1996в]. Предварительное введение этим особям блокатора ОР налоксона полностью предупреждало развитие антиаритмического эффекта адаптации [Маслов Л.Н. и др., 1996б; Лишманов Ю.Б. и др. 1996б]. Однако, селективный антагонист δ -ОР налтриндол не влиял на частоту возникновения аритмий у адаптированных крыс [Лишманов Ю.Б. и др. 1996б; Маслов Л.Н. и др., 1996б]. Непроницающий через ГЭБ блокатор ОР метилналтрексон на модели адреналин-индуцированных аритмий ослаблял антиаритмический эффект адаптации к стрессу, но не устранял его полностью [Лишманов Ю.Б. и др., 1996г]. Таким образом, вопрос о рецепторной специфичности участия опиоидов в формировании антиаритмического эффекта адаптации к стрессу остается открытым. Поскольку налоксон обладает сродством как к δ -ОР, так и к μ -ОР, можно предполагать, что антиаритмический эффект адаптации к стрессу связан с активацией периферических μ -ОР, однако данный факт требует проверки.

Следует отметить, что опиоидные рецепторы вовлечены в реализацию срочных адаптивных феноменов ишемического прекондиционирования, ишемического посткондиционирования и дистантного прекондиционирования. Так, в 90-е годы прошлого века было обнаружено, что предварительное введение налоксона предупреждает развитие инфаркт-лимитирующего действия ИП на модели острой коронароокклюзии-реперфузии *in vivo* [Chien G.L., Van Winkle D.M. 1996]. Группа ученых под руководством проф. Gross G.J. обнаружили

периферическую локализацию ОР, опосредующих кардиопротекторный эффект ИП [Schultz J.J., et al., 1997a] и, впоследствии выявили рецепторную природу участия опиоидов в ИП, показав отсутствие кардиопротекторного эффекта ИП на фоне блокады δ -ОР [Schultz J.J., et al., 1997b]. Эти данные были подтверждены на модели прекондиционирования кардиомиоцитов [Huh J. et al., 2001].

В 2008 г впервые были получены данные о том, что опиоидные рецепторы могут участвовать в посткондиционировании сердца [Zatta A.J. et al., 2008]. В этих экспериментах на крысах было показано, что внутривенное введение неселективного антагониста ОР налоксона за 5 мин до реперфузии устраняет инфаркт-лимитирующий эффект посткондиционирования. Исследователи из Атланты (США) под руководством проф. Vinten-Johansen J. выявили рецепторную природу участия опиоидов в посткондиционировании. В экспериментах с коронароокклюзией-реперфузией *in vivo* они обнаружили, что инфаркт-лимитирующий эффект посткондиционирования не реализуется, если крысы получали внутривенно блокатор δ -ОР налтриндол или блокатор μ -ОР СТАР [Zatta A.J. et al., 2008].

В 2006 году обнаружено участие опиоидных рецепторов в дистантном прекондиционировании. Показано, что блокатор κ -ОР норбиналторфимин предупреждает кардиопротекторный эффект, наблюдаемый при дистантном прекондиционировании *in vivo* [Zhang S.Z. et al., 2006]. В 2013 г. группой исследователей из Канады были опубликованы данные об участии δ -ОР и κ -ОР в дистантном прекондиционировании изолированных кардиомиоцитов [Surendra H. et al., 2013].

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

ЗАКЛЮЧЕНИЕ К ОБЗОРУ ЛИТЕРАТУРЫ

Изложенные факты ясно свидетельствуют о том, что опиоидная система участвует в формировании кардиопротекторного эффекта ишемического пре- и посткондиционирования [Schultz J.E. et al., 1995; Guo H.T. et al., 2011], адаптации к гипобарической гипоксии и стрессу [Лишманов Ю.Б., 2003а; Нарыжная Н.В., 2011]. Эти данные позволяют нам предполагать, что опиоидные рецепторы являются опосредующим звеном в реализации неспецифических адаптивных реакций. Однако рецепторная специфичность участия опиоидной системы в кардиопротекторном и антиаритмическом эффектах адаптации к хронической гипоксии, а также внутриклеточные механизмы их реализации, остаются малоизученными. При сравнении механизмов реализации кардиопротекторного действия агонистов опиоидных рецепторов и ишемического прекодиционирования в отношении острой ишемии-реперфузии, можно отметить их значительное сходство. Так, эти механизмы включают $G_{i/o}$ белки, каскадную активацию регуляторных киназ (RISK-киназ и SAFE-киназ), среди которых доказано значение протеинкиназы C, тирозинкиназ, Src/EGFR-киназы, PI3-киназы, NO-синтазы. и других, конечными эффекторами которых являются АТФ-чувствительные K^+ -каналы и mPTP-поры митохондрий. На основании этих данных мы можем выдвинуть гипотезу о том, что механизмы формирования кардиопротекторного и антиаритмического эффекта адаптации к хронической гипоксии могут реализоваться через опиоидные рецепторы и связанные с ними внутриклеточные механизмы. Однако это предположения нуждаются в экспериментальной проверке. В настоящий момент неясно, какой тип опиоидных рецепторов участвует в реализации кардиопротекторного и антиаритмического эффекта адаптации к гипоксии, так же как и роль ключевых регуляторных киназ. Исследованию участия опиоидных рецепторов и сопряженных с ними внутриклеточных регуляторных каскадов в возникновении адаптационной резистентности миокарда к ишемии и реперфузии под действием хронической гипоксии посвящена настоящая работа.

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объект исследования

Работа выполнена на аутбредных конвенциональных крысах-самцах Вистар массой 250 – 320 г.

Животных содержали в виварии НИИ кардиологии. Содержание животных и уход за ними производился на основании законодательных и нормативных документов, регламентирующих работу с лабораторными животными:

– СанПин 1045-73 «Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)». Утверждено Главным санитарным врачом СССР П.И. Бургасовым 06.04.1973 г.

– Положение 2003 г «Положение о контроле качества лабораторных животных, питомников экспериментально-биологических клиник (вивариев)». Утверждено Министром Здравоохранения РФ Ю.Б. Шевченко 23.04.2003 г.

– Правила лабораторной практики в РФ. Приказ МЗ РФ №708 Н от 28.08.2010 г.

– Приказ № 1179 от 10.10.83 г «Об утверждении нормативов затрат кормов для лабораторных животных в учреждениях здравоохранения».

Этично-правовые нормы регулировались Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986) и рекомендациями о гуманном отношении к лабораторным животным, изложенными в Приказе МЗ СССР за № 755 от 12 августа 1977 г. Дизайн исследования одобрен этическим комитетом НИИ кардиологии. Все болезненные процедуры проводили на наркотизированных крысах.

2.2 Дизайн исследования

Дизайн исследования представлен в таблице 1. Кардиопротекторный эффект хронической непрерывной нормобарической гипоксии исследовали на следующих моделях:

- на модели острой коронароокклюзии-реперфузии *in vivo*, оценку повреждения миокарда проводили по размеру инфаркта. В сыворотке крови и

ткани миокарда животных после коронароокклюзии-реперфузии исследовали содержание опиоидных пептидов и стабильных метаболитов NO.

- на модели тотальной ишемии и реперфузии изолированного–перфузируемого сердца крысы, оценку повреждения миокарда проводили по выходу в перфузионный раствор маркера повреждения креатинфосфокиназы и изменению сократительной активности. Миокард, подвергнутый ишемии-реперфузии на этой модели, использовали для определения содержания АТФ, а так же для выделения митохондрий с последующим измерением скорости их дыхания, трансмембранного потенциала и устойчивости mPTP к открытию.

- на модели аноксии-реоксигенации изолированных кардиомиоцитов, оценку их повреждения проводили по выживаемости клеток и по выходу в инкубационный раствор маркера повреждения лактатдегидрогеназы.

Кардиопротекторный эффект хронической прерывистой гипобарической гипоксии (ХПГГ) исследовали на модели острой 20-минутной коронароокклюзии – 3 ч реперфузии *in vivo*, оценку повреждения миокарда проводили по размеру инфаркта; на модели тотальной ишемии и реперфузии изолированного–перфузируемого сердца крысы по активности креатинфосфокиназы в оттекающем от изолированного сердца перфузионном растворе. Антиаритмический эффект при адаптирующих воздействиях оценивали на модели острой коронароокклюзии-реперфузии *in vivo*, при тотальной ишемии-реперфузии изолированного сердца *in vitro* или при введении адреналина.

Об участии исследуемых субтипов опиоидных рецепторов в кардиопротекторном или антиаритмическом эффекте адаптирующих воздействий судили по содержанию опиоидов в плазме крови и миокарде крыс, выраженности этих эффектов в условиях ингибирования ОР. Об участии киназ и K_{ATP} -каналов в кардиопротекторном эффекте ХПГГ воздействий судили по выраженности этих эффектов в условиях ингибирования соответствующих киназ и K_{ATP} -каналов. Роль NO-синтазы в реализации инфаркт-лимитирующего действия ХПГГ подтверждали изменением содержания стабильных метаболитов NO нитритов и нитратов [Bryan N.S., Grisham M.B. 2007] и в экспериментах с селективными блокаторами индуцибельной и нейрональной NO-синтазы.

Таблица 1 – Дизайн исследования

Способ адаптации к гипоксии	Хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия			Хроническая прерывистая гипобарическая гипоксия	
Способ моделирования ишемии-реперфузии	Коронароокклюзия-реперфузия in vivo	Тотальная ишемия-реперфузия изолированного сердца	Аноксия-реоксигенация изолированных кардиомиоцитов	Коронароокклюзия-реперфузия in vivo	Тотальная ишемия-реперфузия изолированного сердца
Моделирование аритмогенного воздействия	Коронароокклюзия-реперфузия	Тотальная ишемия-реперфузия изолированного сердца	-	Коронароокклюзия-реперфузия, введение адреналина	Тотальная ишемия-реперфузия изолированного сердца
Способ детекции повреждения миокарда	Размер инфаркта	Выход маркера повреждения	Выход маркера повреждения, гибель кардиомиоцитов	Размер инфаркта	Выход маркера повреждения
Физиологические показатели	ЭКГ, частота возникновения ишемических-реперфузионных аритмий	ЭКГ, сократительная активность миокарда, частота возникновения реперфузионных аритмий	-	ЭКГ, частота возникновения ишемических, реперфузионных и адреналиновых аритмий	ЭКГ, сократительная активность миокарда, частота возникновения реперфузионных аритмий
Исследуемые биохимические и гистологические показатели	Опиоидные пептиды и метаболиты NO в ткани миокарда и сыворотке крови, гемоглобин, эритроциты, гематокрит и кортикостерон крови	Креатинфосфокиназа, АТФ, скорость дыхания изолированных митохондрий, их трансмембранный потенциал и устойчивость mPTP к открытию	Лактатдегидрогеназа, активные формы кислорода	Опиоидные пептиды в тканях, гемоглобин, эритроциты, гематокрит и кортикостерон крови. катехоламины в миокарде и надпочечниках	Креатинфосфокиназа
Способ оценки роли опиоидных рецепторов в эффектах адаптации	Внутривенное введение антагонистов ОР перед моделированием коронароокклюзии	Добавление антагонистов ОР в перфузионный раствор изолированного сердца перед моделированием ишемии	Добавление антагонистов ОР в инкубационный раствор изолированных кардиомиоцитов перед моделированием аноксии	Внутривенное введение антагонистов ОР перед моделированием коронароокклюзии или введением адреналина	-
Способ оценки роли киназ и K_{ATP} -каналов в эффектах адаптации	Внутривенное введение ингибиторов перед моделированием коронароокклюзии	-	Добавление ингибиторов в инкубационный раствор изолированных кардиомиоцитов перед моделированием аноксии	-	-

О роли симпатической нервной системы в реализации антиаритмического действия хронической прерывистой гипобарической гипоксии судили по проявлению антиаритмического эффекта ХПГГ при моделировании адреналиновых аритмий и содержанию катехоламинов в адренергических волокнах миокарда и надпочечников при провокации их выброса изадринном.

2.2 Характеристика методов исследования

2.2.1 Моделирование хронических гипоксических воздействий

Хроническую непрерывную нормобарическую гипоксию (ХННГ) проводили путем непрерывного содержания крыс в специальной герметичной камере, содержание кислорода в которой было снижено до 12% в течение 21 дня. Парциальное давление O_2 и CO_2 внутри гипоксической камеры постоянно поддерживали системой «Био-нова-204G4R1» (НТО Био-нова, Россия, г. Москва) и контролировали датчиками TCOD-IR и OLC 20 (Oldham, Франция), через блок управления MX32 (Oldham, Франция). Показано, что после курса нормобарической гипоксии миокард крыс становится устойчивым к воздействию острой ишемии и реперфузии [Neckar J. et al., 2004].

Хроническую прерывистую гипобарическую гипоксию (ХПГГ) проводили в медицинской барокамере «ОКА-МТ». Животных 5 раз в неделю (за исключением субботы и воскресенья) помещали в барокамеру на 6 ч в течение 6 недель (всего 30 сеансов гипоксии). В течение первой недели давление в барокамере ступенчато снижали до 405 мм рт. ст. (54 кПа), что соответствовало высоте 5000 м над уровнем моря (далее «высота 5000 м»). В течение последующих 5 недель крыс тренировали при этом давлении [Meerson F.Z. et al., 1987].

2.2.2. Оценка стресс-реакции

Количественную оценку стресс-реакции осуществляли по изменению массы тимуса, надпочечников, селезенки, числу язв слизистой оболочки желудка и уровню кортикостерона в сыворотке крови животных. Для оценки интенсивности стресса применяли шестибальную шкалу В.И. Добрякова в нашей модификации [Добряков В.И., 1978, Нарыжная Н.В. и др., 2015]. Забор крови для определения уровня кортикостерона осуществлялся сразу же после декапитации. Кровь

центрифугировали в течение 15 мин, со скоростью 3000 об/мин. Отбирали сыворотку, замораживали в морозильной камере (при -18°C) и хранили до 2 недель. Измерение уровня кортикостерона проводили иммуноферментным методом набором «Corticosterone (Human, Rat, Mouse) ELISA» RE52211 (IBL International GmbH, Германия) на микропланшетном ридере «Infinite 200 PRO» (Tecan GmbH, Австрия).

2.2.3 Моделирование коронароокклюзии и реперфузии *in vivo* и оценка размера инфаркта миокарда

Перед выполнением процедуры коронароокклюзии животные были наркотизированы с помощью α -хлоралозы (100 мг/кг) или пентабарбитала (60 мг/кг) внутривенно. Во время выполнения последующих манипуляций животные находились на искусственной вентиляции атмосферным воздухом (аппарат “РО-2”, Россия) через интубированную трахею.

Грудную клетку вскрывали на уровне V межреберья слева от грудины. Сердце освобождали от перикарда и накладывали лигатуру на левую коронарную артерию в ее верхней трети. Ориентиром для определения места прохождения левой коронарной артерии служила вена, нисходящая вдоль передней перегородки левого желудочка. Контроль наступления ишемии проводился визуально по осветлению области предполагаемой гипоперфузии. Реперфузию осуществляли путем освобождения лигатуры, ранее наложенной на левую коронарную артерию с визуальным контролем возобновления коронарного кровообращения по гиперемии ишемизированной области [Neckar J., et al., 2004].

Острую ишемию проводили по двум схемам: кратковременная (10 мин) ишемия с последующей 10 минутной реперфузией и длительная (20 мин ишемия) с последующей 3 часовой реперфузией. В первом случае на протяжении 10 минут ишемии и 10 минут реперфузии регистрировали ЭКГ в I и II стандартных отведениях путем фиксации электродов на конечностях крысы с помощью усилителя биопотенциалов MP35 (Biopac System Inc., Goleta, США). Количественную обработку полученных данных осуществляли с помощью программного обеспечения INSTBSL-W компании Biopac System Inc., (Goleta, США). При анализе ЭКГ подсчитывали частоту встречаемости в

экспериментальных группах желудочковых экстрасистол, желудочковой тахикардии и фибрилляции желудочков.

При моделировании длительной (20 мин) коронароокклюзии и реперфузии запись ЭКГ проводили в течение всего периода ишемии и первых 10 минут реперфузии. При моделировании длительной модели ишемии-реперфузии, после окончания реперфузии проводили определение размера зоны некроза. Для этого, сердца крыс извлекали из грудной клетки и промывали через аорту физиологическим раствором с гепарином (в конечной концентрации 125000 МЕ/л). Для выявления зоны гипоперфузии, лигатуру, наложенную ранее на левую коронарную артерию, вновь затягивали и участок миокарда не подвергшийся ишемии прокрашивали концентрированным раствором перманганата калия. После ополаскивания миокарда физиологическим раствором, отделяли правый желудочек, оба желудочка взвешивали, левый желудочек пересекали на срезы толщиной 1 мм параллельно оси сердца. Срезы левого желудочка окрашивали 2,3,5-трифенилтетразолием (37°C, 30 минут) для выявления зоны некроза и помещали на 1 сутки в 10% раствор нейтрального формалина. Краситель 2,3,5-трифенилтетразолий 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. Срезы сканировали (Scanjet G2710), размер зоны некроза и зоны риска определяли планиметрически с помощью пакета специальных программ. Величину зоны некроза выражали в процентах от размера зоны риска.

2.2.4 Исследование гемодинамики

Измерение артериального давления осуществляли прямым методом путем канюлирования правой общей сонной артерии. Для этого освобождали доступ к 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 убрали, и канюлю закрепляли в артерии при помощи 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).

2.2.5 Моделирование тотальной ишемии и реперфузии изолированного сердца

Экспериментальные исследования на изолированном сердце проведены с использованием метода Лангендорфа. На данной модели оценивали инотропный, хронотропный и кардиопротекторный эффекты экспериментальных воздействий. Преимущество исследований на изолированном сердце по сравнению с работами, выполняемыми *in vivo*, состоит в том, что миокард в данном случае выведен из-под влияния регуляторных систем целого организма. Это дает возможность обнаружить изменения биохимических процессов и сократительной функции, зависящие только от нарушений структуры и метаболизма миокарда. В данной работе использовали модель тотальной (глобальной) ишемии, при которой полностью прекращалось поступление кислорода и питательных субстратов к клеткам сердца на 45 минут с последующей 30-минутной реперфузией.

У наркотизированных эфиром крыс удаляли кожный покров с грудной клетки и вскрывали ее ножницами, делая три разреза: один – поперек грудины и два продольных. Пинцетом с резиновыми наконечниками на браншах захватывали подходящие к сердцу сосуды, после чего их отсекали выше места захвата. Выделенное сердце с целью остановки спонтанных сокращений переносили в охлажденный до +4°C раствор Кребса-Хензelayта, после чего помещали в термостабилизированную увлажненную камеру и вводили канюлю в восходящую часть дуги аорты. Через канюлю под давлением 52 мм рт. ст. подавали изотонический раствор Кребса-Хензelayта следующего состава (в ммоль/л): NaCl –

120; KCl – 4,8; CaCl₂ – 2,0; MgSO₄ – 1,2; KH₂PO₄ – 1,2; NaHCO₃ – 20; глюкоза – 10, рН 7,5, при температуре 37±0,5°C. Перфузионный раствор предварительно насыщали газовой смесью, содержащей 95% O₂ и 5% CO₂. Для приготовления раствора Кребса-Хензелята использовали реактивы компаний «Sigma-Aldrich» (Сент-Луис, США) и «MP Biomedicals» (Ирвин, США). Раствор Кребса-Хензелята и все реактивы приготовлены на деионизованной воде, полученной на установке “Simplicity” компании «Millipore» (Франция).

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

Запись параметров сократительной функции изолированного сердца проводили в течение 10 с в следующие промежутки времени: до моделирования ишемии, на 5-й, 15-й и 30-й минутах реперфузии. В начале реперфузионного периода осуществляли запись параметров сокращения сердца и электрокардиограмму в течение 10 мин.

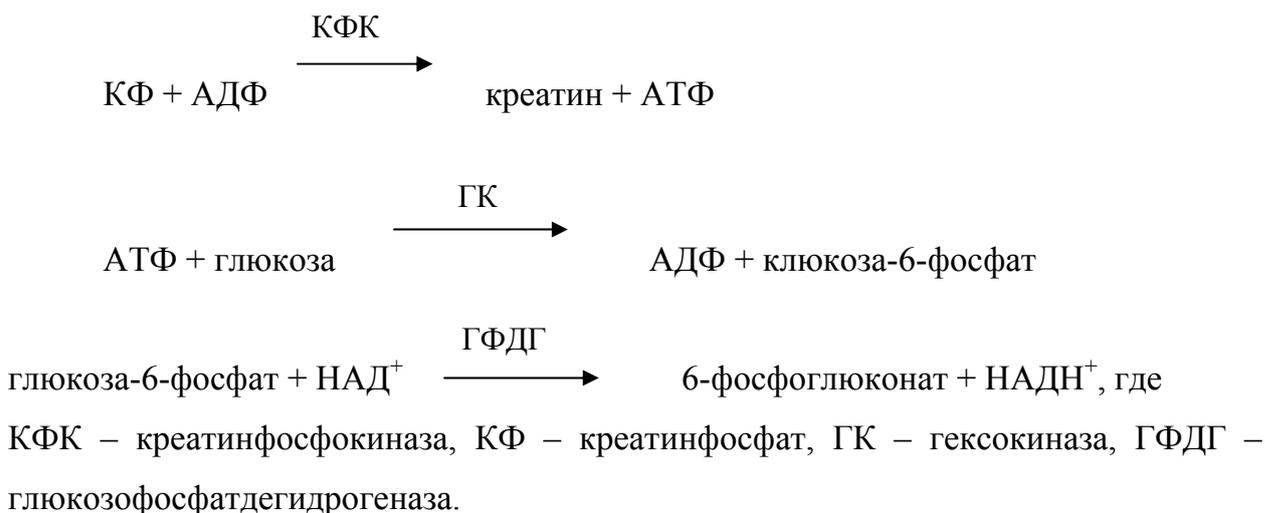
Измеряли следующие показатели сокращений изолированного сердца:

- частоту сердечных сокращений (уд/мин);
- давление, развиваемое левым желудочком изолированного сердца (мм рт. ст.), вычисляется как разница между систолическим и диастолическим давлением. Данный показатель характеризует силу сокращений изолированного сердца. Уменьшение этого параметра при постишемической реперфузии является одним из показателей тяжести повреждения сердечной мышцы [Inafuku H. et al., 2013];

– конечное диастолическое давление (выражали в % от исходного) для оценки степени расслабления миокарда.

На основании измерений вычисляли двойное произведение как $1/1000$ произведения ЧСС и давления, развиваемого левым желудочком, частоту возникновения нарушений ритма. Вычисляли встречаемость в экспериментальных группах желудочковых экстрасистол, желудочковой тахикардии и фибрилляции желудочков и тяжесть нарушений ритма в баллах по следующей схеме: наличие единичных желудочковых экстрасистол (менее 16 за 10 минут) - 1 балл, множественных (16 и более экстрасистол за 10 мин) - 2 балла, желудочковой тахикардии - 3 балла, обратимая фибрилляция желудочков - 4 балла, повторная или необратимая (фатальная) фибрилляция желудочков - 5 баллов. При наличии нескольких типов аритмий у крысы принимали во внимание только наиболее тяжелое нарушение сердечного ритма.

Степень повреждения кардиомиоцитов оценивали по активности креатинфосфокиназы (КФК) в оттекающем от сердца перфузате, которую определяли с помощью коммерческих энзиматических наборов фирмы "Bioson SK-Nac" «Analiticon Biotechnologies» (Lichtenfeis, Германия). Метод основан на поглощении НАДН⁺ света длиной волны 340 нм, которое прямо пропорционально активности КФК в образце. Принцип метода:



Креатинфосфокиназа катализирует образование АТФ из креатинфосфата и АДФ. Полученная АТФ включается в реакцию фосфорилирования глюкозы. Образующийся при этом глюкозо-6-фосфат на третьем этапе реакции участвует в восстановлении НАД⁺ до НАДН⁺. Таким образом, скорость образования НАДН⁺,

измеряемая спектрофотометрически при длине волны $\lambda=340$ нм, пропорциональна активности КФК.

В кювету вносили 1 мл реакционной смеси и термостатировали в течение 2 минут. Затем добавляли 0,1 мл перфузионного раствора, оттекающего от изолированного миокарда и инкубировали при $+30^{\circ}\text{C}$, измеряя оптическую плотность на 3-й и 5-й минуте от начала инкубации. Оптическую плотность образцов регистрировали на спектрофотометре Smart Spec PLus (фирма «Bio-Rad», США) при длине волны 340 нм. Активность КФК вычисляли по формуле:

$$KФК \left(\frac{\text{мкмоль}NADH}{\text{мин} \times \text{л}} \right) = \frac{(\text{Анач} - \text{Аконеч}) \times V \times 10000}{6,22 \times P \times 2},$$

Анач – оптическая плотность на 3 минуте инкубации пробы, Аконеч – оптическая плотность на 5 минуте инкубации пробы, V - общий объем (мл), P – объем пробы (мл), 6,22 – коэффициент молярной экстинкции НАДН⁺ при 340 нм, 1000 - коэффициент пересчета на литр. Значение активности КФК выражали в ед/г миокарда.

2.2.6 Метод моделирования аноксии-реоксигенации изолированных кардиомиоцитов

Выделение изолированных кардиомиоцитов из сердца крысы проводили энзиматическим методом с применением коллагеназы [Xu X., Colecraft H. 2009]. Животных гепаринизировали (1500 МЕ, внутривенно) и умерщвляли шейной дислокацией под эфирным наркозом. После стернотомии сердца быстро иссекали и помещали в буфер Тироде ($+4^{\circ}$) до остановки. Аорту канюлировали и закрепляли для ретроградной перфузии. Скорость перфузии на протяжении всего выделения составляла 10 мл/мин, температура 37°C , все растворы были предварительно насыщены смесью газов 95% O_2 – 5% CO_2 , после чего их рН доведена до 7,4. Осуществляли ретроградную перфузию миокарда в течение 3 минут буфером Тироде (в мМ): 140 NaCl, 5.4 KCl, 1 Na_2HPO_4 , 1 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 глюкоза, 5 HEPES, 1 CaCl_2 , затем в течение 3 минут перфузировали бескальциевым буфером Тироде. Последующую перфузию осуществляли раствором коллагеназы, содержащим (в мМ): 140 NaCl, 5.4 KCl, 1 Na_2HPO_4 , 1 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 глюкоза, 5 HEPES, 1,6 г/л БСА, коллагеназу тип II 335 U/мл (Worthington) и протеазу XIV 0,230 г/л (Sigma) в

течение 15-25 минут до размягчения миокарда. Для удаления коллагеназы, миокард перфузировали бескальциевым раствором Тироде в течение 4 минут. Миокард отсекали от аорты и диспергировали путём перемешивания в 10 мл бескальциевого буфера Тироде, содержащего 10 мг/мл БСА. Полученную суспензию клеток фильтровали через марлю и осаждали при комнатной температуре в течение 5 минут. Надосадок удаляли, осевшие кардиомиоциты разбавляли бескальциевым буфером Тироде до 350-400 тысяч клеток в 1 мл. Количество клеток контролировали микроскопически.

Для стабилизации выделенные клетки инкубировали в течение 1 часа при температуре +28°C под протоком 5% CO₂ в CO₂-инкубаторе MCO-5AC (SANYO, Япония).

После окончания инкубации проводили контроль выживаемости клеток по включению трипанового синего, который окрашивает только в погибшие клетки. Подсчитывали процент погибших (окрашенных) клеток и жизнеспособных палочковидных кардиомиоцитов (соотношение длина : ширина не менее 3:1). Кардиомиоциты, не окрасившиеся трипановым синим, но потерявшие палочковидную форму были условно обозначены как гибнущие. Исследование проводили на микроскопе Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss Surgical GmbH, Германия). Исходную выживаемость 50% и более палочковидных кардиомиоцитов считали пригодной для дальнейшего изучения. В инкубационной среде проводили определение лактатдегидрогеназы (ЛДГ) с применением наборов Fluitest LDH-L (Analytical biotechnologies AG, Германия) на спектрофотометре INFINITE 200M (Текан, Австрия).

Для моделирования аноксии клетки инкубировали в модифицированном буфере Кребса (аноксическом буфере), содержащем (в мМ): 118 NaCl, 25 NaHCO₃, 4.7 KCl, 1.2 MgSO₄, 1.2 KH₂PO₄, 5 2-дезоксиглюкозы, pH 7,4. Для предотвращения доступа кислорода на поверхность суспензии наслаивали 5-6 капель минерального масла [Vander Heide R.S., et al, 1990]. Клетки подвергали аноксии в течение 20 минут при комнатной температуре.

После окончания аноксии суспензию клеток аккуратно отбирали через масло и центрифугировали 1 мин при 800g, надосадок клеток полностью удаляли и использовали для определения ЛДГ. Реоксигенацию кардиомиоцитов

осуществляли в бескальциевом буфере Тироде в течение 30 минут. По окончании реоксигенации проводили контроль выживаемости клеток и измеряли выход ЛДГ как описано выше. Контролем служили клетки, ресуспендированные на время равное аноксии (20 минут) в бескальциевом растворе Кребса, содержащем (в мМ): 118 NaCl, 25 NaHCO₃, 11 глюкоза, 4,7 KCl, 1,2 MgSO₄, 1,2 KH₂PO₄, pH 7,4, далее в течение 30 минут в бескальциевом буфере Тироде (нормоксия). Гибель клеток и выход ЛДГ при аноксии-реоксигенации вычисляли в процентах от нормоксии (инкубация с буфером Кребса).

2.2.7 Оценка образования активных форм кислорода изолированными кардиомиоцитами

Оценку образования активных форм кислорода изолированными кардиомиоцитами проводили флуоресцентным методом по свечению селективного АФК-чувствительного внутриклеточного зонда 2',7'-дихлорфлуоресцеина диацетата. Известно, что нефлуоресцирующее вещество 2',7'-дихлорфлуоресцеин диацетат способен проникать в живые клетки, где расщепляется эстеразами до 2',7'-дихлорфлуоресцеина, имеющего способность к флуоресценции при соединении с гидроксильным радикалом, супероксид-радикалом и перекисью водорода [Dikalov S.I., Harrison D.G. 2014].

Для выявления активных форм кислорода к 200 мкл суспензии изолированных кардиомиоцитов добавляли 30 нМ 2',7'-дихлорфлуоресцеина диацетата, инкубировали в темноте при температуре 37°C 30 мин и измеряли флуоресценцию при длинах волн $\lambda_{ex}=500$ нм; $\lambda_{em}=530$ нм на планшетном спектрофлуориметре INFINITE 200M (Текан, Австрия). Выработку активных форм кислорода при аноксии-реоксигенации выражали в процентах относительно клеток, не подвергнутых аноксии (нормоксия) после вычитания фонового свечения ДХФ.

Валидацию метода проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss Surgical GmbH, Германия) (Рис. 3). Было показано, что свечение 2',7'-дихлорфлуоресцеина наблюдается в живых кардиомиоцитах, в то время как неспецифическое свечение погибших клеток и фона незначительно (Рис. 3).

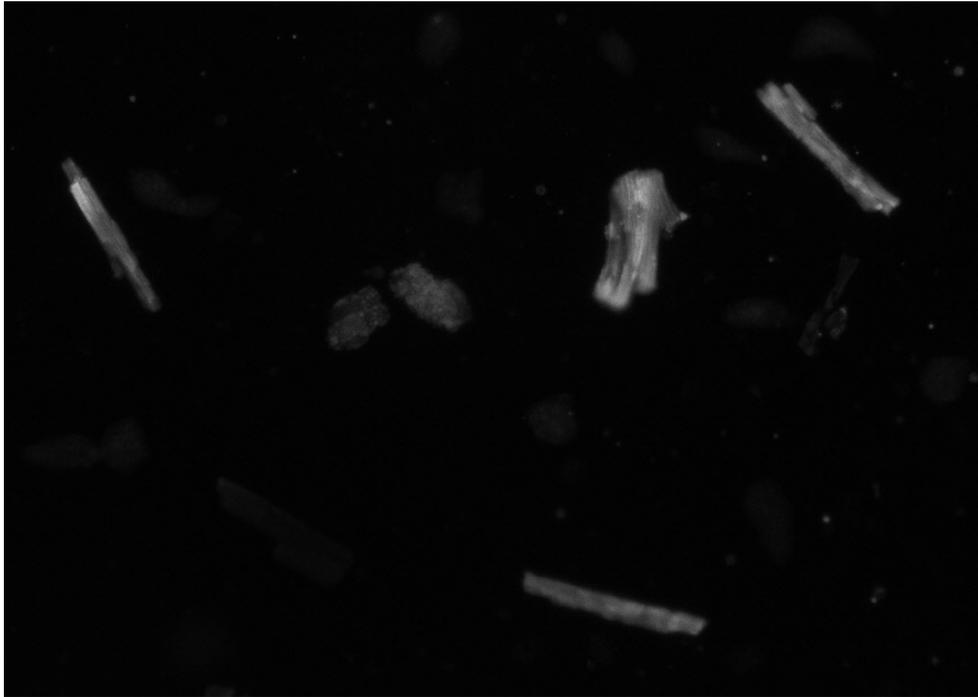


Рисунок 3 - Свечение 2',7'-дихлорфлуоресцеина после аноксии-реоксигенации в изолированных кардиомиоцитах интактных крыс

2.2.8 Моделирование адреналиновых аритмий

Адреналиновые аритмии выполняли внутривенным введением раствора адреналина в дозе 80 мкг/кг. При таком воздействии у интактных крыс в 50-80% случаев возникают нарушения желудочкового ритма. На протяжении 5 минут после инъекции у животных, находящихся под легким эфирным наркозом, регистрировали ЭКГ во II стандартном отведении. При анализе ЭКГ подсчитывали число желудочковых экстрасистол, частоту появления желудочковой тахикардии и фибрилляции желудочков в экспериментальных группах.

2.2.9 Лабораторные методы исследования крови

Подсчет эритроцитов производили по унифицированной методике в счетной камере Горяева. 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. Содержание

гемоглобина крови определяли гемихромным методом на спектрофотометре Smart Spec PLus (фирма «Bio-Rad», США) при длине волны 560 нм, применяя контрольные растворы гемоглобина фирмы «Гемоконт» фирмы «ООО Медлакор», Санкт-Петербург.

2.2.10 Спектрофотометрическое 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 иммуноферментными наборами фирмы Бахем (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).

Кровь и ткань миокарда забирали непосредственно после окончания ишемии-реперфузии. 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, отбирали супернатант, который 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 экстракт плазмы, осторожно промывали колонки буфером А (дважды по 3 мл) и отбрасывали получившийся раствор. Элюировали пептиды медленно 3-мя мл буфера Б (однократно). Полученный раствор пептидов высушивали с применением вакуума. Перед исследованием сухие пробы растворяли в 250 мл буфера иммуноферментного 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 иммуноферментными наборами фирмы Бахем (Bachem, Peninsula Laboratories, LLC, San Carlos, CA, USA), является метод конкурентного связывания конъюгированных антител с пептидами исследуемых образцов и антисыворотки. Молекулы антисыворотки связаны с биотинилированной меткой (Bt-tracer), способной взаимодействовать с стрептавидин-связанной пероксидазой хрена, которая образует растворимый окрашенный продукт, регистрируемый спектрофотометрически.

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 мкл 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.

2.2.11 Метод гистохимического определения опиоидных пептидов

Для определения опиоидных пептидов на криостатные срезы переднего и заднего гипоталамуса наносили иммунную кроличью антисыворотку к мет-энкефалину-Arg⁶-Phe⁷ или к диноρφину В, разведенную физиологическим раствором на фосфатном буфере (pH 7,4) в соотношении, соответственно, 1:100 или 1:200. После этого срезы инкубировали во влажной камере в течение 1 сут при 4°C. Для контроля специфичности иммунологической реакции на некоторые смежные срезы наносили буферный раствор без кроличьей антисыворотки. Для

второго этапа инкубации использовали козы антитела к иммуноглобулинам кролика, меченные изотиоцианатом флуоресцеина (ФИТЦ) в разведении 1:5. Все антисыворотки были любезно предоставлены нам профессором L.Terenius (Karolinska Institute, Stokholm, Швеция). Полученные препараты заключали в нефлюоресцирующее вазелиновое масло. Полуколичественную оценку уровня флюоресценции иммунореактивных мет-энкефалина-Arg⁶-Phe⁷ и динорфина в нервных волокнах и телах нейронов проводили цитофотометрически на микроскопе ЛЮМАМ-ИЗ (“ЛОМО”, Санкт-Петербург, Россия) [Автандилов Г.Г., 1973].

2.2.12 Метод гистохимического определения катехоламинов

Ранее показано, что уровень катехоламинов в нервных структурах является интегральным показателем процессов синтеза, высвобождения и обратного нейронального захвата медиатора адренергическими структурами [Авакян О.М. 1977]. Криостатные срезы левого желудочка сердца и надпочечников толщиной 15 или 25 мкм, изготавливали при температуре -15°C. Катехоламины, преимущественно норадреналин, выявляли модифицированным глиоксильным методом. После 10-минутной инкубации свежих срезов гистологических образцов в 2% растворе глиоксильной кислоты (pH 7,2-7,4) их подсушивали в течении 15-30 мин под вентилятором. Для окончания гистохимической реакции срезы выдерживали 10 минут при температуре 85°C. При этом, в результате конденсации катехоламинов ткани с глиоксильной кислотой образуются изохинолины, которые способны люминесцировать в видимой части спектра при облучении ультрафиолетовым светом с длиной волны 390-410 нм [Авакян О.М. 1977]. После термической обработки готовые препараты заключали в нефлюоресцирующее вазелиновое масло и исследовали в люминесцентном микроскопе. Для контроля специфичности реакции в части случаев глиоксильную кислоту заменяли в инкубационной среде на KH_2PO_4 .

Определение количественного содержания катехоламинов в адренергических клетках надпочечников выполняли на цитофотометре ЛЮМАМ-ИЗ. Измерение уровня флуоресценции катехоламинов проводили в падающем ультрафиолетовом свете, проходящем через возбуждающие фильтры СЗС-24-4, ФС-1-2, СС-15-2 и запирающие фильтры ЖС-18 и ЖС-19, при длине волны 521 нм.

Считываемые показания интенсивности флюоресценции с цифрового регистрирующего прибора выражали в условных единицах. Оптическую плотность и интенсивность определяли не менее чем при 30-ти наложениях фотометрического зонда в каждом гистологическом препарате, что гарантирует необходимую достоверность результата.

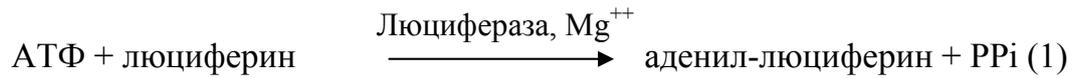
Содержание катехоламинов в адренергических волокнах миокарда оценивали полуколичественным косвенным способом, исходя из того, что при изменении концентрации катехоламинов в нервных волокнах изменяется и количество видимых флюоресцирующих адренергических волокон на гистологическом срезе. Поэтому, проводили измерение относительной объемной плотности адренергических волокон наложением на срез тестовой сетки, имеющей 100 тестовых ячеек [Автандилов Г.Г.,1973]. Измерения в каждом препарате осуществляли не менее чем при 20 случайных наложениях сетки, подсчитывая точки, приходящиеся на исследуемые структуры. Полученные величины объемной плотности адренергических волокон выражали в объемных процентах.

Для провокации выброса катехоламинов из надпочечников и нервных терминалей в миокарде использовали однократное введение изадрина в дозе 40 мг/кг внутривенно за 24 часа до взятия материала [Лишманов Ю.Б. и соавт. 2003].

2.2.13 Определение содержания АТФ в ткани миокарда

Исследование содержания АТФ проводили в ткани миокарда, подвергнутого ишемии и реперфузии на модели изолированного сердца. После окончания реперфузии 100 мг ткани отсекали и моментально замораживали в жидком азоте. Гомогенизирование проводили в жидком азоте при добавлении к образцу 2 мл охлажденной до +2°C 3% трихлоруксусной кислоты. Гомогенаты центрифугировали 10 минут при 3000g и температуре +2°C. Надосадок отбирали, нейтрализовали 1M Trizma base и доводили объем образца деионизованной водой до 2 мл [Chida J. et al., 2012]. Определение АТФ проводили с помощью биолюминесцентного анализа наборами фирмы Sigma, США (FL-AA), на биолюминометре Lucy-2 (Anthos labtec instruments, Salzburg, Austria).

Принцип метода:



Реакция (1) равновесно-обратима, в то время как реакция 2 необратима. Таким образом, содержание АТФ в исходном образце является лимитирующим фактором реакции и количество выделяющегося света прямо пропорционально содержанию АТФ [Strehler B.L. 1974].

2.2.14 Исследование функционального состояния митохондрий миокарда

Исследование влияния хронической непрерывной нормобарической гипоксии на функциональное состояние митохондрий миокарда крыс проводили после моделировании тотальной ишемии-реперфузии на изолированном перфузируемом сердце. Эта методика позволила не только выявить изменения параметров дыхания митохондрий, величин трансмембранного потенциала и Са-связывающей способности митохондрий, но и сопоставить эти показатели с параметрами сократимости миокарда, что позволило оценить значимость выявленных изменений для постишемического восстановления.

Выделение митохондрий из ткани миокарда проводили методом дифференциального центрифугирования [Argaud L. et al., 2005]. Все процедуры проведены на холоде при +2°C - +4°C. Фрагменты миокарда массой 0,5–1 г гомогенизировали в растворе, содержащем 70 мМ сахарозы, 210 мМ манитола, 1 мМ EGTA, 5 мг/мл БСА V фракции (свободной от жирных кислот), 10 мМ НЕРЕС, рН 7,4, центрифугировали при 200g 3 минуты, затем при 700g 4 минуты. Осадок гомогенизировали повторно, центрифугировали в том же режиме. Супернатанты объединяли и митохондрии осаждали центрифугированием при 12000g в течение 10 мин. Осадок, содержащий митохондрии промывали буфером, содержащим 70 мМ сахарозы, 210 мМ манитола, 0,1 мМ EGTA, 10 мМ НЕРЕС, рН 7,4 и осаждали центрифугированием при 12000g 10 мин. Осадок митохондрий ресуспендировали

в 100 мкл того же буфера. В конечном продукте определяли концентрацию белка методом Бредфорда [Bradford M.M. et al., 1976].

Оценка параметров дыхания митохондрий проводилась по поглощению ими кислорода в герметичной термостатируемой камере при помощи Кларковского кислород-чувствительного электрода ДКТП-02.4 прибором рН-метр-иономер «Эксперт–001» (Москва, Россия) в насыщенном кислородом растворе, содержащем 200 мМ сахарозы, 10 мМ Trizma base, 5 мМ KH_2PO_4 , 10 мкМ ЭГТА, 3 мМ пирувата, 3 мМ малата или 5 мМ сукцината, 2,5 мг/мл БСА V фракции, 0,5 мг/мл суспензии митохондрий, рН 7.4, 25°C, конечный объем камеры 1,2 мл, в присутствии/отсутствии 200 нМ АДФ [Chance B., Williams G.R. 1955]. Измеряли скорость поглощения кислорода в присутствии НАДН-зависимых субстратов 3 мМ малата и 3 мМ пирувата или FAD-зависимое дыхание в присутствии 5 мМ сукцината (состояние 2, State 2), после добавления 200 нМ АДФ (состояние 3, State 3) и когда синтез АТФ был завершен (Состояние 4, State 4) [Chance B., Williams G.R. 1955]. Скорость дыхания митохондрий выражали в нМ кислорода на мг белка в минуту. Эффективность дыхания вычислялась по соотношению количества добавленного АДФ (200 нМ) к поглощенному в течение состояния 3 кислороду (коэффициент АДФ/О).

Измерение трансмембранного потенциала ($\Delta\psi$) митохондрий проводили с использованием химического катионного флуоресцентного зонда этиловый эфир тетраметилпродамина (TMRE, Molecular Probes) на спектрофлуориметре Shimadzu RF-5301-PC (Шимадзу, Япония) в режиме реального времени при длинах волн возбуждения/излучения $\lambda_{\text{Ex}}=550$ нм; $\lambda_{\text{Em}}=575$ нм соответственно [Scaduto R.C. et al., 1999; Singh I.N., 2006]. Суспензию изолированных митохондрий, содержащую 2 мг белка, добавляли к 3 мл термостатированного буфера (200 мМ сахарозы, 10 мМ Tris-HCl, 5 мМ KH_2PO_4 , 10 мкМ ЭГТА, 3 мМ пируват, 3 мМ малат, рН 7.4, 25°C, 150 нМ/л TMRE) [Singh I.N. et al., 2006] и проводили непрерывную регистрацию свечения TMRE. После 20-минутной инкубации к суспензии митохондрий добавляли 0,1 мкМ разобщающего агента FCCP (Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone). О величине трансмембранного потенциала митохондрий судили по падению интенсивности флуоресценции TMRE. Значение

трансмембранного потенциала выражали в условных единицах флуоресценции на миллиграмм белка.

Состояние mPTP-поры оценивали по способности изолированных митохондрий накапливать и удерживать ионы Ca^{2+} (кальций-связывающая способность, КСС) [Gomez L. et al., 2008, Singh I.N., 2006; Argaud L. 2005]. Для этого в суспензии митохондрий в режиме реального времени исследовали динамику концентрации экстрамитохондриального кальция с использованием флуоресцентного Ca^{2+} -чувствительного зонда Calcium Green-5N (Molecular Probes) при длинах волн возбуждения/излучения $\lambda_{\text{Ex}}=506$ нм и $\lambda_{\text{Em}}=535$ нм на спектрофлуориметре Shimadzu RF-5301-PC (Шимадзу, Япония). Среда инкубации содержала 200 мМ сахарозы, 10 мМ Tris-HCl, 5 мМ K_2HPO_4 , 10 мкМ ЭГТА, 3 мМ пирувата, 3 мМ малата, Calcium Green-5N 100 нМ, 1 мг/мл митохондрий, pH 7.4, 25°C, объем 3 мл. К среде инкубации митохондрий дробно добавляли по 100 нМ CaCl_2 и регистрировали возрастание интенсивности свечения экстрамитохондриального Calcium Green-5N с последующим угасанием по причине захвата Ca^{2+} митохондриями. Раствор хлорида кальция добавляли до тех пор, пока не происходило насыщение митохондрий кальцием, открытие mPTP-поры и массиванного выхода Ca^{2+} , вызывающего резкое возрастание флуоресценции Calcium Green-5N (Рис. 4). Кальций-связывающую способность митохондрий вычисляли по максимальному количеству аккумулированного митохондриями Ca^{2+} в пересчете на миллиграмм митохондриального белка [Gomez L. et al., 2008].

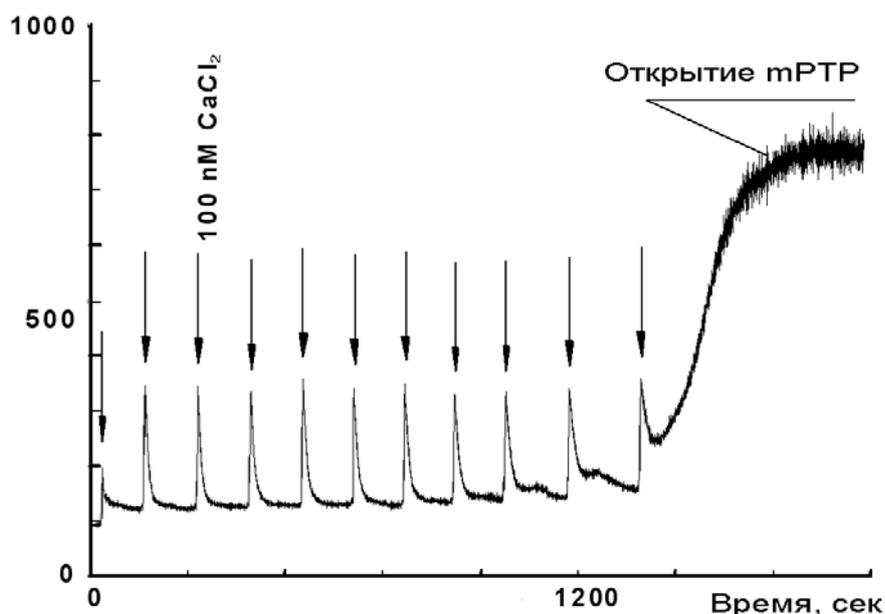


Рисунок 4 – Динамика экстрамитохондриального $[Ca^{2+}]$ при исследовании функционального состояния mPTP-поры

2.2.15 Исследование содержания нитритов и нитратов в крови и ткани миокарда

Исследование содержания нитритов и нитратов в крови и ткани миокарда крыс проводили после окончания периода острой коронароокклюзии *in vivo*, через 5 минут после снятия лигатуры с коронарной артерии.

Для экстракция нитритов и нитратов из крови кровь забирали из передней правой полый вены крысы без применения антикоагулянтов, так как присутствие гепарина может влиять на связывание NO_3 с реактивом Грисса. Полученные образцы крови центрифугировали 10 минут при 3000g, $+4^\circ C$. Образцы сыворотки депротеинизировали центрифугированием в пробирках Amicon Ultra-10 (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) в течение 30 мин при 14000g, $+4^\circ C$. Депротеинизированную сыворотку замораживали и хранили при $-70^\circ C$.

Для экстракции нитритов-нитратов из ткани миокарда миокард извлекали из грудной клетки, промывали через аорту 5 мл фосфатного буфера, содержащего 0,01M KH_2PO_4 , 0,01M K_2HPO_4 , 2,7 мМ KCl, 137 мМ NaCl, 2,5 мМ ЭДТА, pH 7.4. Отсекали 100–150 мг ткани левого желудочка в зоне гипоперфузии и немедленно замораживали и хранили в жидком азоте. Перед анализом образцы

гомогенизировали дроблением в жидком азоте, добавляли 1,5 мл того же буфера, центрифугировали 15 минут при 12000g, +4°C. Супернатант депротеинизировали центрифугированием в пробирках Amicon Ultra–10 в течение 30 мин при 14000g, +4°C. Депротеинизированный экстракт замораживали и хранили при –70°C.

Для определения суммарного содержания нитратов и нитритов в депротеинизированных экстрактах крови и ткани использовали набор фирмы Sigma (St. Louis, USA) 23479–1KT–F. Принцип метода основан на ферментативном преобразовании нитратов в нитриты нитрат–редуктазой в присутствии коферментов NAD⁺ и FAD⁺. Далее имеющиеся в сыворотке и вновь образованные нитриты количественно нитрозируют реактивом Грисса с образованием азо–производного соединения, поглощающего свет при 540 нм. Измерение оптической плотности проводили на спектрофотометре INFINITE-200M (Текан, Австрия).

2.2.16 Фармакологические инструменты

2.2.16.1. Антагонисты опиоидных рецепторов

Для оценки роли эндогенной опиоидной системы в формировании адаптационной устойчивости миокарда к аритмогенным и повреждающим воздействиям, антагонисты опиоидных рецепторов вводили внутривенно, добавляли в перфузионный раствор, омывающий изолированное сердце или в суспензию изолированных кардиомиоцитов животных, предварительно подвергнутых серии коротких иммобилизаций или хронической гипоксии.

В экспериментах *in vivo*:

Антагонист всех типов опиоидных рецепторов налоксон гидрохлорид растворяли в 0,9% растворе NaCl и вводили внутривенно в дозе 2 мг/кг [Kim J.H., Richardson R., 2009].

Антагонист всех типов опиоидных рецепторов налтрексон: (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 [Bienkowski P. et al., 1999; Takemori A.E., Portoghese P.S. 1992; Ebrahimi F., 2006]. Синтезирован в компании «Sigma-Aldrich» (St. Louis, США).

Антагонист δ -опиоидных рецепторов TIPP(ψ): (H-Tyr-TicP ψ -[CH₂NH]-Phe-Phe-OH) растворяли в 0,9% растворе NaCl и вводили внутривенно в дозе 0,5 мг/кг за 25 мин до коронароокклюзии [Schiller P.W. et al., 1993]. Синтезирован компанией “Multiple Peptide Systems”, (San Diego, США).

Антагонист δ -рецепторов ICI-174864 вводили внутривенно в дозе 2,5 мг/кг за 25 минут до коронароокклюзии или введения адреналина.

Селективный антагонист δ_1 -опиоидных рецепторов 7-бензилиденалтрексон малеат (7-Benzylidenenaltrexone maleate, BNTX) растворяли в 0,1 мл DMSO. Полученный раствор в объеме 10 μ л добавляли к 1 мл 20%-раствора hydroxypropyl- β -cyclodextrin (200 мг hydroxypropyl- β -cyclodextrin в 1 мл H₂O) и вводили внутривенно в дозе 0,7 мг/кг за 25 минут до коронароокклюзии [Sofuoglu M. et al., 1991; Zeng X. et al., 2011]. Синтезирован компанией Tocris Bioscience (Bristol, Великобритания).

Селективный антагонист δ_2 -опиоидных рецепторов налтрибен: C₂₆H₂₅NO₄ · CH₄O₃S · xH₂O (Naltriben) растворяли в 0,1 мл DMSO. Полученный раствор в объеме 10 мкл добавляли к 1 мл 20%-раствора hydroxypropyl- β -cyclodextrin (200 мг hydroxypropyl- β -cyclodextrin в 1 мл H₂O) и вводили внутривенно в дозе 0,3 мг/кг за 25 минут до коронароокклюзии [Sofuoglu M. et al., 1991]. Синтезирован компанией Tocris Bioscience (Bristol, Великобритания).

Антагонист μ -опиоидных рецепторов СТАР (H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Arg-Thr-Pen-Thr-NH₂) растворяли в 0,9% растворе NaCl и вводили внутривенно в дозе 0,5 мг/кг за 25 мин до ишемии [Abbruscato T.J. et al., 1997]; Синтезирован компанией “Multiple Peptide Systems”, (San Diego, США).

Для инактивации κ -ОР использовали антагонист κ -опиоидных рецепторов норбиналторфимина гидрохлорид [Takemori A.E., Portoghese P.S. 1992; Stevens W.C. et al., 2000], который растворяли в 0,9% растворе NaCl и вводили внутривенно в дозе 9 мг/кг за 90 минут до ишемического воздействия. Синтезирован в Research Triangle Institute (Research Triangle Park, США).

В экспериментах *in vitro*:

Антагонист всех типов опиоидных рецепторов налоксон использовали в концентрации 300 нМ/л [Ласукова Т.В. и соавт. 2014].

Антагонист δ -опиоидных рецепторов TIPP(ψ) использовали в концентрации 30 нМ/л [Schiller P. W. et al., 1993; Martin N.A. et al., 2001].

Селективный антагонист δ_1 -опиоидных рецепторов BNTX, использовали в концентрации 1 нМ/л [Zeng X. et al., 2011].

Селективный антагонист δ_2 -опиоидных рецепторов налтрибен, использовали в концентрации 1 нМ/л [Huh J. et al., 2001; Zhu M. et al., 2009].

Антагонист μ -опиоидных рецепторов СТАР, использовали в концентрации 100 нМ/л [Devidze N. et al., 2008].

Антагонист κ -опиоидных рецепторов норбиналторфимин, использовали в концентрации 3 нМ/л [Stevens W. C. et al., 2000].

2.2.16.2. Ингибиторы киназ

В экспериментах *in vivo*:

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

Селективный ингибитор NO-синтазы L-NAME: N^G-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME hydrochloride) применяли в дозе 10 мг/кг, растворяли в 0,9% растворе NaCl, вводили внутривенно за 25 минут до коронароокклюзии [Laude K. et al., 2003; Maslov L.N. et al., 2009]. L-NAME был закуплен в компании ICN Biomedicals (Aurora, Ohio, США).

Ингибитор индуцибельной NO-синтазы S-метилтиомочевины сульфат: 2-Methyl-2-thiopseudourea hemisulfate salt S-Methyl-ITU (S-Methylthiourea sulfate) 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).

Ингибитор нейрональной NO-синтазы 7-нитронидазол вводили внутривенно в дозе 50 мг/кг за 5 мин до начала ишемии [Fradorf J. et al., 2010]. Синтезирован в компании «Sigma-Aldrich» (St. Louis, США).

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

Ингибитор Sarc/EGFR-киназы лавендустин метил эфир (Lavendustin A methyl ester) 5-[[[(2,5-Dihydroxyphenyl)methyl][(2-hydroxyphenyl)methyl] amino]-2-hydroxybenzoic methyl ester) растворяли в 0,1 мл DMSO. Полученный раствор прибавляли к 1 мл 20%-раствора гидрохурпропил- β -cyclodextrin (200 мг гидрохурпропил- β -cyclodextrin в 1 мл H₂O) и вводили внутривенно в дозе 1 мг/кг за 25 минут до ишемии [Hamakawa et al., 1999]. Синтезирован компанией Enzo Life Sciences Inc. (New York, США)

Ингибитор PI3 киназы вортманнин (Wortmannin) растворяли в 0,1 мл DMSO. Полученный раствор добавляли к 1 мл 20%-раствора гидрохурпропил- β -cyclodextrin (200 мг гидрохурпропил- β -cyclodextrin в 1 мл H₂O) и 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).

Ингибирование нейтральной эндопептидазы (энкефалиназы) осуществляли при помощи внутривенной инъекции ацеторфана в дозе 10 мг/кг или RB 101 в дозе 10 мг/кг за 25 минут до начала экспериментального воздействия [Ortega-Alvaro A. et al., 1998, Лишманов Ю.Б. и др. 2001].

Блокаду АТФ-чувствительных K⁺-каналов осуществляли внутривенным введением блокатора митохондриальных и сарколеммальных K_{АТФ}-каналов глибенкламида в дозе 0,3 мг/кг за 10 минут до коронароокклюзии, блокатора митохондриальных K⁺_{АТФ}-каналов 5-гидроксидеканоата в дозе 5 мг/кг за 10 минут до коронароокклюзии [Schultz J.J. et al., 1997].

В экспериментах *in vitro*:

Ингибитор протеинкиназы С (ПКС) хелеритрина хлорид использовали в концентрации 5 μ М/л [Fryer R. M. et al., 1999; Khaliulin I., et al., 2010]. Ингибитор ПКС предварительно растворяли в DMSO в конечной концентрации 0,02%.

Ингибитор ПКС- δ роттлерин применяли в концентрации 1 мкМ/л [Маслов Л. Н. и др., 2013]; роттлерин предварительно растворяли в DMSO в конечной концентрации 0,02%.

Ингибитор PI3-киназы вортманнин использовали в концентрации 100 нМ/л. Вортманнин предварительно растворяли в DMSO в конечной концентрации 0,02% [Powis G. et al., 1994].

Ингибитор тирозинкиназы генистеин применяли в концентрации 50 мкМ/л, предварительно растворяли в DMSO в конечной концентрации 0,02% [Fryer R.M. et al., 1999].

2.2.17 Методы статистической обработки результатов

Анализ данных проводили с помощью пакетов программы STATISTICA 6.0. Результаты всех экспериментов приведены в таблицах в виде $M \pm SEM$, где M – среднее, SEM – ошибка среднего, n – объем анализируемой подгруппы, p – достигнутый уровень значимости. Гипотезу о равенстве средних для величин, соответствующих нормальному распределению, проверяли при помощи t -критерия Стьюдента. При сравнении полученных цифровых данных, распределение которых не соответствует нормальному, для выявления межгрупповых различий использовали непараметрический U -критерий Манна-Уитни. Проверку распределения величин проводили с помощью критерия Пирсона. Статистическую обработку качественных признаков (частота возникновения аритмий) проводили с помощью χ -критерия Пирсона (χ^2). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Кардиопротекторный эффект хронической нормобарической гипоксии и его механизмы

3.1.1 Характеристика проявлений кардиопротекторного действия хронической нормобарической гипоксии

О защитном действии хронической непрерывной нормобарической гипоксии в отношении ишемического-реперфузионного повреждения сердца судили по снижению размера ишемического некроза (инфаркта) при 20-минутной коронароокклюзии и последующей реперфузии (3 ч), уменьшению повреждения кардиомиоцитов при тотальной ишемии–реперфузии изолированного сердца крысы и по увеличению выживаемости изолированных кардиомиоцитов при их аноксии–реоксигенации.

3.1.1.1 Инфаркт–лимитирующий эффект хронической непрерывной нормобарической гипоксии¹

При коронароокклюзии во всех случаях наблюдали образование зоны нарушения перфузии (зона риска, ЗР), которая составляла 40% от массы левого желудочка. При этом отсутствие достоверных различий этого показателя между группами указывает на отсутствие изменения коллатерального кровотока под влиянием использованных воздействий и препаратов и воспроизводимость результатов (Рис. 5). Из таблицы 2 и рисунка 5 видно, что у животных контрольной группы 56% от массы зоны риска после окончания реперфузии оказалось некротизированным (Табл. 2, Рис. 5).

Исследования показали, что у крыс, подвергнутых хронической непрерывной гипоксии, зона ишемического некроза миокарда составила лишь 20% от зоны риска, что достоверно ($p < 0,01$) отличалось от соответствующего показателя контрольной группы (Табл. 2). Следовательно, при воздействии ХННГ соотношение зоны некроза к зоне риска уменьшалось на 63% по отношению к контролю.

¹ Исследование выполнено совместно с С.Ю. Цибульниковым

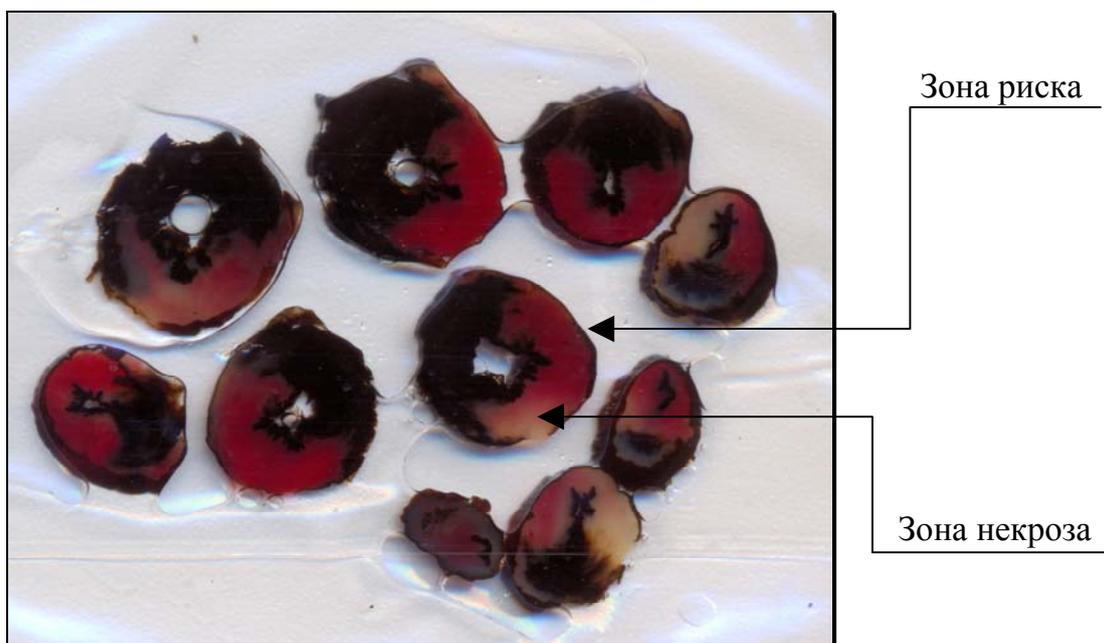


Рисунок 5 – Некроз миокарда при экспериментальной коронароокклюзии-реперфузии

Таблица 2 – Влияние ХННГ на размер зоны некроза при 20-минутной коронароокклюзии и 180-минутной реперфузии у крыс ($M \pm SEM$)

Группа	Контроль, n=15	ХННГ, n=18
МПЖ, мг	208 ± 15,1	256 ± 13 p<0,05
МЛЖ, мг	862 ± 45	760 ± 27
Зона риска, мг	338 ± 28	361 ± 24
Зона некроза, мг	141 ± 21	142 ± 24
ЗН/ЗР, %	56 ± 3	20 ± 2 p<0,01

Примечания: ХННГ – адаптация к хронической непрерывной нормобарической гипоксии. МПЖ – масса правого желудочка, МЛЖ – масса левого желудочка, ЗН/ЗР – соотношение массы зоны некроза к массе зоны риска. p – достоверность относительно группы контроля; U-критерий Манна-Уитни.

Эти результаты свидетельствуют о том, что хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия оказывает выраженный инфаркт-лимитирующий эффект.

Следует отметить, что под действием хронической нормобарической гипоксии у крыс значительно возростала масса правого желудочка, с 208 ± 15 мг в контрольной группе, до 256 ± 13 мг у адаптированных животных, то есть прирост массы составил 20% ($p < 0,05$) (Табл. 2). Эти изменения связаны возрастанием давления в легочной артерии, которое отмечается при подобном воздействии, и последующей компенсаторной гипертрофией сердца [Rivolta I. et al., 2011]. Изменение размера левого желудочка не было статистически значимым (Табл. 2).

Исследование показателей периферической крови крыс, подвергнутых ХННГ показали, что у этих животных происходит увеличения количества эритроцитов крови до 7,09 млн/мл, а концентрация гемоглобина возрастает до 229 г/л (Табл. 3).

Исследование показателей стресс-реакции выявило снижение массы тимуса и селезенки у крыс, подвергнутых ХННГ (Табл. 3). Вместе с тем, мы не наблюдали не возрастания уровня кортикостерона в сыворотке крови этих животных, ни гипертрофии надпочечников (Табл. 3). Изъязвлений желудка в этой экспериментальной группе не возникало. Интегральный балл стресса оказался равным 4,5. Полученные данные позволяют нам отнести адаптацию к хронической нормобарической гипоксии к слабому стрессирующему воздействию [Добряков В.И., 1978].

В таблице 4 представлены результаты измерения параметров гемодинамики – артериального давления и частоты сердечных сокращений в контрольной группе крыс и у крыс после курса ХННГ. Обнаружено, что до начала ишемии-реперфузии систолическое АД крыс составляло в среднем 130 мм рт. ст., а ЧСС - 376 ударов в минуту. Ишемия и последующая реперфузия не вызывала изменений частоты сердечных сокращений (Табл. 4). Во время ишемии не происходило достоверного снижения артериального давления. 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. 4).

Таблица 3 – Показатели периферической крови и стресс-реакции у крыс подвергнутых ХННГ (M ± SEM)

Группа животных	Контроль, n=17	ХННГ, n=14
Гемоглобин, г/л	150,22 ± 12,86	229,18 ± 40,63 p=0,0016
Эритроциты (млн/мл)	4,87 ± 0,61	7,09 ± 0,88 p=0,000005
Гематокрит	0,4 ± 0,02	0,62 ± 0,03 p=0,0005
Кортикостерон, нмоль/л	732,5 ± 46,76	810 ± 74,88 p=0,374260
Масса тимуса, мг	224,92 ± 13,96	186,08 ± 8,28 p= 0,00002
Масса надпочечников, мг	24,67 ± 0,87	23,42 ± 1,51 p=0,48
Масса селезенки, мг	1481,67 ± 69,23	1181,67 ± 65,47 p=0,0046
Количество язв желудка, n	0	0
Балл стресса	0	4,5 ± 0,57 p<0,00001

Примечания: p – уровень достоверности относительно группы контроля; U-критерий Манна-Уитни; ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия, n – количество животных в группе.

Таблица 4 – Влияние хронической нормобарической гипоксии (21 день, 12% O₂) показатели гемодинамики у крыс при 20-минутной коронароокклюзии и 180-минутной реперфузии (M ± SEM)

	Контроль, n =21	ХННГ, n =20
Артериальное давление, мм рт.ст.		
Исходный уровень АД	130 ± 2	129 ± 4
Ишемия	103 ± 2	115 ± 2
Реперфузия	125 ± 4	123 ± 3
ЧСС уд./мин		
Исходный уровень ЧСС	376 ± 2	373 ± 7
Ишемия	375 ± 3	377 ± 5
Реперфузия	366 ± 3	376 ± 4

Примечания: * p < 0,05 - достоверность по отношению к группе контроля; U-критерий Манна-Уитни, ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия, n – количество животных в группе.

Показатели гемодинамики крыс, подвергнутых ХННГ, не отличались от соответствующих показателей контрольной группы (Табл. 4).

Анализ данных электрокардиографии показал, что в первые 10 минут коронароокклюзии (фаза 1а) у всех крыс контрольной группы возникают желудочковые экстрасистолы, у 95% – желудочковая тахикардия, в 76 % случаев была отмечена фибрилляция желудочков (Табл. 5). В фазу 1б (10-20 минуты ишемии) у 76% животных мы наблюдались множественные желудочковые экстрасистолы, в 57% и 48% случаев, соответственно, были отмечены желудочковые тахикардии и фибрилляцию желудочков (Табл. 5).

Таблица 5 – Частота нарушений ритма при 20-минутной коронароокклюзии и 30-минутной реперфузии у крыс, подвергнутых адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии

Показатель	Контроль, n = 21	ХННГ, n = 20
ИШЕМИЯ Фаза 1а (1-10 минута)		
Без нарушений ритма	0 (0%)	2 (10%)
Желудочковые экстрасистолы	21 (100%)	18 (90%)
Желудочковая тахикардия	20 (95%)	17 (85%)
Желудочковая фибрилляция	16 (76%)	13 (65%)
ИШЕМИЯ Фаза 1б (10-20 минута)		
Без нарушений ритма	5 (24%)	3 (15%)
Желудочковые экстрасистолы	16 (76%)	17 (85%)
Желудочковая тахикардия	12 (57%)	13 (65%)
Желудочковая фибрилляция	10 (48%)	12 (60%)
РЕПЕРФУЗИЯ		
Без нарушений ритма	20 (95%)	14 (70%)
Желудочковые экстрасистолы	1 (5%)	6 (30%)
Желудочковая тахикардия	0 (0%)	1 (5%)
Желудочковая фибрилляция	0 (0%)	1 (5%)

Примечания: количество животных с теми или иными нарушениями ритма представлены в абсолютных значениях, в скобках – процент от количества животных в группе, n – количество животных в группе.

При возобновлении коронарного кровотока лишь у 5% контрольных животных обнаружены желудочковые экстрасистолы, без возникновения желудочковой тахикардии и фибрилляции (Табл. 5).

При моделировании 20-минутной ишемии у 90% крыс, прошедших курс ХННГ, в фазу 1а (первые 10 минут) возникали желудочковые экстрасистолы, которые переходили в желудочковые тахикардии и фибрилляцию желудочков в 85% и 65% случаев, соответственно, с последующим восстановлением сердечного ритма (Табл. 5). У 10% животных этой экспериментальной группы во время начальной стадии ишемии желудочковых нарушений сердечного ритма не отмечалось. Указанные частотные характеристики нарушений ритма сердца были статистически сопоставимы с аналогичными показателями группы контроля. Более продолжительное ишемическое воздействие (фаза 1б) нарушения сердечного ритма у 85% животных группы ХННГ, из них желудочковые тахикардия и фибрилляция составляли 65% и 60% случаев, соответственно (Табл. 5). В эту фазу ишемии частота возникновения нарушений ритма статистически не отличалась от таковой у контрольных крыс. Реперфузия вызывала множественные желудочковые экстрасистолы у 6 из 20 крыс группы ХННГ (30%), что было выше, чем в контрольной группе (Табл. 5). Однако статистической значимости эти изменения не имеют.

Резюмируя сказанное, можно говорить о том, что хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия не оказывала антиаритмического эффекта при коронароокклюзии и реперфузии. Приведенные факты подтверждают, что хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия обладает выраженным инфаркт-лимитирующим эффектом при ишемии-реперфузии [Tajima M. et al., 1994, Neckar J. et al., 2004]. При этом гипертрофия правого желудочка у крыс, подвергнутых хронической гипоксии, обнаруживается в большинстве исследований и является показателем приспособления организма к условиям хронической гипоксии [Neckar J., et al., 2004]. Как было показано выше, воздействие гипоксии сопровождается изменениями гематокрита, повышением уровня гемоглобина и содержания эритроцитов, что так же характерно для животных в состоянии адаптации к гипоксии [Neckar J., et al., 2004]. Однако признаки стресс-реакции у крыс, прошедших курс ХННГ выражены слабо,

повышение содержания кортикостерона крови в этой не происходит. Таким образом, в результате применяемого гипоксического воздействия были достигнуты основные значимые параметры адаптации к гипоксии: изменение показателей периферической крови, ремоделирование миокарда и инфаркт–лимитирующий эффект. Следует отметить, что в процессе адаптации крыс к хронической гипоксии не происходило изменения частоты сердечных сокращений и артериального давления в покое и при моделировании коронароокклюзии–реперфузии. Эти данные говорят о том, что инфаркт–лимитирующий эффект, наблюдаемый в результате ХННГ, не связан с изменением параметров центральной гемодинамики. Антиаритмического эффекта ХННГ мы не обнаружили.

3.1.1.2 Влияние хронической непрерывной нормобарической гипоксии на повреждение и сократительную функцию миокарда при тотальной ишемии–реперфузии изолированного сердца крысы²

В опытах на изолированном перфузируемом сердце контрольных животных тотальная 45-минутная ишемия и следующая за этим 30-минутная реперфузия приводила к повышению активности креатинфосфокиназы (КФК) в оттекающем от миокарда перфузионном растворе. Активность КФК при этом составила $45,38 \pm 5,35$ Ед/г (Табл. 5), в то время как фоновый выброс этого фермента клетками миокарда был равен $10,90 \pm 0,93$ Ед/г (Табл. 6). Эти изменения обусловлены ишемическим и реперфузионным некрозом кардиомиоцитов, который сопровождается разрывом сарколеммы и выходом из клеток конститутивных ферментов, таких как КФК [Маслов Л.Н. и др., 2013а].

При моделировании тотальной ишемии–реперфузии изолированного сердца крыс, предварительно подвергнутых ХННГ, выброс КФК составил $20,24 \pm 2,12$ ед/г, что было в 2,2 раза меньше, чем в аналогичной ситуации у неадаптированных крыс (Табл. 6). Эти данные свидетельствуют об уменьшении повреждения миокарда при ишемии–реперфузии у крыс после ХННГ. Исследование параметров сократительной функции миокарда крыс, подвергнутых ХННГ, показало, что исходные (до моделирования ишемии) значения этих величин у интактных животных и крыс с ХННГ не различались (Табл. 7).

² Исследование выполнено совместно с Е.С.Прокудиной

Таблица 6 – Активность креатинфосфокиназы в перфузионном растворе, оттекающем от изолированного миокарда крыс при моделировании тотальной ишемии-реперфузии ($M \pm SEM$).

Группа животных	Исходные значения до ишемии, ед/г	Ишемия – реперфузия, ед/г
Интактные крысы	10,90±0,93	45,38±5,35 p<0,05
ХННГ	8,95±1,24	20,24±2,12 p<0,05, p1<0,05

Примечания: ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия; количество животных в группе равно 10, p – достоверность различий по отношению к исходным значениям, p1 – по отношению к ишемии-реперфузии у неадаптированных крыс; U-критерий Манна-Уитни.

Таблица 7 – Исходные параметры сокращения изолированного сердца крыс. ($M \pm SEM$)

Группа животных	ДРЛЖ (мм рт. ст.)	КДД (mmHg)	ДП (ЧСС * ДРЛЖ/1000)
Интактные крысы	79,8 ± 5,1	11,1 ± 0,66	14.3 ± 1.2
ХННГ	81,9 ± 5,2	12,2 ± 0,4	17.0 ± 0.7

Примечания: ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия; ДРЛЖ – давление, развиваемое левым желудочком; КДД – конечное диастолическое давление; ДП - двойное произведение, равное 1/1000 произведения частоты сердечных сокращений на давление, развиваемое левым желудочком; количество животных в группе равно 10.

Тотальная ишемия изолированного сердца во всех экспериментах приводила к полной остановке сокращений миокарда (данные не представлены в таблице). Во время реперфузии наблюдалось частичное восстановление сократительной активности (Рис. 6). Так, в сердцах крыс контрольной группы восстановление ДРЛЖ через 30 минут реперфузии составило в среднем $20,64 \pm 3,57\%$ от исходного значения (Рис. 6). На рисунке 6 можно видеть, что во время реперфузии ДРЛЖ сердца крыс, подвергнутых ХННГ, составляла $50,3 \pm 1,98\%$ от исходных значений,

то есть постишемическое восстановление сократимости в этой экспериментальной группе оказалось в 2,5 раза выше, чем у неадаптированных крыс (Рис. 6). Полученные результаты позволяют констатировать факт усиления силы сокращений миокарда крыс, адаптированных к ХННГ, в условиях реперфузии.

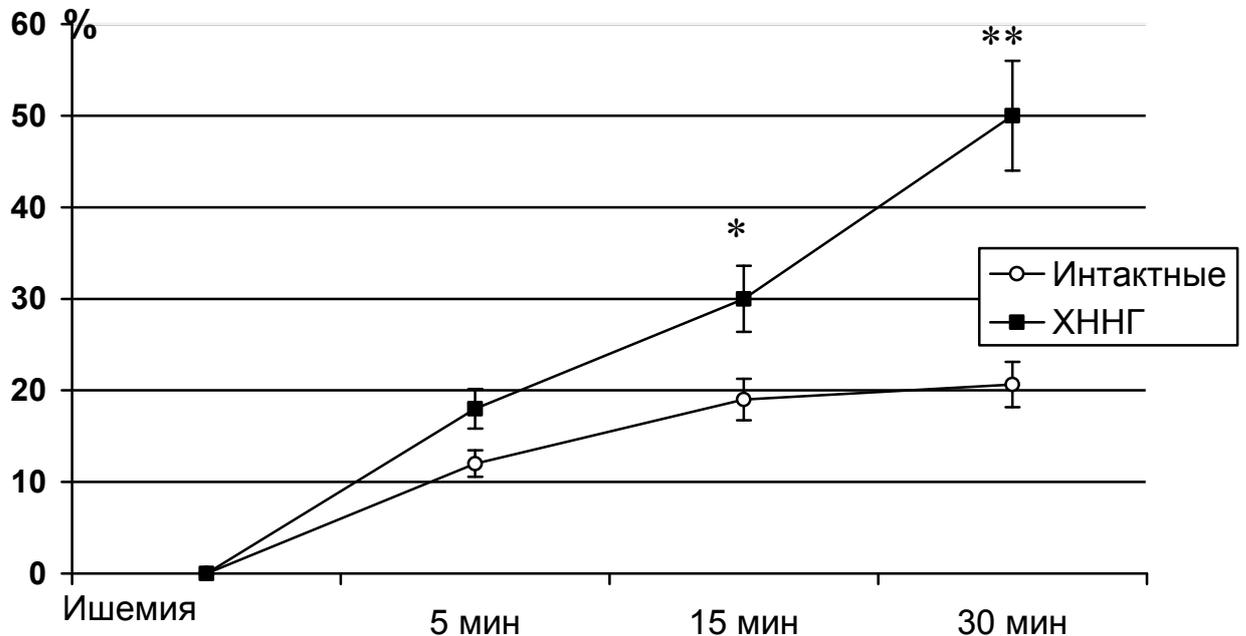


Рисунок 6 – Давление, развиваемое левым желудочком, изолированного сердца при реперфузии после 45-минутной ишемии ($M \pm SEM$)

Примечание: Давление, развиваемое левым желудочком выражено в процентах от исходного значения до ишемии, ХННГ - хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия; количество животных в группе равно 10. * – $p=0,0016$, ** – $p=0,000226$ по отношению к интактным крысам; U-критерий Манна-Уитни.

Кроме снижения ДРЛЖ во время реперфузии миокарда наблюдалось снижение частоты сердечных сокращений по отношению к исходным значениям. Так, после окончания ишемии, в группе интактных крыс ЧСС на 5 минуте реперфузии составило 41 ± 7 уд/мин (20% от исходного). Через 30 минут реперфузии ЧСС интактных сердец восстановилось до 76 ± 12 уд/мин (37% от исходного). Слабое восстановление ЧСС усугубляло нарушение сократительной функции, в связи с чем ее оценивали по величине двойного произведения, представляющего собой 1/1000 произведения ЧСС и силы сокращения миокарда [Najafi M. et al., 2014]. Как можно видеть в таблице 8, двойное произведение

сердце, изолированных у интактных крыс, к 30 минуте реперфузии оказался равным 1,22, что составило 7,5% от исходных значений (Табл. 8). Это свидетельствует о слабом восстановлении сократительной активности миокарда интактных крыс при ишемии–реперфузии.

Таблица 8 – Частота сердечных сокращений и продуктивный индекс изолированного сердца крыс при реперфузии (M±SEM)

Показатель	Временной интервал	Контроль	ХННГ
ЧСС, уд/мин	Исходно	205 ± 14	210 ± 9
	5 мин реперфузии	41 ± 7	51 ± 6
	15 мин реперфузии	49 ± 8	95 ± 9 p=0,0016
	30 мин реперфузии	76 ± 12	148 ± 10 p=0,000226
ДП, уд/мин*мм.рт.ст. 1000	Исходно	16,37 ± 0,78	17,15 ± 0,048
	5 мин реперфузии	0,41 ± 0,007	0,75 ± 0,021
	15 мин реперфузии	0,77 ± 0,016	2,39 ± 0,022 p<0,01
	30 мин реперфузии	1,22 ± 0,02	6,09 ± 0,05 p<0,001

Примечания: ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия; ЧСС – частота сердечных сокращений; ДП – двойное произведение, равное 1/1000 произведения частоты сердечных сокращений на давление, развиваемое левым желудочком; p – по отношению к соответствующему показателю у интактных крыс, U–тест Манна–Уитни; количество животных в каждой группе равно 12.

Как можно видеть в табл. 8, восстановление ЧСС сердец крыс, адаптированных к ХННГ, происходило быстрее, чем в группе интактных крыс. На 5 минуте реперфузии ЧСС этой группы сердец составила 51 ± 6 (24% от исходного), а на 30 минуте – уже 70% от исходного значения (Табл. 8). Увеличение ЧСС в совокупности с более высокими показателями давления, развиваемого левым желудочком, привело к возрастанию ДП крыс, адаптированных к ХННГ, который на 30 минуте реперфузии составил 6,09 ± 0,05 (36% от исходного значения), что в 5 раз превосходило показатель интактных крыс

(Табл. 8). Представленные данные демонстрируют повышение сократительной активности миокарда крыс, адаптированных к ХННГ, при моделировании ишемии-реперфузии.

Исследование диастолической функции сердца при реперфузии, следовавшей после тотальной ишемии, показало, что расслабление миокарда в этом случае нарушено, поскольку конечное диастолическое давление (КДД) в группе интактных крыс пятикратно превышало исходный уровень (Табл. 9). Хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия способствовала снижению этого показателя при постишемической реперфузии препарата сердца таким образом, что он оказался ниже интактных значений в 2 раза (Табл. 9). Следовательно, мы можем говорить о значительном улучшении расслабления миокарда при реперфузии изолированного сердца крыс, адаптированных к ХННГ.

Приведенные данные показывают значительное улучшение сократительной функции миокарда крыс, подвергнутых адаптации к ХННГ, при тотальной ишемии и реперфузии. Во время реперфузии улучшение сократимости, показателем которой являются давление, развиваемое левым желудочком и продуктивный индекс, сопровождается улучшением расслабления миокарда.

Таблица 9 – Конечное диастолическое давление при реперфузии, мм рт.ст (M±SEM)

Временной интервал	Контроль	ХННГ
Исходно	11,1 ± 0,6	12,2 ± 0,4
5 мин реперфузии	49,4 ± 2,4	29,2 ± 1,6 p=0,000016
15 мин реперфузии	44,9 ± 3,0	23,9 ± 1,5 p=0,000037
30 мин реперфузии	41,3 ± 2,3	20,6 ± 1,4 p=0,000019

Примечания: ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия; p – по отношению к соответствующему показателю у интактных крыс, U–тест Манна–Уитни; количество животных в каждой группе равно 10.

3.1.1.3 Изменение устойчивости изолированных кардиомиоцитов к аноксии-реоксигенации у крыс под влиянием хронической непрерывной нормобарической гипоксии

Исследование цитопротекторного действия хронической непрерывной нормобарической гипоксии проводили в условиях моделирования аноксии – реоксигенации свежевыделенной культуры изолированных кардиомиоцитов.

Исходное количество жизнеспособных палочковидных кардиомиоцитов в культуре клеток контрольной и опытной экспериментальных групп составило 65% и 66% соответственно для контрольных крыс и группы ХННГ (Табл. 10). Этот показатель характеризует качество культуры кардиомиоцитов и свидетельствует о сопоставимости изначальных параметров клеток в экспериментальных группах. Исходный выброс лактатдегидрогеназы (ЛДГ) кардиомиоцитами в группе интактных и ХННГ так же не различался (Табл. 11).

При моделировании 20-минутной аноксии и последующей 30-минутной реоксигенации кардиомиоцитов контрольных крыс количество погибших кардиомиоцитов составило $50,63 \pm 3,63\%$ от всего числа клеток (Табл. 10). Относительно исходной выживаемости этот показатель оказался равным 23%, эта величина характеризует количество клеток погибших под влиянием аноксии (Рис. 7). Процент выживших (палочковидных) кардиомиоцитов в контрольной группе составил $38,84 \pm 3,92\%$. При аноксии-реоксигенации кардиомиоцитов крыс, подвергнутых ХННГ, погибшими оказались $38,27 \pm 2,08\%$ (Табл. 10), что составило 2,5% от исходно жизнеспособных клеток (Рис. 7). При этом число выживших (палочковидных) кардиомиоцитов в группе ХННГ оказалось равным $49,78 \pm 2,34\%$, и было достоверно выше, чем в контрольной группе ($p < 0,05$; Табл. 10). Кардиомиоциты, не окрасившиеся трипановым синим, но потерявшие палочковидную форму были условно обозначены как гибнущие. Количество таких клеток и их процентное содержание в культуре кардиомиоцитов контрольной и опытной групп при аноксии–реоксигенации не различалось (Табл. 10).

Таблица 10 – Показатели гибели кардиомиоцитов при аноксии–реоксигенации (M±SEM)

Показатели	Контроль, n=11	ХННГ, n=13
Исходно		
Погибшие, %	29,5 ± 2,9	27,6 ± 3,17
Гибнущие, %	5,9 ± 0,8	6,3 ± 0,9
Палочковидные, %	64,6 ± 3,3	66,2 ± 3,22
Аноксия–реоксигенация		
Погибшие, %	50,63 ± 3,63	38,27 ± 2,08 p1=0,005668
Гибнущие, %	10,54 ± 1,0	11,46 ± 1,0 p1=0,523945
Палочковидные, %	38,84 ± 3,92	49,78 ± 2,34 p1=0,021482

Примечания: p - достоверность относительно интактных крыс (тест Манна–Уитни); ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия.

Параллельно цитологическому исследованию выживаемости кардиомиоцитов при аноксии–реоксигенации проводили определение выброса клетками лактатдегидрогеназы. В связи со значительной величиной фонового значения этого показателя, проводили параллельное исследование выброса ЛДГ клетками, не подвергавшимися аноксии, а инкубировавшимися в буфере Кребса (обозначая эти клетки термином «нормоксия»). Выброс ЛДГ этими клетками принимали за 100% в последующих расчетах.

Выброс лактатдегидрогеназы кардиомиоцитами интактных крыс при аноксии составил 175% относительно нормоксии (Табл. 11). В группе ХННГ этот показатель составил 142%, что оказалось на 33% ниже, чем в кардиомиоцитах интактных крыс при аноксии ($p < 0,05$). После окончания реоксигенации выброс ЛДГ кардиомиоцитами интактных крыс оказался равным 182% от нормоксии, в то же время в кардиомиоцитах крыс, подвергнутых ХННГ выброс ЛДГ составил 138% ($p < 0,05$) (Табл. 11). Следовательно, выброс маркера повреждения лактатдегидрогеназы клетками миокарда крыс, подвергнутых ХННГ, ниже, чем в группе неадаптированных крыс.

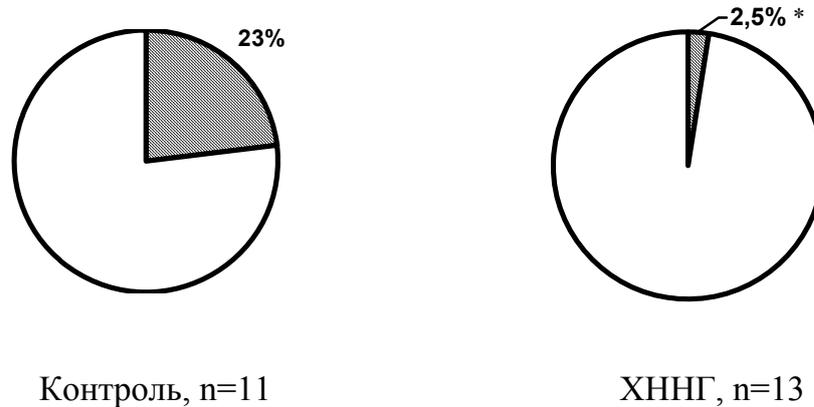


Рисунок 7 – Гибель кардиомиоцитов при аноксии-реоксигенации ($M \pm SEM$)

Примечания: Гибель клеток вычисляли в процентах относительно исходной выживаемости; * – $p < 0,01$ достоверность относительно контрольных крыс, U-тест Манна-Уитни; ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия.

Таблица 11 – Выброс лактатдегидрогеназы изолированными кардиомиоцитами крыс при аноксии–реоксигенации ($M \pm SEM$)

Группа	Контроль, n=11	ХННГ, n=13
Исходно		
Выброс ЛДГ при аноксии, % от исходного значения	$174,65 \pm 19,57$	$141,93 \pm 8,27$ $p1 < 0,05$
Выброс ЛДГ при реоксигенации, % от исходного значения	$181,66 \pm 15,15$	$137,76 \pm 7,94$ $p1 < 0,025$

Примечания: n – количество животных в группе; p1 – достоверность относительно контроля (t–тест Стьюдента); ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия.

Полученные факты свидетельствуют о выраженном цитопротекторном эффекте ХННГ, поскольку при этом экспериментальном воздействии нами было обнаружено снижение клеточной гибели и выброса маркеров повреждения при аноксии–реоксигенации изолированных кардиомиоцитов.

Исследование образования активных форм кислорода выявило, что аноксия и следующая за ней реоксигенация приводит к двукратному возрастанию свечения 2',7'-дихлорфлуоресцеина (ДХФ) в изолированных кардиомиоцитах по отношению к клетками, не подвергнутым аноксии (Табл. 12). В клетках, выделенных из миокарда крыс после ХННГ, свечение ДХФ возросло лишь в 1,5 раза, что было достоверно ниже, чем в группе неадаптированных крыс (Табл. 12). Эти данные свидетельствуют о том, что ХННГ способствует снижению степени окислительного стресса в кардиомиоцитах.

Таблица 12 - Влияние ХННГ на свечение 2',7'-дихлорфлуоресцеина в изолированных кардиомиоцитах крыс после аноксии-реоксигенации (M±SEM)

Экспериментальная группа	Интактные крысы, n=11	ХННГ, n=13
Свечение 2',7'-дихлорфлуоресцеина, %	199,78 ± 26,26	147,86 ± 6,95 p1=0,043875

Примечания: Свечение дихлорфлуоресцеина выражено в процентах от аналогичного показателя клеток, не подвергнутых аноксии-реоксигенации; p1 – по отношению к интактным крысам, t-тест Стьюдента.

Подводя итог сказанному в данном разделе, мы можем с уверенностью говорить о том, что миокард крыс, подвергнутых хронической непрерывной нормобарической гипоксии, становится устойчивым к повреждению, вызванному локальной коронароокклюзией–реперфузией *in vivo* и тотальной ишемией–реперфузией изолированного сердца *in vitro*. Кроме того, нами обнаружен цитопротекторный эффект ХННГ при моделировании аноксии–реоксигенации изолированных кардиомиоцитов. Полученные данные согласуются с результатами других исследователей. Так, впервые в 1994 г японские исследователи М. Tajima M. и соавт. обнаружили, что миокард крыс, подвергнутых хронической нормобарической гипоксии способен лучше восстанавливать сократительную функцию после ишемии [Tajima M. et al., 1994]. Подтверждение этих данных было получено в исследованиях, проведенных в институте физиологии г. Прага коллективом авторов под руководством В. Ostadal и F. Kolar [Kolar F., Ostadal B. 2004; Neckár J. et al., 2013; Borchert G.H. et al., 2011;

2013]. Эти исследователи впервые выявили инфаркт лимитирующий эффект этого адаптирующего воздействия *in vivo* [Neckár J. et al., 2003]. Цитопротекторный эффект хронической нормобарической гипоксии ранее был выявлен только на модели метаболического ингибирования клеточного дыхания [Borchert G.H. et al., 2011; 2013], цитопротекторный эффект ХННГ на модели аноксии–реоксигенации изолированных кардиомиоцитов выявлен впервые.

Следует отметить, что многие авторы отмечают чрезвычайно выраженный и длительный инфаркт–лимитирующий эффект при адаптации к нормобарической гипоксии [Neckar J. et al., 2004]. Так, сокращение размера инфаркта миокарда при этом адаптирующем воздействии достигает 63% (Табл. 2), продолжительность эффекта – до 5 недель после прекращения гипоксии [Neckar J. et al., 2004]. Раскрытие механизмов столь эффективного способа защиты миокарда от ишемического–реперфузионного повреждения позволило бы определить направление для развития новых путей фармакологической терапии и профилактики. Однако в настоящее время механизмы защитного эффекта ХННГ малоизученны. В частности нет данных о рецепторных механизмах реализации эффектов ХННГ. Принимая во внимания данные о важной роли опиоидных рецепторов в реализации ряда адаптивных воздействий [Schultz J.E.J., 1998; Xu Y.C., et al., 2015], целью наших исследований явилось изучение участия опиоидных рецепторов и связанных с ними внутриклеточных сигнальных механизмов в реализации защитного эффекта, который формируется при хронической непрерывной нормобарической гипоксии.

3.1.2 Исследование участия опиоидных рецепторов в механизме реализации кардиопротекторного эффекта хронической нормобарической гипоксии

3.1.2.1 Влияние хронической непрерывной нормобарической гипоксии на содержание опиоидных пептидов в крови и ткани миокарда крыс³

Исследования показали, что содержание мет-энкефалина в плазме крови интактных крыс составляло 528,08 пг/мл, содержание бета-эндорфина было равным 995,33 пг/мл, концентрация эндоморфина-1 и эндоморфина-2 была

³ Исследование выполнено совместно с С.Ю.Цибульниковым

соответственно 4,87 и 11,43 пг/мл (Табл. 13). В ткани миокарда опиоидные пептиды были обнаружены в следующих концентрациях: мет-энкефалин 10,52 пг/мг ткани, бета-эндорфин 0,59 пг/мг, эндоморфин-1 - 0,0049 пг/мг, эндоморфин-2 – 0,022 пг/мг (Табл. 13). Содержание мет-энкефалина и бета-эндорфина в плазме крови и ткани миокарда согласуются с данными литературы [Лишманов Ю.Б. и др., 1987], содержание эндоморфинов в ткани миокарда определено впервые.

Экспериментальная коронароокклюзия и последующая реперфузия привели к значительному снижению содержания опиоидных пептидов мет-энкефалина и бета-эндорфина в ткани миокарда. Оказалось, что содержание мет-энкефалина снизилось в 6,5 раз, бета-эндорфина в 3,2 раза по отношению к интактным крысам (Табл. 13). В содержании эндоморфинов достоверных изменений не произошло. В плазме крови у крыс после коронароокклюзии-реперфузии концентрация мет-энкефалина уменьшилась на 18%, уровень бета-эндорфина снизился на 23%, а содержание эндоморфина-2 - на 40% по сравнению с интактными животными; концентрация эндоморфина-1 значимо не изменилась (Табл. 13). У крыс подвергнутых хронической непрерывной нормобарической гипоксии наблюдалось достоверное большее по сравнению с интактными животными содержание мет-энкефалина в плазме крови, оно составило 702 пг/мл, и ткани миокарда (20 пг/мл, Табл. 13). Количество эндоморфина-1 в плазме крови крыс после ХННГ оказалось выше, чем у интактных особей в 1,5 раза, в ткани миокарда – в 11 раз (Табл. 13). Повышение содержания эндоморфина-2 в плазме крови крыс под действием ХННГ составило 34%, а в ткани миокарда количество этого пептида превысило уровень интактных крыс в 12 раз (Табл. 13). ХННГ на содержание бета-эндорфина не повлияла. Полученные данные свидетельствуют о значительном повышении содержания опиоидных пептидов в плазме крови и миокарде крыс после хронической непрерывной нормобарической гипоксии. Коронароокклюзия и реперфузия, проводимая у крыс после курса ХННГ, привела к возрастанию концентрации мет-энкефалина в плазме крови по отношению к этому показателю у интактных крыс на 40%, по сравнению с группой животных, которым моделировали коронароокклюзию без предварительного курса ХННГ на 51%. По отношению к крысам, подвергнутым курсу ХННГ без последующей коронароокклюзии возрастание уровня мет-энкефалина составило 21% (Табл. 13).

В миокарде крыс, подвергнутых коронароокклюзии-реперфузии после воздействия ХННГ содержание мет-энкефалина оказалось равным 18,55 пг/мг, что было в 1,8 раза выше, чем у интактных крыс и в 12 раз выше, чем в группе животных, которым коронароокклюзию моделировали без предварительного курса адаптации к гипоксии (Табл. 13). При исследовании концентрации бета-эндорфина в плазме крови крыс, подвергнутых ХННГ и затем коронароокклюзии-реперфузии, обнаружено, что этот показатель возрос на 40% по отношению к группе «коронароокклюзия-реперфузия» (Табл. 13), но статистически значимо не отличался от аналогичного показателя в группе ХННГ и интактных крыс. Содержание этого опиоидного пептида в миокарде крыс при моделировании коронароокклюзии-реперфузии после ХННГ оказалось выше, чем у интактных крыс в 1,8 раза, по сравнению коронароокклюзией без ХННГ в 5,8 раз, а по сравнению с ХННГ в 2 раза (Табл. 13). Содержание эндоморфина-1 в плазме крови крыс, которым моделировали коронароокклюзию-реперфузию после ХННГ, составило 13,7 пг/мл, что оказалось в 2,8 раза выше, чем у интактных крыс; в 3 раза выше, чем в группе животных с моделированием коронароокклюзии-реперфузии без ХННГ и в 1,8 раз выше группы «ХННГ» (Табл. 13). Исследование содержания эндоморфина-2 в плазме крови крыс после курса ХННГ и коронароокклюзии показало возрастание содержания этого опиоидного пептида на 80% по сравнению с интактными крысами, трехкратное повышение по отношению к группе крыс, перенесших коронароокклюзию-реперфузию и увеличение на 37% относительно группы «ХННГ» (Табл. 13). В ткани миокарда у крыс, коронароокклюзия после курса ХННГ привела к еще более выраженным изменениям содержания эндоморфина-2: относительно интактных крыс этот показатель оказался больше в 21 раз, уровень группы «коронароокклюзия-реперфузия» превосходил в 31 раз, а относительно группы ХННГ вырос в 1,8 раза (Табл. 13).

Таблица 13 – Влияние адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии на содержание опиоидных пептидов в плазме крови и ткани миокарда крыс (M ± SEM)

Показатель		Интактные	Коронароокклюзия - реперфузия	ХННГ	ХННГ + коронароокклюзия - реперфузия
Мет-энкефалин	Плазма крови, пг/мл	528,08 ± 29,32	436,38 ± 34,15 p1<0,02	702,88 ± 42,28 p1<0,01	899,79 ± 83,24 p1<0,01; p2<0,01, p3<0,01
	Миокард, пг/мг	10,52 ± 2,8	1,58 ± 0,14 p1<0,01	20 ± 2,92 p1<0,01	18,55 ± 3,39 p3<0,01
β-эндорфин	Плазма крови, пг/мл	995,33 ± 39,7	758,52 ± 88,16 p1<0,05	1045,39 ± 43,16	1062,06 ± 78,15 p3<0,02
	Миокард, пг/мг	0,59 ± 0,06	0,19 ± 0,02 p1<0,01	0,64 ± 0,066	1,04 ± 0,082 p2<0,01 p3<0,01
Эндоморфин-1	Плазма крови, пг/мл	4,88 ± 0,42	4,54 ± 0,53	7,48 ± 0,24 p1<0,01	13,7 ± 1,94 p1<0,01 p2<0,01, p3<0,01
	Миокард, пг/мг	0,0049 ± 0,00034	0,0042 ± 0,00017	0,046 ± 0,0087	0,038 ± 0,0061 p1<0,01; p3<0,01
Эндоморфин-2	Плазма крови, пг/мл	11,44 ± 0,96	6,88 ± 0,73 p1<0,01	15,04 ± 1,24 p1<0,01	20,7 ± 2,41 p2<0,01 p3<0,01
	Миокард, пг/мг	0,023 ± 0,0015	0,016 ± 0,0067	0,258 ± 0,038 p1<0,001	0,465 ± 0,0439 p2<0,01 p3<0,01

Примечания: p1 – по отношению к интактным крысам, p2 – по отношению к группе ХННГ, p3 – по отношению к ишемии-реперфузии у интактных особей, t-тест Стьюдента. Количество наблюдений в каждой группе n=10.

Представленные данные свидетельствуют о том, что хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия способствует увеличению уровня мет-энкефалина, эндоморфина-1 и эндоморфина-2 в плазме крови крыс. При этом в ткани миокарда происходит повышение содержания мет-энкефалина и эндоморфина-2. Коронароокклюзия и реперфузия приводит к значительному снижению содержания в плазме крови и ткани миокарда мет-энкефалина, бета-эндорфина и эндоморфина-2. Тот факт, что наиболее выраженное снижение бета-эндорфина и мет-энкефалина происходят в ткани миокарда можно рассматривать как истощение клеточных депо предшественников опиоидов (проопиомеланокортина и проэнкефалинов).

Однако у крыс, подвергнутых адаптации к ХННГ не происходит снижения уровня опиоидных пептидов в плазме крови и миокарде в ответ на коронароокклюзию и реперфузию. Возможно, это обусловлено накоплением предшественников опиоидов в ткани миокарда и других органов в процессе ХННГ. Это предположение подтверждается обнаруженным нами кратным возрастанием содержания опиоидов в ткани миокарда крыс после курса ХННГ.

Остается неясным, какое значение играют обнаруженные нами изменения опиоидной системы в формировании защитного эффекта хронической непрерывной нормобарической гипоксии. Для выяснения этого нами проведено исследование инфаркт-лимитирующего, кардиопротекторного и цитопротекторного эффекта ХННГ в условиях блокады опиоидных рецепторов.

3.1.2.2 Зависимость размера инфаркта при коронароокклюзии-реперфузии у крыс, подвергнутых хронической непрерывной нормобарической гипоксии, от активации опиоидных рецепторов ⁴

Как показано в таблице 14, введение антагонистов опиоидных рецепторов интактным животным не оказывало влияния на размер инфаркта при последующей коронароокклюзии и реперфузии. Этот факт подтверждает возможность использования выбранных антагонистов опиоидных рецепторов в

⁴ Исследование выполнено совместно с С.Ю.Цибульниковым

качестве фармакологических инструментов для исследования роли ОР в реализации кардиопротекторного эффекта ХННГ

Таблица 14 – Влияние антагонистов опиоидных рецепторов на размер зоны некроза при коронароокклюзии-реперфузии у крыс, не подвергавшихся адаптации к ХННГ (M±SEM).

Группа	n	МПЖ, мг	МЛЖ, мг	Зона риска, мг	Зона некроза, мг	ЗН/ЗР (%)
Контроль	15	208 ± 15,0	861,8± 44,9	336,5±27,6	143,3±21,2	56 ± 2,9
Налтрексон 5 мг/кг	12	210,6±14,5	838,7± 26,4	377,5±21,1	197,9±23,7	52 ± 5,7
ТИРР (ψ) 0,5мг/кг	13	206,3±13,6	837,6± 39,8	373,9±17,5	208,1±13,8	56 ± 4,1
Налтрибен 0,3 мг/кг	11	205,5± 7,1	845,4± 38,4	267,4±24,3	147,6±18,4	54 ± 4,1
ВНТХ 0,7 мг/кг	11	206,7± 17,8	857,5± 24,2	294 ±33,6	145,4±5,9	49 ± 3,07
СТАР 0,1 мг/кг	12	307,6±18,8	846,7± 36,7	367,6±32,5	182,7±36,9	49 ± 9,3
Норбинал- торфимин 9 мг/кг	12	200,2±16,3	855,8± 37,8	313,9±50,9	151,5 ± 9,5	49 ± 3,8

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

Как уже говорилось ранее (Табл. 2), размер инфаркта при коронароокклюзии-реперфузии у крыс, подвергнутых хронической непрерывной нормобарической гипоксии, был в 2,7 раза меньше, чем у неадаптированных особей. Ингибирование всех типов опиоидных рецепторов при помощи введения налтрексона у крыс, подвергнутых ХННГ, приводило к возрастанию соотношения размера зоны некроза/зона риска (ЗН/ЗР) при последующей коронароокклюзии-реперфузии с 20% до 53%, что оказалось равным этому показателю в контрольной группе (Табл. 15). Таким образом обнаружено, что блокирование всех типов ОР приводит к исчезновению инфаркт-лимитирующего эффекта ХННГ. В таблице 15

показано, что блокирование δ -ОР их селективным антагонистом TIPP(ψ) так же приводит к увеличению соотношения ЗН/ЗР у крыс, подвергнутых ХННГ, на 30% (Табл. 15). В результате соотношение ЗН/ЗР в этой экспериментальной группе оказалась сопоставимой с этим показателем в контроле. Эти данные являются доказательством участия δ -ОР в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта ХННГ. Поскольку известны на два субтипа δ -ОР, целью последующего исследования стало выявление значения δ_1 - и δ_2 -ОР в реализации кардиопротекции при ХННГ. Оказалось, что в условиях блокирования δ_1 -ОР их селективным антагонистом BNTX, размер у животных, подвергнутых ХННГ, не изменялся, то есть сохранялся инфаркт-лимитирующий эффект ХННГ (Табл. 15). В то время как блокирование δ_2 -ОР селективным антагонистом этого субтипа ОР налтрибеном способствовало увеличению размера инфаркта (ЗН/ЗР) с 20% у животных с ХННГ до 54% в группе ХННГ + налтрибен (Табл. 15). Эти данные показывают, что в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта ХННГ важную роль играют δ_2 -ОР, а δ_1 -ОР по-видимому, не принимают участие в реализации этого эффекта.

Ингибирование μ -ОР введением селективного антагониста этого вида ОР СТАР приводило к возрастанию показателя ЗН/ЗР на 28%, что свидетельствует об устранении кардиопротекторного эффекта ХННГ при блокировании этого субтипа ОР (Табл. 15). Эти данные свидетельствуют о том, что μ -ОР, также как и δ_2 -ОР, реализуют инфаркт-лимитирующее действия ХННГ. Введение антагониста к-ОР норбиналторфимина не повлияло на показатель ЗН/ЗР у особей, подвергнутых ХННГ (Табл. 15). Следовательно, мы можем говорить о том, что к-ОР не участвуют в реализации кардиопротекторного эффекта ХННГ.

Проведенные исследования показали, что при внутривенном введении антагонистов δ_2 - и μ -опиоидных рецепторов животным, подвергнутым ХННГ, инфаркт лимитирующий эффект этого адаптирующего воздействия не проявляется. Остается неясным вопрос о локализации опиоидных рецепторов, ответственных за кардиопротекторное действие ХННГ. Ответ на него был получен в экспериментах, проведенных на изолированном перфузируемом сердце и изолированных кардиомиоцитах.

Таблица 15 – Влияние блокады опиоидных рецепторов 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	15	207 ± 15,0	861,9± 44,9	337,5± 27,6	142,3± 21,2	57 ± 3
ХННГ	18	256,1± 12,8 P<0,05	760,5± 28,2	360,4± 23,6	142,9± 23,5	20 ± 1,8 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	53 ± 6 P1<0,01
ХННГ + ГИРР (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 ± 4 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± 4,2 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	14± 3,1 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 ± 9,4 p1<0,01
ХННГ + норбинал- торфимин 9 мг/кг	12	240,1± 11,3 p<0,05	805,7± 35,8	312,9± 50,9	50,5 ± 9,5	19 ± 3,7 p<0,01

Примечания: 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; U-критерий Манна-Уитни.

3.1.2.3 Влияние антагонистов опиоидных рецепторов на показатели сократительной функции миокарда и степень повреждения кардиомиоцитов при ишемии-реперфузии изолированного сердца крыс, подвергнутых воздействию хронической нормобарической гипоксии⁵

Ранее в главе 3.1.1 приведены данные, демонстрирующие выраженное кардиопротекторное действие ХННГ при ишемии-реперфузии изолированного перфузируемого сердца крысы (Табл. 6). Выброс креатинфосфокиназы, использованный нами в качестве маркера повреждения кардиомиоцитов при ишемии-реперфузии, у животных после курса ХННГ оказался в 2,3 раза меньше, чем в контрольной группе (Табл. 6, 16).

Для выявления участия опиоидных рецепторов миокарда в кардиопротекторном действии ХННГ, перед моделированием тотальной ишемии-реперфузии изолированного сердца крысы миокард перфузировали раствором одного из селективных антагонистов опиоидных рецепторов. В том случае, если миокард, выделенный у животных, предварительно подвергнутых ХННГ, перед моделированием ишемии-реперфузии перфузировали раствором налоксона (антагонист всех типов ОР), активность КФК в оттекающем от миокарда перфузионном растворе оказалось равным $39,78 \pm 5,29$ ед/г (Табл. 16). Эта величина была вдвое выше, чем в группе ХННГ и не отличалось от неадаптированного контроля (Табл. 16). Результаты этих экспериментов свидетельствуют о том, что кардиопротекторный эффект адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии не проявляется при блокаде опиоидных рецепторов, что может говорить о их важной роли в реализации кардиопротекторного эффекта ХННГ. Перфузия миокарда крыс, подвергнутых ХННГ, селективным антагонистом δ -опиоидных рецепторов $\text{TiPP}(\psi)$ перед ишемией приводила к увеличению выхода КФК в перфузионный раствор по отношению к группе ХННГ, что говорит об увеличении ишемического повреждения миокарда. Следовательно, в присутствии антагониста δ -ОР кардиопротекторный эффект ХННГ на данной модели ишемического-реперфузионного повреждения миокарда не проявляется.

⁵ Исследование выполнено совместно с Е.С.Прокудиной

Предварительное перфузия сердец крыс, подвергнутых ХННГ, раствором, содержащим антагонист δ_2 -ОР налтрибен, приводила к возрастанию выброса КФК из кардиомиоцитов в перфузионный раствор изолированного сердца по отношению к контрольным сердцам группы «ХННГ», в то время как блокада δ_1 -ОР препаратом BNTX не оказало влияния на этот показатель (Табл. 16). Эти данные позволяют говорить о том, что при блокада δ_2 -ОР кардиопротекторный эффект ХННГ при ишемии-реперфузии изолированного сердца не проявляется.

Таблица 16 – Активность креатинфосфокиназы в перфузионном растворе, оттекающем от изолированного миокарда крыс при моделировании тотальной ишемии-реперфузии, ед/г ($M \pm SEM$)

Группа животных	Интактные крысы	ХННГ
Исходные значения	10,90±0,93	8,95±1,24
Ишемия – реперфузия	45,38 ±5,35 p = 0,000002	19,77 ± 1,45 p = 0,00019 p1 = 0,0003
Налоксон + ишемия-реперфузия	43,78 ± 3,17 p=0,0004	39,78 ± 5,29 p2=0,001
TiPP (ψ) + ишемия- реперфузия	49,7 ± 3,67 p=0,0001	51,43 ± 3,06 p2 = 0,000016
BNTX + ишемия- реперфузия	47,19 ± 5,58 p = 0,00022	18,81 ± 1,99 p2 = 0,443422
Налтрибен + ишемия- реперфузия	43,12 ± 4,84 p = 0,000037	46,53 ± 3,7 p2 = 0,000016

Примечания: ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия; количество животных в каждой группе равно 12; p – достоверность различий по отношению к исходным значениям, p1 – по отношению к ишемии-реперфузии у неадаптированных крыс, p2 – к группе «ХННГ+ишемия-реперфузия» ; U- критерий Манна-Уитни.

Как было сказано ранее (Гл. 3.1.1.2), кардиопротекторный эффект ХННГ сопровождался улучшением сократительной функции миокарда. На рис. 8 можно видеть, что сила сокращения сердца крыс, подвергнутых ХННГ, на 15 минуте реперфузии составляла 30% а на 30 минуте достигала 50 % от исходных значений, то есть постишемическое восстановление сократимости в этой экспериментальной группе оказалось в 2 раза эффективнее, чем у неадаптированных крыс, $p < 0,01$ (Рис. 8). Предварительная перфузия миокарда крыс, подвергнутых ХННГ, налоксоном приводила к двукратному снижению сократительной активности миокарда по отношению к группе ХННГ. Таким образом, восстановление силы сокращения в этой экспериментальной группе оказалось статистически не различимым с группой интактного контроля (Рис. 8). Перфузия изолированного сердца крыс группы ХННГ раствором антагониста δ -опиоидных рецепторов $TiPP(\psi)$ приводила к снижению силы сокращений изолированного сердца при реперфузии до показателей контрольной группы, не подвергнутой ХННГ (Рис. 8).

Известно, что δ -опиоидные рецепторы разделяются на I и II субтипы. Блокада δ_1 -ОР путем перфузии миокарда крыс после ХННГ селективным антагонистом этого субтипа ОР BNTX не повлияло на силу сокращения миокарда во время реперфузии. Однако блокада δ_2 -ОР налтрибеном привела к снижению силы сокращения изолированного сердца в два раза по отношению к таковым группы «ХННГ» ($p < 0,05$) (Рис. 8). Приведенные данные свидетельствуют о том, что наблюдаемый при ХННГ положительный инотропный эффект при реперфузии миокарда не обнаруживается в условиях блокады δ_2 -ОР.

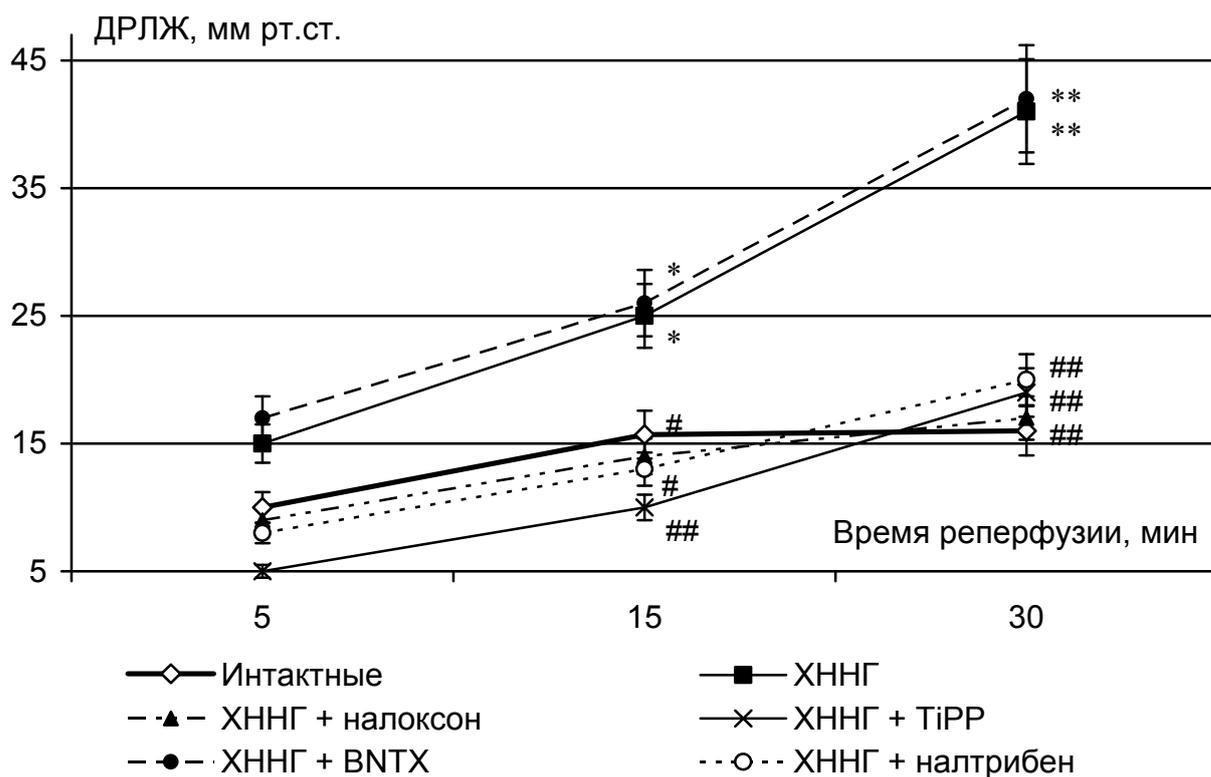


Рисунок 8 – Сила сокращения изолированного сердца крысы при реперфузии после 45-минутной ишемии

Примечание: ХННГ - хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия; ДРЛЖ – давление, развиваемое левым желудочком; * - $p < 0,01$, ** - $p < 0,001$ по отношению к ишемии-реперфузии у интактных крыс, # – $p < 0,01$, ## - $p < 0,0001$ к группе ХННГ; U-критерий Манна-Уитни, количество животных в каждой группе равно 12.

Поскольку следующая за тотальной ишемией реперфузия миокарда характеризуется снижением частоты сердечных сокращений, наиболее адекватным показателем сократимости миокарда является двойное произведение, определяемое как $1/1000$ произведения ЧСС и силы сокращения. Как можно видеть в таблице 17, двойное произведение во время реперфузии значительно снижалось по отношению к исходным значениям и составил $0,41 \pm 0,007$ уд/мин*мм рт.ст./1000 через 5 минут после начала реперфузии, $0,77 \pm 0,016$ уд/мин*мм рт.ст./1000 через 15 минут и $1,22 \pm 0,02$ уд/мин*мм.рт.ст./1000 через 30 минут после возобновления подачи перфузионного раствора против $16,37 \pm 0,078$ уд/мин*мм рт.ст./1000 до начала ишемии (Табл. 17). Следовательно, восстановление этого показателя в течение 30–минутной реперфузии в группе неадаптированных крыс составило лишь 7,5% от исходного значения до начала ишемии. В то же время в группе «ХННГ» сократимость миокарда (ДП) за 30 минут реперфузии восстановилась до 40% по отношению к исходным значениям (Табл. 17). Если же миокард адаптированных к ХННГ животных подвергали ишемии после его предварительной перфузии налоксоном, то восстановление сократимости (ДП) в реперфузионном периоде составило лишь 4,3%, что было достоверно ниже группы «ХННГ» и не имело статистических отличий от неадаптированного контроля (Табл. 17). Блокада δ -ОР с помощью перфузии $TiPP(\psi)$ у крыс, адаптированных к ХННГ, приводило к снижению реперфузионного восстановления сократимости (ДП) до 9,7%, что было ниже показателя группы «ХННГ» ($p < 0,01$), блокада δ_2 -ОР налтрибеном оказала сходный эффект (Табл. 17).

Однако предварительная перфузия миокарда крыс, подвергнутых ХННГ, селективным антагонистом δ_1 -ОР BNTX не повлияла на интегральный показатель сократимости миокарда при реперфузии (Табл. 17). Полученные данные показывают, что сократительная функция миокарда, претерпевающая значительное снижение при ишемии–реперфузии, значимо лучше восстанавливается в миокарде крыс, адаптированных к непрерывной нормобарической гипоксии. При блокаде δ_2 -ОР этот эффект ХННГ не проявляется. Следовательно, мы можем говорить об опосредованном через δ_2 -ОР положительном инотропном действии ХННГ.

Таблица 17 – Частота сердечных сокращений и продуктивный индекс изолированного сердца крыс при реперфузии (M±SEM),

Экспериментальные группы	Интактные	ХННГ	ХННГ + налоксон	ХННГ + TiPP(ψ)	ХННГ + BNTX	ХННГ + налтрибен
Частота сердечных сокращений, уд/мин						
Исходно	204,2 ± 14,4	208,5 ± 9,5	218,5 ± 8,3	215,5 ± 8,7	231,2 ± 11,8	248,4 ± 10,8
5 мин реперфузии	41,5 ± 7,4	50,5 ± 6,4	35,9 ± 5,8	25,7 ± 8,6	76,0 ± 13,5	32,4 ± 2,9
15 мин реперфузии	49,1 ± 8,2	95,1 ± 9,5 p=0,0016	45,5 ± 7,9 p1=0,00074	46,6 ± 10,1 p1=0,0033	124,0 ± 17,44 p=0,027	39,9 ± 9,7 p1=0,0012
30 мин реперфузии	75,9 ± 12,2	147,8 ± 10,1 p=0,000226	49,3 ± 7,1 p1=0,000022	79,7 ± 10,4 p1=0,001331	144,0 ± 12,8 p=0,0086	70,6 ± 8,7 p1=0,000175
Двойное произведение, уд/мин * мм рт.ст./1000						
Исходно	16,37 ± 0,08	17,15 ± 0,048	19,22 ± 0,034	15,93 ± 0,041	17,72 ± 0,036	18,81 ± 0,029
5 мин реперфузии	0,41 ± 0,006	0,76 ± 0,02	0,33 ± 0,004	0,124 ± 0,016	1,32 ± 0,046	0,25 ± 0,003
15 мин реперфузии	0,77 ± 0,016	2,39 ± 0,022 p<0,01	0,62 ± 0,012 p1<0,01	0,47 ± 0,024 p1<0,01	3,22 ± 0,037 p<0,01	0,51 ± 0,011 p1<0,01
30 мин реперфузии	1,22 ± 0,02	6,09 ± 0,05 p<0,001	0,823 ± 0,009 p1<0,01	1,54 ± 0,035 p1<0,01	6,0 ± 0,04 p<0,01	1,36 ± 0,013 p1<0,01

Примечания: ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия; ЧСС – частота сердечных сокращений; Двойное произведение = произведению частоты сердечных сокращений на давление, развиваемое левым желудочком, (HR * LVDP/1000); p – по отношению к соответствующему показателю у интактных крыс, p1 – по отношению к соответствующему показателю группы «ХННГ», U–тест Манна–Уитни; количество животных в каждой группе равно 12.

Исследование диастолической функции миокарда при реперфузии, следовавшей после тотальной ишемии, показало, что расслабление миокарда неадаптированных крыс в этом случае нарушено, конечное диастолическое давление (КДД) превышало исходный уровень в 4,5 раза (Рис. 9). Хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия способствовала снижению КДД при постишемической реперфузии сердца (Рис. 9). Следовательно, мы можем говорить о значительном улучшении расслабления миокарда при реперфузии изолированного сердца крыс, адаптированных к ХННГ. При этом, как показали экспериментальные исследования, этот эффект оказался зависимым от опиоидных рецепторов. Так, предварительная перфузия сердца раствором, содержащим налоксон, полностью предупреждала улучшение расслабления миокарда, обусловленное ХННГ (Рис. 9). Перфузия миокарда раствором, содержащим селективный антагонист δ -ОР ТiPP(ψ) или селективный антагонист δ_2 -ОР налтрибен приводила к тому же результату. Блокада δ_1 -ОР препаратом BNTX не изменяла конечное диастолическое давление при реперфузии миокарда крыс, адаптированных к ХННГ (Рис. 9). Следовательно, мы можем сделать вывод о том, что улучшение диастолической функции миокарда во время реперфузии, наблюдаемое при ХННГ, связано с δ_2 -ОР.

Следует отметить, что предварительная перфузия сердец раствором, содержащим антагонисты ОР, не оказала значимого влияния на исходные параметры сократимости миокарда и постишемическое восстановление силы сокращения миокарда в группе интактных животных (Табл. 18).

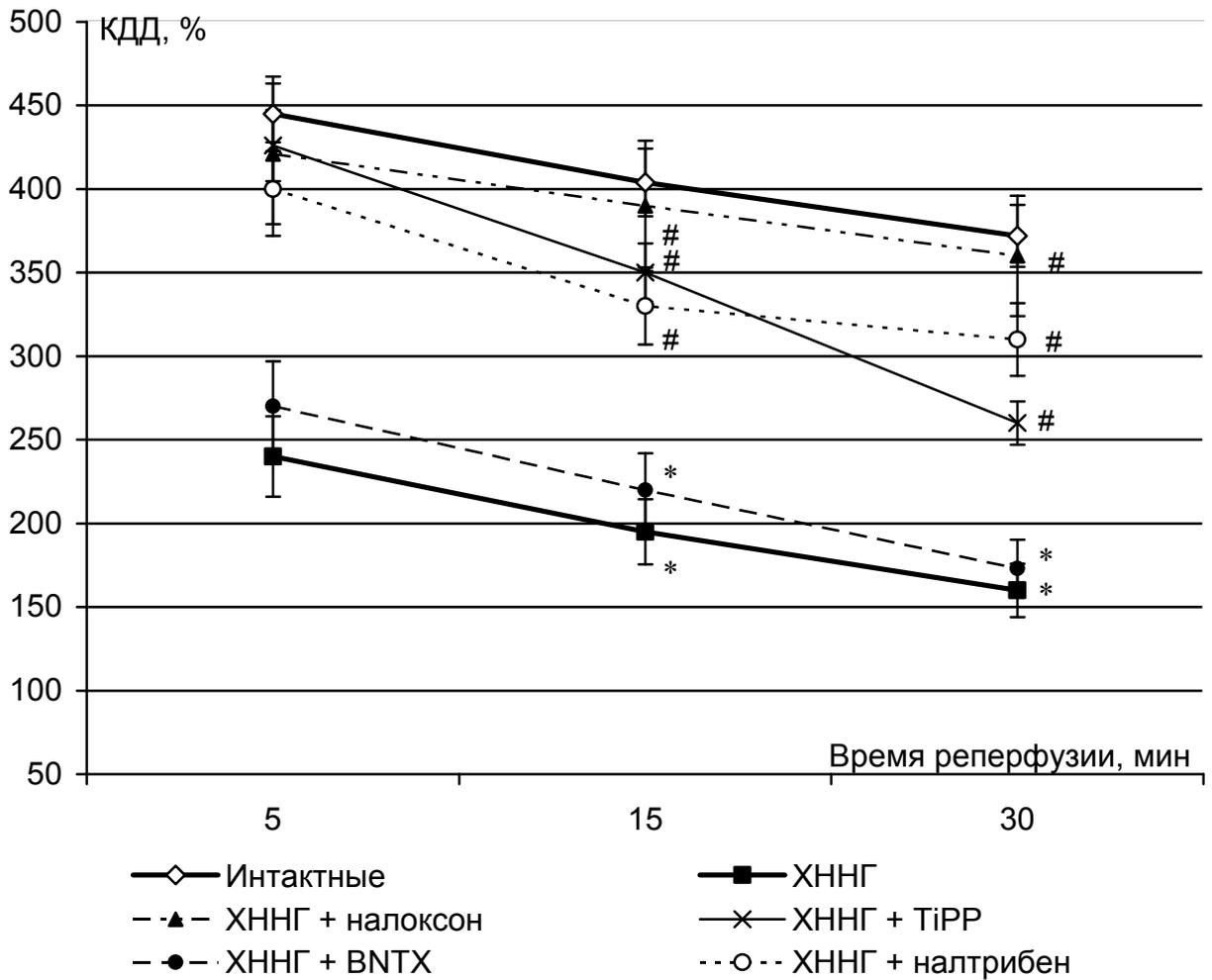


Рисунок 9 – Конечное диастолическое давление левого желудочка изолированного сердца крыс во время реперфузии ($M \pm SEM$)

Примечания: ХННГ - хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия; КДД - конечное диастолическое давление. * - $p < 0,001$ по отношению к ишемии-реперфузии у интактных крыс, # - $p < 0,001$ к группе ХННГ; U-критерий Манна-Уитни, количество животных в каждой группе равно 12.

Таблица 18 – Параметры сокращения изолированного сердца неадаптированных крыс ($M \pm SEM$)

Экспериментальные группы	Ишемия-реперфузия	Ишемия-реперфузия + налоксон	Ишемия-реперфузия + TIPP	Ишемия-реперфузия + BNTX	Ишемия-реперфузия + налтрибен
Частота сердечных сокращений, уд/мин					
Исходно	206,2 ± 14,5	205,4 ± 10	218,7 ± 13	216,8 ± 8,3	222,3 ± 18
5 мин реперфузии	41,4 ± 7,4	32,1 ± 5,1	43,1 ± 9,4	33,3 ± 6,9	39,5 ± 5,5
15 мин реперфузии	49,1 ± 8,2	37,8 ± 9,4	48,1 ± 4,0	58,2 ± 3,4	51,0 ± 5,6
30 мин реперфузии	75,9 ± 12,2	84,3 ± 11,9	76,5 ± 18,5	93,8 ± 10,1	85,0 ± 9,5
Давление, развиваемое левым желудочком, мм рт.ст.					
Исходно	79,8 ± 5,1	81,5 ± 2,4	76,7 ± 5,6	71,5 ± 2,3	74,2 ± 2,0
5 мин реперфузии	9,8 ± 1,0	10,5 ± 2,1	9,4 ± 1,1	8,8 ± 0,7	11,9 ± 2,7
15 мин реперфузии	15,7 ± 2,0	13,3 ± 1,0	11,2 ± 2,5	12,1 ± 1,5	11,1 ± 1,7
30 мин реперфузии	16,1 ± 1,7	14,9 ± 1,9	18,1 ± 2,2	19,6 ± 1,5	18,3 ± 1,7
Конечное диастолическое давление, мм рт.ст.					
Исходно	11,1 ± 0,6	12,4 ± 0,6	12,4 ± 0,4	11,9 ± 0,7	11,5 ± 0,2
5 мин реперфузии	49,4 ± 2,4	50,8 ± 2,7	56,6 ± 3,5	48,3 ± 1,7	49,6 ± 1,8
15 мин реперфузии	44,9 ± 3,0	45,4 ± 1,1	45,0 ± 3,0	41,7 ± 1,5	41,4 ± 2,0
30 мин реперфузии	41,3 ± 2,3	45,8 ± 2,7	40,7 ± 1,3	37,2 ± 1,7	38,1 ± 1,5

Примечание: количество животных в группе равно 12.

Приведенные данные показывают значительное снижение повреждения и многократное улучшение сократительной функции миокарда крыс, подвергнутых адаптации к ХННГ, при тотальной ишемии и реперфузии. Во время реперфузии улучшение сократимости, показателем которой являются давление, развиваемое левым желудочком и продуктивный индекс, сопровождается улучшением расслабления миокарда. Однако ни один из выявленных эффектов, вызываемых тренировкой крыс к состоянию хронической гипоксии, не наблюдался, если в перфузионный раствор был добавлен антагонист ОР налоксон. Следовательно, мы можем заключить, что опиоидные рецепторы миокарда опосредуют влияние ХННГ

на сократительную функцию сердца при ишемии-реперфузии и кардиопротекцию. Рецепторная специфичность обнаруженных эффектов была исследована при блокаде опиоидных рецепторов селективным антагонистом дельта-опиоидных рецепторов TiPP (ψ) и селективного антагониста δ_2 -ОР налтрибена. Обнаружено, что в присутствии их фармакологических агентов кардиопротекторный эффект ХННГ при тотальной ишемии-реперфузии изолированного сердца крысы не проявляется. Эти данные можно рассматривать в качестве подтверждения нашего предположения о роли δ_2 -ОР в формировании кардиопротекторного действия ХННГ. Полученные результаты согласуются с данными *in vivo*, которые демонстрируют важную роль дельта опиоидных рецепторов в инфаркт-лимитирующем действии адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии (Табл. 15, гл. 3.1.2.2).

3.1.2.4 Оценка участия опиоидных рецепторов в реализации цитопротекторного эффекта хронической нормобарической гипоксии

Как было показано ранее (Табл. 10, 11; Рис. 10), кардиомиоциты крыс, подвергнутых ХННГ, более устойчивы к повреждению при аноксии-реоксигенации чем у неадаптированных животных. Выявление участия опиоидных рецепторов в формировании этой устойчивости мы проводили путем добавления одного из селективных антагонистов опиоидных рецепторов в инкубационную среду изолированных кардиомиоцитов перед моделированием аноксии.

Как следует из таблицы 19 и рис. 10, добавление антагонистов опиоидных рецепторов в среду инкубации кардиомиоцитов интактных крыс не вызывало достоверного изменения числа погибших кардиомиоцитов и выброса ЛДГ при аноксии-реоксигенации по сравнению с контролем.

При инкубации кардиомиоцитов крыс группы ХННГ с антагонистом ОР налоксоном, число погибших клеток при аноксии-реоксигенации составило 12%, что оказалось в 5 раз выше аналогичного показателя в группе ХННГ без налоксона и не отличалось от группы крыс «интактные + налоксон» (Рис. 10). Как показано в таблице 18, при аноксии статистически значимого влияния налоксона на выброс

ЛДГ из кардиомиоцитов не наблюдалось. Однако при реоксигенации выброс ЛДГ из клеток был достоверно выше, чем в группе клеток «ХННГ» с незаблокированными опиоидными рецепторами ($p=0,012268$) и оказался сопоставимым с этим показателем у интактных крыс (Табл. 19). Эти данные могут быть интерпретированы как отсутствие цитопротекторного эффекта ХННГ при блокаде опиоидных рецепторов. При добавлении в инкубационный раствор изолированных кардиомиоцитов крыс, прошедших курс ХННГ, селективного антагониста μ -опиоидных рецепторов СТАР, мы наблюдали увеличение количества погибших клеток после аноксии–реоксигенации по отношению к ХННГ (Рис. 10). При этом блокада μ -опиоидных рецепторов, так же как в случае с налоксоном, не приводила к изменению выброса ЛДГ во время аноксии (Табл. 19). Реперфузионный выброс ЛДГ в группе крыс, адаптированных к хронической гипоксии, под влиянием СТАР возрастал на 40% и оказался сопоставимым со значениями неадаптированных животных (Табл. 19). Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии цитопротекторного действия ХННГ при блокаде μ -ОР, что говорит об их важной роли в изучаемом защитном эффекте. Исследование роли дельта-ОР в формировании цитопротекторного действия ХННГ показало, что при добавлении в инкубационный буфер кардиомиоцитов крыс группы ХННГ селективного ингибитора δ -ОР ТiPP (ψ) или селективного ингибитора δ_2 -ОР налтрибена приводит к увеличению процента погибших клеток и выброса лактатдегидрогеназы после окончания реоксигенации по сравнению с клетками группы ХННГ, подвергнутыми аноксии–реоксигенации без антагонистов ОР (Рис. 10, Табл. 19). На содержание ЛДГ в инкубационном буфере, взятом после аноксии, эти антагонисты ОР не повлияли (Табл. 19). Вместе с тем, можно видеть, что селективная блокада δ_1 -ОР препаратом BNTX или к-ОР норбиналторфимином не изменяла выживаемость кардиомиоцитов и содержание ЛДГ при аноксии и реоксигенации у адаптированных к гипоксии крыс (Рис. 10, Табл. 19). Полученные данные свидетельствуют о том, что δ_1 -ОР и к-ОР не принимают опосредующего участия в цитопротекторном действии ХННГ.

Можно видеть, что имелась статистически недостоверная, но отчётливая тенденция к уменьшению числа погибших клеток миокарда под действием налоксона (300 нМ) в условиях аноксии-реоксигенации кардиомиоцитов интактных

крыс (Рис. 10). Эти данные согласуются с результатами исследований А.У. Lee и Т.М. Wong [Lee А.У. и Wong Т.М., 1985], которые обнаружили, что налоксон в концентрации 1,1 мМ/л снижает выброс креатинфосфокиназы в перфузионный раствор, оттекающий от сердца, в ответ на ишемию-реперфузию последнего. Вполне очевидно, что кардиопротекторный эффект налоксона в данном случае не связан с блокадой ОР, а является неспецифичным, поскольку K_i (константа ингибирования) у налоксона по отношению к δ -ОР составляет всего 50 нМ [Roques В.Р. et al., 1990], что в 22 тысячи раз меньше, чем использованная указанными авторами [Lee А.У. и Wong Т.М., 1985] концентрация. Некоторые исследователи рекомендуют использовать агонисты и антагонисты рецепторов в концентрации, превышающей K_i в 10 раз [Miki Т. et al., 1998], то есть для налоксона - 500 нМ/л. Однако подобное увеличение уровня налоксона в перфузионном растворе может, на наш взгляд, привести к усилению неспецифического цитопротекторного эффекта, поэтому налоксон следует использовать только в концентрации 300 нМ/л или ниже.

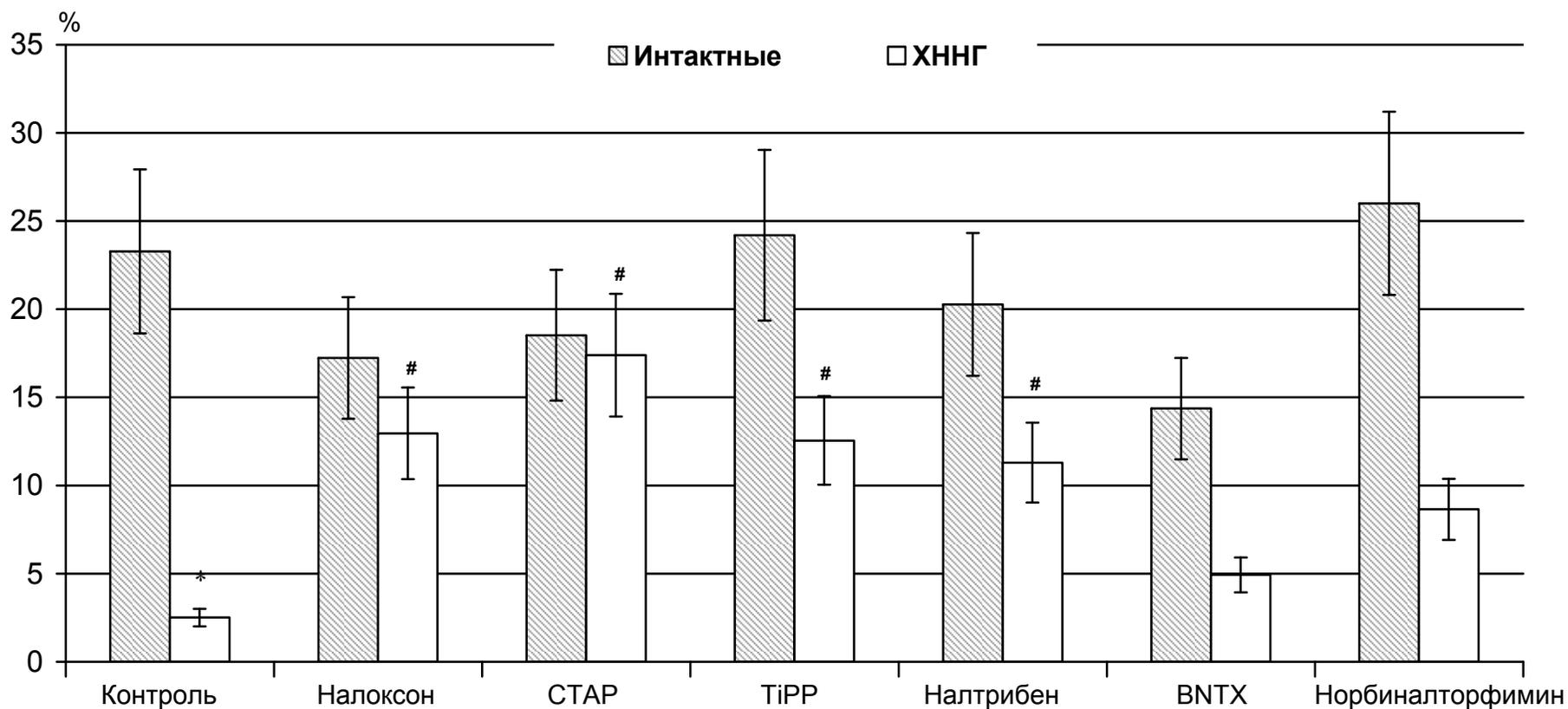


Рисунок 10 – Гибель кардиомиоцитов при аноксии– реоксигенации (M ± SEM)

Примечания: гибель клеток представлена в % к исходной выживаемости. XNHG – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия; * $p < 0,05$ – относительно контрольных клеток интактных крыс; # – $p < 0,05$ – относительно контрольных клеток крыс после XNHG; U-критерий Манна-Уитни. Все препараты добавляли к суспензии клеток за 25 минут до начала аноксии.

Таблица 19 – Выброс лактатдегидрогеназы изолированными кардиомиоцитами крыс при аноксии и реоксигенации (M±SEM)

Группа	Аноксия		Реоксигенация	
	Интактные n=11	ХННГ n=13	Интактные n=11	ХННГ n=13
Контроль	174,65 ± 19,57	141,93 ± 8,27 p1=0,025317	181,66 ± 15,15	137,76 ± 7,94 p1=0,019413
Налоксон 300 нМ	188,18 ± 15,23 p1=0,721116	158,11 ± 11,60 p2=0,166790 p3=0,125742	181,75 ± 13,5 p1=0,771269	172,96 ± 9,84 p2=0,012268 p3=0,65245
СТАР 100 нМ	153,62 ± 7,29 p1=0,193964	152,87 ± 10,55 p2=0,210490 p3=0,953172	164,05 ± 9,4 p1=0,425615	176,63 ± 13,75 p2=0,027730 p3=0,048109
TiPP(ψ) 30 нМ	162,19 ± 14,03 p1=0,398820	170,42 ± 9,70 p2=0,194250 p3=0,887626	181,73 ± 15,99 p1=0,925902	171,28 ± 13,69 p2=0,041043 p3=0,636649
Налтрибен 1 нМ	175,49 ± 16,39 p1=0,509630	165,58 ± 10,67 p2=0,401624 p3=0,601339	170,76 ± 10,49 p1=0,601884	177,92 ± 13,08 p2=0,019159 p3=0,678389
BNTX 1 нМ	186,88 ± 16,72 p1=0,663013	160,46 ± 10,91 p2=0,292148 p3=0,183813	180,9 ± 11,67 p1=0,875369	160,07 ± 10,54 p2=0,112626 p3=0,206925
Норбинал– торфимин 3 нМ	176,85 ± 8,37 p1=0,566122	156,92 ± 7,57 p2=0,106276 p3=0,110343	174,86 ± 19,76 p1=0,942571	158,75 ± 8,34 p2=0,085661 p3=0,402944

Примечания: Содержание лактатдегидрогеназы выражено в процентах к параллельному нормоксическому контролю. ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия; p1 – относительно контрольных клеток интактных крыс; p2 – относительно контрольных клеток крыс после ХННГ; p3 – относительно соответствующего препарата в группе интактных крыс; U-критерий Манна-Уитни. Все препараты добавляли за 25 минут до начала аноксии. n – количество животных в группе.

Как уже говорилось (Гл. 3.1.1.3 , табл. 12) ХННГ способствует снижению степени окислительного стресса в кардиомиоцитах после их аноксии-реоксигенации. Связь этого эффекта с активацией опиоидных рецепторов мы исследовали детектируя АФК в кардиомиоцитах адаптированных к ХННГ крыс при добавлении в инкубационную среду налоксона или селективных антагонистов ОР. Наши исследования показали, что блокада ОР не влияет на образование активных форм кислорода в кардиомиоцитах крыс, подвергнутых ХННГ (Табл. 20).

Таблица 20 – Свечение 2',7'-дихлорфлуоресцеина в изолированных кардиомиоцитах крыс после аноксии-реоксигенации ($M \pm SEM$)

Экспериментальная группа	Неадаптированные крысы, n=11	ХННГ, n=13
Контроль	199,78 ± 26,26	147,86 ± 6,95 p1=0,043875
Налоксон, 300 нМ	162,07 ± 7,05 p1=0,145619	138,11 ± 7,91 p2=0,642736
СТАР, 100 нМ	165,54 ± 19,13 p1=0,237579	146,06 ± 6,74 p2=0,849533
TiPP(ψ), 30 нМ	172,12 ± 19,82 p1=0,431898	139,85 ± 5,40 p2=0,429082
Налтрибен, 1 нМ	163,9 ± 6,48 p1=0,260137	143,0 ± 6,70 p2=0,332760
BNTX, 1 нМ	177,62 ± 30,51 p1=0,708430	136,21 ± 6,65 p2=0,243982
Норбиналторфимин, 3 нМ	184,83 ± 32,54 p1=0,985567	129,38 ± 4,36 p2=0,133360

Примечания: Свечение дихлорфлуоресцеина выражено в процентах от аналогичного показателя клеток, не подвергнутых аноксии-реоксигенации; p1 – по отношению к интактным крысам, p2 – относительно ХННГ; t-тест Стьюдента.

Проведенные исследования показали, что цитопротекторный эффект, наблюдаемый после курса хронической непрерывной нормобарической гипоксии, зависит от активации опиоидных рецепторов. В этот процесс оказываются вовлеченными опиоидные рецепторы μ - и δ_2 -субтипов. Антиоксидантный эффект ХННГ не зависит от активации опиоидных рецепторов.

Подводя итог сказанному в главе 3.1.2 мы можем отметить, что результаты исследования свидетельствуют о значимой роли опиоидной системы в формировании адаптационной устойчивости миокарда к ишемии–реперфузии под влиянием ХННГ. Так, нами обнаружено увеличение содержания эндогенных опиоидов – мет–энкефалина и эндоморфинов, которые являются агонистами дельта– и мю–опиоидных рецепторов, в плазме крови и миокарде крыс, подвергнутых ХННГ. Эти данные говорят об изменениях в опиоидной системе при ХННГ. Физиологическое значение этих изменений становится понятным после исследования проявлений защитных эффектов адаптации в условиях блокады ОР. В нашей работе обнаружено, что инфаркт–лимитирующий эффект *in vivo* не проявляется в условиях блокады δ_2 - и μ -опиоидных рецепторов. Это свидетельствует об опосредованном этими субтипами ОР защитного действия ХННГ в отношении ишемического–реперфузионного повреждения миокарда и позволяет нам с уверенностью говорить о том, что инфаркт–лимитирующий эффект ХННГ реализуется через активацию эндогенной опиоидной системы – выработку опиоидов и стимулирование опиоидных рецепторов. Помимо этого, исследование роли опиоидной системы в процессе адаптации к гипоксии проводили физиологи из исследовательского центра Аризоны [Mayfield K.P., D'Alecy L.G. 1994]. Они доказали важную роль опиоидных рецепторов в повышении толерантности к гипоксии у адаптированных к этому экстремальному воздействию крыс [Mayfield K.P., D'Alecy L.G. 1994].

Исследование локализации ОР, опосредующих кардиопротекторный эффект ХННГ проводилось путем его воспроизведения на модели изолированного перфузируемого сердца и изолированных кардиомиоцитах крысы. Проведенные опыты показали, что если моделирование ишемии–реперфузии было проведено на изолированном сердце или изолированных кардиомиоцитах, защитный эффект ХННГ сохранялся. Более того, при блокаде δ_2 - или μ -опиоидных рецепторов на этих

экспериментальных моделях мы не наблюдали кардиопротекторного и цитопротекторного действия ХННГ. Эти данные позволяют нам говорить о том, что кардиопротекторное действие ХННГ реализуется через δ_2 - и μ -опиоидные рецепторы, расположенные в миокарде, на мембранах кардиомиоцитов.

Наряду с данными о локализации ОР, эксперименты, проведенные на изолированном перфузируемом сердце крыс, подвергнутых ХННГ, позволили выявить улучшение сократительной активности миокарда в постишемическом периоде. При этом положительный инотропный эффект ХННГ сопровождался полноценным диастолическим расслаблением миокарда. Проведение тотальной ишемии изолированного сердца крыс, подвергнутых ХННГ, при добавлении в перфузионный раствор селективных антагонистов ОР показало участие δ_2 -ОР в реализации его инотропных эффектов.

Нами обнаружено, что «антиоксидантный» эффект ХННГ не зависит от активации опиоидных рецепторов.

Внутриклеточные механизмы реализации инфаркт-лимитирующего действия ХННГ исследованы недостаточно. Анализируя данные литературы о механизмах реализации инфаркт-лимитирующего эффекта гипобарической гипоксии, ишемического прекондиционирования и механизма кардиопротекторного действия опиоидов мы можем предполагать, что механизм защитных эффектов хронической нормобарической гипоксии включает в себя PI3-протеинкиназу, тирозинкиназы, протеинкиназу C [Rouet-Benzineb P. et al, 1999; Neckar J. et al., 2005], NO-синтазу [Fitzpatrick C.M. et al., 2005], K_{ATP} -каналы [Fitzpatrick C.M. et al., 2005], mPTP-пору митохондрий [Zhu W.-Zh., et al., 2006]. Однако вопрос участия этих киназ в кардиопротекторном эффекте ХННГ требуют изучения. Важно отметить, что эти киназные каскады связаны с опиоидными рецепторами [Williams-Pritchard G., et al, 2011]. Исследованию внутриклеточных регуляторных механизмов, следующих за активацией опиоидных рецепторов, посвящена следующая часть работы.

3.1.3 Изучение роли сопряженных с опиоидными рецепторами сигнальных систем в реализации кардиопротекторного эффекта хронической нормобарической гипоксии

Результаты, представленные в предыдущей главе показали, что δ_2 - и μ -опиоидные рецепторы, расположенные на мембранах кардиомиоцитов, опосредуют формирование кардиопротекторного эффекта, наблюдающегося при адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии. Следующим этапом нашего исследования стало выявление внутриклеточного сигнального механизма, активация которого способствует повышению устойчивости кардиомиоцитов к ишемическому–реперфузионному повреждению при ХННГ. Мы предположили, что этот внутриклеточный механизм может быть сходным с сигнальным механизмом, опосредующим кардиопротекторное действие агонистов опиоидных рецепторов.

В настоящее время принято считать, что стимуляция опиоидных рецепторов через $G_{i/o}$ -белки приводит к активации каскада протеинкиназ, которые обеспечивают внутриклеточный сигналинг [Williams-Pritchard G. et al., 2011]. В работах последних лет приводятся убедительные данные о том, что важным опосредующим звеном между опиоидными рецепторами, сопряженными с ними $G_{i/o}$ -белками и протеинкиназами является трансактивация (гетеродимеризация) ОР с EGFR-рецептором (рецептор к эндотелиальному фактору роста) [Förster K. et al., 2007]. Внутриклеточным сигнальным ферментом EGFR-рецептора, опосредующим защитный эффект опиоидов, являются рецепторные тирозинкиназы (Src-киназы) [Bełtowski J., Jazmroz-Wiśniewska A. 2014]. Существуют доказательства участия протеинкиназы PI3 (phosphatidylinositol 3) в формировании кардиопротекторного эффекта опиоидов [Маслов Л. Н. и др., 2013а]. В ряде исследований было показано, что в реализации инфаркт-лимитирующего и антиапоптотического эффектов агонистов опиоидных рецепторов принимают участие протеинкиназа С (ПКС) и NO-синтаза [Маслов Л. Н. и др., 2013а]. Митохондриальные поры, изменяющие проницаемость митохондрий (mPTP-поры) и K_{ATP} -каналы (АТФ-чувствительный K^+ -канал) считают конечными эффекторами регуляторного каскада, опосредующего защитные эффекты опиоидов [Маслов Л. Н. и др., 2012, 2013а,b; Cao C. M. et al., 2005b]. Эти данные позволяют нам предполагать, что кардиопротекторный эффект ХННГ может быть реализован через внутриклеточный сигнальный механизм,

включающий тирозинкиназы, PI3-киназу, протеинкиназу C, NO-синтазу, АТФ-чувствительные K^+ -каналы митохондрий и mPTP-поры. Важно отметить, что сходные сигнальные механизмы могут реализовывать кардиопротекторный эффект ишемического пре- и посткондиционирования [Маслов Л.Н. и др. 2013a,b].

В связи с вышеизложенным, дальнейшие эксперименты были направлены на подтверждение предположения о том, что инфаркт-лимитирующий эффект ХННГ может быть реализован через активацию тирозинкиназ, PI3-киназы, протеинкиназы C, NO-синтазы и АТФ-зависимых калиевых каналов.

3.1.3.1 Опосредование тирозинкиназами кардиопротекторного эффекта хронической непрерывной нормобарической гипоксии

Пул тирозинкиназ кардиомиоцитов состоит более чем из 1000 ферментов [Neet K. et al., 1996]. Ранее обнаружено, что кардиопротекторный эффект ишемического и фармакологического преко́ндиционирования реализуется через активацию Src/EGFR-тирозинкиназ [Ping P, et al., 1999; Williams-Pritchard G. et al., 2011]. В связи с этим наше внимание было направлено на исследование роли этого пула тирозинкиназ в формировании инфаркт-лимитирующего и цитопротекторного действия хронической непрерывной нормобарической гипоксии. Изучение роли этих ферментов было проведено путем оценки проявления указанных защитных эффектов при блокаде всего пула тирозинкиназ генистеином [Fryer R.M. et al., 1999] и Src/EGFR-субпопуляции тирозинкиназ лавендустином [Hamakawa et al., 1999].

Как описано ранее (Гл. 3.1.1.1), при коронароокклюзии-реперфузии у крыс, подвергнутых ХННГ, формируется меньший очаг некроза, чем у неадаптированных животных (Табл. 2). Предварительное введение ингибитора всего пула тирозинкиназ генистеина крысам, прошедшим курс ХННГ, привело к тому, что размер зоны некроза оказался на 70% больше, чем в группе ХННГ с незаблокированными тирозинкиназами (Рис. 11). При введении ингибитора src-тирозинкиназ лавендустина изменения размера зоны некроза у крыс, подвергнутых хронической непрерывной нормобарической гипоксии, обнаружено не было (Рис. 11). Введение ингибиторов тирозинкиназ генистеина и лавендустина неадаптированным животным не повлияло на размер инфаркта при моделировании коронароокклюзии и реперфузии (Рис. 11).

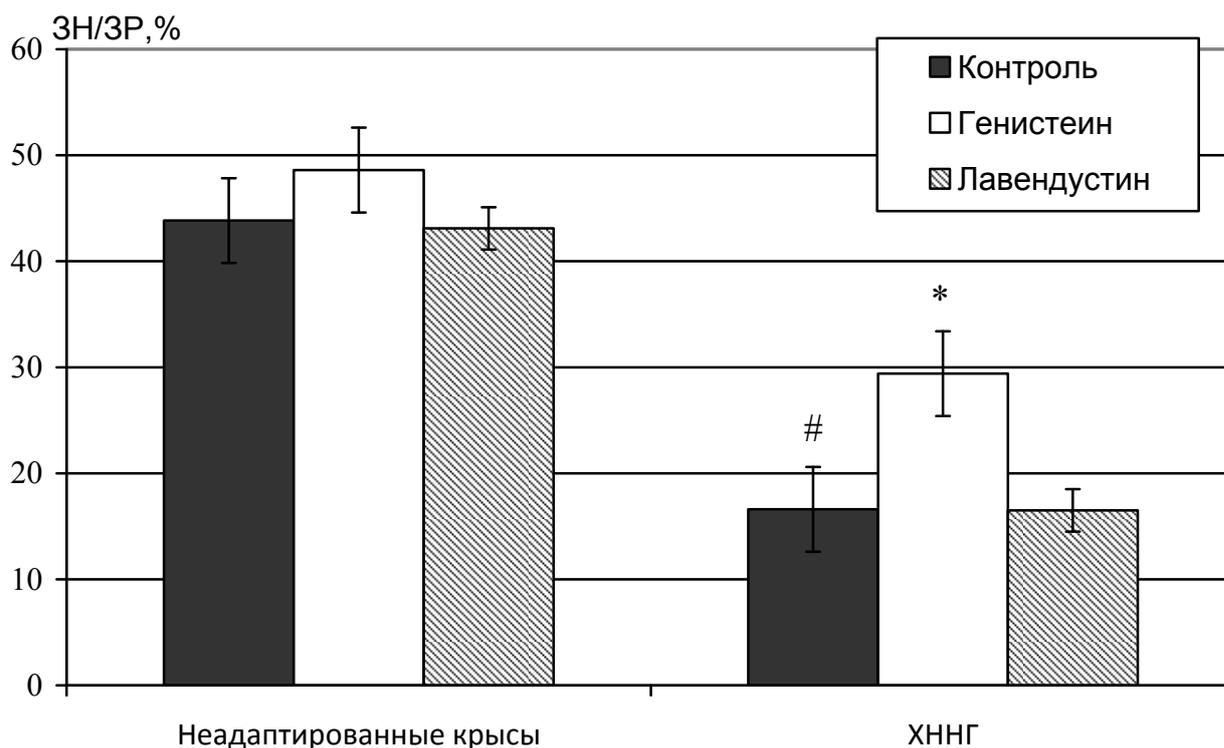


Рисунок 11 – Влияние блокады тирозинкиназ на размер зоны некроза при 20-минутной коронароокклюзии и 180-минутной реперфузии у крыс после курса адаптации к непрерывной нормобарической гипоксии ($M \pm SEM$)

Примечания: ХННГ - хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия. ингибиторы тирозинкиназ вводили внутривенно за 25 мин. до коронароокклюзии, генистеин дозе 5 мг/кг, лавендустин в дозе 10 мг/кг, # - $p < 0,01$ - достоверность относительно неадаптированных крыс, * - $p < 0,01$ достоверность относительно группы ХННГ; U-критерий Манна-Уитни.

Исследование цитопротекторного действия ХННГ показало, что гибель клеток при аноксии–реоксигенации изолированных кардиомиоцитов значительно снижена, если клетки миокарда были выделены у крыс, подвергнутых адаптации к гипоксии (Табл. 21). Так, гибель кардиомиоцитов интактных крыс при аноксии–реоксигенации составила $17,23 \pm 2,50\%$, в то время как в группе ХННГ этот показатель оказался равным $6,76 \pm 0,92\%$ (Табл. 21). Инкубация кардиомиоцитов крыс группы ХННГ с ингибитором тирозинкиназ генистеином приводило к достоверному возрастанию гибели клеток при аноксии–реоксигенации до $19,0 \pm 2,55\%$ (Табл. 21). При этом

выживаемость кардиомиоцитов интактных крыс под влиянием генистеина достоверно не изменялась (Табл. 21).

Таблица 21 – Гибель кардиомиоцитов при аноксии– реоксигенации ($M \pm SEM$)

Группа животных	Контроль	Генистеин, 5 мкМ/л
Неадаптированные крысы, n=6	17,23 \pm 2,50	14,4 \pm 2,98
ХННГ, n=10	6,76 \pm 0,92 p1=0,02676	19,0 \pm 2,55 p2=0,000285

Примечания: гибель клеток выражена в процентах от исходной выживаемости. ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия. Генистеин добавляли в инкубационный буфер за 25 минут до начала аноксии. p1 – достоверность относительно неадаптированных крыс; P2 – относительно группы ХННГ (тест Манна–Уитни).

Выброс лактатдегидрогеназы из изолированных кардиомиоцитов крыс, подвергнутых адаптации к хронической гипоксии, при моделировании аноксии и последующей реоксигенации был ниже, чем в группе неадаптированных животных на 17% (Табл. 22). В том случае, если клетки миокарда крыс группы «ХННГ» инкубировали с ингибитором тирозинкиназ генистеином, выброс ЛДГ при последующей аноксии и реоксигенации оказался ниже, чем у животных группы «ХННГ» без блокады тирозинкиназ на 25% и был сопоставим с этим показателем неадаптированных крыс (Табл. 22).

Таким образом, наши исследования показали, что при моделировании коронароокклюзии и реперфузии у адаптированных к хронической нормобарической гипоксии крыс на фоне ингибирования всех типов тирозинкиназ генистеином, инфаркт–лимитирующий эффект адаптации не проявлялся (Рис. 9). Цитопротекторный эффект ХННГ в отношении аноксии–реоксигенации изолированных кардиомиоцитов так же не был обнаружен при блокаде тирозинкиназ (Табл. 21, 22). Эти данные однозначно свидетельствует о важной роли тирозинкиназ в защитном эффекте ХННГ.

Таблица 22 – Выброс лактатдегидрогеназы изолированными кардиомиоцитами крыс при аноксии и реоксигенации (M±SEM)

Группа	Аноксия		Реоксигенация	
	Интактные n=6	ХННГ n=10	Интактные n=6	ХННГ n=10
Контроль	199,5 ± 13,12	168,88 ± 6,46 p1=0,041209	217,71 ± 12,96	189,59± 13,30 p1=0,049
Генистеин 5 мкМ/л	185,46 ± 13,73	209,1 ± 19,55 p2= 0,048	225,57± 18,57	251,9± 12,76 p2= 0,004224

Примечания: выброс ЛДГ выражен в процентах к параллельному нормоксическому контролю. ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия. p1 – достоверность относительно неадаптированных крыс; P2 – относительно группы ХННГ (U-критерий Манна-Уитни). Генистеин добавляли в инкубационный буфер за 25 минут до начала аноксии. n – количество животных в группе.

Однако, эксперименты, проведенные нами с селективным ингибитором субпопуляции Src/EGFR-тирозинкиназ лавендустином, показали, что инфаркт–лимитирующий эффект ХННГ при селективном ингибировании только Src/EGFR-пула тирозинкиназ не влияет на выраженность инфаркт–лимитирующего действия ХННГ. Следовательно, мы не можем говорить о значимой роли этого фермента в опосредование кардиопротекторного эффекта хронической нормобарической гипоксии. Мы можем предположить, что в защитном действии как адаптации к хронической нормобарической гипоксии, так и агонистов дельта–ОР принимают участие другие, неизвестные субтипы тирозинкиназ. Возможно, что в качестве сигнальных тирозинкиназ в этих случаях выступают Lck – тирозин-киназы, участвующие в реализации инфаркт–лимитирующего действия опиоидов [Fryer RM et al., 2001b].

3.1.3.2 Роль РІЗ-киназы в формировании инфаркт–лимитирующего и цитопротекторного действия хронической непрерывной нормобарической гипоксии

Как упоминалось выше, размер ишемического некроза при моделировании коронароокклюзии–реперфузии у крыс, подвергнутых ХННГ был, значительно меньше, чем у неадаптированных животных (Табл. 2, 23). Предварительное внутривенное введение ингибитора РІЗ-киназы вортманнина интактным животным не влияло на размер инфаркта при моделировании коронароокклюзии-реперфузии (Табл. 23).

При введении ингибитора РІЗ-киназы вортманнина мы не обнаружили какого-либо влияния на размер зоны некроза у подвергнутых хронической непрерывной нормобарической гипоксии крыс (Табл. 23).

Таблица 23 – Размеры зоны некроза при коронароокклюзии-реперфузии у крыс, подвергнутых ХННГ, после введения ингибитора РІЗ-киназы (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
Вортманнин 0,015 мг/кг	12	185 ± 23,4	867,3 ± 39,6	326 ± 27,1	151,3 ± 10,1	46,4 ± 4,1
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
ХННГ + вортманнин 0,015 мг/кг	12	286 ± 23,5	867,4 ± 39,7	366 ± 47,1	81,4 ± 10,2	22,3 ± 4 p<0,05

Примечания: 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; ; U-критерий Манна-Уитни.

Моделирование аноксии–реоксигенации изолированных кардиомиоцитов интактных крыс приводило к гибели 17% жизнеспособных кардиомиоцитов, в то время как в группе ХННГ этот показатель составлял лишь 6,76% (Табл. 24). Инкубация клеток в растворе ингибитора Р13–киназы вортманнина не приводило к статистически значимому изменению количества погибших кардиомиоцитов при моделировании аноксии–реоксигенации, то есть не повлияло на выживаемость кардиомиоцитов как в группе интактных крыс, так и у крыс после курса ХННГ (Табл. 24)

Таблица 24 – Гибель кардиомиоцитов при аноксии– реоксигенации (M ± SEM)

Группа животных	Контроль	Вортманнин, 100 нМ/л
Неадаптированные крысы, n=6	17,23 ± 2,50	14,35 ± 2,9 p1=0,405
ХННГ, n=10	6,76 ± 0,92 p1=0,02676	10,52 ± 1,91 p2=0,128

Примечания: гибель клеток выражена в процентах от исходной выживаемости. ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия. Вортманнин добавляли в инкубационный буфер за 25 минут до начала аноксии. p1 – достоверность относительно неадаптированных крыс; P2 – относительно группы ХННГ (тест Манна–Уитни).

Выброс лактатдегидрогеназы из изолированных кардиомиоцитов крыс, подвергнутых адаптации к хронической гипоксии, при моделировании аноксии и последующей реоксигенации был ниже, чем в группе неадаптированных животных на 17% (Табл. 25). Добавление в инкубационную среду клеток ингибитора Р13–киназы вортманнина не изменило содержания ЛДГ в среде инкубации у крыс, адаптированных к ХННГ, ни при аноксии, ни при реоксигенации.

Таблица 25 – Выброс лактатдегидрогеназы из изолированных кардиомиоцитов крыс при аноксии и реоксигенации (M±SEM)

Группа	Аноксия		Реоксигенация	
	Интактные n=8	ХННГ, n=10	Интактные n=8	ХННГ, n=10
Контроль	206,87 ± 13,54	171,43 ± 6,32 p1=0,021	217,71 ± 12,96	189,59 ± 13,30 p1=0,049
Вортманнин 100 нМ/л	226,79 ± 16,12 p1 n.s.	193,99 ± 11,3 p2 n.s.	233,88 ± 19,78	204,57 ± 10,76

Примечания: выброс ЛДГ выражен в процентах к параллельному нормоксическому контролю. ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия. p1 – достоверность относительно неадаптированных крыс; P2 – относительно группы ХННГ; U-критерий Манна-Уитни. Вортманнин добавляли в инкубационный буфер за 25 минут до начала аноксии. n – количество животных в группе.

На основании полученных данных мы можем сделать вывод о том, что P13-киназа не участвует в реализации кардиопротекторного эффекта ХННГ. Эти данные противоречат имеющимся в литературе сведениям о том, что этот фермент реализует кардиопротекторный эффект ишемического preconditionирования и опиоидов [Qin Q, et al., 2003; Cao Z. et al., 2005b]. На основании проведенного исследования мы можем предполагать, что в механизмах реализации кардиопротекторного эффекта ХННГ и ишемического preconditionирования существуют значительные различия.

3.1.3.3 Участие протеинкиназы С в реализации кардиопротекторного влияния хронической нормобарической гипоксии

Как было показано ранее (Глава 3.1.1), при воспроизведении 20–минутной коронароокклюзии и последующей 180–минутной реперфузии формируется некроз миокарда, составляющий 44% от размера зоны гипоперфузии (Табл. 26). При этом миокард крыс, подвергнутых хронической непрерывной нормобарической гипоксии оказывается более устойчивым к повреждению при коронароокклюзии и реперфузии, размер зоны некроза составляет 17% от размера зоны гипоперфузии (Табл. 26).

Для изучения роли протеинкиназы С в реализации инфаркт–лимитирующего действия ХННГ коронароокклюзию–реперфузию проводили после внутривенного введения ингибитора этой киназы хелеритрина в дозе 5 мг/кг. Как показано в таблице 26, введение ингибитора протеинкиназы С хелеритрина интактным животным не оказывало влияния на размер зоны некроза при коронароокклюзии–реперфузии. У крыс, подвергавшихся ХННГ, ингибирование протеинкиназы С хелеритрином приводило к увеличению зоны некроза с 16,6% в случае ХННГ до 55% в группе «ХННГ +хелеритрин» (Табл. 26). Таким образом, размер инфаркта в этой экспериментальной группе оказался сопоставимым с таковым в группе неадаптированного контроля. Эти данные позволяют говорить о том, что кардиопротекторный эффект хронической непрерывной нормобарической гипоксии не проявляется на фоне блокады протеинкиназы С (Табл. 26). Литературные данные свидетельствуют об участии этого фермента в формировании инфаркт–лимитирующего эффекта при адаптивных воздействиях: хронической гипобарической гипоксии [Neckar J. et al., M 2005], ишемическом прекондиционировании [Fryer R.M. et al., 1999] и кардиопротекции при действии агонистов опиоидных рецепторов [Fryer R.M. et al., 2001].

Таблица 26 – Влияние ингибирования протеинкиназы С на размер инфаркта при коронароокклюзии-реперфузии⁶ (M±SEM).

Группа	n	МПЖ, мг	МЛЖ, мг	Зона риска, мг	Зона некроза, мг	ЗН/ЗР (%)
Контроль	14	179,9± 15,4	869,2± 34,7	323,4± 29,1	142,3± 22,1	44 ± 4,7
Хелеритрин 5 мг/кг	12	181,4 ±11,6	867,5± 31,3	328,4± 28,7	153,9± 23,1	47 ± 5,2
ХННГ	14	287,4± 9,1 P<0,05	843,1± 38,3	367,6± 25,3	52,64 ± 7,1	17 ± 2,3 P<0,01
ХННГ + хелеритрин 5 мг/кг	12	310,4± 11,6 P<0,05	865,4± 32,3	297,7± 39,8	183,4± 25,1	55 ± 6,2 P1<0,01

Примечания: ХННГ - хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия, МПЖ – масса правого желудочка, МЛЖ – масса левого желудочка, ЗН/ЗР – соотношение массы зоны некроза к массе зоны риска. Хелеритрин вводили внутривенно за 25 минут до моделирования коронароокклюзии. р – уровень достоверности относительно группы контроля; P1– уровень достоверности относительно группы адаптированных крыс, критерий Манна-Уитни.

Факт устранения инфаркт–лимитирующего действия ХННГ при внутривенном введении хелеритрина не дает ответа на вопрос о локализации протеинкиназы С, опосредующей указанный эффект. Нами были проведены исследования цитопротекторного действия адаптации к хронической гипоксии на модели аноксии–реоксигенации изолированных кардиомиоцитов в присутствие ингибиторов протеинкиназы С. Эти исследования показали зависимость цитопротекторного эффекта ХННГ от активности протеинкиназы С кардиомиоцитов.

При моделировании аноксии–реоксигенации изолированных кардиомиоцитов мы обнаружили, что клетки сердца, выделенные у крыс после курса ХННГ, оказываются более устойчивыми к этому повреждающему воздействию (Табл. 27). Гибель клеток контрольной группы при аноксии– реоксигенации составила 16,5%, в то время как в группе ХННГ этот показатель был снижен до 6,76%, p=0,0019 (Табл. 27). Однако, если в инкубационный раствор перед моделированием аноксии был добавлен ингибитор протеинкиназы С хелеритрин, гибель кардиомиоцитов оказалась

⁶ Исследование выполнено совместно с С.Ю. Цибульниковым

равной $13,97 \pm 0,95$, что оказалось выше, чем в группе адаптированного контроля в 2 раза и было сопоставимо с показателем группы неадаптированных крыс (Табл. 27). Эти результаты подтверждаются данными о содержании лактатдегидрогеназы в инкубационном буфере. Оказалось, что выброс ЛДГ клетками крыс, прошедших курс ХННГ, при реоксигенации оказался на 15% ниже, чем в контрольной группе (Табл. 27). Инкубирование кардиомиоцитов крыс группы «ХННГ» с хелеритрином приводило к повышению выброса ЛДГ до уровня интактных животных (Табл. 27).

Вместе с тем, как можно видеть в таблице 27, количество жизнеспособных кардиомиоцитов в группе «ХННГ+хелеритрин» статистически значимо не отличалось от количества жизнеспособных клеток в группе «ХННГ». Следовательно, хелеритрин не повлиял на выживаемость клеток при аноксии–реоксигенации в этой группе. Этот факт на первый взгляд кажется парадоксальным, однако следует обратить внимание на то, что в данной группе крыс процент гибнущих клеток составил лишь 5,15% против 12,47% в группе «ХННГ» ($p=0,025$. Табл. 27). Следовательно, высокая выживаемость в данном случае была обусловлена снижением процента гибнущих клеток. Таким образом, блокада протеинкиназы С приводило к ускорению гибели чувствительных к аноксии клеток.

Известно, что протеинкиназа С представлена в кардиомиоцитах несколькими субтипами. Наибольшее внимание исследователей привлекает δ -субтип протеинкиназы С, доказано его участие в реализации кардиопротекторного действия ишемического посткондиционирования [Маслов Л.Н. и др., 2013b] и хронической гипобарической гипоксии [Hlavackova M. et al., 2010]. Проведение исследований *in vitro* позволило нам изучить роль С δ в цитопротекторном действии хронической непрерывной нормобарической гипоксии. Обнаружено, что инкубация кардиомиоцитов адаптированных крыс с ингибитором протеинкиназы С δ роттлерином приводит к увеличению гибели клеток при последующей аноксии–реоксигенации с $6,76 \pm 0,92\%$ до $17,82 \pm 2,22\%$ (Табл. 27). При этом показатели выживаемости кардиомиоцитов оказываются сопоставимыми с выживаемостью клеток крыс неадаптированного контроля (Табл. 27). Этот факт свидетельствует о полном отсутствии цитопротекторного действия ХННГ при блокаде протеинкиназы С δ . Как можно видеть в Таблице 27, добавление ингибитора

протеинкиназы С в инкубационную среду клеток неадаптированных крыс не повлияло на выживаемость кардиомиоцитов при аноксии–реоксигенации.

Данные цитологического исследования были подтверждены биохимическими показателями. Выброс лактатдегидрогеназы изолированными кардиомиоцитами крыс при реоксигенации в группе «ХННГ+роттлерин» был на 18% выше, чем в группе «ХННГ» и оказался сопоставимым с уровнем неадаптированного контроля (Табл. 28). Следовательно, мы можем заключить, что блокада протеинкиназы Сδ устраняет цитопротекторное действие адаптации к хронической нормобарической гипоксии.

Таблица 27 – Выживаемость изолированных кардиомиоцитов при аноксии–реоксигенации (M±SEM)

	Интактные крысы, n=8	ХННГ, n=10
Погибшие клетки, %		
Контроль	16,5 ± 2,29	6,76 ± 0,92 p1=0,0019
Хелеритрин 10 мкМ/л	15,41 ± 3,5 p1 > 0,05	13,97 ± 0,95 p2=0,0072
Роттлерин 1 мкМ/л	12,17 ± 2,62 p1 > 0,05	17,82 ± 2,22 p2=0,011
Гибнущие клетки, %		
Контроль	11,23 ± 1,65	12,47 ± 2,11 p1 > 0,05
Хелеритрин 10 мкМ/л	11,1 ± 2,29 p1 > 0,05	5,15 ± 1,49 p2=0,025
Роттлерин 1 мкМ/л	10,57 ± 1,84 p1 > 0,05	14,24 ± 2,19 p2 > 0,05
Жизнеспособные клетки, %		
Контроль	72,82 ± 3,29	81,25 ± 1,8 p1=0,049
Хелеритрин 10 мкМ/л	77,47 ± 2,44 p1 > 0,05	82,26 ± 1,62 p1=0,012 p2 > 0,05
Роттлерин 1 мкМ/л	76,71 ± 3,66 p1 > 0,05	66,1 ± 2,72 p1 > 0,05 p2=0,001152

Примечания: гибель клеток представлена в процентах от исходных значений. ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия; p1 – относительно контрольных клеток интактных крыс; p2 – относительно контрольных клеток крыс после ХННГ, U–тест Манна–Уитни. Все препараты добавляли за 25 минут до начала аноксии.

Таблица 28 – Выброс лактатдегидрогеназы изолированными кардиомиоцитами крыс при аноксии–реоксигенации (M±SEM)

Группа животных	Аноксия	Реоксигенация
Интактные, n=8	215,72 ± 11,83	218,54 ± 17,74
ХННГ, n=10	149,05 ± 2,45 p1=0,025	186,08 ± 11,56 p1=0,049
Хелеритрин, n=8	191,12 ± 15,64 p1>0,05	205,2 ± 19,31 p1>0,05
Хелеритрин + ХННГ, n=10	173,87 ± 21,48 p2>0,05	238,25 ± 19,32 p2=0,035
Роттлерин, n=8	211,25 ± 25,17 p1>0,05	224,3 ± 7,95 p1>0,05
Роттлерин + ХННГ, n=10	168,83 ± 14,96 p2>0,05	220,51 ± 10,06 p2=0,044

Примечания: выброс ЛДГ выражен в процентах к параллельному нормоксическому контролю. ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия. P1 – достоверность относительно неадаптированных крыс; p2 – относительно группы ХННГ; U-критерий Манна-Уитни. Хелеритрин (10 мкМ/л) и роттлерин (1 мкМ/л) добавляли в инкубационный буфер за 25 минут до начала аноксии. n – количество животных в группе.

Проведенные исследования показали важную роль протеинкиназы С в реализации инфаркт–лимитирующего и цитопротекторного действия хронической непрерывной нормобарической гипоксии. Оставалось неясным, какая из изоформ протеинкиназы С опосредует инфаркт–лимитирующий и цитопротекторный эффекты ХННГ. Так, в научной литературе имеются сведения о противоположной функции различных изоформ ПКС при формировании защитных эффектов ИП [Ping P. et al., 1997; Churchill E.N., Mochly-Rosen D. 2007]. Одними авторами показано, что ИП приводит к активации ПКС ϵ [Ping P. et al., 1997; Liu H. et al., 2001], которая играет важную роль при формировании кардиопротекторного эффекта этого адаптирующего воздействия [Churchill E.N. et al., 2010, Gray M.O. et al., 1997; Ping P. et al., 2002]. В то же время эксперименты с «нокаутированными» по гену ПКС δ мышами показали, инфаркт-лимитирующий эффект ИП у таких животных не формируется [Maug M. et al., 2004]. При исследовании участия изоформ ПКС в реализации инфаркт–лимитирующего действия хронической прерывистой гипобарической

гипоксии было обнаружено, что при блокаде ПКСδ протекторное действие такой адаптации не проявляется [Neckar J. et al., 2005; Hlavackova M et al., 2010].

Наше исследование показало важную роль протеинкиназы Сδ в цитопротекторном действии ХННГ.

3.1.3.4 Выявление роли NO-синтазы в реализации защитного действия хронической непрерывной нормобарической гипоксии⁷

При исследовании механизмов неспецифической адаптационной устойчивости миокарда к ишемии ранее были получены данные, позволяющие нам рассматривать этот фермент и продукцию им оксида азота как значимое событие в кардиопротекции [Доломан Л.Б., и соавт. 2004]. Например, было отмечено увеличение содержания в крови испытуемых при воздействии длительной гипобарической гипоксии метаболитов NO – нитритов и нитратов [Доломан Л.Б., и соавт. 2004]. Ряд исследователей сообщают об увеличении активности NOS и экспрессии кодирующих ее генов в миокарде животных, подвергнутых адаптации к гипоксии [Gonzales G. F. et al., 2005; Jung, F. et al., 2000]. Показано участие NO-синтазы и оксида азота в формировании инфаркт-лимитирующего действия опиоидов [Маслов Л.Н. и соавт. 2009а]. Кроме того, данные о том, что доноры NO оказывают инфаркт-лимитирующий эффект, говорят о возможности его участия в защитных эффектах адаптирующих воздействий. К сожалению, до настоящего времени не предпринимались исследования, направленные на изучение роли NO-синтазы и оксида азота в повышение толерантности сердца к ишемии-реперфузии после ХННГ.

Известно, что в кардиомиоцитах существуют различные субтипы NOS. Среди них выделяют эндотелиальную (конститутивную) (eNOS), нейрональную (nNOS) и индуцибельную (iNOS) [Меньщикова Е.Б. и др., 2006; Mattila J.T., Thomas A.C. 2014]. Существуют различные мнения относительно участия этих изоформ NOS в формировании адаптации к гипоксии. Например, в ряде публикаций говорится об увеличении активности, содержания iNOS и кодирующей её мРНК под воздействием хронической гипобарической гипоксии [Kolar F., Ostadal B., 2004; Rouet-Benzineb P. et al., 1999; Grilli A. et al., 2003; Jung, F et al., 2000], а в других исследованиях

⁷ Исследование проведено совместно с С.Ю. Цибульниковым

обнаружено увеличение активности eNOS при акклиматизации новорожденных кроликов к прерывистой нормобарической гипоксии [Baker J.E. et al., 1999; Fitzpatrick C. M. et al., 2005]. Недавними исследованиями показана важная роль eNOS в формировании инфаркт-лимитирующего действия ишемического preconditionирования [Yang C. et al., 2013]. До настоящего времени роль различных изоформ NOS в формировании инфаркт-лимитирующего эффекта хронической непрерывной нормобарической гипоксии была не исследована. В связи с этим следующая глава настоящей работы посвящена оценке участия нейрональной и индуцибельной форм NO-синтазы в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта хронической непрерывной нормобарической гипоксии.

Наши исследования показали, что курс хронической непрерывной нормобарической гипоксии способствует увеличению суммарного содержания нитратов и нитритов в сыворотке крови крыс в 1,5 раза по сравнению с интактными животными ($p < 0,05$, Табл. 29). Возрастание количества нитратов и нитритов в ткани миокарда адаптированных крыс оказалось двукратным по сравнению с контрольными особями (Табл. 29). Эти результаты свидетельствуют о повышении выработки оксида азота в ткани миокарда и других органах крыс, подвергнутых хронической непрерывной нормобарической гипоксии.

При проведении коронароокклюзии и реперфузии исследование нитритов и нитратов проводили после окончания ишемии, через 5 мин после начала реперфузии. В этом случае количество нитратов и нитритов в сыворотке крови и миокарде крыс, подвергнутых ХННГ, оказалось, соответственно, в 1,65 и 2,1 раза более высоким, чем у неадаптированных крыс, подвергнутых ишемии-реперфузии (Табл. 29). Полученные данные говорят о том, что повышение активности NO-синтазы в организме адаптированных к ХННГ животных сохраняется и преумножается при воздействии на миокард ишемии. Наши последующие эксперименты были направлены на выявление значимости этих изменений для реализации инфаркт-лимитирующего эффекта ХННГ.

Как можно видеть на Рис. 12, размер некроза миокарда, образовавшегося после ишемии-реперфузии в контрольной группе животных, составил 56,5% от зоны риска. В то же время величина зоны ишемического некроза миокарда у крыс, подвергнутых предварительной хронической гипоксии, составила 20,4% от зоны риска, что достоверно ($p < 0,01$) отличалось от соответствующего показателя контрольной группы

(Рис. 12). Эти результаты свидетельствуют о том, что хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия способна оказывать выраженное кардиопротективное действие.

Введение L-NAME (ингибитора всех изоформ NO-синтазы) животным, повергнутым ХННГ, сопровождалось формированием большего ишемического некроза, чем в группой адаптированных крыс, не получавших препаратов (Рис. 12). Соотношение зоны некроза к области риска в этой группе крыс составило 54%, что оказалось сопоставимым с этим показателем в группе «неадаптированного контроля» (Рис. 12). Эти данные позволяют предположить участие NO-синтазы в формировании инфаркт-лимитирующего эффекта ХННГ (Рис. 12).

Таблица 29 – Содержание нитратов и нитритов в крови и миокарде крыс после курса хронической непрерывной нормобарической гипоксии ($M \pm SEM$)

Группа животных	Без ишемии		После ишемии	
	Сыворотка крови, мкМ/л	Миокард, зона риска мкМ/мг	Сыворотка крови, мкМ/л	Миокард, зона риска мкМ/мг
Неадаптированные, n= 12	3,75 ± 0,49	0,20 ± 0,058	3,68 ± 0,376	0,17 ± 0,044
Хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия, n=10	5,53 ± 0,65 p=0,045	0,43 ± 0,068 p=0,021	6,10 ± 1,34 p=0,027	0,367 ± 0,07 p=0,03

Примечания: кровь и ткань миокарда забирали через 5 минут после начала реперфузии. p – достоверность различий относительно неадаптированных крыс t-тест Стьюдента.

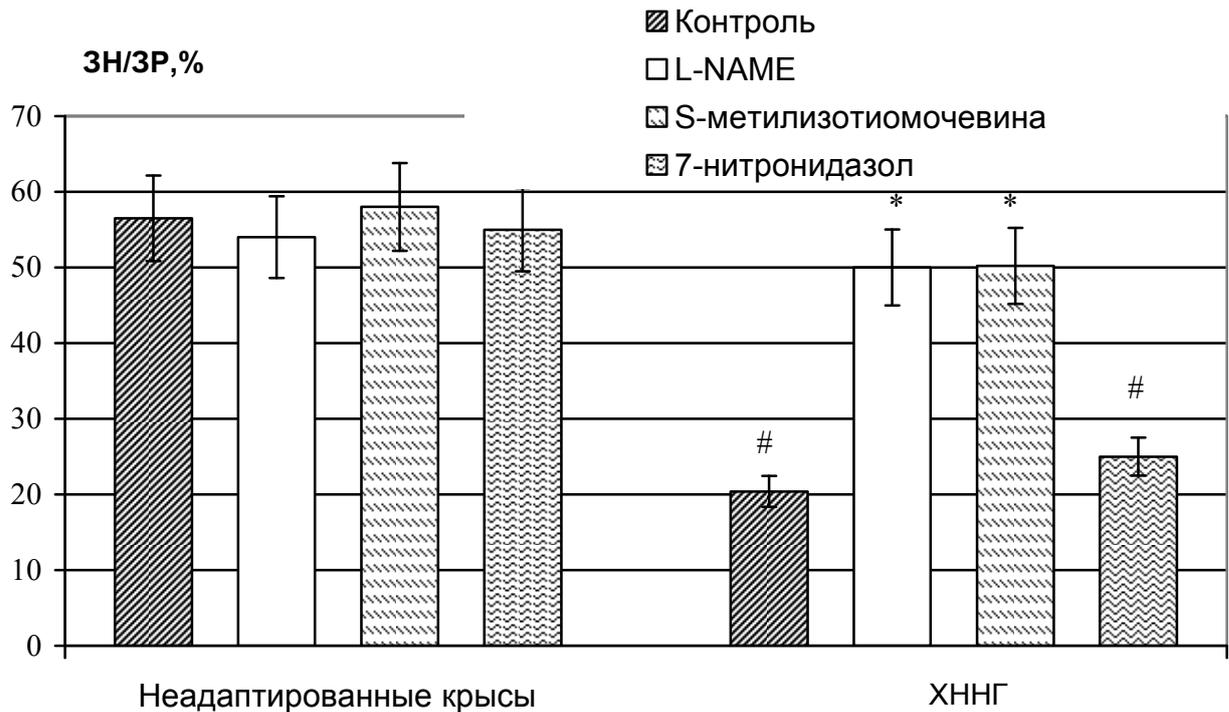


Рисунок 12 – Влияние ингибирования NO-синтазы на размер зоны некроза при коронароокклюзии-реперфузии у крыс, подвергнутых ХННГ ($M \pm SEM$)

Примечания: ХННГ - хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия; ЗН/ЗР – соотношение зоны некроза и зоны риска; L-NAME вводили внутривенно в дозе 10 мг/кг внутривенно за 25 минут до коронароокклюзии; S-метилтиомочевины сульфат вводили внутривенно в дозе 3 мг/кг за 30 мин до ишемии; 7-нитронидазол вводили внутривенно в дозе 50 мг/кг за 5 мин до начала ишемии. # - $p < 0,01$ - достоверность относительно группы неадаптированных крыс, * $p < 0,01$ - достоверность относительно ХННГ; U-критерий Манна-Уитни.

Внутривенное введение селективного ингибитора индуцибельной формы NO-синтазы S-метилизотиомочевины крысам, адаптированным к ХННГ перед моделированием коронароокклюзии-реперфузии, сопровождалось значительным (в 3 раза) увеличением размера зоны некроза по сравнению с группой ХННГ (Рис. 12). Значение индекса ЗН/ЗР при этом оказалось практически равным размеру некроза группы «неадаптированного контроля» (Рис. 12). Введение ингибитора нейрональной изоформы NO-синтазы - 7-нитронидазола – крысам, адаптированным к ХННГ, не устраняло инфаркт-лимитирующий эффект адаптации к гипоксии (Рис. 12). Ни один

из использованных ингибиторов не повлиял на размер некроза миокарда при коронароокклюзии-реперфузии у неадаптированных животных (Рис. 12).

Проведенное исследование позволило доказать важную роль NO-синтазы в реализации кардиопротективного действия хронической непрерывной нормобарической гипоксии. Об этом свидетельствуют как повышение уровня оксида азота в ткани миокарда и крови крыс, прошедших курс ХННГ, так и отсутствие проявлений инфаркт-лимитирующего эффекта этого вида адаптации при блокаде NO-синтазы. Эти данные согласуются и с результатами исследований других авторов, показавших важную роль NO-синтаз в формировании повышенной толерантности сердца к действию ишемии-реперфузии после нескольких сеансов гипобарической гипоксии [Zaobornyj T. et al., 2009] или ишемического preconditionирования [Шляхто Е. В. и др., 2009; Yang C. et al., 2013].

Наши исследования показали, что на фоне ингибирования iNOS инфаркт-лимитирующей эффект хронической нормобарической гипоксии не проявляется, а при блокаде нейрональной NO-синтазы защитный эффект ХННГ в отношении ишемического-реперфузионного повреждения миокарда сохранился. Полученные результаты свидетельствуют о важной роли индуцибельного пула NO-синтазы в защитном эффекте адаптации к ХННГ. Нейрональная NO-синтаза, по-видимому, не участвует в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта ХННГ при коронароокклюзии и реперфузии.

3.1.3.5 Изменение размера инфаркта при коронароокклюзии-реперфузии под влиянием блокады АТФ-зависимых K^+ -каналов у крыс после хронической непрерывной нормобарической гипоксии

Предыдущими исследованиями было выявлено, что сигнальная цепь протекторного эффекта ХННГ включает протеинкиназу С и NO-синтазу (Гл. 3.1.3.3. и 3.1.3.4). Активация этих внутриклеточных ферментов приводит к увеличению входящего K^+ тока в митохондриях посредством активации K_{ATP} -каналов [Costa A.D., et al., 2005,2008; Costa A.D., Garlid K.D. 2008]. Эти мембранные структуры митохондрий считают эффекторным звеном кардиопротекторного эффекта ишемического preconditionирования и адаптации к хронической гипобарической

гипоксии [Costa A.D., Garlid K.D. 2008; Нарыжная Н.В. и др., 2009]. В настоящем исследовании изучена роли K_{ATP} -каналов в опосредование инфаркт-лимитирующего действия ХННГ.

Результаты исследования показали, что введение блокатора митохондриальных и сарколеммальных K_{ATP} -каналов глибенкламида или блокатора митохондриальных K_{ATP} -каналов 5-гидроксидеканоата неадаптированным крысам не изменяет соотношение зона риска/зона некроза при моделировании коронароокклюзии и реперфузии (Табл. 30). Однако если эти препараты вводились животным, подвергнутым ХННГ, размер инфаркта (ЗН/ЗР) оказался больше, чем в группе ХННГ в 1,55 и 1,5 раза соответственно (Табл. 30).

Таблица 30 – Влияние блокады АТФ-зависимых K^+ -каналов на размер инфаркта при коронароокклюзии-реперфузии у крыс, подвергнутых ХННГ ($M \pm SEM$).

Серия	n	МПЖ мг	МЛЖ, мг	Зона некроза, мг	Зона риска, мг	ЗН/ ЗР (%)
Контроль	20	226,1± 15,4	1050,1 ± 39,9	208,9 ± 21,1	333,6 ± 29,8	62,3 ± 7,2
ХННГ	20	328,4 ± 15,4 p<0,05	1037,5± 33,9	134,8 ± 15,9 p<0,05	366,6 ± 39,8	37,3 ± 6,5 p<0,05
Глибенкламид 0,3 мг/кг	12	227,4± 10,4	1093,1 ± 25,9	221,22 ± 16,3	377,5 ± 23,1	58,6 ± 5,3
ХННГ + глибенкламид 0,3 мг/кг	13	330,3 ± 11,9 p<0,05	1076,3 ± 51,8	185,8 ± 21,8 p1<0,05	321,5 ± 28,2	57,8 ± 4,5 p1<0,05
5-гидрокси- деcanoат, 5 мг/кг	12	232,1± 13,1	1042,1 ± 29,3	214,2 ± 20,5	361,2 ± 25,1	59,3 ± 3,5
ХННГ + 5-гидрокси- деcanoат, 5 мг/кг	12	351, 2 ± 30,6 p<0,05	991,6 ± 65,2	200,9 ± 31,6 p1<0,05	356,2 ± 34,8	56,4 ± 5,7 p1<0,05

Примечание: ХННГ - хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия; ЗН/ЗР – соотношение зоны некроза и зоны риска; МПЖ – масса правого желудочка, МЛЖ – масса левого желудочка; n – количество животных в группе; p – уровень достоверности относительно группы контроля; p1– уровень достоверности относительно группы адаптированных крыс, критерий Манна-Уитни.

Поскольку размер инфаркта в группах контрольных крыс и ХННГ с блокадой K_{ATP} -каналов оказались сопоставимыми (статистически не различались), мы можем говорить о полном устранении инфаркт-лимитирующего эффекта ХННГ в условиях блокады K_{ATP} -каналов.

Полученные данные позволяют нам сделать вывод о том, что инфаркт-лимитирующее действие ХННГ реализуется через активацию K_{ATP} -каналов. Поскольку инфаркт-лимитирующий эффект ХННГ не проявлялся при блокаде митохондриального пула K_{ATP} -каналов, мы можем сделать вывод о значимости этих структур в реализации указанного эффекта.

3.1.3.6 Показатели энергетического метаболизма и функциональное состояние mPTR-пор митохондрий миокарда при ишемии-реперфузии у крыс, подвергнутых хронической непрерывной нормобарической гипоксии⁸

Исследование влияния хронической непрерывной нормобарической гипоксии на функциональное состояние митохондрий миокарда крыс проводили при моделировании тотальной 45-минутной ишемии и 30-минутной реперфузии изолированного перфузируемого сердца. Эта методика позволила не только выявить изменения параметров дыхания митохондрий, величин трансмембранного потенциала и Ca^{2+} -гомеостаза митохондрий у адаптированных крыс при ишемии-реперфузии, но и сопоставить эти показатели с параметрами сократимости миокарда, что позволило оценить значимость выявленных изменений для постишемического восстановления.

В таблице 31 представлены результаты исследования параметров дыхания митохондрий интактных крыс и крыс после курса ХННГ без моделирования ишемии-реперфузии. Как можно видеть, скорость АДФ-зависимого дыхания (состояние 3) митохондрий миокарда крыс после ХННГ была несколько выше, чем у интактных крыс, однако эти изменения не носили статистически значимый характер (Табл. 31). Остальные параметры дыхания митохондрий не изменялись.

⁸ Исследование выполнено совместно с Е.С.Прокудиной

Таблица 31 – Скорость дыхания митохондрий при нормоксии у интактных крыс и крыс после курса ХННГ (M± SEM).

Группа животных	Состояние 2	Состояние 3	Состояние 4	Максимальная скорость дыхания при разобщении
Интактные	42 ± 4	155 ± 16	66 ± 7	269 ± 23
ХННГ	47 ± 6	183 ± 20	52 ± 5	298 ± 25

Примечания: ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия. Состояние 2 – скорость снижения концентрации кислорода в присутствии митохондрий, малата и пирувата; состояние 3 - в присутствии митохондрий, малата, пирувата и 200 нМ АДФ; состояние 4 – после завершения АДФ-зависимого дыхания; максимальная скорость дыхания при разобщении – в присутствии митохондрий, малата, пирувата и 0,1 мкМ FCCP.

Иная картина наблюдалась при исследовании скорости дыхания после моделирования ишемии-реперфузии. Дизайн исследования и основные параметры дыхания представлены на рисунке 13. Митохондрии, изолированные из миокарда, подвергшегося ишемии-реперфузии демонстрировали значимо меньшую скорость АДФ-зависимого дыхания и поглощения кислорода при разобщении (Рис. 13). Этого не наблюдалось в случае, если ишемии-реперфузии подвергали сердца крыс, прошедших курс ХННГ (Рис. 13).

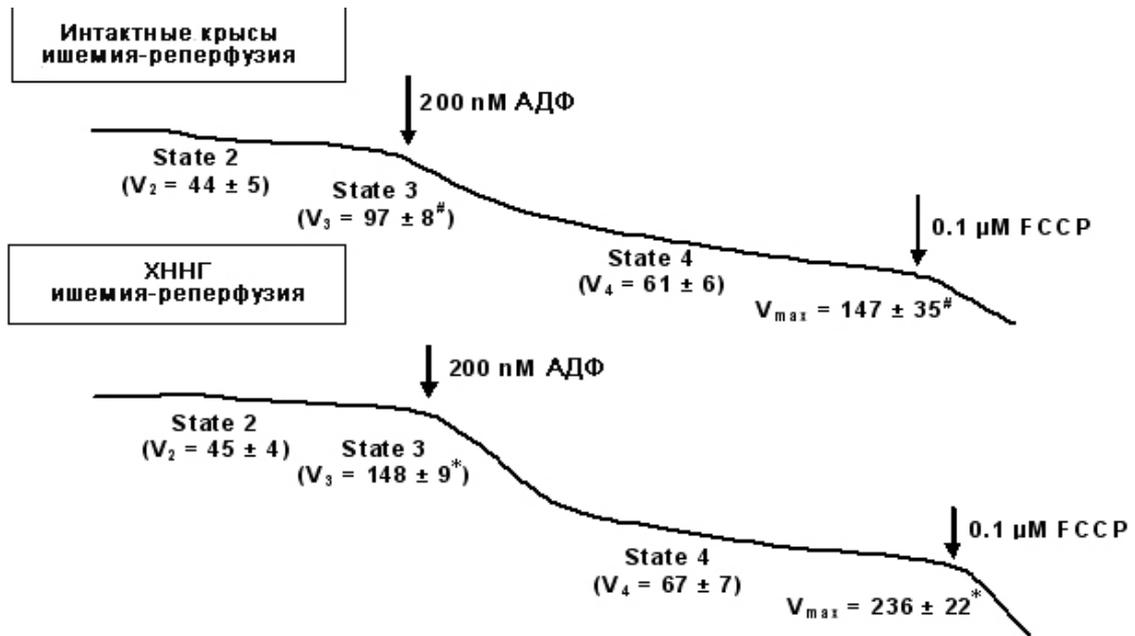


Рисунок 13 – Влияние хронической непрерывной нормобарической гипоксии на дыхание митохондрий миокарда крыс после ишемии-реперфузии

Примечания: ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия. State 2 – в присутствии митохондрий, малата и пирувата; State 3 - в присутствии митохондрий, малата, пирувата и 200 нМ АДФ; State 4 – после завершения АДФ-зависимого дыхания; максимальная скорость дыхания при разобщении – в присутствии митохондрий, малата, пирувата и 0,1 мкМ FCCP. Скорости дыхания выражали в нм O₂ / мг белка /мин. Данные представлены как M ± SEM, в каждой группе 12 крыс. # p < 0,01 по отношению к интактным; * p < 0,01 по отношению к ишемии-реперфузии у неадаптированных крыс; U-критерий Манна-Уитни.

Наряду со снижением скорости дыхания, ишемия-реперфузия приводила к достоверному снижению коэффициента АДФ/О в митохондриях миокарда неадаптированных крыс в 1,5 раза, что говорит о разобщении процессов окисления и фосфорилирования (Табл. 32). В группе крыс, прошедших курс ХННГ мы не наблюдали достоверного снижения этого параметра в ответ на ишемию-реперфузию. При этом соотношение АДФ/О митохондрий миокарда после ишемии-реперфузии адаптированных к ХННГ крыс оказалось достоверно выше, чем в группе ишемического контроля (Табл. 32). По показателям абсолютной скорости сукцинат-зависимого дыхания достоверных различий между всеми тремя группами животных обнаружено не было, так же как и при сравнении показателя АДФ/О (данные не

представлены в таблице). Полученные данные позволяют говорить о том, что адаптация крыс к хронической непрерывной нормобарической гипоксии улучшает параметры NADH–зависимого дыхания митохондрий.

Таблица 32 – Эффективность дыхания митохондрий миокарда крыс (АДФ/О), адаптированных к хронической непрерывной нормобарической гипоксии (M±SEM)

Группа животных Воздействие	Неадаптированные крысы	ХННГ
Исходно	2,63 ± 0,102	2,72 ± 0,1
Ишемия-реперфузия	1,8 ± 0,137*	2,35 ± 0,109#

Примечания: ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия. АДФ/О представляли в нМ АДФ на нМ поглощенного кислорода. Субстраты: 3мМ малат, 3 мМ пируват. * $p < 0,05$ по отношению к интактным; # $p < 0,05$ по отношению к ишемии-реперфузии у неадаптированных крыс; U-критерий Манна-Уитни.

Исследование трансмембранного потенциала ($\Delta\psi$) митохондрий показало значительное (в 2,5 раза) снижение этого показателя для митохондрий, выделенных из миокарда после ишемии-реперфузии (Рис. 14). У крыс после курса хронической гипоксии величина трансмембранного потенциала ($\Delta\psi$) митохондрий при ишемии-реперфузии оставалась значимо выше и достоверно не отличилась от соответствующего показателя интактных крыс (Рис. 14).

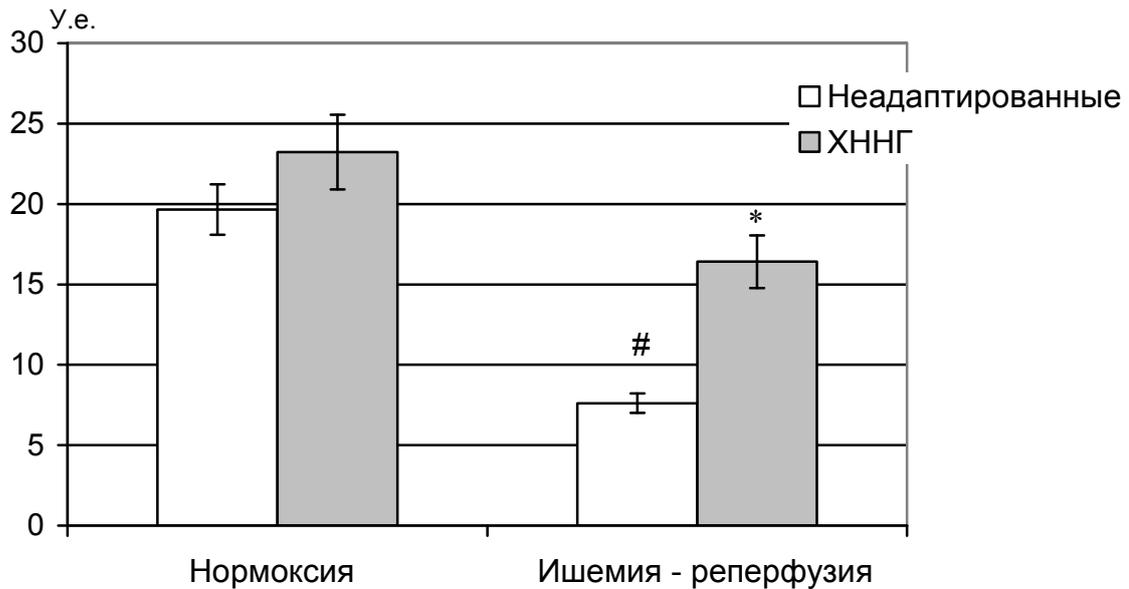


Рисунок 14 – Величина трансмембранного потенциала митохондрий ($M \pm SEM$)

Примечания: ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия. # $p < 0,01$ по отношению к интактным; * $p < 0,025$ по отношению к ишемии-реперфузии у неадаптированных крыс; U-критерий Манна-Уитни.

Выявленные изменения скорости дыхания и трансмембранного потенциала митохондрий миокарда крыс после курса ХННГ косвенно свидетельствуют об улучшении клеточного энергетического метаболизма. Подтверждением этому служат и результаты исследования содержания АТФ в ткани миокарда. В результате наших исследований обнаружено, что содержание АТФ в ткани миокарда интактных крыс и животных, подвергнутых ХННГ, в условиях нормоксии не различалось (Рис. 15). В ответ на моделирование тотальной ишемии и реперфузии изолированного сердца, содержание АТФ в миокарде неадаптированных крыс оказалось значимо сниженным (с $2,2 \pm 0,23$ нМ/г до $0,92 \pm 0,15$ нМ/г, $p=0,001$, Рис. 15). Эти данные согласуются с результатами исследования Akki A., и соавт. [Akki A. et al., 2012], которые обнаружили, что восстановление содержания АТФ в миокарде при его реперфузии после 25-минутной ишемии составляет 30% от исходного. В ткани миокарда крыс, адаптированных к ХННГ, подобного снижения не происходило (Рис. 15). Следовательно, мы можем говорить о том, что увеличение скорости митохондриального дыхания и трансмембранного потенциала приводит к увеличению энергетического потенциала клетки в виде АТФ.

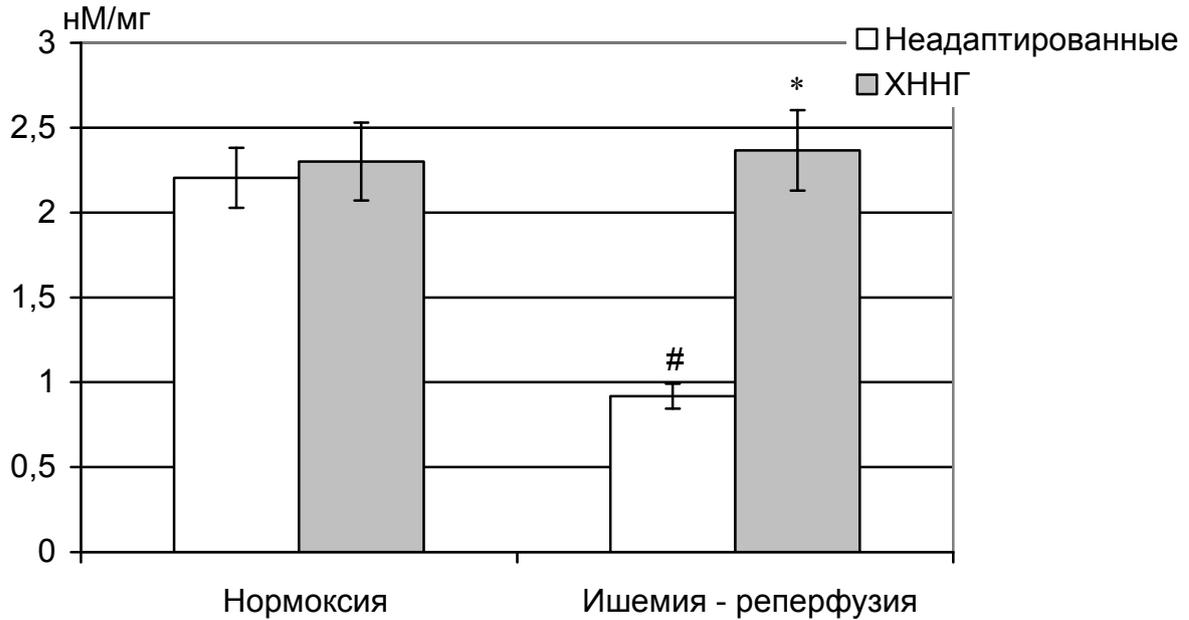


Рисунок 15 – Содержание АТФ в ткани миокарда ($M \pm SEM$)

Примечания: ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия.

$p < 0,01$ по отношению к интактным; * $p < 0,025$ по отношению к ишемии-реперфузии у неадаптированных крыс; + $p < 0,025$ по отношению к группе ХННГ + ишемия-реперфузия; U-критерий Манна-Уитни.

Как показали наши исследования (Рис. 16), открытие mPTP-пор митохондрий миокарда крысы после воздействия ишемии-реперфузии происходит под влиянием меньшего количества Ca^{2+} , чем у интактных крыс. Таким образом, Ca^{2+} -связывающая способность митохондрий после ишемии-реперфузии оказалась на 40% ($p < 0,01$) ниже таковой в митохондриях контрольных сердец (Рис. 16). Величина Ca^{2+} -связывающей способности митохондрий крыс, подвергнутых хронической нормобарической гипоксии, не снижалась при моделировании ишемии-реперфузии и оставалась достоверно не отличимой от этого показателя в группе нормоксического контроля. (Рис. 16).

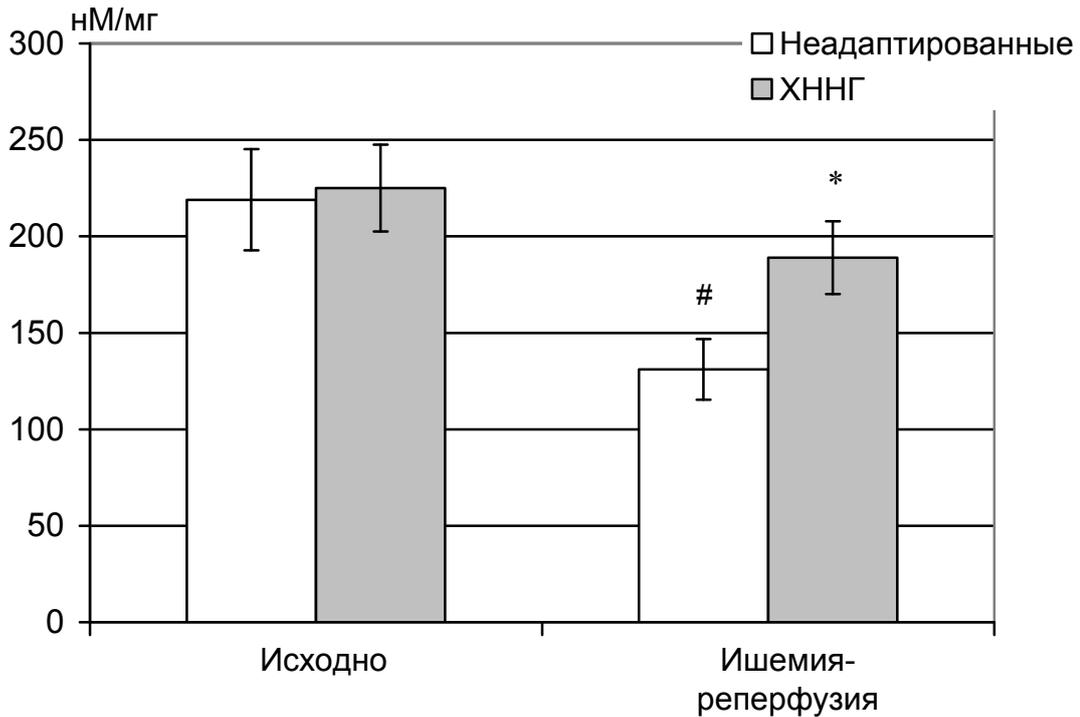


Рисунок 16 – Кальций-связывающая способность митохондрий ($M \pm SEM$)

Примечания: ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия.

$p < 0,01$ по отношению к интактным; * $p < 0,001$ по отношению к ишемии-реперфузии у неадаптированных крыс; U-критерий Манна-Уитни.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что увеличение чувствительности mPTP-поры к Ca^{2+} , наблюдаемое при ишемии-реперфузии, значительно менее выражено у крыс после адаптации к ХННГ.

Выбранная модель исследования позволила сопоставить параметры функционального состояния митохондрий и сократительную активность изолированного сердца крысы. Результаты корреляционного анализа свидетельствуют о прямой зависимости скорости АДФ-индуцированного дыхания митохондрий в присутствии НАД-зависимых субстратов (состояние 3) и силой сокращения изолированного сердца крысы в период реперфузии (Табл. 33). При этом корреляционная связь между этими двумя показателями сохранялась во всех экспериментальных группах (Табл. 33). Эти результаты свидетельствуют о взаимном влиянии силы сокращения миокарда и скорости дыхания митохондрий.

Сходные результаты мы получили при исследовании зависимости силы сокращения изолированного сердца во время реперфузии и функционального

состояния mPTP-пор (Табл. 33). Во всех экспериментальных группах наблюдали прямую корреляционную зависимость между давлением, развиваемым левым желудочком в период реперфузии и кальций-связывающей способностью митохондрий. Эти данные свидетельствуют о взаимосвязи выявленных изменений.

Таблица 33 – Корреляционная зависимость параметров функционального состояния митохондрий и силы сокращения изолированного сердца крыс ($M \pm SEM$)

Группа	Сравниваемые параметры	Коэффициент корреляции (r)	Достоверность (p)
Ишемия-реперфузия	Состояние 3 и сила сокращения	0,75	0,005
	КСС и сила сокращения	0,67	0,016
ХННГ + ишемия-реперфузия	Состояние 3 и сила сокращения	0,81	0,001
	КСС и сила сокращения	0,69	0,014

Примечания: ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия; состояние 3 – скорость дыхания митохондрий в состоянии 3; КСС – кальций-связывающая способность митохондрий; сила сокращения – давление, развиваемое левым желудочком крыс на 30 мин. реперфузии.

Резюмируя сказанное, в исследовании было обнаружено повышение эффективности митохондриального дыхания и синтеза АТФ в условиях ишемии–реперфузии у крыс после курса ХННГ. Корреляционный анализ данных показал наличие взаимосвязи между скоростью АДФ-индуцированного дыхания митохондрий в присутствии $НАД^+$ -зависимых субстратов (состояние 3) и силой сокращения изолированного сердца крысы в период реперфузии, повышение сократительной активности миокарда происходило параллельно с улучшением параметров митохондриального дыхания. В исследовании мы обнаружили, что mPTP–поры крыс, адаптированных к ХННГ, оказываются более устойчивыми к открытию, чем у неадаптированных особей. Корреляционный анализ данных выявил взаимосвязь повышения устойчивости mPTP–пор с инотропной состоятельностью миокарда, как в группе ХННГ, так и при блокаде опиоидных рецепторов. Следовательно, мы можем сделать вывод о том, что способность митохондрий

сохранять высокоэффективный энергетический метаболизм и поддерживать закрытыми mPTP–поры играет важную роль в положительном инотропном действии ХННГ.

3.1.3.7 Влияние антагонистов опиоидных рецепторов на показатели энергетического метаболизма и функциональное состояние mPTP-пор митохондрий миокарда крыс при воздействии хронической непрерывной нормобарической гипоксии⁹

Как сообщалось ранее (Гл. 3.1.3.6, Рис. 14, 15, 16, Табл. 31, 32) митохондрии, изолированные из миокарда крыс, адаптированных к хронической гипоксии, не подвержены ишемическому–реперфузионному снижению эффективности дыхания. Дальнейшие исследования показали, что при моделировании ишемии–реперфузии сердец крыс, подвергнутых ХННГ, после их перфузии раствором, содержащим налоксон, скорость дыхания в состоянии 3 и FCCP-стимулированного поглощения кислорода оказалась значительно более низкой, чем в группе «ХННГ» ($p < 0,01$, табл. 34). Перфузия миокарда интактных крыс раствором, содержащим налоксон, не повлияла на параметры дыхания митохондрий интактных крыс (Табл. 34).

В группе крыс, прошедших курс ХННГ мы наблюдали незначительное, статистически не значимое снижение коэффициента АДФ/О в ответ на ишемию–реперфузию (Табл. 35). При этом соотношение АДФ/О митохондрий миокарда после ишемии–реперфузии адаптированных к ХННГ крыс оказалось достоверно выше, чем в группе ишемического контроля (Табл. 35). Перфузия миокарда налоксоном перед моделированием тотальной ишемии–реперфузии приводила к тому, что эффективность дыхания митохондрий в группе ХННГ снизилась на 25% и оказалась достоверно не отличимой от неадаптированного контроля (Табл. 35). Полученные данные позволяют говорить о том, что адаптация крыс к хронической непрерывной нормобарической гипоксии улучшает параметры дыхания митохондрий и этот эффект зависит от опиоидных рецепторов.

⁹ Исследование выполнено совместно с Е.С.Прокудиной

Таблица 32 – Влияние хронической непрерывной нормобарической гипоксии на дыхание митохондрий миокарда крыс после ишемии-реперфузии (M ± SEM)

Группа животных	Состояние 2	Состояние 3	Состояние 4	Максимальная скорость дыхания при разобщении
Неадаптированные крысы				
Контроль	44 ± 5	97 ± 8	61 ± 6	147 ± 35
Налоксон	45 ± 3	93 ± 8	59 ± 7	141 ± 18
Хроническая нормобарическая гипоксия				
Контроль	45 ± 4	148 ± 9 p1 < 0,01	67 ± 7	236 ± 22 p1 < 0,01
Налоксон	46 ± 2	101 ± 4 p2 < 0,01	64 ± 2	133 ± 11 p2 < 0,01

Примечания: ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия. Состояние 2 – в присутствии митохондрий, малата и пирувата; состояние 3 – в присутствии митохондрий, малата, пирувата и 200 нМ АДФ; состояние 4 – после завершения АДФ-зависимого дыхания; максимальная скорость дыхания при разобщении – в присутствии митохондрий, малата, пирувата и 0,1 мкМ FCCP. Скорости дыхания выражали в нм O₂ / мг белка /мин. p1 – по отношению к ишемии-реперфузии у неадаптированных крыс; p2 – по отношению к группе ХННГ + ишемия-реперфузия; U-критерий Манна-Уитни.

Таблица 33 – Эффективность дыхания митохондрий миокарда крыс (АДФ/О), адаптированных к хронической непрерывной нормобарической гипоксии (M±SEM)

Группа животных Воздействие	Неадаптированные	ХННГ
Нормоксия	2,63 ± 0,102	2,72 ± 0,1
Ишемия-реперфузия	1,8 ± 0,137*	2,35 ± 0,109#
Ишемия-реперфузия + налоксон	1,62 ± 0,181*	1,77 ± 0,217+

Примечание: ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия. АДФ/О представляли в нМ АДФ на нМ поглощенного кислорода. * $p < 0,05$ по отношению к интактным; # $p < 0,05$ по отношению к ишемии-реперфузии у неадаптированных крыс; + $p < 0,05$ по отношению к группе ХННГ + ишемия-реперфузия; U-критерий Манна-Уитни.

У крыс после курса хронической гипоксии величина трансмембранного потенциала ($\Delta\psi$) митохондрий при ишемии-реперфузии оставалась значимо выше этого показателя у неадаптированных крыс (Рис. 17). Применение налоксона перед моделированием ишемии-реперфузии привело к снижению трансмембранного потенциала в 3 раза по сравнению с группой ХННГ (Рис. 17).

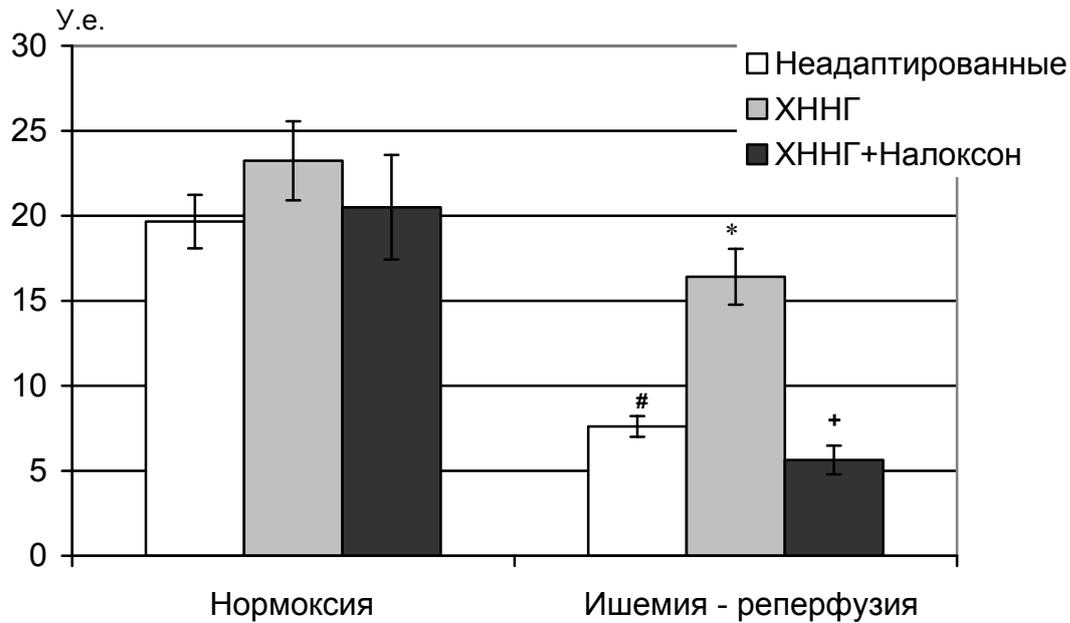


Рисунок 17 - Величина трансмембранного потенциала митохондрий ($M \pm SEM$)

Примечания: ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия.

$p < 0,01$ по отношению к интактным; * $p < 0,025$ по отношению к ишемии-реперфузии у неадаптированных крыс; + $p < 0,025$ по отношению к группе ХННГ + ишемия-реперфузия; U-критерий Манна-Уитни.

Как можно видеть на рисунке 18, снижение содержания АТФ в ткани миокарда после ишемии-реперфузии не выявлялось у животных, подвергнутых ХННГ (Рис. 18). Однако, если миокард крыс экспериментальной группы «ХННГ» перед моделированием ишемии перфузировали раствором налоксона, содержание АТФ в нем оказывалось сопоставимым с группой неадаптированных животных после ишемии-реперфузии (Рис. 18). Следовательно, мы можем говорить о том, что эффект сохранения высокого содержания АТФ в миокарде при ХННГ в условиях блокады ОР не проявляется. На основании полученных данных мы можем предполагать, что увеличение скорости митохондриального дыхания, трансмембранного потенциала и соответствующее этому увеличению содержания АТФ у крыс после ХННГ зависит от активации опиоидных рецепторов.

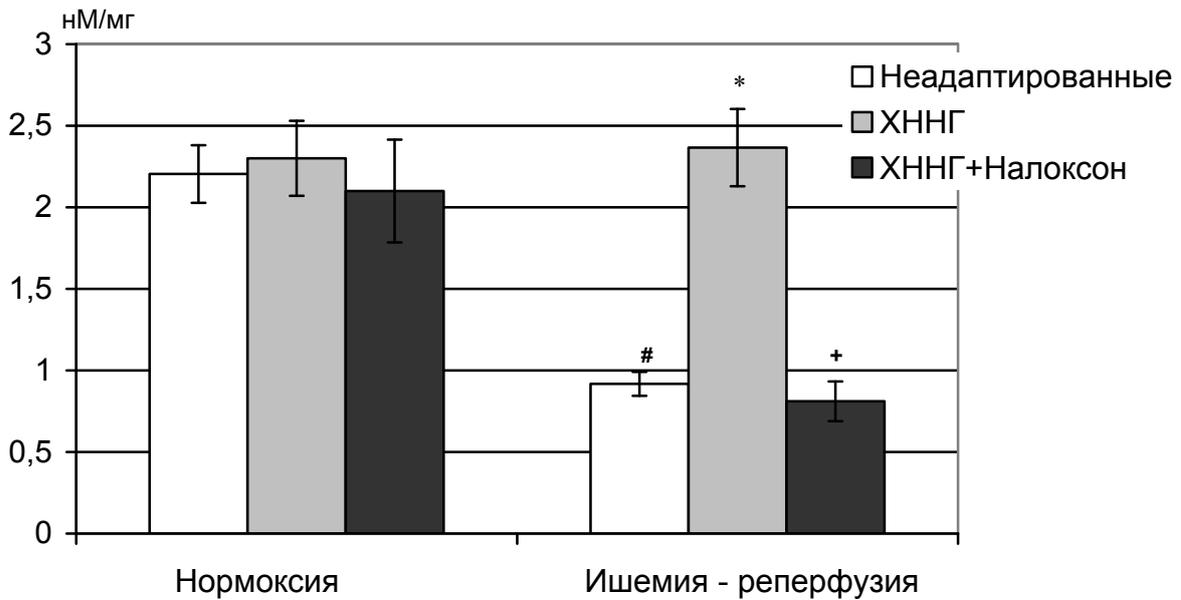


Рисунок 18 – Содержание АТФ в ткани миокарда (М ± SEM)

Примечания: ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия.

$p < 0,01$ по отношению к интактным; * $p < 0,025$ по отношению к ишемии-реперфузии у неадаптированных крыс; + $p < 0,025$ по отношению к группе ХННГ + ишемия-реперфузия; U-критерий Манна-Уитни.

Как показали наши исследования, величина Ca^{2+} -связывающей способности митохондрий крыс, подвергнутых хронической нормобарической гипоксии, не снижалась при моделировании ишемии-реперфузии (Рис. 19). В группе «ХННГ + налоксон + ишемия-реперфузия» показатель устойчивости mPTP-пор митохондрий был статистически не отличим от группы «Ишемия-реперфузия», то есть эффект адаптации к ХННГ не проявлялся (Рис. 19). Полученные результаты свидетельствуют о том, что увеличение чувствительности mPTP-поры к Ca^{2+} , наблюдаемое при ишемии-реперфузии, значительно менее выражено у крыс после адаптации к ХННГ. Этот эффект связан с активацией опиоидных рецепторов, поскольку не выявляется в присутствии их антагониста налоксона.

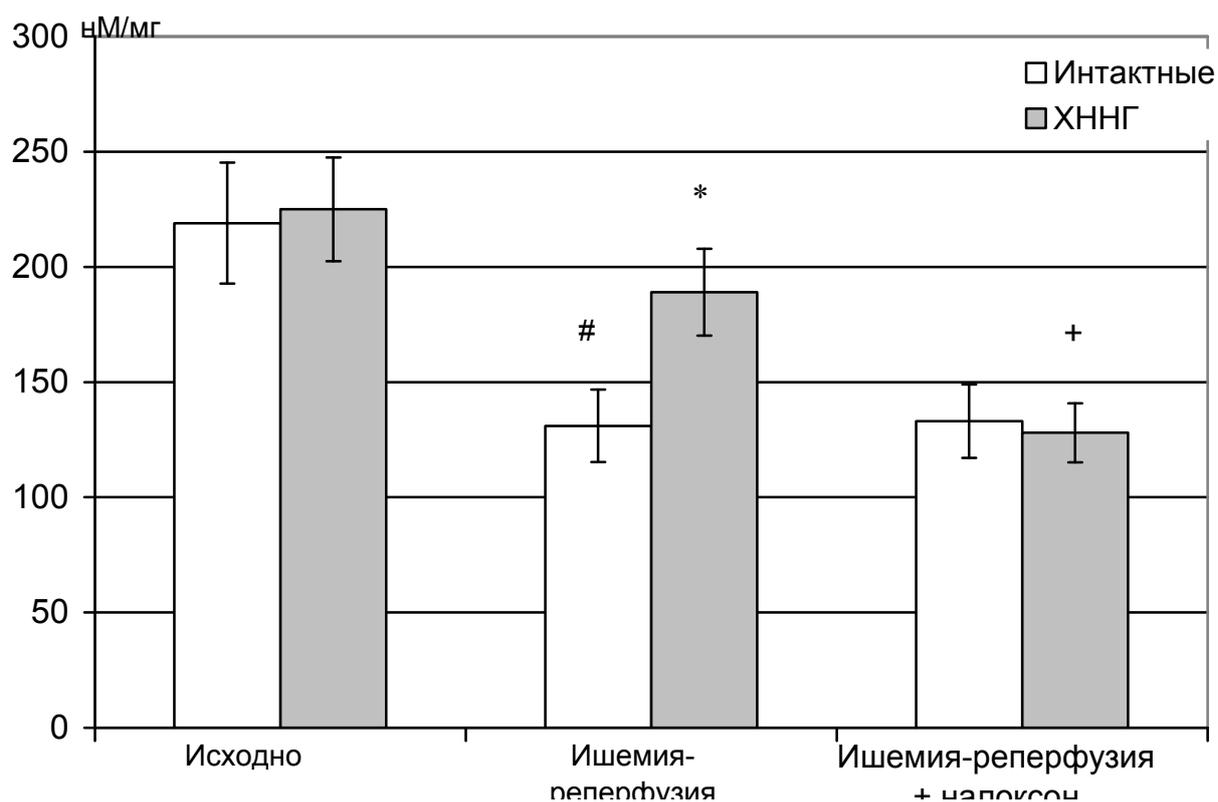


Рисунок 19 – Кальций-связывающая способность митохондрий ($M \pm SEM$)

Примечания: ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия.

$p < 0,01$ по отношению к интактным; * $p < 0,001$ по отношению к ишемии-реперфузии у неадаптированных крыс; + $p < 0,001$ по отношению к группе ХННГ + ишемия-реперфузия; U-критерий Манна-Уитни.

Корреляционный анализ показал зависимость между скоростью дыхания митохондрий в состоянии 3 (то есть в присутствии субстратов: малата, пирувата и АДФ) и силой сокращения изолированного сердца как в группах неадаптированных крыс, ХННГ, так и в присутствии антагониста опиоидных рецепторов налоксона (Рис. 20). Корреляционная зависимость наблюдалась и между кальций-связывающей способностью митохондрий миокарда и силой сокращения изолированного сердца (Табл. 36).

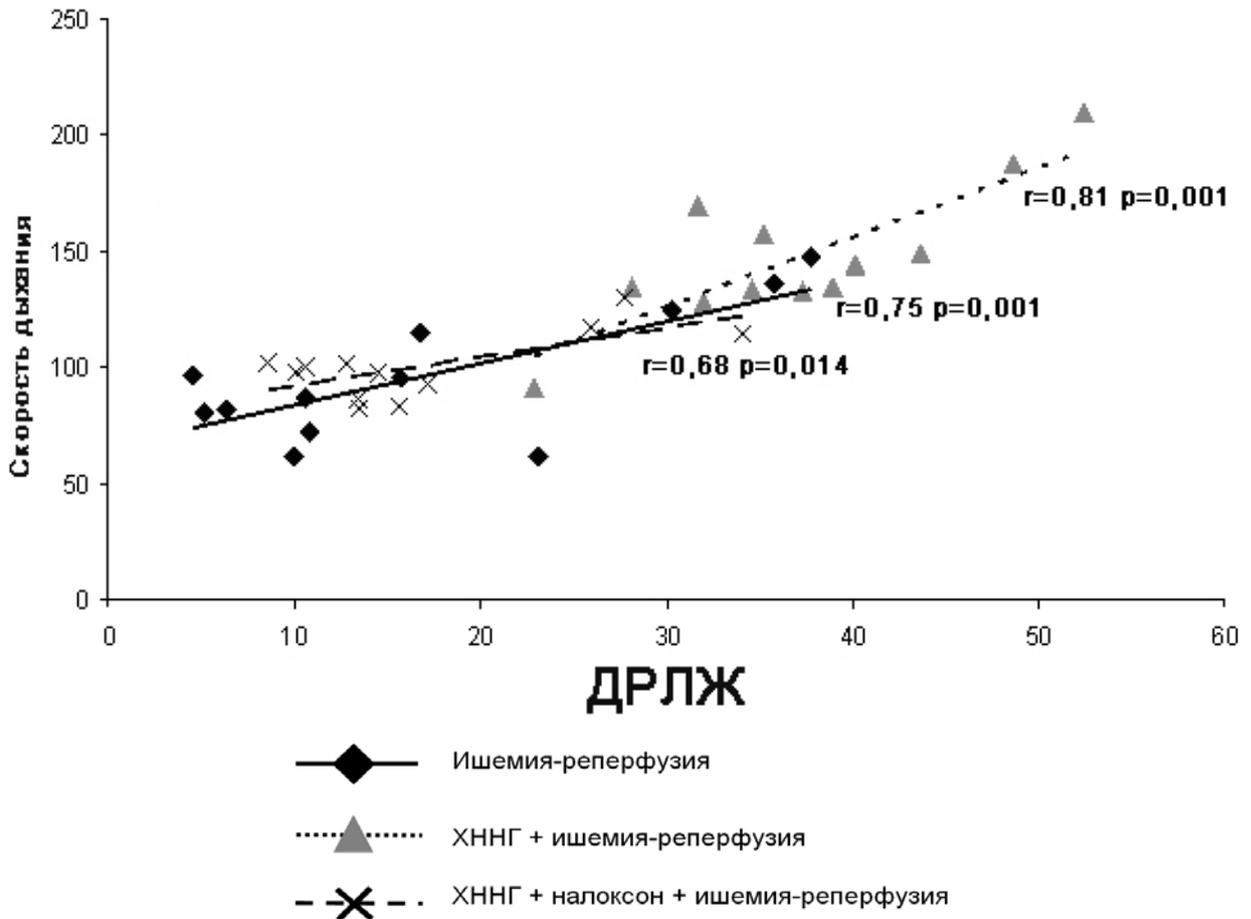


Рисунок 20 – Корреляционная зависимость скорости дыхания митохондрий и силы сокращения изолированного сердца крыс

Примечания: Скорость митохондриального дыхания исследовали в присутствии малата, пирувата и 200 нМ АДФ, O_2 /мг/мин; ДРЛЖ - сила сокращения левого желудочка, мм рт.ст.; ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия.

Таким образом, в исследовании было обнаружено повышение эффективности митохондриального дыхания и синтеза АТФ в условиях ишемии–реперфузии у крыс после курса ХННГ. Этот эффект зависит от активации опиоидных рецепторов, поскольку не проявляется при их блокаде. Корреляционный анализ данных показал наличие взаимосвязи между скоростью АДФ-индуцированного дыхания митохондрий в присутствии $НАД^+$ -зависимых субстратов (состояние 3) и силой сокращения изолированного сердца крысы в период реперфузии.

Таблица 36 – Корреляционная зависимость кальций-связывающей способности митохондрий и силы сокращения изолированного сердца крыс

Группа	Коэффициент корреляции (r)	Достоверность (p)
Ишемия-реперфузия	0,67	0,016
ХННГ + ишемия-реперфузия	0,69	0,014
ХННГ + ишемия-реперфузия + налоксон	0,79	0,002

Примечания: ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия; State 3 – скорость дыхания митохондрий в присутствие малата, пирувата и 200 нМ АДФ; КСС – кальций-связывающая способность митохондрий; LVDP- сила сокращения левого желудочка крыс во время реперфузии.

Эта закономерность сохранялась и в случае применения антагонистов опиоидных рецепторов, изменение сократительной активности миокарда происходило параллельно параметрам митохондриального дыхания. В исследовании мы обнаружили, что mPTP–поры крыс, адаптированных к ХННГ, оказываются более устойчивыми к открытию, чем у неадаптированных особей. В присутствие антагониста опиоидных рецепторов налоксона этот эффект нам обнаружить не удалось. Корреляционный анализ данных выявил взаимосвязь повышения устойчивости mPTP–пор с инотропной состоятельностью миокарда, как в группе ХННГ, так и при блокаде опиоидных рецепторов. Следовательно, мы можем сделать вывод о том, что способность митохондрий сохранять функциональную активность играет важную роль в реализации положительного инотропного действия ХННГ, и этот эффект зависит от опиоидных рецепторов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ГЛАВЫ 3.1

Данные, представленные в главе 3.1, убедительно свидетельствуют о том, что миокард крыс, подвергнутых хронической непрерывной нормобарической гипоксии, устойчив к повреждению, вызванному коронароокклюзией и реперфузией *in vivo* (Табл. 2) и тотальной ишемией–реперфузией изолированного сердца *in vitro* (Табл. 6). У крыс, адаптированных к ХННГ, оказалась выше и сократительная активность миокарда, определяемая по силе сокращений и продуктивному индексу (Рис. 6, Табл. 8). Кроме этого нами был обнаружен цитопротекторный эффект ХННГ при моделировании аноксии–реоксигенации изолированных кардиомиоцитов (Табл. 10, 11). Полученные в ходе выполнения работы факты подтверждаются результатами других исследователей. В 1994 году японскими учеными М. Тајима и соавт. было впервые обнаружено, что миокард крыс, подвергнутых хронической нормобарической гипоксии способен лучше восстанавливать сократительную функцию после ишемии, чем миокард неадаптированных крыс [Тајима М. et al., 1994]. Инфаркт–лимитирующий эффект ХННГ *in vivo* впервые выявили в институте физиологии г. Прага в 2003 г [Neckár J. et al., 2003]. Однако цитопротекторное действие хронической нормобарической гипоксии ранее было показано только на модели метаболического ингибирования клеточного дыхания [Borchert G.H. et al., 2011; 2013], а на модели аноксии–реоксигенации изолированных кардиомиоцитов этот эффект ХННГ выявлен нами впервые.

Несмотря на выраженный и длительный инфаркт–лимитирующий эффект адаптации к нормобарической гипоксии (уменьшение размера инфаркта миокарда при этом адаптирующем воздействии достигает 63%, а продолжительность эффекта – до 5 недель после прекращения гипоксии) [Neckar J. et al., 2004], его механизмы до настоящего времени были недостаточно исследованы. Тот факт, что протекторное действие ХННГ обнаруживается на модели изолированных кардиомиоцитов свидетельствует о том, что реализация этого эффекта происходит, в том числе, через внутриклеточные сигнальные механизмы и/или связанные с ними рецепторы. Однако в научной литературе полностью отсутствовала информация о рецепторах, опосредующих протекторный эффект ХННГ. Вместе с тем, известно, что рецепторы, находящиеся на мембране кардиомиоцитов, в частности: аденозиновые, брадикининовые, опиоидные и каннабиноидные рецепторы, объединенные в группу

GPCR ($G_{i/o}$ -белок–сопряженных рецепторов) являются необходимым звеном для передачи внутрь клетки протекторного сигнала при таких воздействиях как ишемическое пре– и пост–кондиционирование, дистантное и фармакологическое прекондиционирование [Schultz J.E.J., 1998; Xu Y.C., et al., 2015]. Опиоидные рецепторы, на наш взгляд, являются наиболее перспективными структурами для фармакологического воздействия на кардиомиоциты с целью повышения устойчивости миокарда к ишемическому–реперфузионному повреждению, поскольку их селективные агонисты показывают выраженное протекторное действие, не обладая негативными побочными эффектами, как агонисты аденозиновых, брадикининовых и каннабиноидных рецепторов [Маслов Л.Н. и др., 2013а]. В связи с этим, первоочередной задачей настоящего исследования оказалось выявление участия опиоидных рецепторов различных субтипов и опиоидной системы в целом в реализации кардиопротекторного действия ХННГ.

Важным фактом, обнаруженным нами при решении поставленной задачи, стало возрастание уровня эндогенных опиоидов – мет–энкефалина и эндоморфинов – в плазме крови и миокарде крыс, подвергнутых ХННГ (Табл. 13). Повышение содержания опиоидных пептидов было обнаружено ранее в плазме крови и мозге крыс при адаптации к хроническому стрессу [Маслова Л.В., Лишманов Ю.Б., 1989; Лишманов Ю.Б. и др. 1996]. При длительном воздействии хронической гипобарической гипоксии этими же авторами было обнаружено возрастание содержания мет–энкефалина в гипоталамусе [Маслов Л.Н. и др. 1998а]. В 1996 г. группа ученых из исследовательского центра Аризоны выявила повышение экспрессии гена, кодирующего дельта–опиоидные рецепторы, в мозге мышей после 7–дневной нормобарической гипоксии [Mayfield K.P. et al., 1996]. Все эти данные однозначно свидетельствуют о значительных изменениях, которым подвергается опиоидная система в процессе адаптационных воздействий. Важно отметить, что обнаруженное нами повышение содержания эндогенных опиоидов в крови и миокарде адаптированных к ХННГ крыс сохраняется при коронароокклюзии–реперфузии, в то время как у неадаптированных крыс уровень опиоидов снижается (Табл. 13). Физиологическое значение этих изменений становится понятным после исследования с применением антагонистов ОР: для выявления роли опиоидной системы в развитии адаптационной устойчивости

миокарда к ишемическим–реперфузионным повреждениям мы исследовали инфаркт–лимитирующий, кардиопротекторный и цитопротекторный эффекты ХННГ в условиях блокады опиоидных рецепторов их селективными агонистами. В нашей работе обнаружено, что инфаркт–лимитирующий эффект ХННГ *in vivo* не проявляется в условиях блокады δ_2 - и μ -опиоидных рецепторов (Табл. 14). Это свидетельствует об опосредованности этими субтипами ОР защитного действия ХННГ в отношении ишемического–реперфузионного повреждения миокарда и позволяет нам с уверенностью говорить о том, что инфаркт–лимитирующий эффект ХННГ реализуется через активацию эндогенной опиоидной системы – выработку опиоидов и стимулирование опиоидных рецепторов. Исследование роли опиоидной системы в процессе адаптации к гипоксии проводили физиологи из США [Mayfield K.P., D'Alecy L.G. 1994]. Ими была установлена важная роль опиоидных рецепторов в повышении толерантности к гипоксии у адаптированных к этому экстремальному воздействию крыс [Mayfield K.P., D'Alecy L.G. 1994].

Важным вопросом является выяснение локализации опиоидных рецепторов, ответственных за реализацию обнаруженных защитных эффектов хронической гипоксии. Проведенные опыты показали, что в случае, если моделирование ишемии–реперфузии было проведено на изолированном сердце (Табл. 6-9) или изолированных кардиомиоцитах (Табл. 10, 11, Рис. 7), защитный эффект ХННГ сохранялся. Более того, при блокаде δ_2 - или μ -опиоидных рецепторов на этих экспериментальных моделях мы не наблюдали кардиопротекторного и цитопротекторного действия ХННГ (Табл. 16, Рис. 10). Эти данные позволяют нам говорить о том, что кардиопротекторное действие ХННГ реализуется через δ_2 - и μ -опиоидные рецепторы, расположенные в миокарде, на мембранах кардиомиоцитов.

Эксперименты, проведенные на изолированном перфузируемом сердце крыс, подвергнутых курсу хронической непрерывной нормобарической гипоксии, показали, что кардиопротекторный эффект этого адаптирующего воздействия сопровождается улучшением сократительной активности миокарда в постишемическом периоде (Рис. 6, Табл. 8). При этом положительный инотропный эффект ХННГ сопровождается улучшением диастолической функции (Табл. 9). Проведение тотальной ишемии изолированного сердца крыс, подвергнутых ХННГ, при добавлении в перфузионный раствор селективных антагонистов δ - и δ_2 -ОР приводило к полному устранению

инотропного и кардиопротекторного действия ХННГ, что позволяет нам сделать вывод об участии δ_2 -ОР в реализации этих эффектов (Рис. 8, 9, Табл. 17).

Известно, что опиоидные рецепторы являются одним из ключевых рецепторных звеньев реализации кардиопротекторного действия ишемического preconditionирования [Miki T. et al., 1998]. При исследовании инфаркт-лимитирующего эффекта ишемического preconditionирования, было обнаружено, что этот защитный эффект реализуется через активацию δ_1 -ОР, в то время как δ_2 -ОР не участвуют в инфаркт-лимитирующем эффекте ишемического preconditionирования [Schultz J.E.J. et al., 1998]. Другие авторы сообщают об участии κ -, но не дельта опиоидных рецепторов в реализации механизма защитного действия preconditionирования [Wang G.Y. et al., 2001]. Обнаружено вовлечение δ - и κ -ОР в кардиопротекторный эффект дистантного preconditionирования [Sugendra N. et al., 2013]. Кроме того, ранее сообщалось о вовлечении μ -, но не δ -ОР в антиаритмический эффект адаптации крыс к стрессу [Маслов Л.Н. и др., 2004b]. Приведенные данные литературы расходятся с полученными нами результатами, которые выявили важную роль δ_2 -ОР в реализации кардиопротекторного действия ХННГ. Мы можем предполагать, что различие субтипов опиоидных рецепторов, вовлеченных в формирование защитных эффектов при различных адаптирующих воздействиях, может быть обусловлено изменением экспрессии опиоидных рецепторов того или иного субтипа на мембранах кардиомиоцитов. К сожалению, в пользу этого предположения мы можем привести лишь одно исследование, в котором обнаружено увеличение экспрессии дельта-опиоидных рецепторов в мозге мышей после 7-дневной нормобарической гипоксии [Mayfield K.P. et al., 1996]. Кроме того, подобная ситуация может быть связана с тем, что большинство эндогенных опиоидов имеют низкую рецепторную селективность. Так, например, мет- и лей-энкефалины имеют высокое сродство к μ - и δ -ОР [Cox V.M. et al., 2015]. Относительную рецепторную селективность имеют лишь эндоморфины, имеющие сродство преимущественно к μ -ОР [Feng Y. et al., 2012]. Низкая рецепторная специфичность эндогенных опиоидов сопровождается сходством молекулярной структуры и внутриклеточного сигнального механизма, сопряженного с μ -, δ - и κ - опиоидными рецепторами [Feng Y. et al., 2012]. Тем не менее, накопленных к настоящему моменту

фактов достаточно для того, чтобы можно было говорить об опиоидной системе как универсальном опосредующем механизме регуляции выживаемости клеток сердца при адаптирующих воздействиях.

Внутриклеточные механизмы реализации инфаркт–лимитирующего действия ХННГ до настоящего времени были исследованы недостаточно. Анализируя данные литературы о механизмах реализации инфаркт–лимитирующего эффекта гипобарической гипоксии, ишемического прекондиционирования и механизма кардиопротекторного действия опиоидов мы предположили, что механизм защитных эффектов хронической нормобарической гипоксии включает в себя тирозинкиназы, PI3-протеинкиназу [Williams-Pritchard G., et al, 2011], протеинкиназу C [Rouet-Benzineb P. et al, 1999; Neckar J. et al., 2005], NO-синтазу [Fitzpatrick C.M. et al., 2005], K_{ATP}-каналы [Fitzpatrick C.M. et al., 2005], mPTP-пору митохондрий [Zhu W.-Zh., et al., 2006]. Важно отметить, что эти киназные каскады связаны с опиоидными рецепторами [Williams-Pritchard G., et al, 2011]. В связи с этим второй задачей исследования было выявления участия этих киназ и молекулярных структур в кардиопротекторном эффекте ХННГ.

Наши исследования показали, что при моделировании коронароокклюзии и реперфузии у адаптированных к хронической нормобарической гипоксии крыс на фоне ингибирования всех типов тирозинкиназ генистеином, инфаркт–лимитирующий эффект адаптации не проявлялся (Рис. 11). Цитопротекторный эффект ХННГ в отношении аноксии–реоксигенации изолированных кардиомиоцитов так же не был обнаружен при блокаде тирозинкиназ (Табл. 21, 22). Эти данные однозначно свидетельствуют о важной роли тирозинкиназ кардиомиоцитов в защитном эффекте ХННГ. Полученные результаты согласуются с данными литературы об участии тирозинкиназ в формировании инфаркт–лимитирующего действия раннего и отсроченного ишемического прекондиционирования [Ge H., et al., 2015; Ping P, et al., 1999], или этого же эффекта опиоидов [Fryer R.M. et al., 2001]. Следует отметить, что тирозинкиназы представляют собой обширное семейство ферментов, регулирующее активность нижестоящих энзимов фосфорилированием тирозина [Dengjel J. et al., 2010]. При исследовании инфаркт–лимитирующего действия ишемического прекондиционирования обнаружена важная роль в этом явлении рецепторных тирозинкиназ эпидермального фактора роста (Src/EGFR-тирозинкиназ) [Ping P, et al.,

1999]. В ряде работ показана сопряженность опиоидных рецепторов с Src/EGFR-тирозинкиназами [Eisinger D.A., Ammer H. 2008, 2011; Chen Y. et al., 2008]. Однако эксперименты, проведенные нами с селективным антагонистом Src/EGFR-тирозинкиназ лавендустином, показали, что селективная блокада только этого пула тирозинкиназ не влияет на выраженность инфаркт–лимитирующего действия ХННГ (Рис. 11). Следовательно, мы не можем говорить о значимой роли этого фермента в опосредовании кардиопротекторного эффекта хронической нормобарической гипоксии. С результатами наших экспериментов согласуются данные, полученные в исследованиях R. M. Fryer соавт. (2001). Эти авторы сообщили о том, что при блокаде всего пула тирозинкиназ генистеином кардиопротекторное действие агонистов δ -ОР не проявляется, в то время как применение ингибитора Src/EGFR-тирозинкиназ лавендустина не оказывает такого эффекта [Fryer R.M. et al., 2001]. Следовательно, мы можем предположить, что внутриклеточные сигнальные механизмы, опосредующие инфаркт–лимитирующее действие ишемического preconditionирования отличаются от таковых при хронической непрерывной нормобарической гипоксии. Возможно, что в защитном действии как адаптации к хронической нормобарической гипоксии, так и агонистов дельта–ОР принимают участие другие, неизвестные субтипы тирозинкиназ. В качестве сигнальных тирозинкиназ в этих случаях, вероятно, выступают цитоплазматические Lck-тирозинкиназы, участвующие в реализации инфаркт–лимитирующего действия опиоидов [Fryer R.M. et al., 2001b].

При исследовании участия PI3-киназы в механизмах реализации инфаркт–лимитирующего и цитопротекторного действия ХННГ нами были получены неожиданные данные, свидетельствующие о том, что PI3-киназа не участвует в реализации инфаркт–лимитирующего и цитопротекторного эффекта ХННГ (Табл. 23-25). Ранее было обнаружено, что этот фермент участвует в кардиопротекторном эффекте ишемического preconditionирования и опиоидов [Qin Q, et al., 2003; Cao Z. et al., 2005b]. Известно, что активация PI3-киназы при ишемическом preconditionировании способствует образованию фосфатидил инозитол-(3,4,5)–трифосфата, который активирует фосфоинозитол–зависимые киназы (PDK), функциональное состояние которых влияет на активность протеинкиназы C [Oudit G.Y., Penninger J.M., 2009; Tong H. et al., 2000]. Роль этого внутриклеточного

механизма в реализации кардиопротекторного действия ишемического пре-, посткондиционирования и дистантного прекодиционирования показана в недавних исследованиях [Heusch G., 2015]. Сигнальный каскад, одним из ключевых звеньев которого является PI3-киназа, в 2004 г был назван RISK-киназным каскадом (**R**eperfusion-**I**nduced **S**alvage **K**inase) по инициативе профессоров Лондонского университета D.M. Yellon и D.J. Hausenloy [Hausenloy D.J., Yellon D.M. 2007], включившим в эту сигнальную цепь такие внутриклеточные ферменты как PI3-киназа (фосфоинозитид-3-киназа), фосфоинозитид-зависимые киназы 1 и 2 (PDK1,2), Akt-киназу (киназа, выделенная из **AKR thymoma cells**), ПКК (протеинкиназа C) и NO-синтазу. В исследовании Jain K. и соавт. было показано, что у крыс, устойчивых к гипоксии (выживших при давлении 223 мм рт.ст. более 25 минут) увеличена экспрессия PI3-киназы в ткани миокарда [Jain K. et al., 2013].

В противоположность приведенным данным литературы S.E. He и соавт. показали, что кардиопротекторный эффект морфина при ишемии-реперфузии изолированного сердца может реализоваться без участия PI3K/Akt-киназ [He S.F. et al., 2015]. Наши данные свидетельствуют о том, что PI3-киназа не вовлечена в регуляторный каскад ХННГ. Возможно, ключевую роль в активации RISK-киназного каскада при ХННГ играет NO-синтаза, значения которой в реализации эффектов ХННГ будет обсуждаться ниже.

Проведенные исследования показали важную роль протеинкиназы C и ее δ -типа в реализации инфаркт-лимитирующего и цитопротекторного действия хронической непрерывной нормобарической гипоксии (Табл. 26-28). Протеинкиназа C была первым обнаруженным цитоплазматическим медиатором кардиопротекторного действия ишемического прекодиционирования, проф. Дж.М. Дауни и его коллеги в 1994 г. показали отсутствие кардиопротекции при ИП на модели коронароокклюзии-реперфузии у кроликов при введении ингибиторов протеинкиназы C [Liu Y. et al., 1994]. Эти исследователи предположили, что активация $G_{i/o}$ -белок-сопряженных рецепторов (GPCR, в число которых входят и опиоидные рецепторы) вызывает активацию фосфолипазы C, которая продуцирует инозитолтрифосфат и диацилглицерол в качестве вторичных мессенджеров. Диацилглицерол вызывает активацию и транслокацию протеинкиназы C [Liu Y. et al., 1994]. Позднее было обнаружено, что активация протеинкиназы C может

происходить фосфатидил-зависимыми киназами, которые в свою очередь активируются PI3-киназой [Tong H. et al., 2000 Oudit G.Y., Penninger J.M., 2009; Tong H. et al., 2000]. Несмотря на наличие единичных публикаций, опровергающих роль протеинкиназы С в кардиопротекторном эффекте ИП [Simkhovich BZ. et al., 1996], концепция о ключевом значении протеинкиназы С в формировании кардиопротекторного эффекта неспецифических адаптивных реакций остается в числе одной из самых обсуждаемых до настоящего времени [Heusch G., 2015].

Известно, что функции различных изоформ ПКС в формировании защитных эффектов неоднозначны [Ping P. et al., 1997; Liu H. et al., 2001; Churchill E.N., Mochly-Rosen D. 2007]. Было обнаружено, что ИП у кроликов приводит к активации ПКС ϵ [Ping P. et al., 1997; Liu H. et al., 2001]. В 2010 г были опубликованы результаты исследования, проведенного в Стенфордском университете США [Churchill E.N. et al., 2010]. На модели ИП изолированного перфузируемого сердца крысы обнаружено, что митохондриальная (партикулярная) фракция гомогената кардиомиоцитов крыс, подвергшихся ИП перед длительной ишемией, содержит в 3,8 раз меньше активной (фосфорилированной) ПКС δ , но в 16 раз больше активной ПКС ϵ , чем у непрекондиционированных крыс. При этом общее содержание ПКС δ в клетках сердца preconditionированных сердец снижено. Эти данные позволили предполагать, что опосредование кардиопротекторного действия ИП реализуется через ϵ -субтип ПКС. Недавними исследованиями показано, что ингибирование экспрессии ПКС β 2 способно снижать ишемическое–реперфузионное повреждение кардиомиоцитов [Liu Y. et al., 2015]. Мнения исследователей об участии ПКС δ в защитном действии ИП противоречивы. Существуют данные как о протективной [Maug M. et al., 2004], так и о негативной [Inagaki K. et al., 2003; Kong L. et al., 2008] роли ПКС δ в регуляции толерантности сердца к действию ишемии-реперфузии. Наше исследование показало важную роль протеинкиназы С δ в цитопротекторном действии ХННГ (Табл. 26-28). Эти данные подтверждаются результатами исследования наших коллег из института физиологии г. Прага об увеличении экспрессии ПКС δ в миокарде крыс при адаптации к гипобарической гипоксии [Neckar J. et al., 2005; Hlavackova M. et al., 2010]. Однако недавние исследования этой же группы ученых показали увеличение содержания в степени фосфорилирования ϵ -изоформы ПКС в миокарде крыс после хронической непрерывной гипоксии [Holzerová K. et al., 2015].

Анализ данных литературы позволяет выделить несколько мишеней ПКС, которые участвуют в формировании адаптивной реакции сердца в ответ гипоксию: это АТФ-зависимые K^+ -каналы ($K_{ATФ}$ -каналы) [Fryer R.M. et al., 2001], тирозинкиназы [Baines C.P. et al., 1998], факторы транскрипции [Yuan G., 2008], саркоплазматический ретикулум [Yamamura K. 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 $K_{ATФ}$ -каналов) [Cohen M.V. et al., 2007; Costa A.D. et al., 2006; Penna C. et al., 2006; 2007] и ингибированию открытия mPTP-пор [Cohen M.V. et al., 2007; Costa A.D. et al., 2006; Penna C. et al., 2006; 2007]. Группа исследователей под руководством проф. D.M. Yellon на модели ишемии–реоксигенации трабекул предсердий человека обнаружила, что кардиопротекция, вызванная активатором протеинкиназы C 1,2–диоктаноил-sn-глицеролом, зависит от активации $K_{ATФ}$ -каналов, а последнее событие приводит к последующему локальному увеличению выработки активных форм кислорода митохондриями [Costa A.D., Garlid K.D. 2008], которое приводит к увеличению активности ПКСε, образуя, таким образом, положительную обратную связь. О важной роли этого сигнального механизма в адаптационной кардиопротекции свидетельствуют публикации об устранении кардиопротекторного и антиаритмического эффектов хронической гипобарической гипоксии после блокады $K_{ATФ}$ -каналов [Нарыжная Н.В. и др., 2009, Baker J.E. et al., 1997] или при активации mPTP-пор у адаптированных крыс [Zhu W.-Zh. 2006]. Подтверждением сказанному могут служить результаты нашего исследования, показывающие важную роль $K_{ATФ}$ -каналов и mPTP–пор в проявлении инфаркт–лимитирующего и кардиопротекторного эффектов ХННГ. Так, ингибирование митохондриальных $K_{ATФ}$ -каналов селективным блокатором в нашем исследовании приводило к полному устранению инфаркт-лимитирующего действия ХННГ (Табл. 28). В нашей работе была обнаружена повышенная устойчивость mPTP–пор к воздействию Ca^{2+} под влиянием ХННГ, но этот эффект не проявлялся при блокаде ОР. Данные факты свидетельствуют о том, что внутриклеточный регуляторный механизм защитного эффекта ХННГ, запущенный опиоидами, реализуется через $K_{ATФ}$ -каналы и mPTP–поры митохондрий.

Возвращаясь к обсуждению механизма действия ПКС, следует упомянуть литературные данные, которые свидетельствуют о том, что ПКС может транслоцироваться в саркоплазматический ретикулум и способствовать снижению содержания Ca^{2+} в СПР [Yamamura K. et al., 2005]. Авторы этой публикации предполагают, что данное действие активной протеинкиназы С может обуславливать цитопротекторный эффект, наблюдающийся при ее активации [Yamamura K. et al., 2005]. Возможно, оптимизация Ca^{2+} -метаболизма кардиомиоцита под действием ПКС приводит к улучшению постишемической инотропной функции, как это мы наблюдали у крыс после курса ХННГ (Рис. 6, Табл. 7-9).

Обсуждая механизмы вовлечения протеинкиназы С в механизмы кардиопротекции важно упомянуть данные, свидетельствующие о возможности активации этим ферментом фактора транскрипции HIF-1 [Yuan G., 2008]. Кроме того, что ПКС через mTOR активирует HIF-1 обнаружено, что ПКС может напрямую ингибировать фермент, разрушающий HIF-1 - пролил-4-гидроксилазу [Yuan G., 2005]. Транскрипционный фактор HIF-1 активируется при гипоксии клетки [Semenza G.L. 2009, 2013; Yuan G., 2004] и регулирует активность ряда генов, кодирующих такие белки как VEGF (vascular endothelial growth factor), гемоксигеназу-1, эритропоэтин и его рецептор; в левом желудочке: миозин (при этом усиливается транскрипция фетальной формы этого белка и супрессируется взрослая форма), кальмодулин и Са-кальмодулинкиназу; JNKs (c-Jun N-terminal kinase); Akt-киназу; фетальную форму транспортера монокарбоксилатов (MCT); лактатдегидрогеназу; фетальную форму транспортера глюкозы (GLUT1); натрийуретический фактор предсердий, гексокиназу II [Yang C. et al., 2014; Ong S.G. et al., 2015]. Как можно видеть среди этих белков присутствует ряд ферментов, участвующих в энергетическом метаболизме миокарда. Более того, чешские физиологи в 1999 г показали увеличение активности цитохром с оксидазы в миокарде крыс, адаптированных к гипоксии [Stieglerová A. et al., 1999]. Эта же группа исследователей обнаружила, что изменение транскрипционного профиля кардиомиоцитов у крыс, адаптированных к хронической нормобарической гипоксии, не обнаруживается у животных, дефицитных по гену Hif1a [Bohuslavova R. et al., 2010]. В недавних исследованиях было обнаружено увеличение экспрессии и трансляции креатинфосфокиназы и гексокиназы в миокарде крыс, тренированных как с помощью прерывистой, так и непрерывной хронической гипоксии [Waskova-

Arnostova P. et al., 2014]. Эти данные литературы согласуются с полученными нами результатами об улучшении энергетического метаболизма митохондрий, повышении их трансмембранного потенциала в миокарде крыс, адаптированных к ХННГ (Табл. 31,32, Рис. 13-15). Ранее повышение скорости дыхания митохондрий в условиях ишемии-реперфузии были выявлены на модели адаптации к хронической прерывистой гипоксии [Magalhaes J. et al., 2013].

Проведенное исследование позволило доказать важную роль NO-синтазы в реализации кардиопротективного действия хронической непрерывной нормобарической гипоксии. Об этом свидетельствуют как повышение уровня метаболитов оксида азота в ткани миокарда и крови крыс, прошедших курс ХННГ (Табл. 29), так и отсутствие проявлений инфаркт-лимитирующего эффекта этого вида адаптации при блокаде NO-синтазы (Рис. 12). Эти данные согласуются и с результатами исследований других авторов, показавших важную роль NO-синтаз в формировании повышенной толерантности сердца к действию ишемии-реперфузии после нескольких сеансов гипобарической гипоксии [Zaobornyj T. et al., 2009], ишемического прекондиционирования [Шляхто Е. В. и др., 2009; Yang C. et al., 2013], а так же с данными о повышении содержания оксида азота в выдыхаемом воздухе у людей, подвергнутых нормобарической гипоксии [MacInnis M.J. et al., 2015]. Было обнаружено, что инфаркт-лимитирующий эффект хронической непрерывной нормобарической гипоксии и донора оксида азота молсидомина (molsidomine) не суммируются [Alánová P. et al., 2015], что может указывать на реализацию эффекта ХННГ через усиление синтеза NO.

Известно, что NO-синтаза представлена в ткани сердца несколькими изоформами, участие каждой из которых в адаптационных процессах остается предметом дискуссий [Bencsik P. et al., 2010; Kolar F., Ostadal B., 2004]. Так, ранее было обнаружено, что экспрессия гена эндотелиальной формы NO-синтазы возрастает при ишемическом прекондиционировании сердца [Bencsik P. et al., 2010]. Другая группа исследователей сообщает об увеличении активности iNOS при воздействии хронической гипобарической гипоксии [Kolar F., Ostadal B. 2004; Rouet-Benzineb P. et al., 1999]. Также существуют данные о возрастании при подобном гипоксическом воздействии содержания iNOS и кодирующей её мРНК [Grilli A. et al., 2003; Jung F. et al., 2000]. Большой вклад в изучение роли NOS в адаптации к

гипоксии внёс коллектив учёных, возглавляемый проф. J.E. Baker [Baker J.E. et al., 1999; Fitzpatrick C. M. et al., 2005; Shi Y. et al., 2002]. При исследовании защитного эффекта хронической гипоксии у новорожденных кроликов они обнаружили, что 9-дневная нормобарическая прерывистая гипоксия вызывает более чем 3-кратное увеличение активности eNOS в миокарде и содержания мРНК, кодирующей eNOS. Повышение активности eNOS ведет к возрастанию уровня нитритов, нитратов и цГМФ в ткани сердца [Baker J.E. et al., 1999; Fitzpatrick C. M. et al., 2005; Shi Y. et al., 2002]. Авторы полагают, что именно эти изменения определяют увеличение устойчивости животных к гипоксии. Однако экспериментов, в которых инфаркт-лимитирующий эффект адаптации к ХННГ был бы исследован на фоне селективного ингибирования разных изоформ NOS, до настоящего времени не проводилось.

Наши исследования показали, что на фоне ингибирования iNOS инфаркт-лимитирующий эффект хронической нормобарической гипоксии не проявляется, а при блокаде нейрональной NO-синтазы защитный эффект ХННГ в отношении ишемического-реперфузионного повреждения миокарда сохранился (Рис. 12). Полученные результаты свидетельствуют о важной роли индуцибельного пула NO-синтазы в защитном эффекте адаптации к ХННГ, в то время как нейрональная NO-синтаза не участвует в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта ХННГ при коронароокклюзии и реперфузии. Эти данные согласуются с результатами группы проф. T. Zaobornyj [Gonzales G. F. et al., 2005], которые обнаружили в цитоплазме кардиомиоцитов крыс, подвергнутых хронической гипобарической гипоксии, значительное возрастание содержания iNOS по сравнению с неадаптированными животными.

В качестве механизма повышения содержания NO при хронической нормобарической гипоксии мы можем предположить снижение активности фермента диметиламиногидролазы. Этот фермент способствует образованию в организме димелиларгина, который ингибирует образование NO [Bueno M. et al., 2013]. Обнаружено, что в организме животных, проживающих в условиях высокогорья, активность диметиламиногидролазы снижена, а активность NOS и образование NO повышено [Mizuno S. et al., 2015].

Повышение толерантности сердца к действию ишемии-реперфузии под действием оксида азота является общеизвестным фактом [Maslov L.N. et al., 2009;

Miller M.W. et al., 2013]. По мнению M.V. Cohen и J.M. Downey [Cohen M.V., Downey J.M. 2011], активация NO-синтазы и выработка оксида азота приводит к активации гуанилатциклазы, образованию цГМФ и следом за этим повышение активности протеинкиназы G. Эта протеинкиназа может воздействовать на эффекторное звено протекции – митоK_{ATФ}-канал, который посредством повышения выработки активных форм кислорода приводит к активации протеинкиназы C [Cohen M.V., Downey J.M. 2011]. К сожалению, до настоящего времени этот сигнальный механизм кардиопротекции был доказан только в отношении ишемического прекондиционирования. Результаты наших исследований, выявившие роль активации митоK_{ATФ}-каналов в реализации инфаркт-лимитирующего действия ХННГ, показывают, что этот сигнальный механизм может быть реализован и при адаптации к непрерывной нормобарической гипоксии.

Ряд данных литературы свидетельствуют об открытии митоK_{ATФ}-каналов при ишемическом прекондиционировании в результате активации RISK-киназного сигнального механизма, который, как известно, включает PI3-киназу, PDK1,2 киназы, Akt-киназу, PKC [Hausenloy D.J., Yellon D.M. 2007]. Однако наши исследования показали, что инфаркт-лимитирующей и цитопротекторный эффекты хронической нормобарической гипоксии не зависят от активности PI3-киназы (Табл. 23, 24). Это противоречие можно разрешить следующими доводами. В 2010 г коллективом центра сердечно-сосудистых исследований г. Братислава, Словакия, обнаружено, что открыватель митоK_{ATФ}-каналов диазоксид оказал инфаркт-лимитирующий и антиаритмический эффекты при локальной ишемии-реперфузии изолированного сердца крысы [Matejíková J. et al., 2010]. При этом от активации PI3-киназы зависит только инфаркт-лимитирующий, но не антиаритмический эффект диазоксида. Эти данные свидетельствуют о том, что открытие митоK_{ATФ}-каналов может происходить по независимому от PI3/Akt-киназ пути. Эти данные согласуются с нашими данными о том, что в реализации кардиопротекторного эффекта хронической нормобарической гипоксии могут принимать участие митоK_{ATФ}-каналы, но не PI3-киназа.

В нашем исследовании мы обнаружили, что mPTR-поры крыс, адаптированных к ХННГ, оказываются более устойчивыми к открытию, чем у неадаптированных особей (Рис. 16). В присутствии антагониста опиоидных рецепторов налоксона этот эффект не обнаруживается (Рис. 19). Корреляционный анализ данных выявил

взаимосвязь повышения устойчивости mPTP–пор с инотропной состоятельностью миокарда, как в группе ХННГ, так и при блокаде опиоидных рецепторов (Табл. 33, 36). Следовательно, мы можем сделать вывод о том, что способность митохондрий сохранять закрытыми mPTP–поры играет важную роль в положительном инотропном действии ХННГ, и этот эффект зависит от опиоидных рецепторов. Поры, изменяющие проницаемость митохондрий (mPTP–поры) играют важную роль в запуске процесса апоптоза и клеточной гибели при ишемии-реперфузии [Halestrap A.P., et al., 2010; Borutaite V. et al., 2013]. Их открытие приводит к набуханию митохондрий и выходу в цитоплазму ряда проапоптотических факторов [Mace P.D., Riedl S.J. 2010; Borutaite V. et al., 2013]. В связи с этим в научной литературе сложилось устойчивое мнение о том, что сохранение этих клеточных структур в закрытом состоянии при реперфузии способствует сохранению жизнеспособности кардиомиоцитов [Mace P.D., Riedl S.J. 2010; Movassagh M., Foo R.S. 2008; Halestrap A.P., et al., 2010; Nazareth W. et al., 1991]. Ранее было обнаружено, что уменьшение ишемического-реперфузионного повреждения миокарда, в том числе сокращение размера некроза, наблюдаемое при таких воздействиях как ишемическое пре- и посткондиционирование [Cohen M.V., Downey J.M., 2011], фармакологическое preconditionирование [Rudyk O.V. et al., 2004], адаптация к прерывистой гипобарической гипоксии в значительной степени связано с замедлением открытия mPTP [Zhu W.-Zh. et al, 2006]. В настоящем исследовании мы подтвердили участие mPTP–пор в формировании кардиопротекции при ХННГ.

На основании полученных данных мы можем предположить несколько механизмов, приводящих к повышению устойчивости mPTP к открытию при ишемии-реперфузии у крыс, адаптированных к ХННГ. В первую очередь это активация K_{ATP} -каналов, взаимосвязь которых с mPTP показана в ряде работ [Pain T. et al., 2000]. Следует отметить, что активации K_{ATP} -каналов может способствовать как протеинкиназа С [Fryer R.M. et al., 2001], так и NO-синтаза [Cohen M.V., Downey J.M. 2011]. Кроме того, активация RISK-киназного каскада приводит к активации киназы гликогенсинтазы-3 β (GSK-3 β), которая ингибирует открытие mPTP [Juhaszova M. et al., 2004, Gross E.R. et al., 2007a]. Повышению устойчивости mPTP к открытию может происходить через оптимизацию Ca^{2+} и энергетического метаболизма митохондрий, поскольку эти клеточные структуры чувствительны к изменению клеточного

содержания Ca^{2+} и АТФ. Недавние исследования показали, что фактор транскрипции HIF1 α усиливает экспрессию гена гексокиназы II, которая является структурной единицей mPTP, что приводит к повышению устойчивости этой поры к открытию [Ong S.G. et al., 2014].

В настоящий момент многочисленные литературные данные свидетельствуют о важной роли митохондрий в формировании и предупреждении ишемического-реперфузионного повреждения миокарда [Masuzawa A., et al., 2013; Solhjoo S, O'Rourke B. 2015; Ong S.B. et al., 2015b; Bliksoen M. et al., 2015; Borutaite V. et al., 2013; Wang Z.H. et al., 2012]. Мы предположили, что одним из механизмов реализации кардиопротекторного и инотропных эффектов, наблюдаемых при ХННГ, может выступать улучшение энергетического метаболизма кардиомиоцитов. В пользу этой гипотезы свидетельствует повышение эффективности митохондриального дыхания и трансмембранного потенциала в условиях ишемии–реперфузии у крыс после курса ХННГ (Табл. 31, Рис. 14), которое сопровождается увеличением количества АТФ в ткани миокарда (Рис. 15). Корреляционный анализ данных показал наличие взаимосвязи между скоростью АДФ-индуцированного дыхания митохондрий в присутствии НАД⁺-зависимых субстратов (состояние 3) и силой сокращения изолированного сердца крыс, подвергнутых ХННГ, в период реперфузии. Важно отметить, что эта закономерность сохранялась и в случае применения антагонистов опиоидных рецепторов, изменение сократительной активности миокарда происходило параллельно параметрам митохондриального дыхания (Рис. 20). Исследования показали, что влияние ХННГ на энергетический метаболизм миокарда, показателем которого является высокий уровень АТФ в ткани миокарда и трансмембранный потенциал митохондрий, не проявляется в условиях блокады опиоидных рецепторов (Рис. 17, 18). Этот факт позволяет нам предполагать, что опиоидные рецепторы при ХННГ регулируют состояние сократительной функции миокарда в условиях ишемии и реперфузии через оптимизацию энергетического метаболизма клетки. Можно предполагать, что улучшение митохондриального дыхания приводит к повышению устойчивости mPTP к открытию, поскольку эти митохондриальные структуры чувствительны к понижению АТФ [Halestrap AP et al., 2010].

Наши исследования показали снижение интенсивности окислительного стресса, индуцируемого аноксией-реоксигенацией, у крыс после курса ХННГ (Табл. 12). Эти данные согласуются с опубликованными ранее данными об увеличении активности супероксиддисмутазы ($Mn^{2+}SOD$) в митохондриях левого желудочка крыс, подвергнутых хронической прерывистой гипобарической гипоксии [Balkova P. et al., 2011] и увеличение транскрипции ферментов антиоксидантной защиты кардиомиоцитов при хронической нормобарической гипоксии [Kasparova D. et al., 2015]. О значении этих изменений красноречиво свидетельствует отсутствие защитного эффекта хронической нормобарической гипоксии на фоне курсового введения антиоксиданта N-ацетилцистеина [Balková P. et al., 2011]. Другие исследователи обнаружили снижение уровня окислительного стресса и образования конечных продуктов перекисного окисления липидов при ишемии в миокарде морских свинок, подвергнутых курсу прерывистой гипобарической гипоксии [Guo H.C. et al., 2009]. У спортсменов, подвергнутых нормобарической гипоксии, обнаружено повышение содержания супероксиддисмутазы, каталазы и антиокислительного потенциала сыворотки крови, при этом продукт ПОЛ нитротирозин снижен [Debevec T. et al., 2015]. По-видимому «антиоксидантный» эффект хронической гипоксии является универсальной адаптивной реакцией, поскольку проявляется как у млекопитающих [Balková P. et al., 2011; Debevec T. et al., 2015], так и у рептилий [Zhang Y. et al., 2015]. Следовательно, мы можем говорить об «антиоксидантном» эффекте хронической гипоксии.

Как обнаружено ранее, окислительный стресс может быть причиной нарушения сократительной функции миокарда при ишемии-реперфузии [Myers M.L. et al., 1985]. В связи с этим можно предположить, что улучшение сократимости миокарда у крыс, адаптированных к ХННГ (Рис. 8), является следствием снижения выработки АФК.

Следует отметить, что блокада ОР не предупреждала антиоксидантный эффект ХННГ (Табл. 20). Эти результаты не позволяют нам говорить о реализации «антиоксидантного» действия ХННГ через ОР. По мнению проф. G. Semenza, при непрерывной гипоксии основным механизмом запуска протективных процессов является ингибирование пролил-4-гидроксилазы, что может привести непосредственно к активации фактора транскрипции HIF-1 [Semenza G., 2013]. В

другом исследовании отмечена корреляционная зависимость между увеличением содержания HIF-1 и активностью СОД в ткани миокарда, при отрицательной взаимосвязи HIF-1 и образования продукта ПОЛ МДА [Wang Z., Si L.Y. 2013]. Следовательно, мы можем предполагать, что антиоксидантный эффект хронической гипоксии реализуется через ингибирование пролил-4-гидроксилазы, активацию фактора транскрипции HIF-1 и стимулирование им транскрипции ферментов антиоксидантной защиты клетки.

Резюмируя сказанное, мы можем предположить, что сигнальный механизм реализации кардиопротекторного действия ХННГ последовательно включает δ_2 -ОР и μ -ОР \rightarrow GPCR \rightarrow тирозинкиназы \rightarrow ПКС δ \rightarrow NOS \rightarrow K_{ATP} -каналы \rightarrow mPTP-поры \rightarrow повышение толерантности миокарда к повреждающему действию ишемии-реперфузии (Рис. 21).

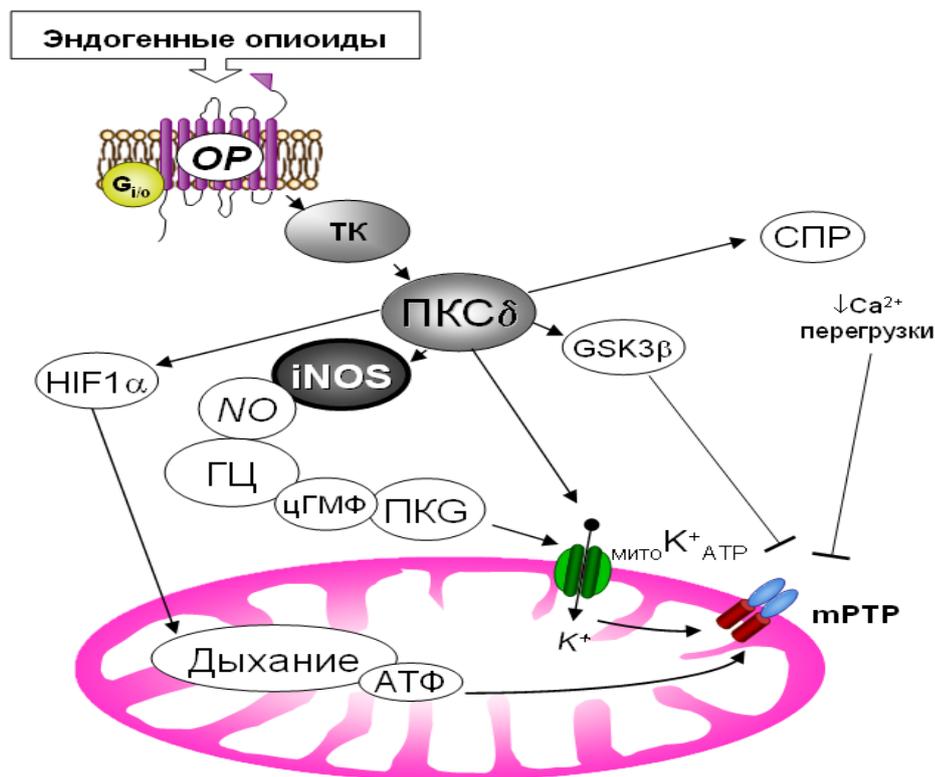


Рисунок 21 – Механизм кардиопротекторного действия хронической непрерывной нормобарической гипоксии

Примечания: ОР – опиоидные рецепторы, ТК – тирозинкиназы, ПКС – протеинкиназа С, NOS – синтаза оксида азота, ГЦ – гуанилатциклаза, ПКГ – протеинкиназа G, mitoK_{ATP} – митохондриальный АТФ-зависимый K⁺ канал, mPTP – поры, изменяющие проницаемость митохондрий, HIF1 α - гипоксия-индуцируемый фактор транскрипции 1 α , GSK3 β - киназа гликогенсинтазы 3 β .

3.2 Антиаритмический эффект хронической прерывистой гипобарической гипоксии и его механизмы

Способность живых организмов приспосабливаться к недостатку кислорода является одной из самых распространенных и древних видов адаптации, при которой наряду с увеличением потенциальных возможностей систем кислородного обеспечения организма формируется повышенная устойчивость миокарда к повреждающему действию разнообразных экстремальных факторов [Лишманов Ю.Б. et al., 1998a; Меерсон Ф.З., Пшенникова М.Г., 1989; Meerson F.Z. et al., 1987]. Так, ранее было показано, что в процессе адаптации к гипобарической гипоксии происходит усиление резистентности сердца к аритмогенному действию ишемии [Меерсон Ф.З. et al., 1987; Asemu G. et al., 1999; Kolar F. 1996; Meerson F.Z., et al., 1987], повреждающему и аритмогенному действию больших доз катехоламинов [Лишманов Ю.Б. et al., 1998a]. Однако механизмы формирования данного эффекта до сих пор остаются недостаточно изученными. Ранее было установлено, что введение животным агонистов опиоидных рецепторов повышает устойчивость миокарда к аритмогенным воздействиям (ишемия, высокие дозы адреналина, аконитина и CaCl_2) [Lishmanov Yu.B. et al., 1999; Маслов Л.Н. et al., 1998a; Лишманов Ю.Б. et al., 1995; Лишманов Ю.Б. et al., 1998a,б]. На основании этого мы предположили, что опиоидная система может играть важную роль в формировании повышенной адаптационной устойчивости миокарда к аритмогенному действию ишемии и реперфузии. Однако эта гипотеза оставалась недоказанной, так же как неясными были рецепторная специфичность и локализация опиоидных рецепторов (ОР), отвечающих за сохранение высокой электрической стабильности миокарда у адаптированных крыс, не исследованы внутриклеточные механизмы участия ОР в сохранении электрической стабильности миокарда при адаптации к гипоксии. Исходя из этого, первой задачей настоящего исследования было изучение рецепторной специфичности участия опиоидной системы в повышении устойчивости миокарда к аритмогенному действию ишемии и реперфузии у крыс, адаптированных к хронической прерывистой гипобарической гипоксии.

Хроническая прерывистая гипобарическая гипоксия приводила к достоверному увеличению длительности жизни экспериментальных животных в условиях острой

летальной гипобарической гипоксии (11000 м над уровнем моря) в 3,5 раза (с 86 ± 5 до 300 ± 42 сек., $p < 0,01$, данные не представлены в таблице). Эти данные позволяют нам говорить о том, что хроническая прерывистая гипобарическая гипоксия является адаптацией к гипоксии. Наши исследования показали, что курс адаптации к хронической гипобарической гипоксии способствовал увеличению содержания гемоглобина и эритроцитов в крови крыс, при этом показатель гематокрита возрастал в 1,5 раза (Табл. 37). Эти данные соответствуют адаптивным изменениям системы крови в условиях гипоксии [Yelmen N., et al., 2012].

Таблица 37 – Показатели периферической крови у крыс подвергнутых ХПГГ (М ± SEM)

	Гемоглобин, г/л	Эритроциты (млн/мл)	Гематокрит
Контроль, n=15	$150,22 \pm 12,86$	$6,87 \pm 0,61$	$0,4 \pm 0,03$
ХННГ, n=14	$171,29 \pm 21,23$ $p=0,05$	$8,29 \pm 0,88$ $p=0,05$	$0,59 \pm 0,02$ $p=0,0005$

Примечания: ХПГГ – хроническая прерывистая гипобарическая гипоксия, n – количество животных в группе, p – уровень достоверности относительно группы контроля; U-критерий Манна-Уитни.

В таблице 38 показаны параметры стресс-реакции у крыс после курса ХПГГ. Можно видеть, что хроническая гипобарическая гипоксия вызывала увеличение массы надпочечников на 20% по отношению в этому показателю в контрольной группе (Табл. 38). Остальные параметры стресс-реакции, такие как содержание кортикостерона, масса тимуса и селезенки под влиянием ХПГГ не изменялись, язв желудка в этой экспериментальной группе не наблюдали. В результате балл стресс-реакции оказался равным 4,18, что соответствует слабому стрессу [Добряков В.И., 1978].

Таблица 38 – Параметры стресс-реакции у крыс, подвергнутых ХПГГ ($M \pm SEM$)

Группа животных	Контроль, n=17	ХПГГ, n=14
Кортикостерон, нмоль/л	732,5 ± 46,76	816,25 ± 77,89 p=0,339107
Масса тимуса, мг	224,92 ± 13,96	195,23 ± 7,94 p=0,07
Масса надпочечников, мг	24,67 ± 0,87	29,0 ± 1,36 p=0,012
Масса селезенки, мг	1481,67 ± 69,23	1434,62 ± 74,98 p=0,64
Количество язв желудка, n	0	0
Балл стресса	0	4,18 ± 0,46 p<0,00001

Примечания: ХПГГ – хроническая прерывистая гипобарическая гипоксия, n – количество животных в группе, p – уровень достоверности относительно группы контроля, U-критерий Манна-Уитни.

Приведенные данные показывают, что курс прерывистой гипобарической гипоксии приводит к соответствующим изменениям системы крови, с развитием устойчивости крыс к острой гипоксии и сопровождается слабой стресс-реакцией.

3.2.1 Влияние хронической прерывистой гипобарической гипоксии на частоту возникновения нарушений ритма сердца и повреждение миокарда у крыс при ишемии и реперфузии

Антиаритмический эффект хронической прерывистой гипобарической гипоксии оценивали по частоте возникновения нарушений ритма сердца - множественных желудочковых аритмий, желудочковой тахикардии и фибрилляции желудочков - на двух моделях ишемии: при 10-минутной коронароокклюзии и следующей за ней 10-минутной реперфузии *in vivo* и на модели тотальной ишемии-реперфузии изолированного сердца крысы. В дополнение к указанным показателям первом случае регистрировали суммарную продолжительность эпизодов желудочковой тахикардии при ишемии и реперфузии. О степени повреждения

миокарда при ишемии-реперфузии судили по размеру формирующегося инфаркта при 20-минутной ишемии – 3 ч реперфузии в опытах *in vivo* и по активности креатинфосфокиназы в оттекающем от изолированного сердца перфузионном растворе при тотальной ишемии-реперфузии *in vitro*.

При моделировании 10-минутной коронароокклюзии *in vivo* у крыс контрольной группы в 81% наблюдений возникали нарушения сердечного ритма. При этом у 17 из 21 крысы (81%) отмечали множественные желудочковые аритмии, у 16 животных (76%) наблюдали желудочковую тахикардию и у 38% - фибрилляцию желудочков (Табл. 39). Восстановление коронарного кровообращения у контрольных крыс сопровождалось нарушениями ритма сердца, в 74% представленными множественными желудочковыми аритмиями и желудочковой тахикардией, у 26% крыс этой группы реперфузия провоцировала фибрилляцию желудочков (Табл. 39).

Адаптация животных к прерывистой гипобарической гипоксии способствовала снижению частоты возникновения нарушений ритма сердца при последующей коронароокклюзии. Так, у 80% крыс этой группы не возникало нарушений ритма во время 10-минутной ишемии и более чем у 70% - во время реперфузии (Табл. 39), в 10 раз сократилась частота появления ишемических тахикардий (Табл. 39). Во время реперфузии частота встречаемости желудочковых тахикардий у адаптированных крыс была на 54% ниже по сравнению с контролем (Табл. 39). Следует отметить, что предварительная адаптация крыс к гипобарической гипоксии полностью предотвращала появление фибрилляции желудочков при ишемии и реперфузии.

Таблица 39 – Влияние хронической прерывистой гипобарической гипоксии на частоту возникновения ишемических и реперфузионных аритмий при 10-минутной коронароокклюзии и реперфузии

Группа	Контроль, N=21	ХПГГ, N=15
ИШЕМИЯ		
Без нарушений ритма, n (%)	4 (19%)	12** (80%)
Множественные желудочковые экстрасистолы, n (%)	17 (81%)	3** (20%)
Желудочковая тахикардия, n (%)	16 (76%)	1 ** (7%)
Желудочковая фибрилляция, n (%)	8 (38%)	0 **
РЕПЕРФУЗИЯ		
Без нарушений ритма, n (%)	5 (26%)	11 ** (73%)
Множественные желудочковые экстрасистолы, n (%)	14 (74%)	4 ** (27%)
Желудочковая тахикардия, n (%)	14 (74%)	3** (20%)
Желудочковая фибрилляция, n (%)	5 (26%)	0*

Примечания: ХПГГ - хроническая прерывистая гипобарическая гипоксия N – количество животных в группе, n – количество животных с нарушениями ритма. *- $p < 0,05$; **- $p < 0,01$ – уровень достоверности по отношению к контролю, критерий Пирсона χ^2 .

Для выявления инфаркт-лимитирующего действия ХПГГ моделировали 20-минутную коронароокклюзию и 3 ч реперфузию. Наши исследования показали, что у крыс, адаптированных к ХПГГ, размер инфаркта при ишемии-реперфузии *in vivo* не отличается от группы контроля (Табл. 40). Эти данные свидетельствуют об отсутствии кардиопротекторного эффекта ХПГГ.

Таблица 40 – Размер инфаркта при 20 минутной коронароокклюзии – 3 ч реперфузии *in vivo* (ЗН/ЗР, М±SEM)

Группа	Размер инфаркта (ЗН/ЗР), %
Контроль, n=14	59,0 ± 2,2
ХПГГ, n=14	53,9 ± 2,9

Примечания: ХПГГ - хроническая прерывистая гипобарическая гипоксия, n – количество животных в группе.

В следующей серии опытов были проведены исследования на изолированных перфузируемых сердцах крыс, адаптированных к ХПГГ. После 45-минутной тотальной ишемии сердец интактных животных мы наблюдали реперфузионные нарушения ритма у 6 (57%) из 14 крыс (Табл. 41). Желудочковая тахикардия возникала в 7 (50%), а фибрилляция – в 2 (14%) из 14 случаев. Среднегрупповой показатель тяжести нарушений ритма составил $1,79 \pm 0,45$ балла (Табл. 41). Кроме того, после возобновления коронарной перфузии мы наблюдали частичное восстановление сократимости левого желудочка (до 80% от исходного значения, данные не представлены в таблице) и подъем активности креатинфосфокиназы в оттекающем от изолированного миокарда перфузате (Табл. 41). Активность креатинфосфокиназы определяли в перфузате, собранном за 30 мин реперфузии после 30-минутной тотальной ишемии.

Нам не удалось выявить статистически значимых различий между группой контроля и адаптированными на «высоте» 5000 м крысами как по частоте встречаемости и тяжести реперфузионных аритмий, так и по выбросу КФК в перфузат изолированного сердца во время реоксигенации (Табл. 41). Кроме того, статистически значимых различий между контролем и опытом по параметрам реперфузионной сократимости изолированного сердца нам также обнаружить не удалось (данные не представлены в таблице).

Таблица 41 - Влияние хронической прерывистой гипобарической гипоксии на частоту возникновения аритмий, тяжесть нарушений ритма и активность креатинфосфокиназы в перфузате изолированного сердца крысы при его тотальной ишемии-реперфузии (M±SEM)

Группа	БНР n (%)	МЖЭ n (%)	ЖТ n (%)	ЖФ n (%)	Тяжесть аритмий, баллы	КФК, ед/г
Контроль, N=14	6 (43)	8 (57%)	7 (50%)	2 (14%)	1,79 ± 0,45	38,3 ± 3,11
ХПГГ, N=14	7 (50%)	7 (50%)	4 (28%)	3 (21%)	1,5 ± 0,45	41,5 ± 5,96

Примечания: ХПГГ - хроническая прерывистая гипобарическая гипоксия, ЖТ – желудочковая тахикардия, ЖФ – желудочковая фибрилляция, МЖЭ – множественные желудочковые экстрасистолы, БНР – без нарушений ритма, КФК – креатинфосфокиназа. N – количество животных в группе, n – количество животных с нарушениями ритма.

Исследование сократительной активности изолированного сердца показало, что тотальная ишемия приводит к остановке сердцебиений, восстановление которых происходит в период реперфузии (Рис. 22). При этом сила сокращений миокарда восстанавливается на 74-88% от исходных значений за 30 минут реперфузии, частота сердечных сокращений – на 65-75% (Рис. 22), в то время как конечное диастолическое давление остается повышенным в 1,8-2 раза на протяжении 30 минут реперфузии (Рис. 22). Как можно видеть на рис. 22, хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия не повлияла на параметры сократительной активности миокарда, как в исходном состоянии, так и при реперфузии.

Таким образом, проведенные нами исследования показали, что адаптация крыс к гипобарической гипоксии защищает миокард от возникновения нарушений ритма при экспериментальной ишемии и реперфузии, но этот эффект проявляется только в условиях моделирования ишемии-реперфузии *in vivo*.

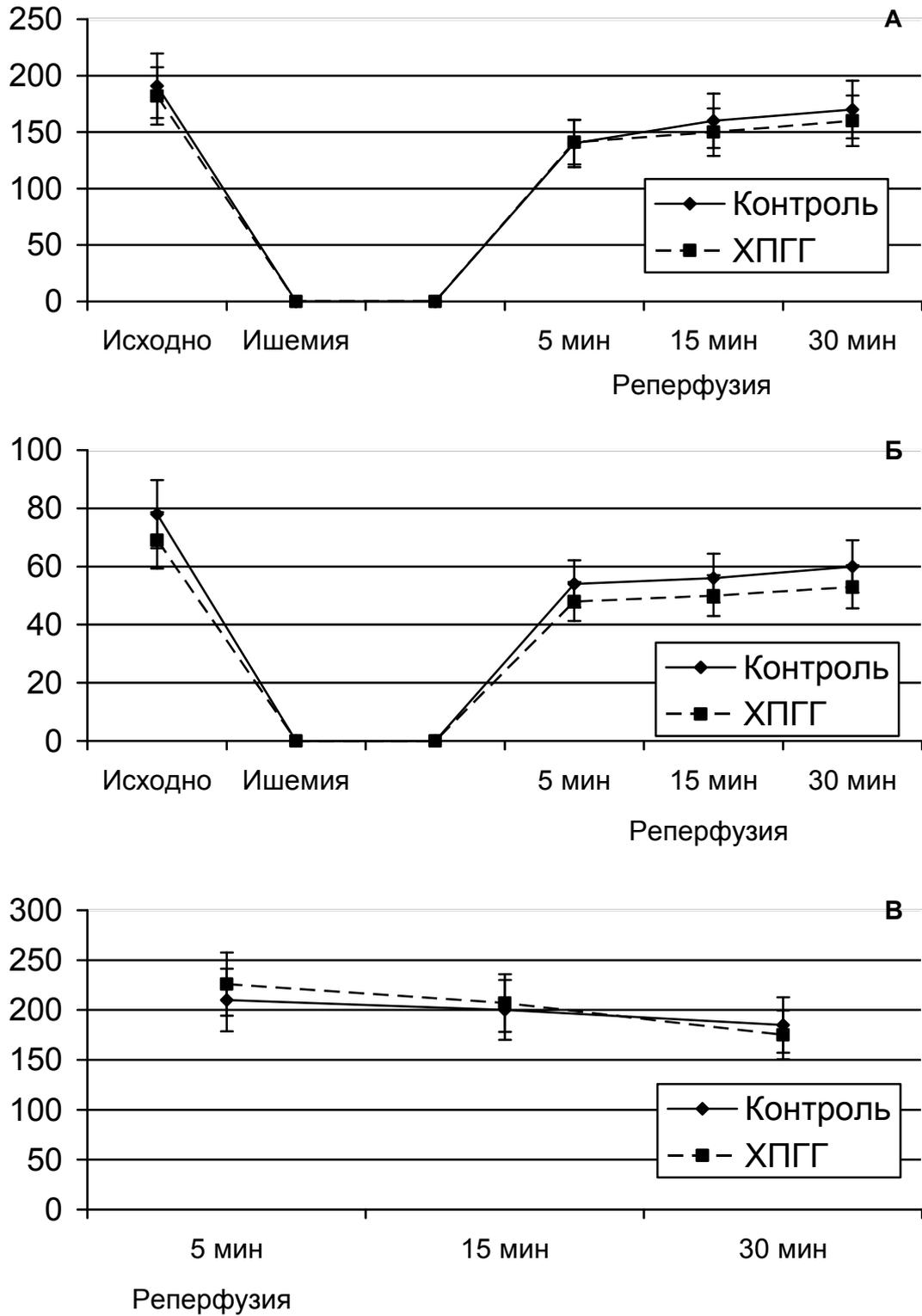


Рисунок 22 – Параметры сократимости миокарда крыс, подвергнутых ХПГГ, при тотальной ишемии-реперфузии ($M \pm SEM$)

А – частота сердечных сокращений, уд/мин.;

Б – давление, развиваемое левым желудочком, мм рт. ст.;

В – конечное диастолическое давление, % от исходного значения.

3.2.2 Участие опиоидных рецепторов в реализации антиаритмического эффекта хронической прерывистой гипобарической гипоксии

3.2.2.1 Изменение содержания предшественника мет-энкефалина и динарфина В в ткани мозга крыс при воздействии хронической прерывистой гипобарической гипоксии

Определяли содержание предшественника мет-энкефалина мет-энкефалин-Arg₆-Phe₇ [Benuck M. et al., 1981] и эндогенного агониста κ-ОР динарфина В [Merg F. et al., 2006] гистохимическим методом в структурах мозга крыс, подвергнутых ХПГГ. Было обнаружено, что адаптация к хронической гипобарической гипоксии сопровождается усилением флюоресценции материала, содержащего мет-энкефалин-Arg₆-Phe₇ в переднем и заднем гипоталамусе, по сравнению с интактными крысами (Рис. 23). Изменение содержания динарфина В в структурах головного мозга у крыс, адаптированных к гипобарической гипоксии, не было достоверным (Рис. 24).

Поскольку мет-энкефалин является эндогенным лигандом μ- и δ-опиоидных рецепторов [Gross G.J. 2003], а его предшественник мет-энкефалин-Arg₆-Phe₇ способен взаимодействовать с μ-ОР и, с низкой аффинностью, с κ-ОР [Kim K.W. et al., 2000], мы предположили участие данных типов опиоидных рецепторов в реализации антиаритмического эффекта ХПГГ.

При этом отсутствие изменений в содержании эндогенного агониста κ-ОР динарфина В свидетельствует о том, что этот субтип ОР может не участвовать в антиаритмическом действии ХПГГ.

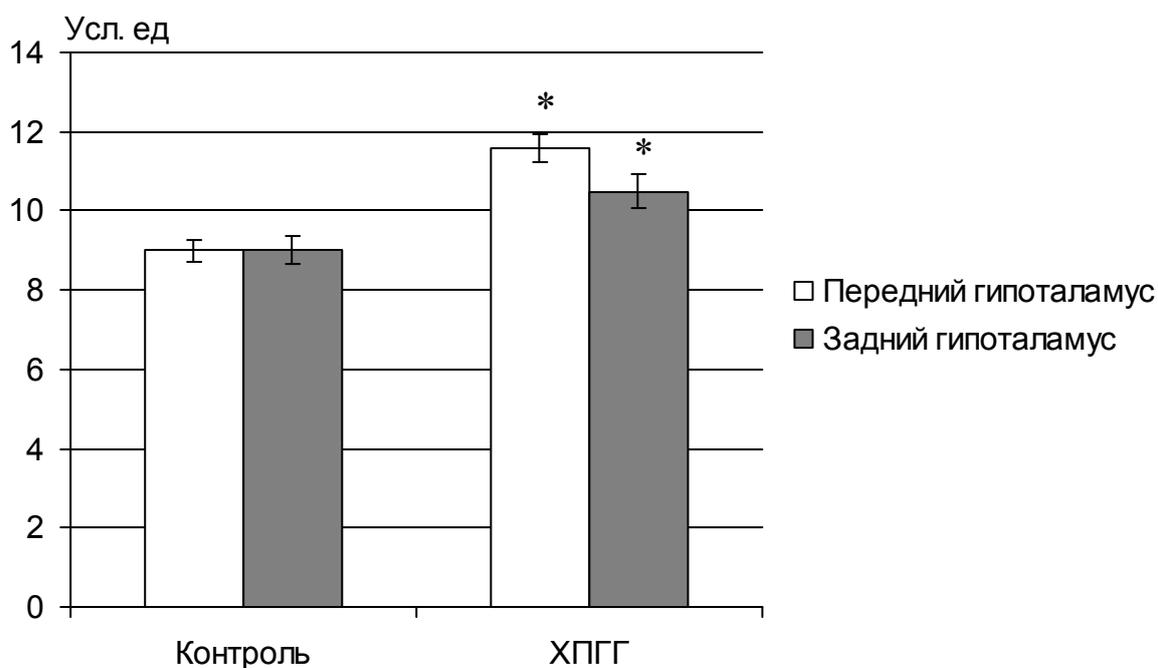


Рисунок 23 – Содержание мет-энкефалина-Arg⁶-Phe⁷ в структурах головного мозга у крыс, адаптированных к гипобарической гипоксии (M±SEM).

*p<0,05 - достоверность по отношению к контролю.

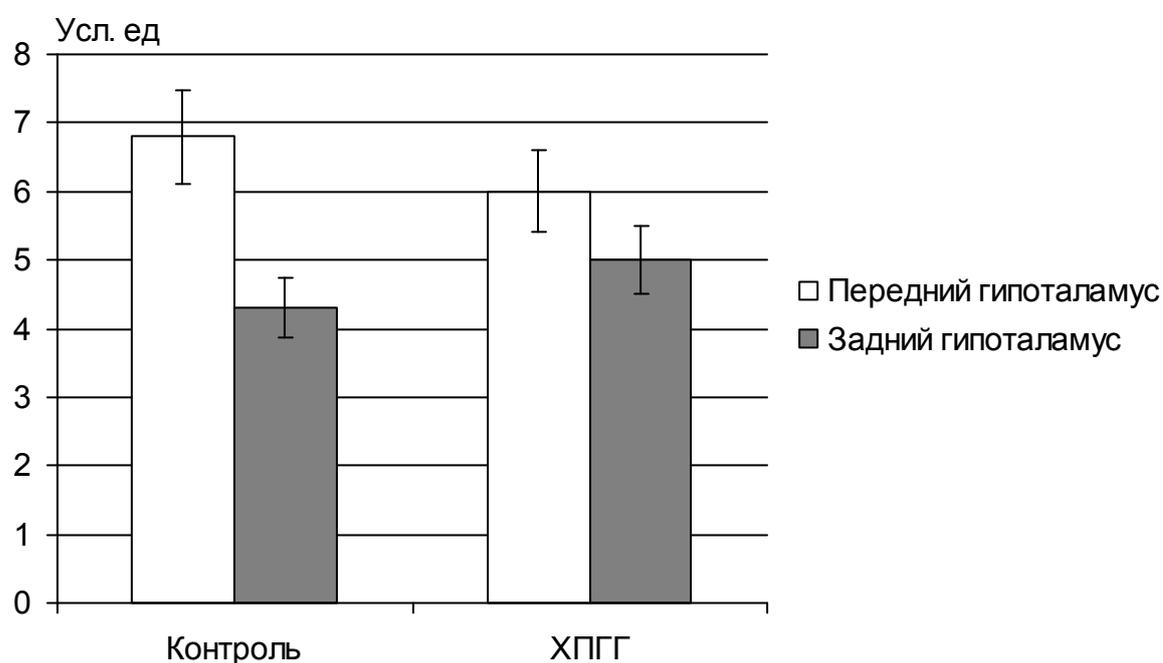


Рисунок 24 – Содержание динорфина В в структурах головного мозга у крыс, адаптированных к гипобарической гипоксии (M±SEM).

*p<0,05 - достоверность по отношению к контролю ; U-критерий Манна-Уитни.

3.2.2.2 Зависимость частоты возникновения ишемических и реперфузионных нарушений ритма у крыс, подвергнутых хронической прерывистой гипобарической гипоксии, от активации опиоидных рецепторов

Как было сказано ранее, адаптация животных к прерывистой гипобарической гипоксии способствовала снижению частоты нарушений ритма сердца при последующей коронароокклюзии (Табл. 42). Так, у 80% крыс этой группы не возникало нарушений ритма во время 10-минутной ишемии и более чем у 70% - во время реперфузии (Табл. 42). При этом в 10 раз сократилась вероятность возникновения ишемических тахикардий (Табл. 42). Во время реперфузии частота встречаемости желудочковых тахикардий у адаптированных крыс была на 54% ниже по сравнению с контролем (Табл. 42). Следует отметить, что предварительная адаптация крыс к гипоксии полностью предотвращала появление фибрилляции желудочков при ишемии и реперфузии.

Дальнейшие опыты показали, что предварительная блокада μ -ОР при помощи внутривенной инъекции их селективного антагониста СТАР у крыс, адаптированных к гипоксии, не оказывала влияния на частоту возникновения окклюзионных желудочковых аритмий (Табл. 42).

Блокада δ -опиоидных рецепторов с помощью инъекции TIPP(ψ) крысам, адаптированных к гипоксии, способствовала достоверному увеличению частоты возникновения желудочковых экстрасистол во время ишемии в 3,6 раза, желудочковых тахикардий в 7,5 раз по сравнению с адаптационным контролем (Табл. 42). Животные без нарушений ритма сердца в этой группе встречались в 3 раза реже, чем в группе адаптированных крыс с незаблокированными опиоидными рецепторами (Табл. 42). В условиях ингибирования δ -рецепторов у адаптированных особей мы наблюдали также возрастание частоты реперфузионных нарушений ритма (ЖЭ в 2,5 раза, ЖТ в 2,6 раза по отношению к группе “адаптация к гипоксии”, встречаемость ФЖ достоверно не отличалась от таковой у неадаптированных крыс) (Табл. 42). Эти данные свидетельствуют об устранении антиаритмического эффекта адаптации к гипоксии при блокаде δ -опиоидных рецепторов.

После ингибирования κ -рецепторов норбиналторфимином процент животных с окклюзионными и реперфузионными нарушениями ритма достоверно не изменился в группе адаптированных к гипоксии крыс (Табл. 42).

Следует отметить, что введение неадаптированным особям антагонистов μ -, δ -, и κ -ОР не влияло на частоту появления окклюзионных и реперфузионных аритмий (Табл. 42).

Таким образом, мы можем заключить, что адаптация к прерывистой гипобарической гипоксии повышает устойчивость миокарда к аритмиям при 10-минутной ишемии и последующей реперфузии. Эксперименты с антагонистами ОР показали, что δ -ОР вовлечены в формирование антиаритмического эффекта адаптации к прерывистой гипобарической гипоксии, μ -ОР и κ -ОР не участвуют в регуляции ритма сердца у крыс при ХПГГ. Вместе с тем остаются неясными механизмы, через которые ОР вовлечены в регуляцию устойчивости миокарда к аритмиям. Учитывая данные о тесном взаимодействии опиоидной и симпатoadреналовой систем [Нарыжная Н.В. и др. 1998], а так же важное значение медиаторов симпатической нервной системы в возникновении нарушений ритма сердца при ишемии-реперфузии [Martins J.V. 1983], мы предположили, что антиаритмическое действие опиоидов при ХПГГ может быть обусловлено их влиянием на депонирование и выброс адреналина из надпочечников и нервных терминалей в миокарде или их прямое антиадренергическое действие. В связи с этим следующей целью нашей работы явилось выявление роли антиадренергического эффекта опиоидов в реализации антиаритмического эффекта ХПГГ.

Таблица 42 - Влияние блокады опиоидных рецепторов на частоту возникновения ишемических и реперфузионных аритмий у крыс, адаптированных к хронической прерывистой гипобарической гипоксии

Группа	Ишемия									Реперфузия								
	N	БНР		МЖЭ		ЖТ		ЖФ		N	БНР		МЖЭ		ЖТ		ЖФ	
		п	%	п	%	п	%	п	%		п	%	п	%	п	%	п	%
Контроль	21	4	19%	17	81%	16	76%	8	38%	19	5	26%	14	74%	14	74%	5	26%
ХПГГ	15	12 **	80%	3 **	20%	1 **	7%	0 **	0	15	11 **	73%	4 **	27%	3 **	20%	0 *	0
СТАР, 0,5 мг/кг	14	2	14%	11	79%	8	57%	3	21%	14	2	14%	12	86%	10	71%	1	7%
ХПГГ + СТАР, 0,5 мг/кг	18	12 **	80%	3 **	20%	1 **	7%	0 **	0	18	8 **	44%	5 **	28%	5 **	28%	2	11%
ТИРР(ψ), 0,5 мг/кг	14	3	21%	10	71%	8	57%	0	0	14	2	14%	12	86%	10	71%	1	7%
ХПГГ + ТИРР(ψ), 0,5 мг/кг	15	4 ##	27%	11 ##	73%	8 ##	53%	0 **	0	15	5 #	33%	10 #	67%	8	53%	1	7%
Норбинал- торфимин, 9 мг/кг	15	2	13%	13	87%	12	80%	3	20%	15	2	13%	13	87%	11	73%	3	20%
ХПГГ + норбинал- торфимин, 9 мг/кг	15	12 **	80%	3 **	20%	2 **	13%	0 **	0	15	10	67%	4	27%	5	33%	2	13%

Примечание: продолжительность коронароокклюзии и реперфузии – по 10-минут; N – количество животных в группе, n – количество животных с нарушениями ритма. *-p<0,05; **-p<0,01 – уровень достоверности по отношению к контролю, #, ## - то же по отношению к группе адаптированных крыс, критерий Пирсона χ^2 . БНР – без нарушений ритма, МЖЭ – множественные желудочковые экстрасистолы, ЖТ – желудочковая тахикардия, ЖФ - желудочковая фибрилляция; ХПГГ – хроническая прерывистая гипобарическая гипоксия.

3.2.3 Участие опиоидных рецепторов в реализации антиадренергического действия хронической прерывистой гипобарической гипоксии при формировании антиаритмического эффекта

3.2.3.1 Изменение содержания депонированных в миокарде и надпочечниках катехоламинов под влиянием хронической прерывистой гипобарической гипоксии. Значение опиоидных рецепторов

Об изменении в симпатoadреналовой системе у крыс, прошедших курс ХПГГ, судили по содержанию депонированных надпочечниками и миокардом катехоламинов. Морфологическими методами было установлено (Рис. 25А), что показатель плотности адренергических волокон, который отражает количество депонированных катехоламинов, в миокарде адаптированных крыс оказались достоверно более высокими, чем у контрольных животных (на 27%).

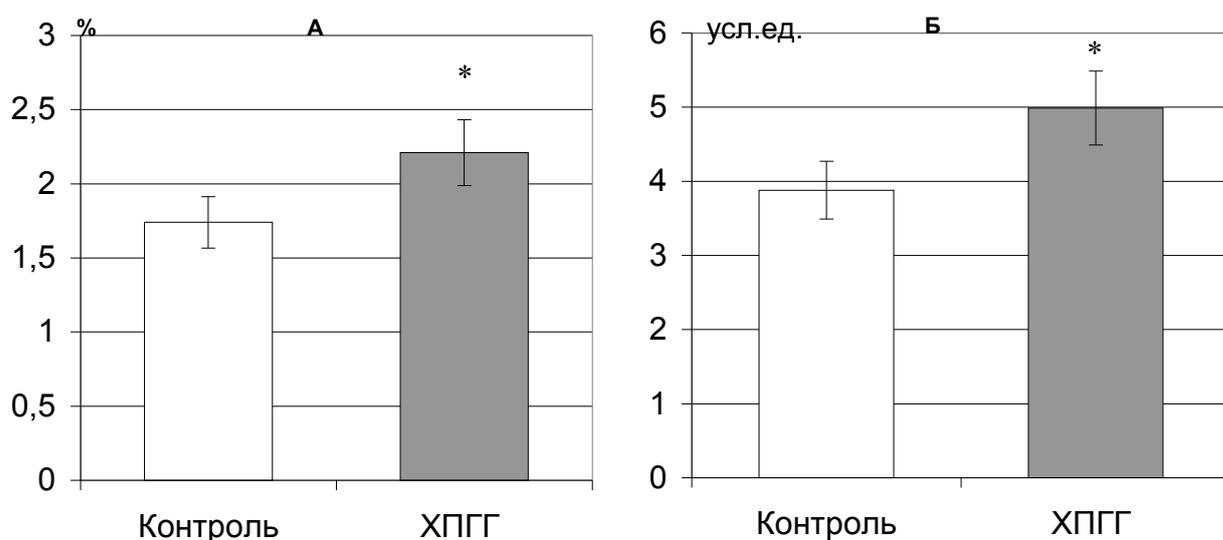


Рисунок 25 – Гистохимические показатели содержания катехоламинов в надпочечниках и сердце крыс после ХПГГ ($M \pm SEM$).

А - флуоресценция адренергических волокон в миокарде (объемные проценты);

Б - содержание депонированных в надпочечниках катехоламинов (усл. ед);

Примечания: *- $p < 0,05$ достоверность различий по отношению к группе контроля;

U-критерий Манна-Уитни; ХПГГ - хроническая прерывистая гипобарическая гипоксия.

В надпочечниках крыс, подвергнутых адаптации к хронической гипобарической гипоксии, было отмечено достоверно большее, по сравнению с контролем, содержание депонированных катехоламинов, что можно расценивать как показатель увеличения резервных возможностей симпатoadреналовой системы (Рис. 25 Б). О значении повышенного содержания катехоламинов в надпочечниках и миокарде крыс, подвергнутых ХПГГ, мы можем судить по результатам экспериментов с введением агониста β -АР изадрина. Обнаружено, что подкожное введение этого вещества в дозе 40 мг/кг за 24 часа до эвтаназии вызывает снижение содержания катехоламинов в хромаффинных клетках мозгового вещества надпочечников на 25%, а плотность адренергических волокон в миокарде оказывается снижена под действием изадрина на 40% (Табл. 43). У животных, подвергнутых ХПГГ, снижения содержания КА в миокарде и надпочечниках мы не наблюдали (Табл. 43). Следовательно, мы можем говорить о том, что у крыс, адаптированных к ХПГГ происходит снижение выброса КА в ответ на стимуляцию АР.

Таблица 43 – Влияние ХПГГ на гистохимические показатели содержания катехоламинов в надпочечниках и сердце крыс при введении изадрина (M \pm SEM)

Группы животных	Интенсивность флуоресценции катехоламинов в хромаффинных клетках мозгового вещества надпочечников, (усл.ед.)	Плотность адренергических волокон в миокарде, (% об.)
Интактные	6,0 \pm 0,3	12,3 \pm 0,7
Изадрин, 40 мг/кг	4,6 \pm 0,2 $p_1 < 0,05$	7,3 \pm 0,3 $p_1 < 0,05$
ХПГГ + изадрин	6,6 \pm 0,3 $p_2 < 0,05$	12,5 \pm 0,2 $p_2 < 0,05$
ХПГГ + налоксон, 2 мг/кг + изадрин	4,5 \pm 0,2 $p_3 < 0,01$	7,2 \pm 0,2 $p_3 < 0,01$

Примечания: изадрин вводили однократно подкожно за 24 ч до взятия материала. В каждой группе не менее 12 животных. p_1 – достоверность различий по отношению к группе интактных животных, p_2 – то же по отношению к группе животных с введением изадрина; p_3 – то же по отношению к группе ХПГГ; U-критерий Манна-Уитни.

В том случае, если крысам, адаптированным к ХПГГ, за 20 минут до изадрина внутривенно вводили антагонист ОР налоксон, содержание КА в хромоаффинных клетках мозгового вещества надпочечников и в миокарде оказалась ниже, чем в группе «ХПГГ» и сопоставимой с показателями неадаптированных крыс (Табл. 43).

Полученные результаты позволяют нам предполагать, что ХПГГ препятствует выбросу КА из надпочечников и симпатических терминалей в миокарде и этот эффект опосредован через опиоидные рецепторы.

3.2.3.2 Влияние антагонистов опиоидных рецепторов на частоту возникновения адреналин-индуцированных нарушений ритма сердца у крыс, подвергнутых хронической прерывистой гипобарической гипоксии

Предыдущее исследование показало, что ХПГГ способствует увеличению депонированных в миокарде и надпочечниках катехоламинов. Следующим этапом работы стало исследование влияния ХПГГ на устойчивость миокарда к аритмиям, вызванным введением адреналина.

Внутривенное введение адреналина (80 мкг/кг) вызывало возникновение нарушений ритма сердца у 72% животных контрольной группы (Табл. 44). В 72% случаев регистрировались множественные желудочковые экстрасистолы, у 32% крыс наблюдали желудочковую тахикардию, фибрилляция желудочков возникала в 28% наблюдений (Табл. 44).

Введение адреналина крысам, адаптированным к ХПГГ, приводило к возникновению нарушений ритма сердца в 13% случаев, в то время как у 87% крыс аритмий не наблюдалось. Желудочковая тахикардия возникла у лишь 1 крысы из 15, а фибрилляций желудочков в этой группе не было (Табл. 44). Эти данные свидетельствуют о том, что антиаритмический эффект ХПГГ воспроизводится на модели адреналиновых аритмий.

При блокаде всех типов опиоидных рецепторов налоксоном введение адреналина вызывало нарушения ритма у 60% животных (Табл. 44). Эти данные свидетельствуют о том, что антиаритмический эффект ХПГГ не наблюдается в условиях блокады ОР. Изучение рецепторной специфичности обнаруженного

эффекта проводили с селективными антагонистами μ -, δ - или κ -ОР. Наши исследования показали, что предварительное введение селективного антагониста δ -ОР ICI-174864 крысам, адаптированным к ХПГГ, достоверно увеличивает частоту возникновения множественных желудочковых экстрасистол и желудочковых тахикардий при введении адреналина таким образом, что этот показатель статистически не отличается от контрольной группы (Табл. 44).

Таблица 44 - Влияние антагонистов опиоидных рецепторов на частоту возникновения адреналин-индуцированных аритмий у крыс, адаптированных к ХПГГ

Экспериментальные группы	n	БНР		МЖЭ		ЖТ		ЖФ	
		n	%	n	%	n	%	n	%
Контроль	25	7	28	18	72	8	32	7	28
ХПГГ	15	13	87**	2	13**	1	7*	0	0*
Налоксон, 2 мг/кг	17	4	24	11	65	10	59	6	35
ХПГГ + налоксон, 2 мг/кг	15	6	40##	9	60##	0	0	0	0
ICI-174864, 2,5 мг/кг	20	2	10	13	65	9	45	3	15
ХПГГ + ICI 174864, 2,5 мг/кг	16	6	38##	10	62##	0	0	1	6
СТАР, 1 мг/кг	20	4	20	16	80	9	45	3	15
ХПГГ + СТАР, 1 мг/кг	15	1	7##	14	93##	0	0	2	13
Норбинаторфимин, 10 мг/кг	19	0	0	18	72	8	32	7	28
ХПГГ + норбинаторфимин, 10 мг/кг	15	1	7##	13	93##	3	21	6	43#

Примечания: ХПГГ – хроническая прерывистая гипобарическая гипоксия. БНР - без нарушений ритма, МЖЭ - множественные желудочковые экстрасистолы; ЖТ - желудочковые тахикардии; ЖФ - желудочковая фибрилляция. *- $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой; # - $p < 0,05$; ## $p < 0,01$, по сравнению с группой ХПГГ, критерий Пирсона χ^2 .

Блокада μ -ОР перед введением адреналина у животных, подвергнутых ХППГ, приводило к возрастанию МЖЭ до 93%, по отношению к 13% в группе ХППГ без блокады ОР, однако частота возникновения желудочковой тахикардии и фибрилляции осталась такой же низкой, как в группе «ХППГ» (Табл. 44).

Блокада κ -ОР у животных после ХППГ приводила к увеличению встречаемости не только множественных экстрасистол (93% против 13% в группе ХППГ), но и фибрилляции желудочков (до 43%) (Табл. 44). Следовательно, мы можем полагать, что антиаритмический эффект ХППГ на модели адреналиновых аритмий зависит от активации опиоидных рецепторов, при этом возможно участие всех трех типов ОР. Следует отметить, что ни один из антагонистов ОР не оказывал влияние на частоту встречаемости нарушений ритма у неадаптированных животных (Табл. 44).

Полученные данные свидетельствуют о том, что антиаритмический эффект ХППГ проявляется на модели адреналиновых аритмий и зависит от опиоидных рецепторов.

3.2.4 Антиаритмическое действие ингибиторов энкефалиназ

Данные предыдущего раздела показали, что эндогенные опиоиды участвуют в формировании антиаритмического действия хронической гипобарической гипоксии (Табл. 42, 44). Целью наших дальнейших исследований стало выяснение возможности увеличения устойчивости миокарда к аритмогенному воздействию адреналина путем повышения уровня эндогенных опиоидных пептидов. Подходом к решению этой задачи мы выбрали ингибирование энзиматического гидролиза опиоидов. Известно, что разрушение опиоидных пептидов происходит несколькими ферментами: аминопептидазой N, нейтральной эндопептидазой (энкефалиназой), дипептидилпептидазой-3, карбоксипептидазой A6 и ангиотензин-превращающим ферментом [Thanawala V. et al., 2008; Lyons P.J., et al., 2008]. Указанные ферменты являются потенциальными мишенями для фармакологического увеличения содержания опиоидных пептидов в тканях [Thanawala V. et al., 2008; Lecomte J.-M. et al., 1986; Poras H. et al., 2015].

Наибольший вклад в катаболизм энкефалинов вносит нейтральная эндопептидаза (24.11) [Gupta A. et al., 2014].

В нашем исследовании обнаружено, что предварительное введение ингибитора энкефалиназы ацеторфана снижает частоту возникновения адреналиновых аритмий с 80% в контрольной группе до 20% при введении ацеторфана (Табл. 45). Сходные результаты были получены с использованием другого ингибитора энкефалиназы RB 101 (Табл. 45).

Таблица 45 - Влияние ингибиторов энкефалиназ ацеторфана и RB101 на частоту возникновения адреналиновых аритмий

Экспериментальная группа	n	БНР		МЖЭ		ЖТ		ЖФ	
		n	%	n	%	n	%	n	%
Контроль	25	3	12	20	80	4	16	4	16
Ацеторфан, 10 мг/кг	15	11	73*	3	20**	0	0	1	7
RB 101, 20 мг/кг	15	12	80**	3	20**	0	0	0	0

Примечания: БНР - без нарушений ритма, МЖЭ - множественные желудочковые экстрасистолы, ЖТ - желудочковая тахикардия, ЖФ - желудочковая фибрилляция. *- $p < 0,05$; **- $p < 0,01$ по отношению к контрольной группе; критерий Пирсона χ^2 .

Полученные результаты подтверждают возможность увеличения устойчивости миокарда к адреналиновым аритмиями путем введения энкефалиназ. Однако оставалось неясным, связано ли действие ингибиторов энкефалиназ с увеличением содержания эндогенных опиоидов и воздействием на ОР. Выяснить это мы смогли, проведя эксперименты с блокадой ОР.

Наши исследования показали, что на фоне блокады ОР налоксоном (2 мг/кг внутривенно) антиаритмический эффект ацеторфана не проявляется (Рис. 26). Блокада δ -ОР препаратом ICI 174864 перед введением ацеторфана так же приводило к возрастанию частоты нарушений ритма, вызванных адреналином (Рис. 26). Вместе с тем блокада μ -ОР при помощи инъекции СТАР не повлияло на проявление антиаритмического действия ацеторфана.

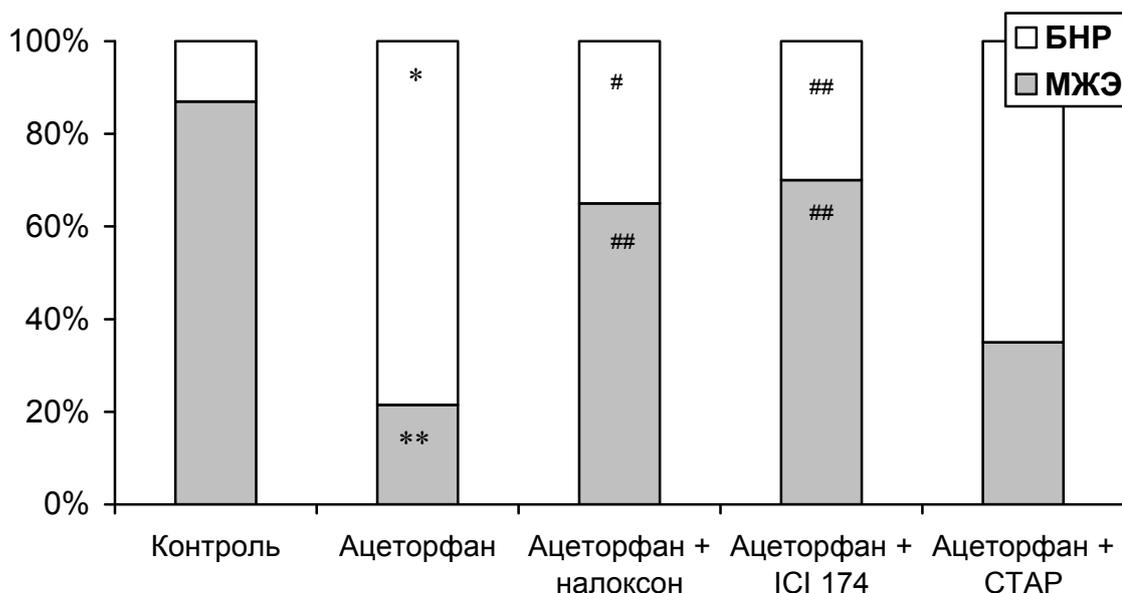


Рисунок 26 – Влияние ацеторфана и антагонистов опиоидных рецепторов на частоту возникновения адреналиновых нарушений ритма сердца у крыс.

Примечания: БНР - без нарушений ритма, МЖЭ - множественные желудочковые экстрасистолы, * $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ по отношению к введению ацеторфана; критерий Пирсона χ^2 .

Проведенное исследование подтверждает возможность увеличения электрической стабильности сердца путем блокады энкефалиназ, при этом наблюдаемый антиаритмический эффект эндогенных опиоидов реализуется через активацию δ -ОР.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ГЛАВЫ 3.2

Исследования, проведенные в рамках настоящей главы, показали, что адаптация крыс к хронической гипобарической гипоксии защищает миокард от возникновения нарушений ритма при экспериментальной ишемии и реперфузии или введении адреналина. Эти данные согласуются с результатами других авторов об антиаритмическом воздействии длительной гипоксии [Kolar F. 1996, Meerson F.Z. et al., 1987]. Следует обратить внимание на работы F. Kolar и соавт. [Kolar F. 1996, Asemu G. et al., 2004], в которых был продемонстрирован антиаритмический эффект адаптации к гипобарической гипоксии с моделированием этого экспериментального воздействия при давлении 41,1 кПа (7000 м над уровнем моря) на модели ишемии-реперфузии изолированного сердца. Результаты исследования Zhou J.J. и соавторов [Zhou J.J. et al., 2013] показали улучшение реперфузионной сократимости миокарда крыс, адаптированных к хронической гипобарической гипоксии. Анализируя эти результаты, можно предположить, что процесс адаптационной защиты миокарда от ишемических нарушений ритма происходит при участии кардиальных механизмов. Однако результаты наших исследований показали, что на модели изолированного сердца антиаритмический эффект ХПГГ не проявляется, что говорит о вовлечении в формирование этого эффекта экстракардиальных механизмов. Подобное разногласие можно объяснить тем, что в наших исследованиях применяли гипоксическое воздействие, соответствующее 5000 м над уровнем моря (54,052 кПа) в то время как чешские коллеги использовали 7000 м [Kolar F. 1996, Asemu G. et al., 2004].

Как в экспериментах *in vivo*, так и на модели изолированного перфузируемого сердца нами не было обнаружено кардиопротекторного действия ХПГГ (Табл. 40, 41).

Важно отметить, что показатели стресс-реакции у крыс после курса ХПГГ не соответствуют общему адаптационному синдрому, поскольку масса тимуса и селезенки после ХПГГ не изменяется, уровень кортикостерона в крови также не увеличивается (Табл. 38). Следовательно, мы можем исключить влияние стресса на полученные результаты.

К сожалению, механизмы антиаритмического действия ХПГГ до настоящего времени мало изучены. Если относительно внутриклеточных регуляторных

механизмов, опосредующих защитные эффекты хронической гипоксии, в литературе присутствует достаточно много информации [Baker J.E. et al., 1999; Balková P. et al., 2011; Cameron J.S., Baghdady R., 1994; Gonzales G.F. et al., 2005; Greenberg H. et al., 2006; Guo H.C. et al., 2009; Hlaváčková M. et al., 2010; Jung F. et al., 2000; Kolár F. et al., 2007; Kolar F., Ostadal B., 2004; Kopylov Iu.N., Meerson F.Z., 1992; Manukhina E.B. et al., 1999; Milano G. et al., 2010a, 2010b; Morel O.E. et al., 2003, 2006; Neckař J. et al., 2001, 2002b, 2005; Ostergaard L. et al., 2007; Rafiee P. et al., 2002; Ravingerová T. et al., 2007; Rouet-Benzineb P. et al., 1999; Rudyk O.V. et al., 2004; Ryan S. et al., 2007; Ryou M.G. et al., 2008; Semenza G., 1996, 2009, 2014; Strniskova M. et al., 2006; Szarszoi O. et al., 2003; Zaobornyj T. et al., 2009; Zhu W.-Zh. et al., 2003, 2006; Меерсон Ф.З. и др., 1992; Нарыжная Н.В. и др., 2009; Yuan G. et al., 2005, 2008], то экстракардиальные и рецепторные механизмы реализации антиаритмического эффектов практически не исследованы. Поскольку известно, что ряд адаптивных воздействий приводят к увеличению активности опиоидной системы [Лишманов Ю.Б., Маслов Л.Н., 1994; Maslov L.N. et al., 2013] и доказано участие опиоидов в реализации кардиопротекторного эффекта фитоадаптогенов и адаптации к стрессу [Лишманов Ю.Б., 1997 и др., 1997; Маслов, Л. Н. и др., 2004b], мы предположили, что эндогенная опиоидная система может опосредовать антиаритмический эффект хронической прерывистой гипобарической гипоксии. Решение этой задачи нами было проведено путем изучения содержания опиоидов в головном мозге крыс после ХПГГ и оценки антиаритмического действия ХПГГ в условиях блокады ОР. Наши исследования показали, что содержание предшественника мет-энкефалина (мет-энкефалин-Arg⁶-Phe⁷ [Benuck M. et al., 1981]) в структурах головного мозга у крыс после курса ХПГГ повышено (Рис. 23). Однако уровень динорфина В (эндогенного агониста κ-ОР [Merg F. et al., 2006]) при ХПГГ не изменился (Рис. 24). Эти данные позволили нам предположить, что важную роль в формировании антиаритмического действия ХПГГ играют μ- или δ-ОР, поскольку мет-энкефалин является агонистом этих субтипов ОР [Gross G.J. 2003; Dhawan B.N. et al., 1996]. Эксперименты с селективными антагонистами ОР показали, что в условиях ингибирования δ-ОР антиаритмический эффект ХПГГ не наблюдался, в то время как блокада μ- или κ-ОР не повлияла на проявление антиаритмического эффекта ХПГГ (Табл. 42). Следовательно, мы можем сделать

вывод о том, что антиаритмический эффект ХПГГ опосредован через выработку эндогенного мет-энкефалина и активацию δ -ОР.

Ранее было установлено, что предварительная активация всех трех изучаемых типов ОР предотвращает появление ишемических и реперфузионных нарушений желудочкового ритма у неадаптированных крыс [Lishmanov Yu.V. et al., 1999, 2000; Maslov L.N., et al., 2014]. Однако, в ходе проведения настоящего исследования мы обнаружили, что μ - и κ -ОР не играют важной роли в формировании антиаритмического эффекта ХПГГ. Это противоречие можно объяснить, если принимать во внимание тот факт, что в процессе адаптации к гипоксии наиболее выраженное изменение претерпевает содержание предшественника эндогенного мет-энкефалина (Рис. 23), который является смешанным агонистом μ - и δ -ОР [Dhawan B.N. et al., 1996; Gross G.J., 2003]. Эти данные подтверждаются результатами исследований группы проф. L.G. D'Alecy, который установил важную роль δ -ОР в адаптации к острой гипоксии [Mayfield K.P. et al., 1996, 1994]. Нами было показано, что, в отличие от мет-энкефалина, содержание эндогенного динарфина, который является преимущественным агонистом κ -ОР [Merg F. et al., 2006], в процессе адаптации к гипоксии не изменяется (Рис. 24), поэтому, на наш взгляд, вполне закономерно то, что мы не обнаружили участия κ -рецепторов в формировании адаптационной устойчивости миокарда к ишемическим аритмиям.

Многочисленные работы, в том числе и проведенные в рамках настоящего исследования показали, что реализация защитного эффекта адаптирующих воздействий может происходить через кардиальные ОР, в том числе расположенные на сарколемме кардиомиоцитов (Гл.3.1., Табл. 16, 19; Рис.10) [Xin W. et al., 2012; Surendra H. et al., 2013; Ласукова Т.В. и др., 2014]. Однако наши исследования показали, что на модели изолированного сердца антиаритмический эффект ХПГГ не проявляется. Эти данные свидетельствуют о том, что указанный эффект реализуется через экстракардиальные ОР. Поиск экстракардиальных механизмов, на которые могут воздействовать опиоиды при формировании антиаритмического действия ХПГГ, стал следующей задачей нашего исследования.

Известно, что важную роль в аритмогенезе при ишемии-реперфузии играет симпатическая нервная система [Shekher A., et al., 1996; Dimassi N. et al., 1992; Rochette L. et al., 2001]. В частности интенсивность выброса и обратного захвата норадреналина симпатических нервных терминалей в миокарде может быть одним из ключевых механизмов, регулирующих устойчивость сердца к аритмогенным воздействиям [Shekher A., et al., 1996; Rochette L. et al., 2001]. Литературные данные свидетельствуют о тесном взаимодействии опиоидной и симпатoadреналовой систем (САС), при котором опиоиды способствуют торможению выброса нейромедиаторов из надпочечников и симпатических нервных терминалей [Caffrey J.L., 1984; Bali A. et al., 2015; Mercadante S. et al., 2014; Leal A.K. et al., 2013]. Подтверждение этим данным приводятся в работах Ю.Б. Лишманова и соавт. [Лишманов Ю.Б. 1986], в которых было показано, что агонист μ - и δ -ОР даларгин способен снижать стресс-индуцированное выделение КА с мочой, что трактуется авторами как антиадренергическое действие пептида. Более того, агонисты опиоидных рецепторов способны предупреждать повреждение миокарда при эмоциональном стрессе через регуляцию активности периферического звена САС [Лишманов Ю.Б. и др., 1998; Нарыжная Н.В. и др., 1998]. Опиоиды действуют на пресинаптические ОР, что ведёт к ингибированию выброса НА из периферических терминалей [Szabo B. et al., 1986; Ensinger H. et al., 1984].

Вместе с тем, в работах коллектива авторов медицинского центра университета Кентукки под руководством проф. Van Loon [Houdi A.A. et al., 1991, 1996] показано, что при центральном введении агонисты ОР оказывают стимулирующее действие на САС: вызывают тахикардию, увеличение артериального давления и уровня катехоламинов в плазме крови. С другой стороны, показано, что морфин способен рецептор-опосредованно снижать спонтанную активность нейронов locus coeruleus - ядра, содержащего как тела большинства адренергических нейронов головного мозга, так и энкефалинергические нейроны [Korf J., Bunney B.S., 1974], что предполагает тормозное влияние этого опиоида на активность симпатической нервной системы. Как можно видеть, данные о влиянии опиоидов на САС противоречивы. Отчасти это происходит вследствие того, что авторами не исследуется рецепторная

специфичность используемого лиганда и не учитывается локализация опиоидных рецепторов. Последнее обстоятельство является важным, поскольку эффекты активации ОР в ЦНС и на периферии могут быть противоположными [Маслов Л.Н., и др., 1996а; Caffrey J.L. et al., 1984; Houdi A.A. et al., 1996]. Немаловажным является то, что до настоящего времени не получено прямого доказательства тому, что протекторные эффекты опиоидов опосредуются через изменение активности САС. Изложенные факты позволили нам выдвинуть предположение об опосредующей роли симпатoadреналовой системы в реализации антиаритмического действия эндогенных опиоидов при ХПГГ. Решение поставленной задачи мы осуществили путем исследования состояния симпатической нервной системы после курса ХПГГ и выявление антиаритмического эффекта хронической гипобарической гипоксии на модели адреналиновых аритмий в условиях блокады ОР.

Наши исследования показали, что флуоресценция адренергических волокон в миокарде и содержание депонированных в надпочечниках катехоламинов у крыс, подвергнутых ХПГГ выше, чем у неадаптированных особей (Рис. 25). На первый взгляд подобное накопление катехоламинов можно расценивать как увеличение активности САС. Однако ранее выполненное исследование по изучению взаимодействия САС и опиоидов показало, что под влиянием последних в миокарде и надпочечниках происходит аналогичное накопление норадреналина, и этот эффект обусловлен не усилением его синтеза, а снижением выброса [Лишманов Ю.Б. и др., 1998; Нарыжная Н.В. и др., 1998]. Более того, наши исследования показали, что введение агониста β -АР изадрина у интактных крыс вызывает снижение содержания норадреналина в надпочечниках и симпатических нервных терминалях миокарда, в то время как у крыс, подвергнутых ХПГГ этого не происходит (Табл. 43). Указанный эффект зависит от активации ОР, поскольку не проявляется в присутствии налоксона (Табл. 43). В настоящей работе обнаружено, что увеличение содержания норадреналина в миокарде и надпочечниках при ХПГГ сопровождается увеличением резистентности миокарда к ишемическим и реперфузионным аритмиям, а так же к аритмогенному действию адреналина. Все указанные эффекты ХПГГ зависят от активации δ -ОР, поскольку не выявляются в условиях их блокады. Полученные результаты, подтверждаемые

вышеприведенными данными литературы, позволяют предполагать, что «адреносберегающее» действие опиоидов приводит к повышению электрической стабильности миокарда при ХПГГ. Результаты исследования и данные литературы позволили нам выдвинуть гипотезу о том, что опиоидные рецепторы, опосредующие антиаритмический эффект ХПГГ, расположены в надпочечниках и на адренергических нервных терминалях миокарда (Рис. 27). Эндогенные агонисты ОР, воздействуя на эти ОР, предупреждают выброс из них нейромедиаторов, способствуя тем самым повышению электрической стабильности сердца.

Эти предположения подтверждаются и рядом исследований, показавших, что адаптационная устойчивость к аритмогенным воздействиям обусловлена перестройкой мембранно-рецепторного аппарата кардиомиоцитов, при которой, в частности, изменяется чувствительность β -адренорецепторов [Меерсон Ф.З. и др., 1991; Voelkel N.F. et al., 1981; Guan Y. et al., 2010]. Ранее было показано, что в ходе адаптации к гипобарической гипоксии в миокарде увеличивается количество β -адренорецепторов [Меерсон Ф.З. и др., 1991], однако одновременно с этим уменьшается базальная аденилатциклазная активность и снижается чувствительность кардиомиоцитов к действию β -агонистов [Меерсон Ф.З. и др., 1991; Guan Y. et al., 2010]. В другом исследовании продемонстрировано снижение плотности адренорецепторов в миокарде [Voelkel N.F. et al., 1981]. Обнаружено увеличение активности моноаминоксидазы в миокарде крыс после хронической гипобарической гипоксии [Shatemirova K.K. et al., 1990]. В работе Y. Guan и соавт. обнаружено снижение чувствительности кардиомиоцитов к адреномиметикам у крыс после хронической прерывистой гипобарической гипоксии, моделируемой аналогично нашему исследованию [Guan Y. et al., 2010]. У здоровых волонтеров обнаружено снижение симпатической активности после 6-месячного проживания в высокогорье (4500-4800 м над уровнем моря) [Dhar P. et al., 2014]. Такое уменьшение реактивности β -рецептор-аденилатциклазной системы может играть значительную роль в механизме антиаритмического эффекта адаптации к гипоксии, поскольку увеличение внутриклеточной концентрации цАМФ в миокарде во время ишемии и реперфузии способствует появлению аритмий, а фармакологические агенты, снижающие уровень цАМФ в кардиомиоцитах, оказывают антиаритмическое влияние [Lubbe W.F. et al., 1992]. Внутриклеточные

последствия снижения цАМФ могут включать снижение Ca^{2+} -перегрузки кардиомиоцита при ишемии и реперфузии, как это показано в исследовании Н.Д. Ма и соавт. [Ma H.J. et al., 2014], которая, как известно, является одной из ведущих причин нарушений ритма при этой патологии. Интерес исследователей к изменению адренореактивности миокарда под влиянием хронической гипоксии в настоящий момент переживает «вторую волну» [Guan Y. et al., 2010; Dick T.E. et al., 2014; Ma H.J. et al., 2014]. Механизм этого явления до конца не ясен. Мы можем предположить следующий механизм реализации снижения адренореактивности миокарда. Известно, что активация δ -ОР экзогенным лей-энкефалином способствует снижению синтеза цАМФ в изолированных кардиомиоцитах [Xiao R.-P. et al., 1997]. В исследовании чешских физиологов было показано, что хроническое применение морфина приводит к снижению активности аденилатциклазы в кардиомиоцитах крыс [Skrabalova J. et al., 2012]. Поскольку хроническая прерывистая гипобарическая гипоксия приводит к увеличению синтеза мет-энкефалина, имеющего сходную рецепторную специфичность в отношении опиоидных рецепторов, по всей видимости, в миокарде и надпочечниках адаптированных животных происходит ингибирование выброса нейромедиаторов из симпатических нервных терминалей и надпочечников, что в конечном итоге обеспечивает электрическую стабильность сердца в условиях экспериментальной коронароокклюзии и реперфузии.

Данные настоящей главы показали, что эндогенные опиоиды участвуют в формировании антиаритмического действия хронической гипобарической гипоксии (Табл. 42, 44). Следовательно, ОР можно рассматривать в качестве мишеней для разработки новых лекарственных средств для профилактики и лечения аритмий. Данные литературы свидетельствуют о том, что экзогенное введение агонистов ОР оказывает выраженный антиаритмический эффект [Maslov L.N. et al., 2014]. Вместе с тем применение агонистов ОР для защиты миокарда от аритмий встречает ряд препятствий. В первую очередь это недостаточный спектр агонистов ОР, многие из которых являются пептидами. Кроме того остается актуальной проблема быстрой ферментативной деградации опиоидов. Наличие ряда побочных эффектов агонистов ОР, таких как лекарственная зависимость или снижение артериального давления, усугубляет ситуацию. Однако возможен иной

подход к решению данной проблемы – увеличение уровня эндогенных опиоидов путем ингибирования разрушающих их ферментов. В связи с этим мы выяснили, существует ли принципиальная возможность увеличения устойчивости миокарда к аритмогенному воздействию путем повышения уровня эндогенных опиоидных пептидов. Подходом к решению этой задачи мы выбрали ингибирование энзиматического разрушения опиоидов. Деградация опиоидных пептидов в организме происходит несколькими ферментами: аминопептидазой N, нейтральной эндопептидазой (энкефалиназой), дипептидилпептидазой-3, карбоксипептидазой А6 и ангиотензин-превращающим ферментом [Thanawala V. et al., 2008; Lyons P.J., et al., 2008]. Указанные ферменты являются потенциальными мишенями для фармакологического увеличения содержания опиоидных пептидов в тканях [Thanawala V. et al., 2008; Poras H. et al., 2015]. Наибольший вклад в катаболизм энкефалинов вносит нейтральная эндопептидаза (24.11) [Gupta A. et al., 2014]. Наши исследования показали, что блокирование нейтральной эндопептидазы (энкефалиназы) ее селективными ингибиторами ацеторфаном или RB101 оказывает выраженный антиаритмический эффект при моделировании адреналиновых аритмий (Табл. 45). При этом антиаритмический эффект ингибирования энкефалиназы устраняется при блокаде δ -опиоидных рецепторов (Рис. 26). Эти данные свидетельствуют о том, что увеличение содержания эндогенных опиоидов под воздействием блокады энкефалиназ приводит к повышению устойчивости миокарда к аритмиям. Полученные результаты позволяют нам говорить о том, что ингибиторы энкефалиназ являются новым перспективным направлением для создания на их основе нового класса антиаритмических средств.

Таким образом, результаты проведенного исследования позволяют нам с определенной долей уверенности предполагать, что эндогенная опиоидная система играет важную роль в формировании адаптационной устойчивости миокарда к аритмогенному действию ишемии и реперфузии, центральным регуляторным звеном в данном процессе выступают δ -опиоидные рецепторы. Регуляция активности опиоидной системы может служить мишенью для разработки новых антиаритмических средств.

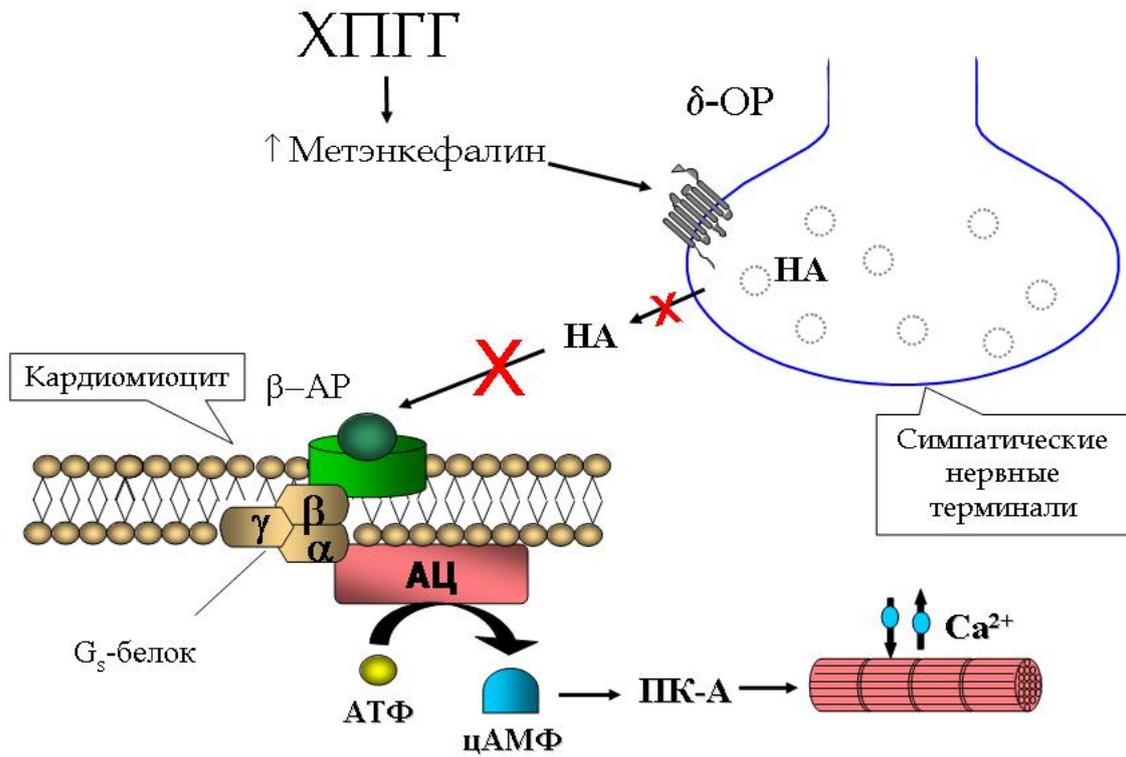


Рисунок 27 - Механизм антиаритмического действия хронической прерывистой гипобарической гипоксии

Примечания: ХПГГ – хроническая прерывистая гипобарическая гипоксия; ОР – опиоидные рецепторы; НА – норадреналин; АР – адренорецепторы; АЦ – аденилатциклаза; ПК-А – протеинкиназа А; пояснения в тексте.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящий момент широко известно, что ряд срочных адаптивных реакций в ответ на локальную органную ишемию - ишемическое пре-, пост- и дистантное кондиционирование - сопровождается выраженным кардиопротекторным и антиаритмическим действием [Cohen M.V., Downey J.M. 2011; Gao L. et al., 2012; Wang Z., Si L.Y. 2013; Cai Z. et al., 2013; Bulluck H, Hausenloy DJ. 2015]. Исследования механизмов кондиционирования проводились и проводятся в настоящее время с целью выявления мишени для фармакотерапии острого инфаркта миокарда [Oerlemans M.I. et al., 2013; Чазов Е.И. 2013]. Однако следует заметить, что эффективность применения прекодиционирования на практике до настоящего времени не подтверждена, поскольку при проведении клинических исследований получены результаты как подтверждающие кардиопротекцию и антиаритмический эффект ишемического и дистантного прекодиционирования [Takagi H. et al., 2011; Hausenloy D.J., Yellon D.M., 2012; White S.K. et al., 2015], так и отсутствие этих эффектов [Ovize M. et al., 2013; McCrindle B.W. et al., 2014; Karuppusamy P. et al., 2011]. На наш взгляд это обстоятельство является основной причиной того, что, несмотря на обширные сведения о механизме формирования протекции при ишемическом или дистантном прекодиционировании, до настоящего времени на основе этих знаний не создано новых фармакологических средств, показавших свою эффективность в клинике. Так, на основе предположения об участии протеинкиназы Сδ в механизме повреждающего действия ишемии-реперфузии был создан новый фармакологический препарат делкасертиб, блокатор указанной протеинкиназы [Miyaji Y., et al., 2011]. Однако клиническую эффективность этого соединения при остром инфаркте миокарда доказать не удалось [Lincoff A.M. et al., 2014]. Экспериментальные исследования, показавшие эффективность эритропоэтина при ишемии-реперфузии миокарда не были подтверждены клиническими данными [Pearl R.G. et al., 2014]. Кроме того, применение ингибитора mPTP-пор циклоспорина у пациентов с острым инфарктом миокарда не повлияло на гемодинамические показатели и ремоделирование левого желудочка в течение 1 года [Cung T.T. et al., 2015]. Возможно, такая ситуация обусловлена тем, что механизмы ИП исследуют на здоровых животных. Поэтому фармакологическая активация мишеней, определенных на основании знаний об эти

механизмах, оказывается не эффективной у пациентов с хронической патологией. Состояние адаптации к гипоксии, на наш взгляд, наиболее адекватно соответствует хронической сердечной недостаточности в стадии компенсации. Понять, какие механизмы удерживают ХСН от перехода к декомпенсации, может помочь изучение защитных эффектов хронической гипоксии. Исследования последних лет показали, что адаптация к гипоксии способствует сокращению размера инфаркта [Wang Z., Si L.Y. 2013; Ma H.J. et al., 2014], улучшению постишемической сократимости миокарда [Tajima M. et al., 1994] и уменьшению вероятности возникновения ишемических-реперфузионных аритмий [Zhou J.J. et al., 2015].

Хотелось бы отметить, что в отличие от ишемического preconditionирования, эффекты адаптации к хронической гипоксии могут быть воспроизведены при метаболическом синдроме и сахарном диабете. Так, в исследованиях физиологов из Хебейского университета (Китай) под руководством проф. И. Жанг было обнаружено, что у крыс с метаболическим синдромом ХПГГ вызывает нормализацию АД, индекса массы тела, содержания в крови глюкозы, триглицеридов, холестерина [Zhou J.J. et al., 2013]. Кроме того, адаптация к ХПГГ оказывает у животных с метаболическим синдромом антиаритмический эффект [Zhou J.J. et al., 2015]. В то же время мы можем видеть неэффективность моделирования ИП у животных с экспериментальным метаболическим синдромом и экспериментальным сахарным диабетом [Gross E.R., 2007b; Babbar L., et al., 2013; Hausenloy DJ. et al., 2013], у пациентов с хронической сердечной недостаточностью [Ovize M. et al., 2013]. Эти данные говорят о том, что определение фармакологических мишеней и создание новых подходов к лечению сердечно-сосудистой патологии и тесно связанным с ней нарушением метаболизма следует проводить на основе знаний о механизмах формирования резистентности миокарда к ишемии, возникающей при воздействии долговременной адаптации.

В настоящее время имеющиеся знания о механизмах защитных эффектов адаптации к гипоксии недостаточны. Целью настоящего исследования стало получение новой информации о механизмах возникновения устойчивости миокарда к ишемии-реперфузии, возникающей под влиянием хронической гипоксии.

Анализируя данные научной литературы, мы обнаружили, что авторами используются различные способы моделирования хронической гипоксии. При этом нельзя обойти вниманием исследования, в которых хроническую гипоксию используют для моделирования патологических состояний дезадаптации. Для этого используют гипобарическую непрерывную гипоксию, один из режимов которой вызывает нарушение функционального состояния митохондрий [McCarthy J. et al., 2011], другой приводит к усилению выработки в миокарде АФК и снижению содержания в ткани сердца оксида азота [Singh M. et al., 2012]. Ряд моделей хронической гипоксии оказывают неблагоприятное воздействие и используются для моделирования патологических состояний, таких как артериальная гипертензия [Yaman M.O. et al., 2014], состояния апное [Moraga F.A. et al., 2014; Lyons O.D. et al., 2015; Floras J.S. 2015].

Наиболее эффективным методом для достижения инфаркт-лимитирующего эффекта является хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия [Neckar J. et al., 2003, 2004]. Ее защитный эффект в отношении ишемического-реперфузионного повреждения был обнаружен еще в 1994 г [Tajima M. et al., 1994], однако широко исследуется только в последние 10 лет [Neckar J. et al., 2005, 2013; Strniskova M. et al., 2006; Hlavackova M. et al., 2010; Milano G. et al., 2010a,b; Borchert G.H. et al., 2011; Waskova-Arnostova P. et al., 2013, 2014; Chytilova A. et al., 2015; Alanova P. et al., 2015; Holzerova K. et al., 2015]. При этом важно отметить, что авторы вышеприведенных публикаций уделили внимание изучению отдельных внутриклеточных факторов реализации инфаркт-лимитирующего действия ХННГ, в то время как рецепторные механизмы запуска адаптационной реакции оставались неисследованными.

Ни в одной из приведенных работ не было обнаружено антиаритмического действия ХННГ. Однако известно, что другой способ адаптации к хронической гипоксии приводит к повышению устойчивости миокарда к действию аритмогенных факторов. Это хроническая прерывистая гипобарическая гипоксия, антиаритмический эффект которой был обнаружен в 1987 г в институте общей патологии и патофизиологии под руководством Ф. З. Меерсона [Meerson F.Z. et al., 1987] и подтвержден в более поздних исследованиях другими авторами [Zhou J.J. et al., 2015]. До настоящего времени было неясно, какие механизмы лежат в основе

этого эффекта. Чешскими физиологами было высказано предположение о важной роли K_{ATP} -каналов в формировании устойчивости миокарда к аритмогенному действию ишемии-реперфузии при ХПГГ [Kolar F., Ostadal B. 2004]. Данных о других механизмах реализации антиаритмического действия ХПГГ мы в литературе не встретили.

Приведенные данные позволили нам выбрать способы адаптации к гипоксии для моделирования кардиопротекторного и антиаритмического эффектов и дальнейшего изучения механизмов их реализации. Наши исследования показали, что в результате ХННГ формируется выраженный инфаркт-лимитирующий эффект, кардиопротекторный и цитопротекторный эффект, это адаптирующее воздействие оказывает положительный инотропный эффект, который сопровождается улучшением диастолической функции сердца. В то же время ХПГГ способствует повышению устойчивости миокарда крыс к аритмогенному действию ишемии, реперфузии или введения адреналина.

Данные литературы свидетельствуют, что продолжительность защитного эффекта ХННГ достигает 5 недель [Neckar J., et al., 2003]. Это значительно превосходит продолжительность кардиопротекции при ишемическом прекондиционировании, эффективность которого ограничена несколькими часами. В связи с этим, исследование механизмов формирования длительной и выраженной устойчивости миокарда к ишемическому–реперфузионному повреждению с целью выявления фармакологических мишеней для создания в последствии новых кардиопротекторных препаратов явилось первой задачей нашего исследования.

Как уже упоминалось выше, в литературе отсутствуют данные о рецепторном механизме реализации эффектов хронической гипоксии. Между тем известно, что опиоидные рецепторы опосредуют кардиопротекторный эффект ишемического пре- и посткондиционирования [Yang X. et al., 2010; Neusch G. 2015]. Данные клинических исследований показали, что от состояния опиоидной системы зависит исход такого социально-значимого заболевания, как острый инфаркт миокарда: обнаружено, что содержание проэнкефалина в сыворотке крови пациентов с ОИМ имеет прямую корреляцию с осложнениями ИМ (сердечная недостаточность, повторный инфаркт, смерть в течение 2 лет) [Ng L.L. et al., 2014]. Поэтому исследование участия опиоидных рецепторов в механизме формирования

устойчивости миокарда к аритмогенному и повреждающему действию ишемии и реперфузии стало первоочередной задачей настоящего исследования. Мы обнаружили, что инфаркт-лимитирующий эффект ХННГ, так же как и антиаритмическое действие ХППГ, не проявляются после блокады δ -ОР. Эти данные позволяют нам предполагать участие этого типа ОР в реализации указанных эффектов. Кроме того, уточнение рецепторной специфичности кардиопротекторного действия ХННГ обнаружило, что этот эффект реализуется через δ_2 и, частично, через μ -ОР. Эти данные позволили нам выдвинуть предположение о том, что в результате хронической гипоксии, проводимой в этих режимах, происходит активация эндогенной опиоидной системы, гуморальные факторы которой (эндогенные опиоиды) стимулируют ОР, что приводит к возрастанию устойчивости миокарда к аритмиям и повреждению при ишемии-реперфузии. Это предположение подтвердилось обнаруженным нами увеличением содержания опиоидных пептидов в крови и миокарде крыс, подвергнутых ХННГ и увеличением содержания предшественника энкефалинов в головном мозге после ХППГ. Следовательно, наша гипотеза об активации опиоидной системы при хронических адаптирующих воздействиях верна. Вероятно, рецепторами, опосредующими активацию опиоидной системы и протекторные эффекты являются δ -ОР. Возможность протекции миокарда при активации этого типа ОР показана рядом исследований [Maslov L. N. et al., 2009, 2010, 2014; Peart J. N. et al., 2011; Peppin J.F., Raffa R.B., 2015]. Кроме того известно, что δ -ОР участвуют в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта ишемического preconditionирования [Miki T. et al., 1998]. Нами обнаружено участие μ -ОР в реализации инфаркт-лимитирующего и цитопротекторного действия ХННГ.

Второй задачей нашего исследования оказалось выявление локализации ОР, реализующих инфаркт-лимитирующее действие ХННГ и антиаритмическое действие ХППГ. Для решения этой задачи нами были проведены эксперименты, в которых ишемию-реперфузию миокарда у крыс, прошедших адаптацию к гипоксии, моделировали на изолированном перфузируемом сердце в условиях блокады ОР. Мы обнаружили, что изолированный миокард крыс, подвергнутых ХННГ, устойчив к ишемическому-реперфузионному повреждению. Обнаружено, что при блокаде ОР перфузией селективного антагониста δ -ОР

кардиопротекторное действие ХННГ не проявляется. Эти данные свидетельствуют о том, что защитный эффект ХННГ реализуется через кардиальные механизмы, в частности через ОР, расположенные в миокарде. Исследование, проведенное на модели аноксии-реоксигенации изолированных кардиомиоцитов, подтвердило наше предположение о том, что ОР, ответственные за протекцию, сформировавшаяся в ходе ХННГ, расположены на мембранах кардиомиоцитов.

Иная картина наблюдалась при хронической периодической гипобарической гипоксии. При моделировании ишемии-реперфузии изолированного сердца крыс, подвергнутых ХПГГ, мы не наблюдали антиаритмического эффекта. Эти данные свидетельствуют о том, что указанное действие ХПГГ реализуется через экстракардиальные механизмы.

Полученные результаты послужили основанием для нашего выбора при дальнейшем исследовании механизмов реализации антиаритмического действия ХПГГ и кардиопротекторного эффекта ХННГ. Логично предположить, что при ХННГ стимуляция ОР, расположенных на мембранах кардиомиоцитов, эндогенными агонистами приводит к запуску внутриклеточного регуляторного каскада, сходного с таковым при активации ОР экзогенными лигандами. Литературные данные свидетельствуют о том, что этот каскад включает $G_{i/o}$ -белки, Р13-киназу, протеинкиназу С, тирозинкиназы, K_{ATP} -каналы и mPTP поры [Маслов Л. Н. и др., 2013; Salman S., et al., 2014]. Эти доводы легли в основу исследования внутриклеточных механизмов реализации эффекта ХННГ. Наши исследования показали, что инфаркт-лимитирующий эффект ХННГ реализуется через активацию тирозинкиназ, протеинкиназы С δ , iNO-синтазу, мито K_{ATP} -каналы и mPTP-поры. Однако мы не обнаружили зависимости инфаркт-лимитирующего действия ХННГ от активации Р13-киназы, что свидетельствует о некотором различии в механизмах реализации эффектов ХННГ и активации опиоидных рецепторов. На наш взгляд это различие заключается в длительности воздействия. Поскольку ХННГ длится 21 день, возможно, происходит хроническая активация ОР, эффекты которой отличаются от одномоментного воздействия агонистов ОР. Так, обнаружено, что хроническое воздействие опиоидов приводит к изменению транскрипционной активности клетки через активацию HIF2 α фактора и последующему увеличению выработки одной из субъединиц K_{ATP} -канала (Kir6.2) [Salman S. et al., 2014].

Приводит ли это к открытию указанного канала, остается неизвестным, однако эти данные позволяют предположить, что активация $K_{\text{АТР}}$ -канала под влиянием хронической нормобарической гипоксии может быть связана с длительным воздействием эндогенных опиоидов.

Другой группой исследователей подтвержден факт изменения транскрипционной активности кардиомиоцитов под действием ХННГ [Waskova-Arnostova P. et al., 2014]. Обнаружено увеличение экспрессии и трансляции креатинфосфокиназы и гексокиназы в миокарде крыс, тренированных как с помощью прерывистой, так и непрерывной хронической гипоксии [Waskova-Arnostova P. et al., 2014]. Эти данные согласуются с обнаруженным нами улучшением энергетического метаболизма митохондрий при хронической нормобарической гипоксии, а так же данными, полученными Z. H. Wang и соавт. о повышении эффективности дыхания и синтеза АТФ у крыс после гипобарической гипоксии [Wang Z.H. et al., 2012]. Мы выявили опиоид-зависимое увеличение скорости дыхания митохондрий в присутствии АДФ и увеличение трансмембранного потенциала митохондрий в условиях реперфузионного повреждения сердца. Корреляционный анализ показал положительную взаимосвязь между параметрами дыхания митохондрий и силой сокращения миокарда в период реперфузии у крыс после ХННГ. При этом зависимость сохранялась при блокировании ОР, когда снижение скорости дыхания митохондрий сопровождалось падением силы сокращения миокарда при реперфузии. Эти данные свидетельствуют о том, что опиоиды при ХННГ способствуют поддержанию энергетического метаболизма митохондрий на высоком уровне, что приводит к усилению сократительной активности миокарда в реперфузионном периоде. Важное значение этих результатов становится очевидным, если принимать во внимание, что дисфункция митохондрий является одним из основных патогенетических механизмов повреждения миокарда при ишемии-реперфузии [Borutaite V. et al., 2013] и митохондрии рассматривают как одну из мишеней для фармакологической коррекции ишемического-реперфузионного повреждения миокарда [Marín-García J. et al., 2013; Buja LM. 2013; Masuzawa A. et al., 2015]

Наряду с улучшением функционального состояния митохондрий мы обнаружили прямую корреляционную взаимосвязь между силой сокращения изолированного сердца и устойчивостью mPTP-пор к открытию под влиянием ионов Ca^{2+} . Этот эффект оказался опиоид-зависимым. Полученные данные мы можем интерпретировать в пользу нашей гипотезы о том, что конечным эффектором действия эндогенных опиоидов при ХННГ является увеличение устойчивости mPTP-поры к открытию. К сожалению, механизм увеличения устойчивости mPTP-поры при ХННГ не раскрыт, на основании литературных данных мы можем предполагать взаимосвязь между этим явлением и открытием K_{ATP} -каналов [Halestrap A.P. et al., 2015; Neusch G., 2015]. В настоящий момент mPTP-пору и один из ее компонентов - гексокиназу - рассматривают как наиболее перспективную мишень для трансляции экспериментальных данных в клиническое исследование [Halestrap A.P. et al., 2015]. Результаты нашего исследования подтверждают приведенное мнение.

При исследовании механизмов антиаритмического действия хронической прерывистой гипобарической гипоксии (ХПГГ) мы предположили, что указанный механизм может реализовываться через снижение активности симпатoadреналовой системы. Аргументами в пользу этого предположения были известные факты об ингибировании опиоидами выброса катехоламинов [Caffrey J.L., 1984; Bali A. et al., 2015; Mercadante S. et al., 2014; Leal A.K. et al., 2013] и снижение чувствительности β -адренорецепторов миокарда к катехоламинам после адаптации крыс к хронической гипобарической гипоксии [Меерсон Ф.З. и др., 1991; Voelkel N.F. et al., 1981; Guan Y. et al., 2010].

Наши исследования показали, что антиаритмическое действие ХПГГ выявляется при моделировании аритмий, вызванных введением адреналина. При этом у крыс, подвергнутых ХННГ, содержание катехоламинов в хромоаффинной ткани надпочечников и адренергических терминалях миокарда выше, чем у неадаптированных животных, как в покое, так и при потенцировании выброса катехоламинов изадрином. Важно отметить, что «адреносберегающий» эффект ХПГГ оказался опиоид-зависимым, поскольку не проявлялся в условиях блокирования ОР. Следовательно, мы можем заключить, что эндогенные опиоиды при ХПГГ тормозят выброс катехоламинов из надпочечников и терминалей в

миокарде. Сопоставляя эти данные с антиаритмическим действием ХПГГ на модели адреналиновых аритмий, мы можем предполагать, что снижение выброса катехоламинов в ответ на стимуляцию опиоидных рецепторов, является одним из механизмов реализации антиаритмического действия ХПГГ. Эти данные согласуются с результатами S. Salman и соавт., которые наблюдали снижение выброса катехоламинов (дофамина и норадреналина) из хромаффинной ткани надпочечников (культура ткани) в ответ на острую гипоксию после хронического введения морфина [Salman S. et al., 2013, 2014], что подтверждает возможность моделирования опиоидами выброса катехоламинов.

Резюмируя сказанное, мы можем предполагать, что опиоидные рецепторы являются мишенью для создания на их основе новых антиаритмических и кардиопротекторных средств. При этом стимуляция ОР возможна двумя путями – во-первых, экзогенным введением агонистов ОР, работы в этом направлении ведутся последние несколько лет [Maslov, L.N. et al., 2010]; во-вторых, возможно увеличение содержания эндогенных ОР путем воздействия на их метаболизм. В частности получило развитие создание препаратов на основе блокаторов энкефалиназ – ферментов, гидролизующих энкефалины [Poras H. et al., 2015]. Мы установили, что ингибирование энкефалиназ приводит к увеличению устойчивости миокарда к аритмогенному действию адреналина. Эти данные подтверждают нашу гипотезу о ключевой роли ОР в поддержании электрической стабильности миокарда и показывают возможность использования этого механизма для ее фармакологической регуляции.

В заключение необходимо отметить, что оба метода адаптации к гипоксии вызывают увеличение выработки эндогенных опиоидов. Однако кардиопротекторный эффект ХННГ и антиаритмическое действия ХПГГ зависят от активации этими опиоидами ОР различной локализации. В связи с этим механизмы устойчивости миокарда к аритмогенному и повреждающему действию ишемии-реперфузии оказываются различными. Схематично механизмы реализации эффектов адаптации к хронической гипоксии представлены на Рис. 28.

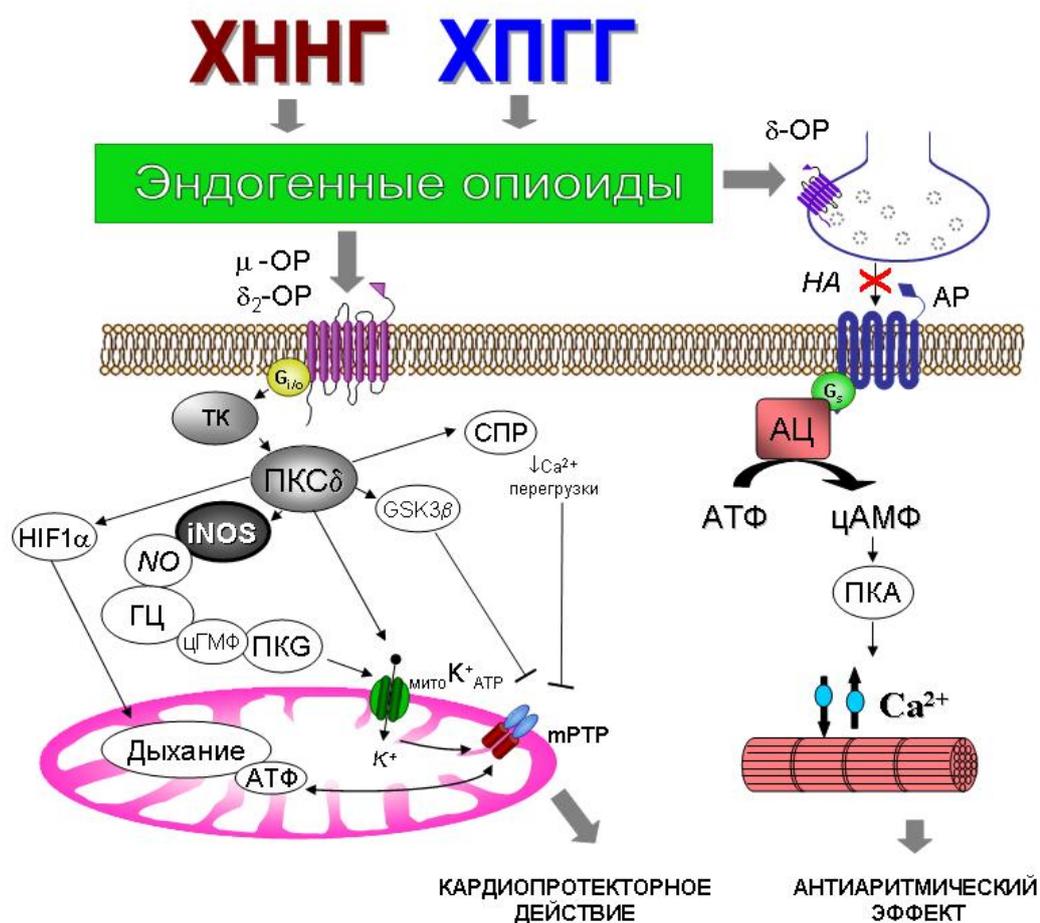


Рисунок 28 – Защитные эффекты адаптации к хронической гипоксии

Примечания: ХННГ - хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия; ХПГГ – хроническая прерывистая гипобарическая гипоксия; ОР – опиоидные рецепторы; НА – норадреналин; АР – адренорецепторы; АЦ – аденилатциклаза; ПК-А – протеинкиназа А; ТК – тирозинкиназы, ПКС – протеинкиназа С, iNOS – Индуцибельная синтаза оксида азота, ГЦ – гуанилатциклаза, ПКГ – протеинкиназа G, митоK⁺_{АТФ} – митохондриальный АТФ-зависимый K⁺ канал, mPTP – поры, изменяющие проницаемость митохондрий, HIF1 α - гипоксия-индуцируемый фактор транскрипции 1 α , GSK3 β - киназа гликогенсинтазы 3 β .

ВЫВОДЫ

1. В процессе адаптации крыс к хронической гипоксии происходит активация опиоидной системы, о чём свидетельствует повышение уровня опиоидных пептидов в крови и тканях, как в состоянии физиологического покоя, так и при ишемии-реперфузии.
2. Инфаркт-лимитирующий, кардиопротекторный и цитопротекторный эффекты хронической непрерывной нормобарической гипоксии опосредуются через активацию кардиальных δ_2 - и μ -опиоидных рецепторов.
3. Адаптационное повышение устойчивости сердца к аритмогенному действию ишемии и реперфузии, происходящее при хронической прерывистой гипобарической гипоксии, связано с активацией экстракардиальных δ -опиоидных рецепторов.
4. Сигнальными звеньями связанной с опиоидными рецепторами кардиопротекции при хронической непрерывной нормобарической гипоксии являются тирозинкиназы, протеинкиназа $C\delta$, iNO-синтаза и митоK_{ATФ}-каналы.
5. Сопряженная с опиоидными рецепторами PI3-протеинкиназа не участвует в обеспечении повышенной резистентности миокарда к ишемии и реперфузии у адаптированных к непрерывной нормобарической гипоксии животных.
6. Улучшение функционального состояния митохондрий миокарда (скорость дыхания, величина трансмембранного потенциала, содержание АТФ и устойчивость mPTP-поры к открытию) у крыс после адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии связано с активацией опиоидных рецепторов.
7. Антиадренергическое действие эндогенных опиоидов играет важную роль в формировании повышенной толерантности сердца к аритмогенным воздействиям у адаптированных к хронической гипобарической гипоксии животных.
8. Повышение устойчивости миокарда к аритмогенным воздействиям может быть реализовано путём увеличения уровня опиоидов в крови и тканях.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АД – артериальное давление;
- АМПК, АМРК – аденозинмонофосфат-активируемая протеинкиназа;
- АМФ – аденозинмонофосфат;
- АР – адренорецепторы;
- АТФ – аденозинтрифосфат;
- АФК – активные формы кислорода;
- БНР – без нарушений ритма;
- ГП – гипоксическое preconditionирование;
- ДАГ – диацилглицерол;
- ДП – двойное произведение, равное 1/1000 произведения частоты сердечных сокращений на давление, развиваемое левым желудочком;
- ДРЛЖ – давление, развиваемое левым желудочком;
- ДХФ - 2',7'-дихлорфлуоресцеин;
- ЖТ – желудочковая тахикардия;
- ЖФ - желудочковая фибрилляция;
- ЗН – зона некроза;
- ЗН/ЗР – соотношение зоны некроза к зоне риска;
- ЗР – зона риска;
- ИП – ишемическое preconditionирование;
- ИТФ – инозитолтрифосфат;
- КА – катехоламины;
- КДД - конечное диастолическое давление;
- КФК – креатинфосфокиназа;
- ЛДГ – лактатдегидрогеназа;
- МАРК – MAP-киназа, митоген-активируемая протеинкиназа;
- МЖЭ – множественные желудочковые экстрасистолы;
- митоВК_{Ca} – митохондриальный Ca²⁺-зависимый K⁺-канал большого проведения (big conductance);
- митоK_{АТФ}-канал – митохондриальный АТФ-чувствительный K⁺-канал;
- НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный;
- ОИМ – острый инфаркт миокарда;

ОР – опиоидные рецепторы;
 ПКС – протеинкиназа С;
 ПОЛ – перекисное окисление липидов;
 саркK_{АТФ}-канал – сарколеммальный АТФ-чувствительный K⁺-канал;
 САС - симпатоадреналовая система;
 СПР - саркоплазматический ретикулум;
 ТК – тирозинкиназа;
 ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия;
 ХПГГ – хроническая прерывистая гипобарическая гипоксия;
 ХСН – хроническая сердечная недостаточность;
 АИF1 - Apoptosis Inducing Factor - 1, фактор индукции апоптоза-1;
 Akt-киназа - киназа, выделенная из AKR thymoma cells;
 АНТ - адениннуклеотид-транслоказа;
 Араf1 - apoptosis protease-activating factor 1, активатор проапоптотических протеаз-1;
 Atg5 - autophagy-related protein 5, белок-регулятор с аутофагии;
 Bad - Bcl-2-associated death promoter – проапоптотический белок;
 Bak - Bcl-2 homologous antagonist/killer – проапоптотический белок;
 Bax - Bcl-2 associated protein X) – проапоптотический белок;
 Bcl-2 - B cell lymphoma 2 – семейство апоптоз-связанных белков;
 Bcl-xL - B cell lymphoma extra large) – антиапоптотический белок;
 Bid - BH 3 interacting domain death agonist - – проапоптотический белок;
 Bnip3 - Bcl-2-binding protein;
 EGFR - рецептор эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor);
 ERK^{1/2} - киназа, регулируемая внеклеточными сигналами;
 ERK -киназа - киназа, активируемая экстреклеточными стимулами;
 FABP - fat acid binding protein, белок, связывающий жирные кислоты;
 FADD - Fas-associated death domain, Fas-связанный домен клеточной гибели;
 Fas – Fas-антиген, белок клеточной поверхности 45-kD, синонимы - CD95, АРО-1;
 FasL – Fas-Ligand, лиганд Fas-антигена;
 GKS-3β - glycogen kinase sintase, киназа гликоген синтазы -3β;
 HSF-1 – фактор теплового шока -1;
 HSP70 – белок теплового шока-70;

iPLA₂ – фосфолипаза A₂;
 JAK-киназа - от Janus kinase;
 JNK-киназа - c-Jun N-terminal kinase;
 Mcl-1 - myeloid cell leukaemia-1 – антиапоптотический белок;
 MEK-киназа - mitogen-activated protein kinase kinase, митоген-активируемая протеинкиназа;
 MIF – фактор миграции макрофагов;
 mPTP-пора - mitochondrial permeability transition pore; пора, изменяющая проницаемость митохондрий;
 mTOR – рецептор рапамицина млекопитающих;
 NAD – никотинамидадениндинуклеотид;
 NCX - sodium/calcium exchanger;
 NHE1 - sodium/hydrogen exchanger, Na⁺/H⁺-антипортер;
 no-reflow – феномен невозстановленного кровотока;
 NOS – NO-синтаза – синтаза оксида азота;
 Omi/HtrA2 - high temperature requirement protease A2, белок, связывающий XIAP;
 p70s6K– 70-kDA рибосомальная протеинкиназа s6;
 PARP - поли(АДФ-рибозо)-полимераза;
 PDK-киназа – 3-phosphoinositide-dependent kinase;
 PI3-киназа – инозитолтрифосфат-активируемая протеинкиназа
 PiC - inorganic phosphate carrier, фосфатный канал;
 PHD – prolyl hydroxylase domen, пролил-4-гидроксилаза;
 PKG – протеинкиназа G;
 PKC - протеинкиназа C;
 Raf-1 – серин/треонин киназа, протонкоген;
 Ras – мембраносвязанная ГТФаза;
 RISK-киназы - Reperfusion-Induced Salvade Kinase – индушируемые реперфузией киназы выживания;
 RTK – рецепторная тирозинкиназа;
 SAPK - стресс-активируемая протеинкиназа;
 SAFE-киназы - Survivor Activating Factor Enhancement – факторы, индуцирующие механизм выживания;

SERCA2a - sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 2a, Ca^{2+} -АТФаза саркоплазматического ретикулума 2a;

Smac/DIABLO - second mitochondria-derived activator of caspase / Direct IAP Binding protein with low pI, вторичный активатор каспаз митохондриального происхождения/белок, связывающий IAP;

Src-киназа – субтип тирозинкиназ;

STAT – фактор активатор транскрипции (signal transduced and activator of transcription),

TNF α - tumor necrosis factor- α , фактор некроза опухолей- α ;

TUNEL - Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling, метода детекции апоптоза;

VDAC – voltage-associated anion channel, потенциал-зависимый анионный канал, порин;

VEGF - vascular endothelial growth factor, эндотелиальный фактор роста;

XIAP - X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein, X-связанный ингибитор апоптоза.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авакян, О. М. Симпатоадреналовая система. Методы исследования высвобождения, рецепции и захвата катехоламинов / О. М. Авакян. – Л.: Наука, 1977. – 184 с.
2. Автандилов, Г. Г. Морфометрия в патологии / Г. Г. Автандилов. – М.: Медицина, 1973. – 248 с.
3. Алекминская, Л. А. Взаимодействие энкефалинов с симато-адреналовой системой при острой ишемии миокарда в эксперименте / Л. А. Алекминская, Б. Ю. Кондратьев, В. Д. Слепушкин // Пат. физиол. и экспер. терапия. – 1986. – № 1. – С. 16-18.
4. Бернар, К. (Bernard С.) Курс общей физиологии. Жизненные явления, общие животным и растениям / К. Бернар, Пер. с франц. — Спб., 1878. — 316 с.
5. Бойцов, С. А. Динамика сердечно-сосудистой смертности среди мужчин и женщин в субъектах Российской Федерации (2002—2011 гг.) / С. А. Бойцов, И. В. Самородская // Кардиология. – 2014. – № 4. – С. 4-9.
6. Варфоломеев, С. О. Опиатные рецепторы у крыс с различной адаптацией к эмоциональному стрессу / С. О. Варфоломеев // Клинические и орг. вопр. общей и судебной психиатрии. – М., 1986. – С. 76-80.
7. Газарян, Г. А. Чрескожные коронарные вмешательства у больных острым инфарктом миокарда после безуспешного тромболизиса / Г. А. Газарян, И. В. Захаров, А. П. Голиков // Кардиология. – 2011. – № 1. – С. 50-54.
8. Гарганеева, А. А. Программа ВОЗ «Регистр острого инфаркта миокарда»: 25-летнее эпидемиологическое изучение инфаркта миокарда в среднеурбанизированном городе Западной Сибири / А. А. Гарганеева, С. А. Округин, Ю. И. Зяблов // Сиб. мед. жур. (Томск). – 2010. – Т. 25, № 2. – Вып. 1. – С. 44-48.
9. Гаркави, Л. Х. Адаптационные реакции и резистентность организма / Л. Х. Гаркави, Е. Б. Квакина, М. А. Уколова. – Ростов н/Д: Изд. РГУ, 1990. — 224 с.
10. Гривенникова, В. Г. Генерация активных форм кислорода митохондриями / В. Г. Гривенникова, А. Д. Виноградов // Успехи биологической химии. – 2013. – Т. 53. – С. 245–296

11. Добряков, В. И. Скрининговый метод оценки антистрессорного действия препаратов / В. И. Добряков // Стресс и адаптация: Тез. всесоюзн. симпозиума. – Кишинёв, 1978.- С. 172.
12. Долман, Л. Б. Влияние высокогорной гипоксии на содержание стабильных метаболитов монооксида азота в крови человека / Л. Б. Долман, А. В. Коцюрба, А. С. Хромов, В. Ф. Сагач // Нур. Мед. J. – 2004. – Т. 12, № 3-4. – С. 56-59.
13. Закощиков, К. Ф. Гипокситерапия – «Горный воздух» / К. Ф. Закощиков, С.О. Катин. М.: «Бумажная галерея», 2005. – 66 с.
14. Зенков, Н. К. Окислительный стресс: Биохимический и патофизиологический аспекты / Н. К. Зенков, В. З. Ланкин, Е. Б. Меньщикова. – М.: МАИК “Наука / Интерпериодика”, 2001. – 343 с.
15. Золоев, Г. К. Влияние синтетического энкефалина даларгина на метаболические показатели у больных инфарктом миокарда / Г. К. Золоев, В. Д. Слепушкин, Я. С. Васильцев, М. И. Титов // Кардиология. – 1987. – № 2. – С. 93–94.
16. Золоев, Г. К. Влияние энкефалинов на метаболические показатели при экспериментальном инфаркте миокарда у крыс / Г. К. Золоев, В. Д. Слепушкин, М. И. Титов // Кардиология. – 1985. – № 8. – С. 72–74.
17. Ласукова, Т. В. О роли опиоидной системы миокарда в реализации кардиопротекторного эффекта посткондиционирования / Т. В. Ласукова, Л. Н. Маслов, А. С. Горбунов // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2014. – Т. 100, № 12. – С. 1391-1398.
18. Лишманов, Ю. Б. Активация опиоидных рецепторов изменяет устойчивость сердца к аритмогенному действию ишемии и реперфузии / Ю. Б. Лишманов, Л. Н. Маслов, Г. Дж. Гросс // Пат. физиол. экспер. тер. – 2007. – № 2. - С. 21-26.
19. Лишманов, Ю. Б. Антиаритмический эффект ингибиторов энкефалиназ / Ю. Б. Лишманов, Л. Н. Маслов, Е. В. Ускина // Экспер. и клин. фармакол. - 2001. – Т. 64, № 5. – С. 28-30.
20. Лишманов, Ю. Б. Использование лигандов мю- и дельта-опиатных рецепторов для предупреждения нарушений ритма и сократимости изолированного сердца в постишемическом периоде / Ю. Б. Лишманов, Л. Н. Маслов // Кардиология. – 1998(б). – № 12. – С. 25-30.

21. Лишманов, Ю. Б. Использование энкефалинов для предупреждения стрессорных повреждений сердца в эксперименте / Ю. Б. Лишманов // Бюлл. exper. биол. и мед. – 1986. – № 9. – С. 271-272.
22. Лишманов, Ю. Б. Модулирующее влияние лигандов μ -опиатных рецепторов на адренергическое звено патогенеза стрессорного повреждения сердца / Ю. Б. Лишманов, Н. В. Нарыжная, Ю. Г. Ревинская, Л. Н. Маслов // Бюлл. exper. биол. и мед. – 1998. – Т. 126, № 11 – С. 510-512.
23. Лишманов, Ю. Б. О моделирующем влиянии эндогенных опиоидов на антиаритмический эффект при адаптации крыс к гипоксии / Ю. Б. Лишманов, Е. В. Ускина, А. В. Крылатов, Б. Ю. Кондратьев, Д. С. Угдыжекова, Л. Н. Маслов // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 1998(а). – Т. 84, № 4. – С. 363-372.
24. Лишманов, Ю. Б. О роли центральных μ - и дельта-опиатных рецепторов в реализации антиаритмического эффекта адаптации / Ю. Б. Лишманов, Л. Н. Маслов, Е. В. Ускина, А. В. Крылатов // Бюлл. exper. биол. и мед. – 1996. – Т. 122, № 10. – С. 378-381.
25. Лишманов, Ю. Б. Опиатергические механизмы антиаритмического эффекта адаптации / Ю. Б. Лишманов, Е. В. Ускина, Л. Н. Маслов, А. В. Крылатов // Бюлл. exper. биол. и мед. – 1996. – Т. 122, № 9. – С. 276-278.
26. Лишманов, Ю. Б. Опиоидергическое звено морфофункциональных изменений миокарда при стрессе и адаптации / Ю. Б. Лишманов, Н. В. Нарыжная, Л. Н. Маслов. – Томск: Изд-во “Красное знамя”, 2003. – 224 с.
27. Лишманов, Ю. Б. Опиоидные пептиды и резистентность сердца к аритмогенным воздействиям / Ю. Б. Лишманов, Л. Н. Маслов // Бюлл. exper. биол. и мед. – 2004. – Т. 138, № 8. – С. 124–131.
28. Лишманов, Ю. Б. Периферические μ -опиатные рецепторы и регуляция устойчивости сердца к аритмогенным воздействиям / Ю. Б. Лишманов, Л. Н. Маслов, А. В. Крылатов // Бюлл. exper. биол. и мед. – 1998(в). – Т. 125, № 6. – С. 650-653.
29. Лишманов, Ю. Б. Роль эндогенных опиоидных пептидов в механизмах антиаритмического эффекта адаптации / Ю. Б. Лишманов, Л. Н. Маслов, А. В. Крылатов, Е. В. Ускина // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 1996. – Т. 8, № 5-6. – С. 48-52.

30. Лишманов, Ю. Б. Экспериментальное изучение фармакологической активности лигандов опиатных рецепторов на модели адреналовых аритмий / Ю. Б. Лишманов, Л. Н. Маслов, Д. С. Угдыжекова // Экспер. и клин. фармакология. – 1995. – Т. 56, № 4. – С. 26-28.
31. Лишманов, Ю. Б. Эндогенная опиоидная система как звено срочной и долговременной адаптации организма к экстремальным воздействиям. Перспективы клинического применения опиоидных пептидов / Ю. Б. Лишманов, Л. Н. Маслов, Н. В. Нарыжная, Ж. М. Пей, Ф. Колар, И. Жанг, А. Г. Портниченко, Х. Ванг // Вестник РАМН. – 2012. – № 6. – С. 73-82.
32. Лишманов, Ю. Б. Взаимодействие опиоидной и симпатoadреналовой системы при ишемическом повреждении сердца / Ю. Б. Лишманов, Б. Ю. Кондратьев // Физиол. журн. – 1995. – Т. 81, № 5. – с. 77-85.
33. Лишманов, Ю. Б., Маслов, Л. Н. Опиоидные нейропептиды, стресс и адаптационная защита сердца. – Томск, Изд-во Томского ун-та, – 1994. – 352 с.
34. Лукьянова, Л. Д. Современные проблемы адаптации к гипоксии. Сигнальные механизмы и их роль в системной регуляции / Л. Д. Лукьянова // Пат. физиол. экспер. терапия. – 2011. – № 1. – С. 3-19.
35. Марков, В. А. Вчера, сегодня, завтра в диагностики 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. – Вып. 1. – С. 8-14.
36. Маслов, Л. Н. δ -опиатные рецепторы и устойчивость сердца к аритмогенным воздействиям / Л. Н. Маслов, Д. С. Угдыжекова, А. В. Крылатов, Ю. Б. Лишманов // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 1998. – Т. – 84, № 12. – С. 1394-1401.
37. Маслов, Л. Н. Активация δ -опиоидных рецепторов предупреждает появление необратимых повреждений кардиомиоцитов и усугубляет сократительную дисфункцию миокарда при ишемии-реперфузии / Л. Н. Маслов, А. А. Платонов, Т. В. Ласукова, Ю. Б. Лишманов, П. Олтджен, Х. Нагасе, Ю. К. Подоксенов, А. Ю. Подоксенов // Пат. физиол. и экспер. тер. – 2006. – № 4. – С. 13-17.

38. Маслов, Л. Н. Антиангинальный и антиатерогенный эффект D-Ala²-Leu⁵-Arg⁶-энкефалина (даларгин) / Л. Н. Маслов, Н. А. Федорова, В. А. Дудко, Р. С. Карпов // Клин. фармакол. и терапия. – 2003. – Т. 12, № 4. – С. 80-83.
39. Маслов, Л. Н. Влияние агониста μ - и δ -опиоидных рецепторов даларгина на сократимость миокарда и коронарную перфузию у больных, перенесших инфаркт миокарда / Л. Н. Маслов, Ю. Б. Лишманов, И. В. Максимов, И. Н. Ворожцова, И. Л. Буховец, С. М. Минин, Е. Б. Орлова, А. Г. Лавров, Е. И. Барзах, Ж. Д. Беспалова, Р. С. Карпов // Клин. фармакол. и тер. – 2004(с). – Т. 13, № 4. – С. 47-52.
40. Маслов, Л. Н. Значение опиоидных рецепторов в регуляции толерантности сердца к патогенному действию длительной ишемии-реперфузии *in vivo* / Л. Н. Маслов, Е. И. Барзах, А. В. Крылатов, С. А. Браун, П. Р. Олтджен, М. Говиндашвами, Г. А. Чернышева, Н. В. Соленкова, А. Ю. Лишманов, С. Ю. Цибульников, Т. Криг, Е. Жанг // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2009. – Т. 95, № 6. – С. 563-572.
41. Маслов, Л. Н. Лиганды опиатных рецепторов, сигма рецепторов и коррекция электрической нестабильности сердца при постинфарктном кардиосклерозе / Л. Н. Маслов, Ю. Б. Лишманов, Н. В. Нарыжная, А. В. Крылатов, С. В. Там // Экспер. и клин. фармакол. – 2001. – Т. 64, № 1. – С. 38-41.
42. Маслов, Л. Н. Новые подходы к профилактике и терапии ишемических и реперфузионных повреждений сердца при остром инфаркте миокарда / Л. Н. Маслов // Сиб. мед. жур. (Томск). – 2010. – Т. 25, № 2. – С. 17-24.
43. Маслов, Л. Н. Об участии центральных и периферических κ -опиатных рецепторов в механизме антиаритмического действия производных бензенацетамида / Л. Н. Маслов, Ю. Б. Лишманов, А. В. Крылатов, Д. С. Угдыжекова // Эксперим. и клинич. фармакология. – 1996. – Т. 59, № 6. – С. 20-22.
44. Маслов, Л. Н. Об участии эндогенных агонистов μ - и δ -опиатных рецепторов в механизмах антиаритмического эффекта адаптации. / Л. Н. Маслов, А. В. Крылатов, Ю. Б. Лишманов // Бюлл. exper. биол. и мед. – 1996. – Т. 121, № 1. – С. 24-25.
45. Маслов, Л. Н. Роль протеинкиназ в формировании адаптивного феномена ишемического посткондиционирования сердца / Л. Н. Маслов, А. Г. Мрочек, И. А. Щепёткин, Дж. П. Хедрик, Л. Хануш, Е. И. Барзах, А. Ю. Лишманов,

- А. С. Горбунов, С. Ю. Цибульников, А. Н. Байков // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова – 2013. – Т. 99, № 4. – С. 433-452.
46. Маслов, Л. Н. Роль трансактивации рецепторов в кардиопротекторных эффектах прекондиционирования и посткондиционирования / Л. Н. Маслов, Дж. П. Хедрик, Р. Мешоулам, А. В. Крылатов, А. Ю. Лишманов, Е. И. Барзах, Н. В. Нарыжная, И. Жанг // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова – 2012. – Т. 98. – № 3. – С. 305-317.
47. Маслов, Л. Н. Роль эндогенной опиоидной системы в регуляции неспецифической устойчивости миокарда к реперфузионному повреждению / Л. Н. Маслов, Т. В. Ласукова, Ю. Б. Лишманов // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 1998. – Т. 84, № 5-6. – С. 490-499.
48. Маслов, Л. Н. Сигнальный механизм NO-индуцированного повышения толерантности сердца к ишемии/реперфузии / Л. Н. Маслов, Ф. Колар, Е. И. Барзах // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2009. – Т. 95, № 11. – С. 1175-1189.
49. Маслов, Л. Н. Сигнальный механизм кардиопротекторных эффектов опиоидов / Л. Н. Маслов, Л. Хануш, Ж.-П. Пей, А. В. Крылатов, Х. Ванг, Н. В. Нарыжная, Е. И. Барзах, А. Ю. Лишманов // Экспер. клин. фармакол. – 2013. – Т. 76, № 3. – С. 41-48.
50. Маслов, Л. Н. Стимуляция $\sigma 1$ -рецепторов способствует ослаблению реперфузионного оглушения миокарда / Л. Н. Маслов, Ю. Б. Лишманов // Известия АН. Серия биологическая. – 2004а. – № 2. – С. 209-216.
51. Маслов, Л. Н. Эндогенные опиоидные пептиды и антиаритмический эффект адаптации к стрессу / Л. Н. Маслов, Н. В. Нарыжная, А. В. Крылатов, Г. Дж. Гросс // Пат. физиол. и exper. тер. – 2004b. – № 4. – С. 11-14.
52. Маслова Л. В. Зависимость степени стрессорных повреждений сердца от изменения уровня эндогенного бета-эндорфина в ходе предварительной адаптации / Л. В. Маслова, Ю. Б. Лишманов // Бюлл. exper. биол. и мед. – 1989. – № 6. – С. 662-665.
53. Меерсон, Ф. З. Влияние адаптации организма к коротким стрессорным воздействиям на реализацию стресс-реакции, нарушения метаболизма и сократительной функции сердца, вызванные длительным эмоционально-болевым

стрессом / Ф. З. Меерсон, В. В. Малышев, Е. Н. Екимов, В. А. Петрова, В. И. Лифантьев // Вопр. мед. химии. –1986. – № 1. – С. 76-80.

54. Меерсон, Ф. З. Адаптация к стрессорным ситуациям и стресс-лимитирующие системы организма / Ф. З. Меерсон // Физиология адаптационных процессов: руководство по физиологии. – М.: Наука, 1986. – С. 521-631.

55. Меерсон, Ф. З. Адаптация к стрессорным ситуациям и физическим нагрузкам / Ф. З. Меерсон, М. Г. Пшенникова. – М. : Медицина, 1988. – 252 с.

56. Меерсон, Ф. З. Защитные эффекты адаптации и некоторые перспективы развития адаптационной медицины / Ф. З. Меерсон // Успехи физиол. наук. - 1991. – Т. 22, № 2. – С. 52-89.

57. Меерсон, Ф. З. Повышение $\alpha 1$ -адренореактивности сердца крыс при адаптации к периодической гипоксии / Ф. З. Меерсон, Ю. Н. Копылов, Г. Н. Балденков // Бюлл. exper. биол. и мед. - 1991. – Т. 111, № 6. – С. 570-572.

58. Меерсон, Ф. З. Противоположное влияние адаптаций к непрерывной и периодической гипоксии на антиоксидантные ферменты / Ф. З. Меерсон, Ю. В. Архипенко, И. И. Рожницкая, В. В. Диденко, Т. Г. Сазонтова // Бюлл. exper. биол. и мед. – 1992. – № 7. – С. 14-15.

59. Меерсон, Ф. З. Реабилитационный эффект адаптации к гипоксии при экспериментальном постинфарктном кардиосклерозе / Ф. З. Меерсон, Е. Е. Устинова // Кардиология. – 1987. – № 3. – С. 85-89.

60. Меерсон, Ф. З. Предупреждение активации перекисного окисления липидов и повреждения антиоксидантных систем миокарда при стрессе и экспериментальной инфаркте / Ф. З. Меерсон, В. Е. Каган, В. В. Архипенко // Кардиология. – 1981. – № 12. – С. 55-60.

61. Меньщикова, Е. Б. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / Е. Б. Меньщикова, В. З. Ланкин, Н. К. Зенков, И. А. Бондарь, Н. Ф. Круговых, В. А. Труфакин – М.: «Слово», 2006. – 556 с.

62. Нарыжная, Н. В. Влияние гипоксического прекодиционирования на показатели стресс-реакции у крыс / Н. В. Нарыжная, Л. Н. Маслов, Е. А. Вычужанова, А. С. Семенцов, Ю. К. Подоксенов, А. Г. Портниченко, Ю. Б. Лишманов // Бюлл. exper. биол. и мед. – 2015. – Т. 159, №4. – С. 439–441.

63. Нарыжная, Н. В. К вопросу о рецепторной специфичности опиоидергического повышения электрической стабильности сердца при адаптации к стрессу и гипобарической гипоксии / Н. В. Нарыжная, Л. Н. Маслов, А. С. Таюрская, Ю. Б. Лишманов // Сиб. мед. жур. (Томск). – 2011. – Т. 26, № 4 (вып. 1). – С. 143-147.
64. Нарыжная, Н. В. Роль периферических и центральных μ -опиатных рецепторов в модуляции адренергического повреждения сердца при стрессе / Н. В. Нарыжная, Л. Н. Маслов, Ю. Г. Ревинская, Ю. Б. Лишманов // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 1998. – Т. 84, № 8. – С. 791-797.
65. Нарыжная, Н. В. Роль сарколеммальных и митохондриальных K_{ATP} -каналов в реализации кардиопротекторного и антиаритмического эффектов разных режимов гипобарической адаптации / Н. В. Нарыжная, Я. Некар, Л. Н. Маслов, Ю. Б. Лишманов, Ф. Колар, Т. В. Ласукова // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова – 2009. – Т. 95, № 8. – С. 837-849.
66. Оганов, Р. Г. Смертность от сердечно-сосудистых и других неинфекционных заболеваний среди трудоспособного населения России / Р. Г. Оганов, Г. Я. Масленникова // Кардиоваскуляр. терапия и профилактика. - 2002. - Т. 1, №3. - С. 48.
67. Оганов, Р. Г. Инфаркт миокарда. Предупреждение и реабилитация / Р. Г. Оганов. - М. «Эксмо», 2015. – 46 с.
68. Поляков, Р. С. 12-месячные результаты чрескожных коронарных вмешательств у больных ишемической болезнью сердца в сочетании с сахарным диабетом при использовании стентов, покрытых сиролimusом и эверолимусом / Р. С. Поляков, Ю. М. Саакян, Г. В. Марданян, М. В. Пурецкий, А. А. Пиркова, А. В. Болтенков, С. М. Наумов, С. А. Абугов // Кардиология. – 2014. – № 8. – С. 4-9.
69. Сыркин, А. С. Инфаркт миокарда / А. С. Сыркин. – М. : "Медицинское информационное агентство", 2003. - 466 с.
70. Угдыжекова, Д. С. К вопросу о специфичности антиаритмического эффекта агонистов опиатных $\kappa 1$ -рецепторов / Д. С. Угдыжекова, Л. Н. Маслов, А. В. Крылатов, Ю. Б. Лишманов, С. В. Там // Экспер. и клин. фармакол. – 2001. – Т. 64, № 4. – С. 17-20.

71. Чазов, Е. И. Как уменьшить смертность от сердечно-сосудистых заболеваний / Е. И. Чазов // Тер. архив. – 2008. – Т. 80, № 8. – С. 11-16.
72. Чазов, Е. И. Фундаментальная медицина как основа инноваций в медицинской практике / Е. И. Чазов // Терапевтический архив. – 2013. – № 8. – С. 6-7.
73. Чернявский, А. М. Качество жизни больных ишемической болезнью сердца с выраженной дисфункцией миокарда левого желудочка при медикаментозном и хирургическом методах лечения / А. М. Чернявский, О. С. Ефанова, В. У. Эфендиев, Д. А. Сирота, Е. М. Аляпкина // Кардиология. – 2015. – №4. – С. 5-13
74. Шальнова, С. А. Анализ смертности от сердечно-сосудистых заболеваний в 12 регионах Российской Федерации, участвующих в исследовании «Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний в различных регионах» / С. А. Шальнова, А. О. Конради, Ю. А. Карпов, А. В. Концевая, А. Д. Деев, А. В. Капустина, М. Б. Худяков, Е. В. Шляхто, С. А. Бойцов // Росс. кардиолог. жур. – 2012. – Т. 5, № 97. – С. 6-11.
75. Шляхто, Е. В. Пре- и посткондиционирование как способы кардиоцитопротекции: патофизиологические и клинические аспекты / Е. В. Шляхто, Е. М. Нифонтов, М. М. Галагудза // Сердечная недостаточность. – 2008. – Т. 9, № 1. – С. 4–10.
76. Abbruscato, T. J. Blood-brain barrier permeability and bioavailability of a highly potent and mu-selective opioid receptor antagonist, CTAP: comparison with morphine / T. J. Abbruscato, S. A. Thomas, V. J. Hruby, T. P. Davis // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 1997. – Vol. 280, № 1. – P. 402–409.
77. Acker, T. The good, the bad and the ugly in oxygen-sensing: ROS, cytochromes and prolyl-hydroxylases / T. Acker, J. Fandrey, H. Acker // Cardiovasc. Res. 2006. – Vol. 71, № 2. – P. 195-207.
78. Adluri, R. S. Cardioprotective efficacy of a novel antioxidant mix VitaePro against ex vivo myocardial ischemia-reperfusion injury / R. S. Adluri, M. Thirunavukkarasu, L. Zhan, N. Maulik, K. Svennevig, M. Bagchi, G. Maulik // Cell. Biochem. Biophys. – 2013. – Vol. 67, № 2. – P. 281-286.
79. Akki, A. Creatine kinase overexpression improves ATP kinetics and contractile function in postischemic myocardium / A. Akki, J. Su, T. Yano, A. Gupta, Y. Wang, M.

- K. Leppo, V. P. Chacko, C. Steenbergen, R. G. Weiss // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2012. – Vol. 303. – P. H844–H852.
80. Alanova, P. Role of NO/cGMP signaling pathway in cardiac ischemic tolerance of chronically hypoxic rats / P. Alanova, F. Kolar, B. Ostadal, J. Neckar // *Physiol. Res.* – 2015. – Vol. 64, № 5. – P. 783-778.
81. Aldakkak, M. Inhibited mitochondrial respiration by amobarbital during cardiac ischaemia improves redox state and reduces matrix Ca^{2+} overload and ROS release / M. Aldakkak, D. F. Stowe, Q. Chen, E. J. Lesnefsky, A. K. Camara // *Cardiovasc. Res.* – 2008. – Vol. 77, № 2. – P. 406-415.
82. Andreka, G. Remote ischaemic postconditioning protects the heart during acute myocardial infarction in pigs. / G. Andreka, M. Vertesaljai, G. Szantho, G. Font, Z. Piroth, G. Fontos // *Heart.* – 2007. – Vol. 93, № 6. – P. 749–752.
83. Argaud, L. Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury / L. Argaud, O. Gateau-Roesch, D. Muntean, L. Chalabreysse, J. Loufouat, D. Robert, M. Ovize // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2005. – Vol. 38, № 2. – P. 367–374.
84. Athea, Y. AMP-activated protein kinase $\alpha 2$ deficiency affects cardiac cardiolipin homeostasis and mitochondrial function / Y. Athea, B. Viollet, P. Mateo, D. Rousseau, M. Novotova, A. Garnier, S. Vaulont, J.R. Wilding, A. Grynberg, V. Veksler, J. Hoerter, R. Ventura-Clapier // *Diabetes.* – 2007. – Vol. 56, № 3. – P. 786–794.
85. Babbar, L. Fenofibrate attenuates impaired ischemic preconditioning-mediated cardioprotection in the fructose-fed hypertriglyceridemic rat heart / L. Babbar, N. Mahadevan, P. Balakumar // *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.* – 2013. – Vol. 386, № 4. – P. 319-329.
86. Baines, C. P. How and when do myocytes die during ischemia and reperfusion: the late phase / C. P. Baines // *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* – 2011. – Vol. 16, № 3-4. – P. 239-243.
87. Baker, J. E. Adaptation to chronic hypoxia confers tolerance to subsequent myocardial ischemia by increased nitric oxide production. / J. E. Baker, P. Holman, B. Kalyanaraman, O. W. Griffith, Jr. K. A. Pritchard // *Ann. N-Y Acad. Sci.* – 1999. – Vol. 874. - P. 236-253.

88. Bali, A. Stress and opioids: role of opioids in modulating stress-related behavior and effect of stress on morphine conditioned place preference. / A. Bali, P. K. Randhawa, A. S. Jaggi // *Neurosci. Biobehav. Rev.* – 2015. – Vol. 51. – P. 138-150.
89. Balková, P. N-acetylcysteine treatment prevents the up-regulation of MnSOD in chronically hypoxic rat hearts / P. Balková, M. Hlaváčková, M. Milerová, J. Neckář, F. Kolář, F. Novák, O. Nováková // *Physiol. Res.* – 2011. – Vol. 60, № 3. – P. 467-474.
90. Barnholt, K. E. Endocrine responses to acute and chronic high-altitude exposure , № 4,300 meters: modulating effects of caloric restriction / K. E. Barnholt, A. R. Hoffman, P. B. Rock, S. R. Muza, C. S. Fulco, B. Braun, L. Holloway, R. S. Mazzeo, A. Cymerman, A. L. Friedlander // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2006. – Vol. 290, № 6. – P. E1078-E1088.
91. Barron, B. A. Cardiac opioids. / B. A. Barron // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 2000. – Vol. 224, № 1. – P. 1-7.
92. Beguin, P. C. Intermittent hypoxia-induced delayed cardioprotection is mediated by PKC and triggered by p38 MAP kinase and Erk1/2. / P. C. Beguin, E. Belaidi, D. Godin-Ribuot // *Mol. Cell. Cardiol.* – 2007. – Vol. 42, № 2. – P. 343-351.
93. Bell, R. M. Pivotal role of NOX-2-containing NADPH oxidase in early ischemic preconditioning./ R. M. Bell, A. C. Cave, S. Johar, D. J. Hearse, A. M. Shah, M. J. Shattock // *FASEB J.* – 2005. – Vol. 19, № 14. – P. 2037-2039.
94. 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 // *Cardiovasc. Research.* – 2001. – Vol. 52. – P. 274–280.
95. Beltowski, J. Transactivation of ErbB receptors by leptin in the cardiovascular system: mechanisms, consequences and target for therapy. / J. Beltowski, A. Jazmroz-Wisniewska // *Curr. Pharm. Des.* – 2014. – Vol. 20, № 4. – P. 616-624.
96. Bencsik, P. Role of iNOS and peroxynitrite-matrix metalloproteinase-2 signaling in myocardial late preconditioning in rats / P. Bencsik, K. Kupai, Z. Giricz, A. Görbe, J. Pipis, Z. Murlasits, G. F. Kocsis, Z. Varga-Orvos, L. G. Puskás, C. Csonka, T. Csont, P. Ferdinandy // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2010. – Vol. 299, № 2. – H. H512-H518.

97. Benuck, M. Met-enkephalin-Arg6-Phe7 metabolism: conversion to Met-enkephalin by brain and kidney dipeptidyl carboxypeptidases / M. Benuck, M. J. Berg, N. Marks // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1981. – Vol. 99, № 2. – P. 630-636.
98. Bienkowski, P. Ethanol-reinforced behaviour in the rat: effects of naltrexone / P. Bienkowski, W. Kostowski, E. Koros // *Eur. J. Pharmacol.* – 1999. – Vol. 374, № 3. – P. 321-327.
99. Bliksoen, M. Mitochondrial DNA damage and repair during ischemia-reperfusion injury of the heart / M. Bliksoen, A. Baysa, L. Eide, M. Bjoras, R. Suganthan, J. Vaage, K. O. Stenslokken, G. Valen // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2015. – Vol. 78. – P. 9-22.
100. Bohuslavova, R. Gene expression profiling of sex differences in HIF1-dependent adaptive cardiac responses to chronic hypoxia. / R. Bohuslavova, F. Kolar, L. Kuthanova, J. Neckar, A. Tichopad, G. Pavlinkova // *J. Appl. Physiol.* – 2010 – Vol. 109, №4. – P. 1195-1202.
101. Bolli, R. Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research / R. Bolli // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2001. – Vol. 33. – P. 1897-1918.
102. Bolli, R. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning / R. Bolli, E. Marbán // *Physiol. Rev.* – 1999. – Vol. 79, № 2. – P. 609-634.
103. Borchert, G. H. Mitochondrial BKCa channels contribute to protection of cardiomyocytes isolated from chronically hypoxic rats./ G. H. Borchert, C. Yang, F. Kolar // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2011. – Vol. 300, № 2. – P. H507-H513.
104. Borchert, G. H. Pharmacological activation of mitochondrial BK(Ca) channels protects isolated cardiomyocytes against simulated reperfusion-induced injury / G. H. Borchert, M. Hlaváčková, F. Kolář // *Exp. Biol. Med.* – 2013. – Vol. 238, № 2. – P. 233-241.
105. Borchini, E. Role of NADPH oxidase in H9c2 cardiac muscle cells exposed to simulated ischaemia-reperfusion./ E. Borchini, M. Parri, L. Papucci, M. Becatti, N. Nassi, P. Nassi, C. Nediani // *J. Cell. Mol. Med.* – 2009. – Vol. 13. – P. 2724-2735.
106. Borger, D. R. AMP-activated protein kinase is essential for survival in chronic hypoxia. *Biochem.* / D. R. Borger, L. C. Gavrilescu, M. C. Bucur, M. Ivan, J. A. DeCaprio // *Biophys. Res. Commun.* – 2008. – Vol. 370, № 2. – P. 230–234.

107. Borutaite, V. In the eye of the storm: mitochondrial damage during heart and brain ischaemia. / V. Borutaite, A. Toleikis, G. C. Brown // *FEBS J.* – 2013. – Vol. 280, № 20. – P. 4999-5014.
108. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilized the principle of protein dye binding/ M. M. Bradford // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.
109. Braunwald, E. Clinical efforts to reduce myocardial infarct size - the next step / E. Braunwald // *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* – 2011. – Vol. 16, № 3-4. – P. 349-353.
110. Braunwald, E. The war against heart failure: the Lancet lecture / E. Braunwald // *Lancet.* – 2015. – V. 385, № 9970). – P. 812-824.
111. Brookes, P. S. Concentration-dependent effects of nitric oxide on mitochondrial permeability transition and cytochrome c release / P. S. Brookes, E. P. Salinas, K. Darley-USmar, J. P. Eiserich, B.A. Freeman, V. M. Darley-USmar, P. G. Anderson // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275. – P. 20474-20479.
112. Brooks, A. G. Characteristics of ectopic triggers associated with paroxysmal and persistent atrial fibrillation: evidence for a changing role / A. G. Brooks, G. Rangnekar, A. N. Ganesan, I. Salna, M. E. Middeldorp, P. Kuklik, M. Baumert, K. C. Roberts-Thomson, P. Sanders // *Heart Rhythm.* – 2012. – Vol. 9, № 9. – P. 1367-1374.
113. Bryan, N. S. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples / N. S. Bryan, M. B. Grisham // *Free Radic. Biol. Med.* – 2007. – Vol. 43, № 5. – P. 645-657.
114. Budas, G. R. Mitochondrial import of PKCepsilon is mediated by HSP90: a role in cardioprotection from ischaemia and reperfusion injury / G. R. Budas, E. N. Churchill, M. H. Disatnik, L. Sun, D. Mochly-Rosen // *Cardiovasc. Res.* – 2010. – Vol. 88. – P. 83–92. doi: 10.1093/cvr/cvq154.
115. Bueno, M. Nitrite signaling in pulmonary hypertension: mechanisms of bioactivation, signaling, and therapeutics / M. Bueno, J. Wang, A. L. Mora, M. T. Gladwin // *Antioxid. Redox Signal.* – 2013. – Vol. 18, № 14. – P. 1797–1809.
116. Buja, L. M. The pathobiology of acute coronary syndromes: clinical implications and central role of the mitochondria / L. M. Buja // *Tex. Heart. Inst. J.* – 2013. – Vol. 40, № 3. – P. 221-228.

117. Bulluck, H. Ischaemic conditioning: are we there yet? / H. Bulluck, D. J. Hausenloy // *Heart*. – 2015. – Vol. 101, № 13. – P. 1067-1077.
118. Butler, T. L. Dysfunction induced by ischemia versus edema: does edema matter? / T. L. Butler, J. R. Egan, F. G. Graf, C. G. Au, A. C. McMahon, K. N. North // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 2009. – Vol. 138, № 1. – P. 141–147.
119. Caffrey J. L., Hodges D. Inhibition of the enzymatic degradation of met-enkephalin by catecholamines / J. L. Caffrey, D. Hodges // *Endocrinology*. – 1982. – Vol. 110, № 1. – P. 291-293.
120. Caffrey, J. L. Enkephalin / catecholamine interactions in cardiac, sceletal, and intestinal muscle / J. L. Caffrey // *J. Amer. Osteopath. Assoc.* – 1984. – Vol.84, № 1. Suppl. – P.135-142.
121. Cai, Z. Hypoxia-inducible factor 1 is required for remote ischemic preconditioning of the heart / Z. Cai, W. Luo, H. Zhan, G. L. Semenza // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2013. – Vol.110, № 43. – P. 17462-17467.
122. Calvert, J. W. Acute Metformin Therapy Confers Cardioprotection Against Myocardial Infarction Via AMPK-eNOS–Mediated Signaling / J. W. Calvert, S. Gundewar, S. Jha, J. J. M. Greer, W. H. Bestermann, R. Tian, D. J. Lefer // *Diabetes*. – 2008. – Vol. 57. – P. 696–705.
123. Cameron, J. S. Role of ATP sensitive potassium channels in long term adaptation to metabolic stress / J. S. Cameron, R. Baghday // *Cardiovasc. Res.* – 1994. – Vol. 28. – P. 788-796.
124. Cao, C. M. Calcium-activated potassium channel triggers cardioprotection of ischemic preconditioning / C. M. Cao, Q. Xia, Q. Gao, M. Chen, T. M. Wong // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2005b. – Vol. 312. – P. 644–650.
125. Cao, C. M. The KCa channel as a trigger for the cardioprotection induced by kappa-opioid receptor stimulation - its relationship with protein kinase C / C. M. Cao, M. Chen, T. M. Wong // *Br. J. Pharmacol.* – 2005a. – Vol. 45, № 7. – P. 984-991.
126. Cao, Z. Activation of δ - and κ -opioid receptors by opioid peptides protects cardiomyocytes via KATP channels / Z. Cao, L. Liu, D. M. Van Winkle // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2003. – Vol. 285, № 3. – P. H1032-H1039.
127. Carod-Artal, F. J. High-altitude headache and acute mountain sickness. / F. J. Carod-Artal // *Neurologia*. – 2014. – 29, № 9. – P. 533-540.

128. Chan, A. Y. M. Resveratrol Inhibits Cardiac Hypertrophy via AMP-activated Protein Kinase and Akt / A. Y. M. Chan, V. W. Dolinsky, C. - L. M. Soltys, B. Viollet, S. Baksh, P. E. Light, J. R. B. Dyck // *The journal of biological chemistry*. – 2008. – Vol. 283, № 3. – P. 24194–24201.
129. Chance, B. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state / B. Chance, G. R. Williams // *J. Biol. Chemistry*. – 1955. – Vol. 217, № 1. – P. 409-27.
130. Charlagorla, P. Loss of plasma membrane integrity, complement response and formation of reactive oxygen species during early myocardial ischemia/reperfusion. / P. Charlagorla, J. Liu, M. Patel, J. I. Rushbrook, M. Zhang // *Mol. Immunol.* – 2013. – Vol. 56, № 4. – P. 507-512.
131. Chen, H. P. Anoxic preconditioning up-regulates 14-3-3 protein expression in neonatal rat cardiomyocytes through extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 / H. P. Chen, M. He, Y. L. Xu, Q. R. Huang, G. H. Zeng, D. Liu, Z. P. Liao // *Life Sci.* – 2007. – Vol. 81, №5. – P. 372-379.
132. Chen, Q. Modulation of electron transport protects cardiac mitochondria and decreases myocardial injury during ischemia and reperfusion / Q. Chen, A. K. Camara, D. F. Stowe, C. L. Hoppel, E. J. Lesnefsky // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2007. – Vol. 292. – P. 137–147.
133. Chen, S. The Na⁺/Ca²⁺ exchanger in cardiac ischemia/reperfusion injury / S. Chen, S. Li // *Med Sci Monit.* – 2012. – Vol. 18, №11. – P.RA161-165.
134. Chen, Y. EGF transregulates opioid receptors through EGFR-mediated GRK2 phosphorylation and activation / Y. Chen, H. Long, Z. Wu, X. Jiang, L. Ma // *Mol. Biol. Cell.* – 2008. – Vol. 19, №7. – P.2973-2983.
135. Chida, J. An efficient extraction method for quantitation of adenosine triphosphate in mammalian tissues and cells / J. Chida, K. Yamane, T. Takei, H. Kido // *Anal. Chim. Acta.* – 2012. – Vol. 727. – P.8-12.
136. Chien, G. L. Naloxone blockade of myocardial ischemic preconditioning is stereoselective / G. L. Chien, D. M. Van Winkle // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 1996. – Vol. 28, №9. – P.1895-900.
137. Choi, Y. H. Calcium sensitisation impairs diastolic relaxation in post-ischaemic myocardium: implications for the use of Ca(2+) sensitising inotropes after cardiac

- surgery / Y. H. Choi, D. B. Cowan, T. C. Wahlers, R. Hetzer, P. J. Del Nido, C. Stamm // *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* – 2010. – Vol. 37, №2. – P.376-383.
138. Chou, H. C. 5-Methoxytryptophan-dependent protection of cardiomyocytes from heart ischemia reperfusion injury. / H. C. Chou, H. L. Chan // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2014. – Vol. 543. – P. 15-22.
139. Chouchani, E. T. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS / E. T. Chouchani, V. R. Pell, E. Gaude, D. Aksentijevic, S. Y. Sundier, E. L. Robb [et al] // *Nature.* – 2014. – Vol. 515, № 7527. – P. 431-435.
140. Chung, H. Different contribution of extent of myocardial injury to left ventricular systolic and diastolic function in early reperfused acute myocardial infarction / H. Chung, J. H. Yoon, Y. W. Yoon, C. H. Park, E. J. Ko, J. Y. Kim, P. K. Min, T. H. Kim, B. K. Lee, B. K. Hong, S. J. Rim, H. M. Kwon, E. Y. Choi // *Cardiovasc. Ultrasound.* – 2014. – Vol. 12. – P. 6.
141. Churchill, E. N. Ischaemic preconditioning improves proteasomal activity and increases the degradation of dPKC during reperfusion / E. N. Churchill, J. C. Ferreira, P. C. Brum, L. I. Szweda, D. Mochly-Rosen // *Cardiovascular Research.* – 2010. – Vol. 85. – P. 385–394.
142. Churchill, E. N. The roles of PKCdelta and epsilon isoenzymes in the regulation of myocardial ischaemia/reperfusion injury / E. N. Churchill, D. Mochly-Rosen // *Biochem Soc Trans.* – 2007. – Vol. 35. – P. 1040–1042.
143. Chytilova, A. Tumour necrosis factor- α contributes to improved cardiac ischaemic tolerance in rats adapted to chronic continuous hypoxia / A. Chytilova, G. H. Borchert, P. Mandíková-Alánová, M. Hlavackova, L. Kopkan, M. A. Khan, J. D. Imig, F. Kolar, J. Neckar // *Acta Physiol. (Oxf).* – 2015. – Vol. 214, № 1. – P. 97-108.
144. Cohen, M. V. Is it time to translate ischemic preconditioning's mechanism of cardioprotection into clinical practice? / M. V. Cohen, J. M. Downey // *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* – 2011. – Vol. 16, № 3-4. – P. 273–280.
145. Cohen, M. V. Preconditioning-mimetics bradykinin and DADLE activate PI3-kinase through divergent pathways / M. V. Cohen, S. Philipp, T. Krieg, L. Cui, A. Kuno, V. Solodushko, J. M. Downey // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2007. – Vol. 42, №4. – P. 842-851.

146. 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, №14. – P. 1895-903.
147. Correa, F. Inhibition of the nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway limited the cardioprotective effect of post-conditioning in hearts with apical myocardial infarctio / F. Correa, M. Buelna-Chontal, V. Chagoya, G. García-Rivas, R. María Viguera, J. Pedraza-Chaverri, W. Ramsés García-Nino, R. Hernández-Pando, J. Carlos León-Contreras, C. Zazueta // *Eur. J. Pharmacol.* – 2015. – Vol. 765. – P. 472-481.
148. Costa, A. D. cGMP signaling in pre- and post-conditioning: the role of mitochondria / A. D. Costa, S. V. Pierre, M. V. Cohen, J. M. Downey, K. D. Garlid // *Cardiovasc. Res.* – 2008. – Vol. 77. – P. 344–352.
149. Costa, A. D. Intramitochondrial signaling: interactions among mitoKATP, PKCepsilon, ROS, and MPT / A. D. Costa, K. D. Garlid // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2008. – Vol. 295. – P. H874–H882.
150. Costa, A. D. Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria / A. D. Costa, K. D. Garlid, I. C. West, T. M. Lincoln, J. M. Downey, M. V. Cohen, S. D. Critz // *Circ. Res.* – 2005. – Vol. 97, №4. – P. 329-336.
151. 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, №30. – P. 20801-20808.
152. Cox, B. M. Challenges for opioid receptor nomenclature: IUPHAR Review 9 / B. M. Cox, M. J. Christie, L. Devi, L. Toll, J. R. Traynor // *Br. J. Pharmacol.* – 2015. – Vol. 172, № 2. – P. 317-323.
153. 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 / R. M. Crawford, S. Jovanović, G. R. Budas, A. M. Davies, H. Lad, R. H. Wenger, K. A. Robertson, D. J. Roy, H. J. Ranki, A. Jovanović // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278, №33. – P. 31444–31455.
154. Cristescu, S. M. Harefield BIOTRESS study investigators. Real-time monitoring of endogenous lipid peroxidation by exhaled ethylene in patients undergoing cardiac surgery / S. M. Cristescu, R. Kiss, St. Hekkert, M. Dalby, F. J. Harren, T. H. Risby, N.

- Marczin // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* – 2014. – Vol. 307, № 7. – P. L509-L515.
155. Crompton, M. Inhibition by cyclosporin A of a Ca^{2+} -dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress / M. Crompton, H. Ellinger, A. Costi // *Biochem. J.* – 1988. – Vol. 255, №1. – P. 357-360.
156. Cung, T. T. Cyclosporine before PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction. / T. T. Cung, O. Morel, G. Cayla, G. Rioufol, D. Garcia-Dorado, Angoulvant D. [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2015. – Vol. 373, № 11. – P. 1021-1031.
157. Das, D. K. Preconditioning potentiates redox signaling and converts death signal into survival signal / D. K. Das, N. Maulik // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2003. – Vol. 420, № 2. – P. 305-311.
158. Das, D.K. Cardiac genomic response following preconditioning stimulus. / D. K. Das, N. Maulik // *Cardiovasc. Res.* – 2006. – Vol. 70, № 2. – P. 254-263.
159. Das, S. Angiotensin preconditioning of the heart: evidence for redox signaling / S. Das, R. M. Engelman, N. Maulik, D. K. Das // *Cell Biochem. Biophys.* – 2006a. – Vol. 44, №1. – P. 103-110.
160. Das, S. Redox regulation of angiotensin II preconditioning of the myocardium requires MAP kinase signaling / S. Das, H. Otani, N. Maulik, D. K. Das // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2006b. – Vol. 41, №2. – P. 248-255.
161. Debevec, T. Prooxidant/Antioxidant Balance in Hypoxia: A Cross-Over Study on Normobaric vs. Hypobaric "Live High-Train Low" / T. Debevec, V. Pialoux, J. Saugy, L. Schmitt, R. Cejuela, P. Mury, S. Ehrström, R. Faiss, G.P. Millet // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10, № 9. – P. e0137957.
162. Dengjel, J. Receptor tyrosine kinase signaling: a view from quantitative proteomics / J. Dengjel, I. Kratchmarova, B. Blagoev // *Mol. Biosyst.* – 2009. – Vol. 5, № 10. – P. 1112–1121.
163. Denning, G. M. Proenkephalin expression and enkephalin release are widely observed in non-neuronal tissues. / G. M. Denning, L. W. Ackermann, T. J. Barna, J. G. Armstrong, L. L. Stoll, N. L. Weintraub, E. W. Dickson // *Peptides.* – 2008. – Vol. 29, № 1. – P. 83-92.
164. Devidze, N. Presynaptic actions of opioid receptor agonists in ventromedial hypothalamic neurons in estrogen- and oil-treated female mice/ N. Devidze, Q. Zhang, J.

- Zhou, A. W. Lee, S. Pataky, L. M. Kow, D. W. Pfaff // *Neuroscience*. – 2008. – Vol. 152, № 4. – P. 942-949.
165. Dhar, P. Autonomic cardiovascular responses in acclimatized lowlanders on prolonged stay at high altitude: a longitudinal follow up study. / P. Dhar, V. K. Sharma, K. B. Hota, S. K. Das, S. K. Hota, R. B. Srivastava, S. B. Singh // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9, № 1. – P. e84274.
166. Dhawan, B. N. International union of pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. / B. N. Dhawan, F. Cesselin, R. Raghubir // *Pharmacol. Rev.* – 1996. – Vol. 48, № 4. – P. 567–592.
167. Di Lisa, F. Mitochondrial pathways for ROS formation and myocardial injury: the relevance of p66(Shc) and monoamine oxidase / F. Di Lisa, N. Kaludercic, A. Carpi, R. Menabò, M. Giorgio // *Basic Res Cardiol.* – 2009. – Vol. 104, №2. – P. 131-139.
168. Dick, T. E. Cardiorespiratory coupling: common rhythms in cardiac, sympathetic, and respiratory activities / T. E. Dick, Y. H. Hsieh, R. R. Dhingra, D. M. Baekey, R. F. Galan, E. Wehrwein, K. F. Morris // *Prog. Brain Res.* – 2014. – Vol. 209. – P. 191-205.
169. Dikalov, S. I. Methods for detection of mitochondrial and cellular reactive oxygen species / S. I. Dikalov, D. G. Harrison // *Antioxid. Redox Signal.* – 2014. – Vol. 20, № 2. – P. 372-382.
170. Dimassi, N. Relations between reperfusion arrhythmias and myocardial norepinephrine and accumulation of calcium in the rat / N. Dimassi, A. Bril, N. Autissier, J. Bralet, L. Rochette // *Cardioscience*. – 1992. – Vol. 3, №1. – P. 7-12.
171. Dornbierer, M. Early reperfusion hemodynamics predict recovery in rat hearts: a potential approach towards evaluating cardiac grafts from non-heart-beating donors / M. Dornbierer, M. Stadelmann, J. Sourdon, B. Gahl, S. Cook, T. P. Carrel, H. T. Tevaearai, S. L. Longnus // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7, № 8. – P. e43642.
172. Dosenko, V.E. Protective effect of autophagy in anoxia-reoxygenation of isolated cardiomyocyte? / V. E. Dosenko, V. S. Nagibin, L. V. Tumanovska, A. A. Moibenko // *Autophagy*. – 2006. – Vol. 2. – P. 305–306.
173. Dragon, S. Effect of high altitude and in vivo adenosine-adrenergic receptor blockade on ATP and 2,3BPG concentrations in red blood cells of avian embryos / S. Dragon, C. Carey, K. Martin, R. Baumann // *J. Exp. Biol.* - 1999. - Vol. 202, Pt. 20. - P. 2787-2795.

174. Duquesnes, N. PKC-delta and PKC-epsilon: foes of the same family or strangers? / N. Duquesnes, F. Lezoualc'h, B. Crozatier // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2011. – Vol. 51. – P. 665–673.
175. Ebrahimi F., Involvement of endogenous opioid peptides and nitric oxide in the blunted chronotropic and inotropic responses to beta-adrenergic stimulation in cirrhotic rats / F. Ebrahimi, S. Tavakoli, A. R. Hajrasouliha, H. Sadeghipour, M. Dehghani, S. H. Ahmadi, A. R. Dehpour // *Fundam. Clin. Pharmacol.* – 2006. – Vol. 20, № 5. – P. 461-471.
176. Efremidis, M. Endocardial late potentials during sinus rhythm define the re-entry circuit of ventricular tachycardia in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy / M. Efremidis, E. Prappa, C. Charalampous, N. Protonotarios, K. P. Letsas, A. Sideris // *Hellenic J. Cardiol.* – 2013. – Vol. 54, № 5. – P. 394-346.
177. Eisinger, D.A. Delta-opioid receptors activate ERK/MAP kinase via integrin-stimulated receptor tyrosine kinases / D. A. Eisinger, H. Ammer // *Cell. Signal.* – 2008. – Vol. 20, № 12. – P. 2324-2331.
178. Eisinger, D.A. Epidermal growth factor treatment switches δ -opioid receptor-stimulated extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 signaling from an epidermal growth factor to an insulin-like growth factor-1 receptor-dependent mechanism / D. A. Eisinger, H. Ammer // *Mol. Pharmacol.* – 2011. – Vol. 79, № 2. – P. 326-335.
179. Ensinger, H. Ethylketocyclazocine decreases noradrenaline release and blood pressure in the rabbit at a peripheral opioid receptor / H. Ensinger, L. Hedler, C. Schurr, K. Starke // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* – 1984. – Vol. 328, № 1. – P. 20-23.
180. Emerling, B. M. Hypoxic activation of AMPK is dependent on mitochondrial ROS but independent of an increase in AMP/ATP ratio / B. M. Emerling, F. Weinberg, C. Snyder, Z. Burgess, G. M. Mutlu, B. Viollet, G. R. Budinger, N. S. Chandel // *Free Radic. Biol. Med.* – 2009. – Vol. 46, №10. – P. 1386-1391.
181. Endoh, T. Nor-binaltorphimine: a potent and selective kappa-opioid receptor antagonist with long-lasting activity in vivo / T. Endoh, H. Matsuura, C. Tanaka, H. Nagase // *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* – 1992. – Vol. 316. – P. 30-42.
182. Erl, W. Nuclear factor-kappa-B regulates induction of apoptosis and inhibitor of apoptosis protein-1 expression in vascular smooth muscle cells / W. Erl, G. K. Hansson,

- R. de Martin, G. Draude, K. S. Weber, C. Weber // *Circ. Res.* – 1999. – Vol. 84. – P. 668–677
183. Feng, Y. Current Research on Opioid Receptor Function / Y. Feng, X. He, Y. Yang, D. Chao, L. H. Lazarus, Y. Xia // *Curr Drug Targets.* – 2012. – Vol. 13, №2. – P. 230–246.
184. Festjens, N. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response / N. Festjens, T. Vanden Berghe, P. Vandenabeele // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2006. – Vol. 1757. – P. 1371–1387.
185. Fitzpatrick, C. M. Cardioprotection in chronically hypoxic rabbits persists on exposure to normoxia: role of NOS and K_{ATP} channels / C. M. Fitzpatrick, Y. Shi, W. C. Hutchins, J. Su, G. J. Gross, B. Ostadal, J. S. Tweddell, J. E. Baker // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2005. – Vol. 288. – P. 62-68.
186. Fitzpatrick, S. F. An intact canonical NF- κ B pathway is required for inflammatory gene expression in response to hypoxia / S. F. Fitzpatrick, M. M. Tambuwala, U. Bruning, B. Schaible, C. C. Scholz, A. Byrne, A. O'Connor, W. M. Gallagher, C.R. Lenihan, J. F. Garvey, K. Howell, P. G. Fallon, E. P. Cummins, C. T. Taylor // *J. Immunol.* – 2011. – Vol. 186, №2. – P. 1091-1096.
187. Flaherty, M. P. The role of TNF-alpha receptors p55 and p75 in acute myocardial ischemia/reperfusion injury and late preconditioning / M. P. Flaherty, Y. Guo, S. Tiwari, A. Rezazadeh, G. Hunt, S. K. Sanganalmath, X. L. Tang, R. Bolli, B. Dawn // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2008. – Vol. 45. – P. 735–741.
188. Floras, J. S. Hypertension and Sleep Apnea / J. S. Floras // *Can. J. Cardiol.* – 2015. – Vol. 31, № 7. – P. 889-897.
189. Forster, K. The δ -opioid receptor agonist DADLE at reperfusion protects the heart through activation of pro-survival kinases via EGF receptor transactivation / K. Forster, A. Kuno, N. Solenkova, S. B. Felix, T. Krieg // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2007. – Vol. 293, №3. – P. H1604-H1608.
190. Frassdorf, J. Morphine induces late cardioprotection in rat hearts in vivo: the involvement of opioid receptors and nuclear transcription factor kappaB / J. Frassdorf, N. C. Weber, D. Obal, O. Toma, J. Müllenheim, G. Kojda, B. Preckel, W. Schlack // *Anesth Analg.* – 2005. – Vol. 101, № 4. – P. 934-941

191. Fraessdorf, J. Role of Endogenous Opioid System in Ischemic-Induced Late Preconditioning. / J. Fraessdorf, M. W. Hollmann, I. Hanschmann, A. Heinen, N. C. Weber, B. Preckel, R. Huhn // *PLoS One*. – 2015. – V. 10, №7. – P. e0134283.
192. Fryer, R. M. Dependence of δ_1 -opioid receptor-induced cardioprotection on a tyrosine kinase-dependent but not a Src-dependent pathway. / R. M. Fryer, Y. Wang, A. K. Hsu, H. Nagase, G. J. Gross // *JPET*. – 2001. – Vol. 299, № 2. – P. 477-482.
193. 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.
194. Fryer, R. M. Stress-activated protein kinase phosphorylation during cardioprotection in the ischemic myocardium / R. M. Fryer, H. H. Patel, A. K. Hsu, G. J. Gross // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2001b. – Vol. 281, № 3. – P. H1184-H1192.
195. Fradorf, J. Sevoflurane-induced preconditioning: impact of protocol and aprotinin administration on infarct size and endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation in the rat heart in vivo / J. Fradorf, R. Huhn, N.C. Weber, D. Ebel, N. Wingert, B. Preckel, O. Toma, W. Schlack, M. W. Hollmann // *Anesthesiology*. – 2010. – Vol. 113, № 6. – P. 1289-1298.
196. Fujita, W. Revolution in GPCR signalling: opioid receptor heteromers as novel therapeutic targets: IUPHAR review 10. / W. Fujita, I. Gomes, L. A. Devi // *Br. J. Pharmacol.* – 2014. – Vol. 171, № 18. – P. 4155-4176.
197. Gao, C. J. Hypoxic preconditioning attenuates global cerebral ischemic injury following asphyxial cardiac arrest through regulation of delta opioid receptor system. / C. J. Gao, L. Niu, P. C. Ren, W. Wang, C. Zhu, Y. Q. Li, W. Chai, X. D. Sun // *Neuroscience*. – 2012. – Vol. 202. – P. 352-362.
198. Gao, L. Facilitation of chronic intermittent hypobaric hypoxia on carotid sinus baroreflex in anesthetized rats / L. Gao, Y. Guan, F. Cui, Y. X. Liu, Z. N. Zhou, Y. Zhang // *Chin. J. Physiol.* – 2012. – Vol. 55, № 1. – P. 62-70.
199. Garciarena, C. D. H^+ -activated Na^+ influx in the ventricular myocyte couples Ca^{2+} -signalling to intracellular pH / C. D. Garciarena, J. B. Youm, P. Swietach, R. D. Vaughan-Jones // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2013. – Vol. 61. – P. 51-59.

200. Garg, K. Mechanism of cardioprotective effect of erythropoietin-induced preconditioning in rat heart / K. Garg, H. N. Yadav, M. Singh, P. L. Sharma // *Indian J. Pharmacol.* – 2010. – Vol. 42, № 4. – P. 219-223.
201. Ge, H, Mitochondrial Src tyrosine kinase plays a role in the cardioprotective effect of ischemic preconditioning by modulating complex I activity and mitochondrial ROS generation / H. Ge, M. Zhao, S. Lee, Z. Xu // *Free Radic. Res.* – 2015. – Vol. 49, № 10. – P. 1210-1217.
202. Golstein, P. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. / P. Golstein, G. Kroemer // *Trends Biochem. Sci.* – 2007. – Vol. 32. – P. 37–43.
203. Gomez, L. Inhibition of GSK3 β by postconditioning is required to prevent opening of the mitochondrial permeability transition pore during reperfusion. / L. Gomez, M. Paillard, H. Thibault, G. Derumeaux, M. Ovize // *Circulation.* – 2008. – Vol. 117. – P. 2761–2768.
204. Gomez, L. The SR/ER-mitochondria calcium crosstalk is regulated by GSK3 β during reperfusion injury / L. Gomez, P. A. Thiebaut, M. Paillard, S. Ducreux, M. Abrial, C. Crola Da Silva, A. Durand, M. R. Alam, F. Van Coppenolle, S. S. Sheu, M. Ovize // *Cell. Death. Differ.* – 2015. – Vol. 22, № 11. – P. 1890.
205. Gonzales, G. F. Heart mitochondrial nitric oxide synthase is upregulated in male rats exposed to high altitude (4,340 m). / G. F. Gonzales, F. A. Chung, S. Miranda, L. B. Valdez, T. Zaobornyj, J. Bustamante, A. Boveris // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2005. – Vol. 288. – P. 2568-2573.
206. Gonzalez-Reyes, A. Molecular mechanisms underlying oxytocin-induced cardiomyocyte protection from simulated ischemia-reperfusion / A. Gonzalez-Reyes, A. Menaouar, D. Yip, B. Danalache, E. Plante, N. Noiseux, J. Gutkowska, M. Jankowski // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 2015. – Vol. 412. – P. 170-181.
207. Gray, M. O. A selective epsilon-protein kinase C antagonist inhibits protection of cardiac myocytes from hypoxia-induced cell death / M. O. Gray, J. S. Karliner, D. Mochly-Rosen // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272. – P. 30945–30951.
208. Greenberg, H. Chronic intermittent hypoxia activates nuclear factor-kappaB in cardiovascular tissues in vivo / H. Greenberg, X. Ye, D. Wilson, A. K. Htoo, T. Hendersen, S. F. Liu // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2006. – Vol. 343, № 2. – P. 591-596.

209. Grilli, A. Inducible nitric oxide synthase and heme oxygenase-1 in rat heart: direct effect of chronic exposure to hypoxia./ A. Grilli, M. A. De Lutiis, A. Patruno, L. Speranza, F. Gizzi, A. A. Taccardi, P. Di Napoli, R. De Caterina, P. Conti, M. Felaco// *Ann. Clin. Lab. Sci.* – 2003. – Vol. 33, № 2. – P. 208-215.
210. Gross, G. J. Role of opioids in acute and delayed preconditioning / G. J. Gross // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2003. – Vol. 35, № 7. – P. 709-718.
211. Gross, E. R. Diabetes abolishes morphine-induced cardioprotection via multiple pathways upstream of glycogen synthase kinase-3 β // E. R. Gross, A. K. Hsu, G. J. Gross // *Diabetes.* – 2007b. – Vol. 56, № 1. – P. 127-136.
212. Gross, E. R. GSK3 β inhibition and KATP channel opening mediate acute opioid-induced cardioprotection at reperfusion./ E. R. Gross, A. K. Hsu, G. J. Gross // *Basic Res. Cardiol.* – 2007b. – Vol. 102, № 4. – P. 341-349.
213. Gross, G. J. Opioids and myocardial reperfusion injury / G. J. Gross, J. N. Peart // *Arch. Mal. Coeur. Vaiss.* – 2007. – Vol. 100, № 3. – P. 231-237.
214. Gu, Q. Hypoxia-induced SOCS3 is limiting STAT3 phosphorylation and NF- κ B activation in congenital heart disease / Q. Gu, Y. Kong, Z. B. Yu, L. Bai, Y. B. Xiao // *Biochimie.* – 2011. – Vol. 93, № 5. – P. 909-920.
215. Guan, Y. Chronic intermittent hypobaric hypoxia decreases beta-adrenoceptor activity in right ventricular papillary muscle / Y. Guan, L. Gao, H.J. Ma, Q. Li, H. Zhang, F. Yuan, Z. N. Zhou, Y. Zhang // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2010. – Vol. 298, № 4. – P. H1267-H1272.
216. Guo, H. C. Chronic intermittent hypobaric hypoxia protects the heart against ischemia/reperfusion injury through upregulation of antioxidant enzymes in adult guinea pigs / H. C. Guo, Z. Zhang, L. N. Zhang, C. Xiong, C. Feng, Q. Liu, X. Liu, X. L. Shi, Y. L. Wang // *Acta. Pharmacol. Sin.* – 2009. – Vol. 30, № 7. – P. 947-955.
217. Guo, H. T. Endogenous κ -opioid peptide mediates the cardioprotection induced by ischemic postconditioning./ H. T. Guo, R. H. Zhang, Y. Zhang, L. J. Zhang, J. Li, Q. X. Shi, Y. M. Wang, R. Fan, H. Bi, W. Yin, J. M. Pei // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* – 2011. – Vol. 58, № 2. – P. 207-215.
218. Gupta, A. Opioid receptor function is regulated by post-endocytic peptide processing / A. Gupta, I. Gomes, J. Wardman, L. A. Devi // *J. Biol. Chem.* – 2014. – Vol. 289, № 28. – P. 19613-19626.

219. Gustafsson, A. B. Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart. / A. B. Gustafsson, R. A. Gottlieb // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2007. – Vol. 292, № 1. – P. C45-C51.
220. Guzy, R.D. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia / R. D. Guzy, P. T. Schumacker // *Exp. Physiol.* – 2006. – Vol. 91. – P. 807–819,
221. Hagen, T. Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: effect on HIF-1 α / T. Hagen, C. T. Taylor, F. Lam, S. Moncada // *Science.* – 2003. – Vol. 302. – P. 1975–1978.
222. Halestrap, A. P. A pore way to die: the role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection / A. P. Halestrap // *Biochem. Soc. Trans.* – 2010. – Vol. 38. – P. 841–860.
223. Halestrap, A. P. The C ring of the F1Fo ATP synthase forms the mitochondrial permeability transition pore / A. P. Halestrap // *A. Critical. Appraisal. Front. Oncol.* – 2014. – Vol. 4. – P. 234.
224. Halestrap, A. P. The mitochondrial permeability transition: a current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury / A. P. Halestrap, A. P. Richardson // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2015. – Vol. 78. – P. 129-141.
225. Halestrap, A. P. The role of hexokinase in cardioprotection - mechanism and potential for translation / A. P. Halestrap, G. C. Pereira, P. Pasdois // *Br. J. Pharmacol.* – 2015. – Vol. 172, № 8. – P. 2085-2100.
226. Ham, O. Modulation of Fas-Fas Ligand Interaction Rehabilitates Hypoxia-Induced Apoptosis of Mesenchymal Stem Cells in Ischemic Myocardium Niche / O. Ham, S. Y. Lee, B. W. Song, M. J. Cha, C. Y. Lee, J. H. Park, I. K. Kim, J. Lee, H. H. Seo, M. J. Seung, E. Choi, Y. Jang, K. C. Hwang // *Cell. Transplant.* – 2015. – Vol. 24, № 7. – P. 1329-1341.
227. Hamacher-Brady, A. The interplay between pro-death and pro-survival signaling pathways in myocardial ischemia/reperfusion injury: apoptosis meets autophagy / A. Hamacher-Brady, N. R. Brady, R. A. Gottlieb // *Cardiovasc. Drugs Ther.* – 2006. – Vol. 20. – P. 445–462.
228. Hamakawa, T. Excitatory synaptogenesis between identified lymnaea neurons requires extrinsic trophic factors and is mediated by receptor tyrosine kinases./ T.

- Hamakawa, M. A. Woodin, M. C. Bjorgum, S. D. Painter, M. Takasaki, K. Lukowiak, G. T. Nagle, N. I. Syed // *J. Neurosci.* – 1999. – Vol. 19. – P. 9306-9312.
229. Hausenloy, D. J. “Conditional Conditioning” in cardiac bypass surgery / D. J. Hausenloy, D. M. Yellon // *Basic Res. Cardiol.* – 2012. – Vol. 107, № 3. – P. 258.
230. Hausenloy, D. J. Cardioprotection techniques: preconditioning, postconditioning and remote conditioning (basic science) / D. J. Hausenloy // *Curr. Pharm. Des.* – 2013. – Vol. 19, № 25. – P. 4544-4563.
231. Hausenloy, D. J. Glimepiride treatment facilitates ischemic preconditioning in the diabetic heart / D. J. Hausenloy, A. M. Wynne, M. M. Mocanu, D. M. Yellon // *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* – 2013. – Vol. 18, № 3. – P. 263-269.
232. Hausenloy, D. J. Preconditioning and postconditioning: united at reperfusion / D. J. Hausenloy, D. M. Yellon // *Pharmacol. Ther.* – 2007. – Vol. 116, № 2. – P. 173–191.
233. He, S. F. Morphine preconditioning confers cardioprotection in doxorubicin-induced failing rat hearts via ERK/GSK-3 β pathway independent of PI3K/Akt / S. F. He, S. Y. Jin, H. Wu, B. Wang, Y. X. Wu, S. J. Zhang, M. G. Irwin, T. M. Wong, Y. Zhang // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2015. – Vol. 88, № 3. – P. 349-358.
234. Headrick J. P., Non-analgesic effects of opioids: cardiovascular effects of opioids and their receptor systems. / J. P. Headrick, S. Pepe, J. N. Peart // *Curr. Pharm. Des.* – 2012. – Vol. 18, № 37. – P. 6090-6100.
235. Hedstrom, E. Initial results of inflammatory response, matrix remodeling, and reactive oxygen species following PCI in acute ischemic myocardial injury in man./ E. Hedstrom, K. Aström-Olsson, A. K. Ohlin, H. Ohlin, H. Arheden // *J. Invasive Cardiol.* – 2011. – Vol. 23, № 9. – P. 371-376.
236. Heidbreder, M., Remote vs. ischaemic preconditioning: the differential role of mitogen-activated protein kinase pathways. / M. Heidbreder, A. Naumann, K. Tempel, P. Dominiak, A. Dendorfer // *Cardiovasc. Res.* – 2008. – 78, № 1. – P.108–115.
237. Herman, J. P. Good stress, bad stress and very bad stress / J. P. Herman, M. Maroun, G. Richter-Levin // *Stress.* – 2015. – Vol. 18, № 3. – P. 267-268.
238. Heusch, G. Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning / G. Heusch // *Circ. Res.* – 2015. – Vol. 116, № 4. – P.674-699.

239. Hlavackova, M. Up-regulation and redistribution of protein kinase C- δ in chronically hypoxic heart / M. Hlavackova, K. Kozichova, J. Neckar, F. Kolar, R. J. Musters, F. Novak, O. Novakova // *Mol. Cell. Biochem.* – 2010. – Vol. 345, № 1-2. – P. 271-282.
240. Ho, Y. C. Minimizing Door-to-Balloon Time Is not the Most Critical Factor in Improving Clinical Outcome of ST-Elevation Myocardial Infarction Patients Undergoing Primary Percutaneous Coronary Intervention / Y. C. Ho, T. H. Tsai, P. H. Sung, Y. L. Chen, S. Y. Chung, C. H. Yang, S. M. Chen, C. J. Chen, H. Y. Fang, C. J. Wu, H. K. Yip // *Crit. Care. Med.* – 2014. – Vol. 42, № 8. – P. 1788-1796.
241. Hojo, M. μ -Opioid receptor forms a functional heterodimer with cannabinoid CB1 receptor: electrophysiological and FRET assay analysis. / M. Hojo, Y. Sudo, Y. Ando, K. Minami, M. Takada, T. Matsubara, M. Kanaide, K. Taniyama, K. Sumikawa, Y. Uezono // *J. Pharmacol. Sci.* – 2008. – Vol. 108, № 3. – P. 308-319.
242. Holzerova, K. Involvement of PKCepsilon in cardioprotection induced by adaptation to chronic continuous hypoxia. / K. Holzerova, M. Hlavackova, J. Zurmanova, G. Borchert, J. Neckar, F. Kolar, F. Novak, O. Novakova // *Physiol. Res.* – 2015. – Vol. 64, № 2. – P. 191-201.
243. Hool, L. C. How Does the Heart Sense Changes in Oxygen Tension: A Role for Ion Channels? / L. C. Hool // *Antioxid. Redox Signal.* – 2015. – Vol. 22, № 6. – 522-536.
244. Houdi, A. A. Effects of β -FNA on sympathoadrenal, cardiovascular, and analgesic responses to DAMGO at rest and during stress / A. A. Houdi, L. Marson, K. E. Davenport, G. R. Van Loon // *Pharmacology Biochem. Behav.* – 1996. – Vol. 53, № 4. – P. 927-933.
245. Hoyer-Hansen, M. Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2 / M. Hoyer-Hansen, L. Bastholm, P. Szyniarowski, M. Campanella, G. Szabadkai, T. Farkas, K. Bianchi, N. Fehrenbacher, F. Elling, R. Rizzuto, I. S. Mathiasen, M. Jaattela // *Mol. Cell.* – 2007. – Vol. 25. – P. 193–205.
246. Huang, C. BH3-only protein Bim is upregulated and mediates the apoptosis of cardiomyocytes under glucose and oxygen-deprivation conditions / C. Huang, J. Li, K. Hong, Z. Xia, Y. Xu, X. Cheng // *Cell. Biol. Int.* – 2015. – Vol. 39, № 3. – P. 318-325.
247. Huang, M. H. Reducing ischaemia/reperfusion injury through δ -opioid-regulated intrinsic cardiac adrenergic cells: adrenoceptor-mediated co-signalling. / M. H. Huang, V.

- Nguyen, Y. Wu, S. Rastogi, C. Y. Lui, Y. Birnbaum, H. Q. Wang, D. L. Ware, M. Chauhan, N. Garg, K. K. Poh, L. Ye, A. R. Omar, H. C. Tan, B. F. Uretsky, K. Fujise // *Cardiovasc. Res.* – 2009. – Vol. 84, № 3. – P. 452-460.
248. Hughes, J. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. / J. Hughes, T. W. Smith, H. W. Kosterlitz, L. A. Fothergill, B. A. Morgan, H. R. Morris // *Nature.* – 1975. – Vol. 258, № 5536. – P.577-80.
249. Huh, J. Protection of cardiac myocytes via δ 1-opioid receptors, protein kinase C, and mitochondrial KATP channels. / J. Huh, G. J. Gross, H. Nagase, B. T. Liang // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2001. – Vol. 280, № 1. – P. H377-H383.
250. Hyvarinen, J. Hearts of Hypoxia-inducible Factor Prolyl 4-Hydroxylase-2 Hypomorphic Mice Show Protection against Acute Ischemia-Reperfusion Injury. / J. Hyvarinen, I. E. Hassinen, R. Sormunen, J. M. Maki, K. I. Kivirikko, P. Koivunen, J. Myllyharju // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285. – P. 13646-13657.
251. Iliodromitis, E. K. Protection from post-conditioning depends on the number of short ischemic insults in anesthetized pigs / E. K. Iliodromitis, M. Georgiadis, M. V. Cohen, J. M. Downey, E. Bofilis, D. T. Kremastinos // *Basic Res. Cardiol.* – 2006. – Vol. 101, № 6. – P. 502–507.
252. Inafuku, H. Determination of oxidative stress and cardiac dysfunction after ischemia/reperfusion injury in isolated rat hearts. / H. Inafuku, Y. Kuniyoshi, S. Yamashiro, K. Arakaki, T. Nagano, Y. Morishima, Y. Kise // *Ann. Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 2013. – Vol.19, № 3. – P.186-194.
253. Inagaki, K. Inhibition of δ -protein kinase C protects against reperfusion injury of the ischemic heart in vivo./ K. Inagaki, L. Chen, F. Ikeno, F.H. Lee, K. Imahashi, D. M. Bouley, M. Rezaee, P. G. Yock, E. Murphy, D. Mochly-Rosen // *Circulation.* – 2003. – Vol. 108, № 19. – P. 2304-2307.
254. Jager, S. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1. / S. Jager, C. Handschin, J. St.-Pierre, B. M. Spiegelman // *PNAS.* – 2007. – Vol. 104, № 29. – P. 12017–12022.
255. Jain, K. Differential activation of myocardial ER stress response: a possible role in hypoxic tolerance / K. Jain, G. Suryakumar, R. Prasad, L. Ganju // *Int. J. Cardiol.* – 2013. – Vol. 168, № 5. – P. 4667-4677.

256. Jain, K. Differential hypoxic tolerance is mediated by activation of heat shock response and nitric oxide pathway / K. Jain, G. Suryakumar, L. Ganju, S. B. Singh // *Cell Stress Chaperones*. – 2014. – Vol. 19, № 6. – P. 801-812.
257. Jancso, G. Expression and protective role of heme oxygenase-1 in delayed myocardial preconditioning. / G. Jancsó, B. Cserepes, B. Gasz, L. Benkó, B. Borsiczky, A. Ferenc, M. Kürthy, B. Rácz, J. Lantos, J. Gál, E. Arató, L. Sínayc, G. Wéber, E. Róth // *Ann. N.-Y. Acad. Sci.* – 2007. – Vol. 1095. – P. 251-261.
258. Jian, Z. Increase of macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression in cardiomyocytes during chronic hypoxia./ Z. Jian, J. B. Li, R. Y. Ma, L. Chen, Q. J. Zhong, X. F. Wang, W. Wang, Y. Hong, Y. B. Xiao // *Clin. Chim. Acta.* – 2009. – Vol. 405, № 1-2. – P. 132-138.
259. Jiang, X. Inducible nitric oxide synthase mediates delayed cardioprotection induced by morphine in vivo: evidence from pharmacologic inhibition and gene-knockout mice / X. Jiang, E. Shi, Y. Nakajima, S. Sato // *Anesthesiology*. – 2004. – Vol. 101, № 1. – P. 82-88.
260. Jin, Z. Q. Ischaemic postconditioning protects isolated mouse hearts against ischaemia/reperfusion injury via sphingosine kinase isoform-1 activation./ Z. Q. Jin, J. S. Karliner, D. A. Vessey // *Cardiovasc. Res.* – 2008. – Vol. 79, № 1. – P. 134-140.
261. Jouan-Lanhouet, S. Necroptosis, in vivo detection in experimental disease models / S. Jouan-Lanhouet, F. Riquet, L. Duprez, T. Vanden Berghe, N. Takahashi, P. Vandenabeele // *Semin. Cell. Dev. Biol.* – 2014. – Vol. 35. – P. 2-13.
262. Juhaszova, M. Glycogen synthase kinase-3 β mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. / M. Juhaszova, D. B. Zorov, S. H. Kim, S. Pepe, Q. Fu, K. W. Fishbein, B. D. Ziman, S. Wang, K. Ytrehus, C. L. Antos, E. N. Olson, S. J. Sollott // *J. Clin. Invest.* – 2004. – Vol. 113, № 11. – P. 1535-1549.
263. Jun, J. H. Erythropoietin protects myocardium against ischemia-reperfusion injury under moderate hyperglycemia / J. H. Jun, N. H. Jun, J. K. Shim, E. J. Shin, Y. L. Kwak // *Eur. J. Pharmacol.* – 2014. – Vol. 745. – P. 1-9.
264. Jung, F. Hypoxic regulation of inducible nitric oxide synthase via hypoxia inducible factor-1 in cardiac myocytes./ F. Jung, L. A. Palmer, N. Zhou, R. A. Johns // *Circ. Res.* - 2000. - Vol. 86. - P. 319-325.

265. Kaelin, W. G. Jr. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. / W. G. Jr. Kaelin, P. J. Ratcliffe // *Mol. Cell.* – 2008. – Vol. 30. – P. 393–402.
266. Kaludercic, N. Monoamine oxidases (MAO) in the pathogenesis of heart failure and ischemia/reperfusion injury. / N. Kaludercic, A. Carpi, R. Menabò, F. Di Lisa, N. Paolocci // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2011. – Vol. 1813, № 7. – P. 1323-1332.
267. Kanamori, H. Autophagy limits acute myocardial infarction induced by permanent coronary artery occlusion./ H. Kanamori, G. Takemura, K. Goto, R. Maruyama, K. Ono, K. Nagao, A. Tsujimoto, A. Ogino, T. Takeyama, T. Kawaguchi, T. Watanabe, M. Kawasaki, T. Fujiwara, H. Fujiwara, M. Seishima, S. Minatoguchi // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2011. – Vol. 300, № 6. – P. H2261-H2271.
268. Kandasamy, A. D. Glycogen synthase kinase-3b is activated by matrix metalloproteinase-2 mediated proteolysis in cardiomyoblasts. / A. D. Kandasamy, R. Schulz // *Cardiovasc. Res.* – 2009. – Vol. 83. – P.698–706.
269. Kang, S. H. Mitochondrial Ca²⁺-activated K⁺ channels more efficiently reduce mitochondrial Ca²⁺ overload in rat ventricular myocytes./ S. H. Kang, W. S. Park, N. Kim, J. B. Youm, M. Warda, J. H. Ko, E. A. Ko, J. Han // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2007. – Vol. 293. – P. H307–H313.
270. Karck, M. Myocardial protection by ischemic preconditioning and delta-opioid receptor activation in the isolated working rat heart. / M. Karck, S. Tanaka, S. F. Bolling, A. Simon, T. P. Su, P. R. Oeltgen, A. J. Haverich // *Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 2001. – V. 122, № 5. – P. 986-992.
271. Karupphasamy, P. Remote intermittent ischemia before coronary artery bypass graft surgery: a strategy to reduce injury and inflammation? / P. Karupphasamy, S. Chaubey, T. Dew, R. Musto, R. Sherwood, J. Desai, L. John, A. M. Shah, M. S. Marber, G. Kunst // *Basic Res. Cardiol.* – 2011. – Vol. 106, № 4. – P. 511 – 519.
272. Kasparova, D. Cardioprotective and nonprotective regimens of chronic hypoxia diversely affect the myocardial antioxidant systems / D. Kasparova, J. Neckar, L. Dabrowska, J. Novotny, J. Mraz, F. Kolar, J. Zurmanova // *Physiol. Genomics.* – 2015. – Vol. 47, № 12. – P. 612-620.

273. Katare, R. G. Differential regulation of TNF receptors by vagal nerve stimulation protects heart against acute ischemic injury / R. G. Katare, M. Ando, Y. Kakinuma, M. Arikawa, F. Yamasaki, T. Sato // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2010. – Vol. 49. – P. 234–244.
274. Kerr, J. F. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. / J. F. Kerr, A. H. Wyllie, A. R. Currie // *Br. J. Cancer.* – 1972. – Vol. 26. – P.239–257.
275. Khaliulin, I. Consecutive pharmacological activation of PKA and PKC mimics the potent cardioprotection of temperature preconditioning / I. Khaliulin, J. E. Parker, A. P. Halestrap // *Cardiovasc. Res.* – 2010. – Vol. 88, № 2. – P. 324-333.
276. Khanna, G. Reduction of Ischemic, Pharmacological and Remote Preconditioning Effects by an Antioxidant N-Acetyl Cysteine Pretreatment in Isolated Rat Heart. / G. Khanna, V. Diwan, M. Singh , N. Singh, A. S. Jaggi // *Yakugaku zasshi.* – 2008. – Vol. 128, № 3. – P. 469-477.
277. Khoury, J. Antiinflammatory adaptation to hypoxia through adenosine-mediated cullin-1 deneddylation. / J. Khoury, J. C. Ibla, A. S. Neish, S. P. Colgan // *J. Clin. Invest.* – 2007. – Vol. 117, № 3. – P. 703-711.
278. Kim, H. S. Remifentanil protects myocardium through activation of anti-apoptotic pathways of survival in ischemia-reperfused rat heart. / H. S. Kim, J. E. Cho, S. W. Hong, S. O. Kim, J. K. Shim, Y. L. Kwak // *Physiol. Res.* – 2010. – Vol. 59, № 3. – P. 347-356.
279. Kim, J. H. Morphine-induced postconditioning modulates mitochondrial permeability transition pore opening via delta-1 opioid receptors activation in isolated rat hearts. / J. H. Kim, K. J. Chun, Y. H. Park, J. Kim, J. S. Kim, Y. H. Jang, M. Y. Lee, J. H. Park // *Korean. J. Anesthesiol.* – 2011. – Vol. 61, № 1. – P. 69-74.
280. Kim, J. H. The effect of the mu-opioid receptor antagonist naloxone on extinction of conditioned fear in the developing rat / J. H. Kim, R. Richardson // *Learn Mem.* – 2009. –Vol. 16, № 3. – P. 161-166.
281. Kim, K. W. Receptor selectivity of Met-enkephalin-Arg6-Phe7, an endogenous opioid peptide, in cerebral cortex of human and rat. / K. W. Kim, R. S. Woo, C. J. Kim, Y. P. Cheong, J. K. Kim, J. Kwun, K. P. Cho // *Life Sci.* – 2000. – Vol. 67, № 1. – P. 61-71.

282. Kim, S. J. In vivo gene delivery of XIAP protects against myocardial apoptosis and infarction following ischemia/reperfusion in conscious rabbits. / S. J. Kim, A. Kuklov, G. J. Crystal // *Life Sci.* – 2011. – Vol. 88, № 13-14. – P. 572-577.
283. Kloner, R. A. Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning: an NHLBI workshop. / R. A. Kloner, R. Bolli, E. Marban, L. Reinlib, E. Braunwald // *Circulation.* – 1998. – Vol. 97. – P. 1848– 67.
284. Kolar, F. Molecular mechanisms of cardiac protection by adaptation to chronic hypoxia / F. Kolar, B. Ostadal // *Physiol. Res.* – 2004. – Vol. 53. – P. S3–S13.
285. Kong, L. PKCbeta modulates ischemia-reperfusion injury in the heart. / L. Kong, M. Andrassy, J. S.Chang, C. Huang, T. Asai, M. J. Szabolcs, S. Homma, R. Liu, Zou Y. S., M. Leitges, S. D. Yan, R. Ramasamy, A. M. Schmidt, S. F. Yan // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2008. – Vol. 294. – P. H1862-1870.
286. 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. / E. A. Konorev, M. M. Tarpey, J. Joseph, J. E. Baker, B. Kalyanaraman // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1995. – Vol. 274. – P. 200-206.
287. Kopecky, M. Tissue adaptation to anoxia in rat myocardium / M. Kopecky, S. Daum // *Cs. Fysiol.* – 1958. – Vol. 7. – P. 518-521.
288. Kopylov, Iu. N. Role of the inositol phosphate cycle in the cardioprotective effect of adaptation to intermittent hypoxia. / Iu. N. Kopylov, F. Z. Meerson // *Kardiologiya.* - 1992. – Vol. 32, № 9-10. – P. 45-48.
289. Korf, J. Noradrenergic neurons: morphine inhibition of spontaneous activity / J. Korf, B. S. Bunney, G. K. Aghajanian // *Eur. J. Pharmacol.* – 1974. – Vol. 25, № 2. – P. 165-169.
290. Koshinuma, S. Combination of necroptosis and apoptosis inhibition enhances cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury / S. Koshinuma, M. Miyamae, K. Kaneda, J. Kotani, V. M. Figueredo // *J. Anesth.* – 2014. – Vol. 28, № 2. – P. 235-241.
291. Krauskopf, A. Properties of the permeability transition in VDAC1(-/-) mitochondria. / A. Krauskopf, O. Eriksson, W. J. Craigen, M. A. Forte, P. Bernardi // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2006. – Vol. 1757(5-6). – P.590-595.

292. Kristen, A. V. Inhibition of apoptosis by the intrinsic but not the extrinsic apoptotic pathway in myocardial ischemia-reperfusion / A. V. Kristen, K. Ackermann, S. Buss, L. Lehmann, P. A. Schnabel, A. Haunstetter, H. A. Katus, S. E. Hardt // *Cardiovasc. Pathol.* – 2013. – Vol. 22, № 4. – P. 280-286.
293. Kroemer, G. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. / G. Kroemer, L. Galluzzi, C. Brenner // *Physiol. Rev.* – 2007. – Vol. 87, № 1. – P. 99-163.
294. Kumar, S. Myocardial stunning is associated with impaired calcium uptake by sarcoplasmic reticulum. / S. Kumar, R. J. Hall, A. R. Mani, K. P. Moore, Camici P. G., O. E. Rimoldi, A. J. Williams, K. T. Macleod // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2009. – Vol. 387, № 1. – P. 77-82.
295. Laude, K. NO produced by endothelial NO synthase is a mediator of delayed preconditioning-induced endothelial protection / K. Laude, J. Favre, C. Thuillez, V. Richard // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2003. – Vol. 284, № 6. – P. H2053-H2060.
296. Leal, A. K. Peripheral δ -opioid receptors attenuate the exercise pressor reflex. / A. K. Leal, K. Yamauchi, J. Kim, V. Ruiz-Velasco, M. P. Kaufman // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2013. – Vol. 305, № 8. – P. H1246-1255.
297. Lecour, S. Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: does it go beyond the RISK pathway? / S. Lecour // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2009. – Vol. 47. – P. 32-40.
298. Lee, G. J. Characterization of mitochondria isolated from normal and ischemic hearts in rats utilizing atomic force microscopy / G. J. Lee, S. J. Chae, J. H. Jeong, S. R. Lee, S. J. Ha, Y. K. Pak, W. Kim, H. K. Park // *Micron.* – 2011. – Vol. 42, № 3. – P. 299-304.
299. Levick, S. P. Arachidonic acid metabolism as a potential mediator of cardiac fibrosis associated with inflammation. / S. P. Levick, D. C. Loch, S. M. Taylor, J. S. Janicki // *J. Immunol.* – 2007. – Vol. 178. – P. 641-646.
300. Levraut, J. Cell death during ischemia: relationship to mitochondrial depolarization and ROS generation. / J. Levraut, H. Iwase, Z. H. Shao, T. L. Vanden Hoek, P. T. Schumacker // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2003. – Vol. 284, № 2. – P. H549-58.

301. Li, J. Peroxynitrite is a key mediator of the cardioprotection afforded by ischemic postconditioning in vivo. / J. Li, N. Loukili, N. Rosenblatt-Velin, P. Pacher, F. Feihl, B. Waeber, L. Liaudet // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8, № 7. – P. e70331.
302. Li, L. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. / L. Li Y., X. Luo, X. Wang // *Nature*. – 2001. – Vol. 412. – P. 95-99.
303. Li, X. Inhibition of microRNA-497 ameliorates anoxia/reoxygenation injury in cardiomyocytes by suppressing cell apoptosis and enhancing autophagy / X. Li, Z. Zeng, Q. Li, Q. Xu, J. Xie, H. Hao, G. Luo, W. Liao, J. Bin, X. Huang, Y. Liao // *Oncotarget*. – 2015. – Vol. 6, № 22. – P. 18829-18844.
304. Li, Y. N. NADPH oxidase-mitochondria axis-derived ROS mediate arsenite-induced HIF-1 α stabilization by inhibiting prolyl hydroxylases activity / Y. N. Li, M. M. Xi, Y. Guo, C. X. Hai, W. L. Yang, X. J. Qin // *Toxicol. Lett.* – 2014. – Vol. 224, № 2. – P. 165-174.
305. Lim, C. C. Glutathione peroxidase deficiency exacerbates ischemia-reperfusion injury in male but not female myocardium: insights into antioxidant compensatory mechanisms / C. C. Lim, N. S. Bryan, M. Jain, M. F. Garcia-Saura, B. O. Fernandez, D. B. Sawyer, D. E. Handy, J. Loscalzo, M. Feelisch, R. Liao // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2009. – Vol. 297, № 6. – P. H2144-H2153.
306. Lincoff, A. M. Inhibition of delta-protein kinase C by delcasertib as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention for acute anterior ST-segment elevation myocardial infarction: results of the PROTECTION AMI Randomized Controlled Trial. / A. M. Lincoff, M. Roe, P. Aylward, J. Galla, A. Rynkiewicz, V. Guetta [et al] // *Eur. Heart J.* – 2014. – Vol. 35, № 37. – P. 2516-2523.
307. Liu Y., Chelerythrine, a highly selective protein kinase C inhibitor, blocks the anti-infarct effect of ischemic preconditioning in rabbit hearts. / Y. Liu, M. V. Cohen, J. M. Downey // *Cardiovasc. Drugs Ther.* – 1994. – Vol. 8. – P. 881–882.
308. Liu, G. S. Protein kinase C-epsilon is responsible for the protection of preconditioning in rabbit cardiomyocytes. / G. S. Liu, M. V. Cohen, D. Mochly-Rosen, J. M. Downey // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 1999. – Vol. 31, № 10. – P. 1937–1948.
309. Liu, H. Preconditioning attenuates apoptosis and necrosis: role of protein kinase C epsilon and -delta isoforms. / H. Liu, B. C. McPherson, Z. Yao // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2001. – Vol. 281. – P. H404–H410.

310. Liu, H. Role of opioid $\delta 1$ receptors, mitochondrial KATP channels, and protein kinase C during cardiocyte apoptosis. / H. Liu, H. Y. Zhang, B. C. McPherson, T. Baman, S. Roth, Z. Shao, X. Zhu, Z. Yao // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2001. – Vol. 33, № 11. – P. 2007-2014.
311. Liu, Q. Identification of apoptosis-related microRNAs and their target genes in myocardial infarction post-transplantation with skeletal myoblasts / Q. Liu, G. Q. Du, Z. T. Zhu, C. Zhang, X. W. Sun, J. J. Liu, X. Li, Y. S. Wang, W. J. Du // *J. Transl. Med.* – 2015. – Vol. 13. – P. 270.
312. Liu, Y. Evidence that translocation of protein kinase C is a key event during ischemic preconditioning of rabbit myocardium. / Y. Liu, K. Ytrehus, J. M. Downey // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 1994. – Vol. 26. – P. 661–668.
313. Liu, Y. Inhibition of PKC $\beta 2$ Overexpression Ameliorates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Diabetic Rats via Restoring Caveolin-3/Akt Signaling. / Y. Liu, J. Jin, S. Qiao, S. Lei, S. Liao, Z. D. Ge, H. Li, G. T. Wong, M. G. Irwin, Z. Xia // *Clin Sci (Lond).* – 2015. – Vol. 129, № 4. – P. 331-344.
314. Loor, G. Mitochondrial oxidant stress triggers cell death in simulated ischemia-reperfusion. / G. Loor, J. Kondapalli, H. Iwase, N. S. Chandel, G. B. Waypa, R. D. Guzy, T. L. Vanden Hoek, P. T. Schumacker // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2011. – Vol. 1813, № 7. – P. 1382—1394.
315. Loos, B. At the core of survival: autophagy delays the onset of both apoptotic and necrotic cell death in a model of ischemic cell injury. / B. Loos, S. Genade, B. Ellis, A. Lochner, A. M. Engelbrecht // *Exp. Cell. Res.* – 2011. – Vol. 317, № 10. – P. 1437-1453.
316. Lopaschuk, G. D. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. / G. D. Lopaschuk, J. R. Ussher, C. D. Folmes, J. S. Jaswal, W. C. Stanley // *Physiol. Rev.* – 2010. – Vol. 90, № 1. – P. 207—258.
317. Lubbe, W.F. Potential arrhythmogenic role of cyclic adenosine monophosphate (AMP) and cytosolic calcium overload. Implication for prophylactic effects of beta-blockers in myocardial infarction and proarrhythmic effects of phosphodiesterase inhibitors. / W. F. Lubbe, T. Podzweit, L. N. Opie // *Am. J. Coll. Cardiol.* – 1992. – Vol. 19. - № 7. – P. 1622-1633.
318. Lukyanova, L. D. Development of resistance of an organism under various conditions of hypoxic preconditioning: role of the hypoxic period and reoxygenation. / L.

- D. Lukyanova, E. L. Germanova, R. A. Kopaladze // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2009. – Vol. 147, № 4. – P. 400-404.
319. Lyons, O. D. Heart Failure and Sleep Apnea / O. D. Lyons, T. D. Bradley // *Can. J. Cardiol.* – 2015. – Vol. 31, № 7. – P. 898-908.
320. Lyons, P.J. Characterization of carboxypeptidase A6, an extracellular matrix peptidase. / P. J. Lyons, M. B. Callaway, L. D. Fricker // *J Biol Chem.* 2008. – Vol. 283, № 11. – P. 7054-7063.
321. Ma, H. J. Chronic intermittent hypobaric hypoxia ameliorates ischemia/reperfusion-induced calcium overload in heart via Na/Ca²⁺ exchanger in developing rats / H. J. Ma, Q. Li, H. J. Ma, Y. Guan, M. Shi, J. Yang, D. P. Li, Y. Zhang // *Cell. Physiol. Biochem.* – 2014. – Vol. 34, № 2. – P. 313-324.
322. Ma, M. Q. A 6 hour therapeutic window, optimal for interventions targeting AMPK synergism and apoptosis antagonism, for cardioprotection against myocardial ischemic injury: an experimental study on rats / M. Q. Ma, B. A. Thapalia, X. H. Lin // *Am. J. Cardiovasc. Dis.* – 2015. – Vol. 5, № 1. – P. 63-71.
323. Ma, X. Regulation of the transcription factor EB-PGC1 α axis by beclin-1 controls mitochondrial quality and cardiomyocyte death under stress / X. Ma, H. Liu, J. T. Murphy, S. R. Foyil, R. J. Godar, H. Abuirqeba, C. J. Weinheimer, P. M. Barger, A. Diwan // *Mol. Cell. Biol.* – 2015. – Vol. 35, № 6. – P. 956-976.
324. Mace, P. D. Molecular cell death platforms and assemblies. / P. D. Mace, S. J. Riedl // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2010. – Vol. 22, № 6. – P. 828-836.
325. MacInnis, M. J. A meta-analysis of exhaled nitric oxide in acute normobaric hypoxia / M. J. MacInnis, E. A. Carter, J. Donnelly, M. S. Koehle // *Aerosp. Med. Hum. Perform.* – 2015. – Vol. 86, № 8. – P. 693-697.
326. Magalhaes, J. Synergistic impact of endurance training and intermittent hypobaric hypoxia on cardiac function and mitochondrial energetic and signaling. / J. Magalhaes, I. Falcao-Pires, I. O. Gonçalves, J. Lumini-Oliveira, I. Marques-Aleixo, E. Dos Passos [et al] // *Int. J. Cardiol.* – 2013. – Vol. 168, № 6. – P. 5363-5371.
327. Marber, M. S. Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. / M. S. Marber, D. S. Latchman, J. M. Walker, D. M. Yellon // *Circulation.* – 1993. – Vol. 88, № 3. – P. 1264–1272.

328. Marchant, D. J. Inflammation in myocardial diseases./ D. J. Marchant, J. H. Boyd, D. C. Lin, D. J. Granville, F. S. Garmaroudi, B. M. McManus // *Circ. Res.* – 2012. – Vol. 110, №1. – P. 126-44.
329. Marín-García, J. Mitochondria in heart failure: the emerging role of mitochondrial dynamics / J. Marín-García, A. T. Akhmedov, G. W. Moe // *Heart Fail. Rev.* – 2013. – Vol. 18, № 4. – P. 439-456.
330. Martin, N. A. Agonist activity of the δ -antagonists TIPP and TIPP-c in cellular models expressing endogenous or transfected δ -opioid receptors./ N. A. Martin, M. T. Terruso, P. L. Prather // *JPET.* – 2001. – Vol. 298. – P. 240-248.
331. Martin, W. R. The effects of morphine- and nalorphine-like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. / W. R. Martin, C. E. Eades, J. A. Thompson, R. E. Huppler, P. E. Gilbert // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1976. – Vol. 197. – P. 517-532.
332. Martindale, J. J. Uncoupling of increased cellular oxidative stress and myocardial ischemia reperfusion injury by directed sarcolemma stabilization / J. J. Martindale, J. M. Metzger // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2014. – Vol. 67. – P. 26-37.
333. Martins, J. B. Sympathetic influences in myocardial ischemia: possible mechanisms of arrhythmogenesis. / J. B. Martins, // *Cardiol. Clin.* – 1983. – Vol. 1, № 1. – P. 51-61.
334. Maslov, L. N. Activation of peripheral opioid receptors increases cardiac tolerance to arrhythmogenic effect of ischemia/reperfusion. / Maslov L. N., Oeltgen P. R., Lishmanov Yu. B., Brown S. A. Barzakh E. I., Krylatov A. V., Pei J. M. // *Acad. Emer. Med.* – 2014. – Vol. 21, № 1. – P. 31-39.
335. Maslov, L. N. Activation of peripheral δ_2 opioid receptors increases cardiac tolerance to ischemia/reperfusion injury: Involvement of protein kinase C, NO-synthase, K_{ATP} channels and the autonomic nervous system. / L. N. Maslov, Yu. B. Lishmanov, P. R. Oeltgen // *Life Sci.* – 2009. – Vol. 84, № 19-20 – P. 657-663.
336. Maslov, L. N. Change in opioid peptide level in the heart blood plasma during acute myocardial ischaemia complicated by ventricular fibrillation / L. N. Maslov, Yu. B. Lishmanov // *Clinical. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 1995. – Vol. 22. – P. 812-816.
337. Maslov, L. N. Comparative analysis of the cardioprotective properties of opioid receptor agonists in a rat model of myocardial infarction. / L. N. Maslov, Y. B.

- Lishmanov, P. R. Oeltgen, E. I. Barzakh, A. V. Krylatov, N. V. Naryzhnaya, J. M. Pei, S. A. Brown // *Acad. Emer. Med.* – 2010. – Vol. 17, № 11. – P. 1239-1246.
338. Maslov, L. N. Role of endogenous opioid peptides in the infarct size-limiting effect of adaptation to chronic continuous hypoxia. / L. N. Maslov, N. V. Naryzhnaya, S. Yu. Tsibulnikov, F. Kolar, Yi. Zhang, H. Wang, A. M. Gusakova, Yu. B. Lishmanov // *Life science.* – 2013. – Vol. 93. – P. 373-379.
339. Masuzawa, A. Transplantation of autologously derived mitochondria protects the heart from ischemia-reperfusion injury / A. Masuzawa, K. M. Black, C. A. Pacak, M. Ericsson, R. J. Barnett, C. Drumm, P. Seth, D. B. Bloch, S. Levitsky, D. B. Cowan, J. D. McCully // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2013. – Vol. 304, № 7. – P. H966-H982.
340. Matejíkova, J. Mitochondrial K_{ATP} opening confers protection against lethal myocardial injury and ischaemia-induced arrhythmias in the rat heart via PI3K/Akt-dependent and -independent mechanisms / J. Matejíkova, T. Ravingerova, D. Pancza, S. Carnicka, F. Kolar // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 2009. – Vol. 87, № 12. – P. 1055-1062.
341. Mattiazzi, A. Ca^{2+} Sparks and Ca^{2+} waves are the subcellular events underlying Ca^{2+} overload during ischemia and reperfusion in perfused intact hearts / A. Mattiazzi, M. Argenziano, Y. Aguilar-Sanchez, G. Mazzocchi, A. L. Escobar // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2015. – Vol. 79. – P. 69-78.
342. Mattila, J. T. Nitric oxide synthase: non-canonical expression patterns. / J. T. Mattila, A. C. Thomas // *Front. Immunol.* – 2014. – Vol. 9, № 5. - P. 478.
343. Mauri, L. Causes of late mortality with dual antiplatelet therapy after coronary stents. / L. Mauri, S. Elmariah, R. W. Yeh, D. E. Cutlip, P. G. Steg, S. Windecker, S. D. Wiviott, D. J. Cohen, J. M. Massaro, R. B. Sr D'Agostino, E. Braunwald, D. J. Kereiakes; DAPT Study Investigators.// *Eur. Heart J.* –2016. – Vol. 37, № 4. – P. 378-385.
344. Mayfield, K. P. Delta-1 opioid receptor dependence of acute hypoxic adaptation / K. P. Mayfield, L. G. D'Alecy // *J. Pharm. Exper. Ther.* – 1994. – Vol. 268, № 1. – P. 74-77.
345. Mayfield, K. P. Hypoxia decreases opioid delta receptor expression in mouse brain. / K. P. Mayfield, W. Kozak, G. M. Malvin, F. Porreca // *Neuroscience.* – 1996. – Vol. 72, № 3. – P. 785-9.

346. Mayr, M. Ischemic preconditioning exaggerates cardiac damage in PKC-delta null mice. / M. Mayr, B. Metzler, Y. L. Chung, E. McGregor, U. Mayr, H. Troy, Y. Hu, M. Leitges, O. Pachinger, J. R. Griffiths, M. J. Dunn, Q. Xu // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2004. – Vol. 287. – P. H946-H956.
347. McCarthy, J. PKC ϵ promotes cardiac mitochondrial and metabolic adaptation to chronic hypobaric hypoxia by GSK3 β inhibition / J. McCarthy, A. Lochner, L. H. Opie, M. N. Sack, M. F. Essop // *J. Cell. Physiol.* – 2011. – Vol. 226, № 9. – P. 2457-2468.
348. McCrindle, B. W. Remote ischemic preconditioning in children undergoing cardiac surgery with cardiopulmonary bypass: a single-center double-blinded randomized trial / B. W. McCrindle, N. A. Clarizia, S. Khaikin, H.M. Holtby, C. Manlhiot, S. M. Schwartz, C. A. Caldarone, J. G. Coles, G. S. Van Arsdell, S. W. Scherer, A. N. Redington // *J. Am. Heart. Assoc.* – 2014. – Vol. 3, № 4. – P. e000964.
349. Meerson, F. Z. Prevention and elimination of heart arrhythmias by adaptation to intermittent high altitude hypoxia. / F. Z. Meerson, E. E. Ustinova, E. H. Orlova // *Clin. Cardiol.* – 1987. – Vol. 10, № 12. – P. 783-789.
350. Meerson, F. Z. The role of ITP-DAG regulatory cascade in the mechanism of cardioprotective effect of adaptation to stress. / F. Z. Meerson, Y. N. Kopylov, L.Yu. Golubeva // *Can. J. Cardiol.* – 1994. – Vol. 10, № 1. – P. 137-147.
351. Mega, J. L. Genetic risk, coronary heart disease events, and the clinical benefit of statin therapy: an analysis of primary and secondary prevention trials. / J. L. Mega, N. O. Stitzel, J. G. Smith, D. I. Chasman, M. J. Caulfield, J. J. Devlin, F. Nordio, C. L. Hyde, C. P. Cannon, F. M. Sacks, N. R. Poulter, P. S. Sever, P. M. Ridker, E. Braunwald, O. Melander, S. Kathiresan, M. S. Sabatine // *Lancet.* – 2015. – V. 385, № 9984. – P.2264-2271.
352. Mehmood, A. Diazoxide preconditioning of endothelial progenitor cells improves their ability to repair the infarcted myocardium / A. Mehmood, M. Ali, S. N. Khan, S. Riazuddin // *Cell. Biol. Int.* – 2015. – Vol. 9, № 11– P. 1251-1263.
353. Meng, X. Y., ZFP580, a novel zinc-finger transcription factor, is involved in cardioprotection of intermittent high-altitude hypoxia against myocardial ischemia-reperfusion injury / X. Y. Meng, H. L. Yu, W. C. Zhang, T. H. Wang, X. Mai, H. T. Liu, R. C. Xu // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9, № 4. – P. e94635.

354. Mercadante, S. New opioids. / S. Mercadante, G. Porzio, V. Gebbia // *J Clin Oncol.* – 2014. – Vol. 32, № 16. – P.1671-1676.
355. Merg, F. Big dynorphin as a putative endogenous ligand for the kappa-opioid receptor / F. Merg, D. Filliol, I. Usynin, I. Bazov, N. Bark, Y. L. Hurd, T. Yakovleva, B. L. Kieffer, G. Bakalkin // *J. Neurochem.* – 2006. – Vol. 97, № 1. – P. 292-301.
356. Merry, T. L. Skeletal muscle glucose uptake during contraction is regulated by nitric oxide and ROS independently of AMPK. / T. L. Merry, G. R. Steinberg, G. S. Lynch, G. K. McConell // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2010. – Vol. 298, № 3. – P. E577-85.
357. Michel, M. C. Mitogen-activated protein kinases in the heart / M. C. Michel, Y. Li, G. Heusch // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* – 2001. – Vol. 363. – P. 245–266
358. Miki, T. Opioid receptor contributes to ischemic preconditioning through protein kinase C activation in rabbits. / T. Miki, M. V. Cohen, J. M. Downey // *Mol. Cell. Biochem.* – 1998. – Vol. 186, № 1-2. – P. 3-12.
359. 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.* – 2010a. – Vol. – 37, № 4. – P. 942-949.
360. 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. Maywood.* – 2010b. – Vol. 235, № 3. – P. 401-410.
361. Miller, M. W. Nitric oxide regulates vascular adaptive mitochondrial dynamics. / M. W. Miller, L. A. Knaub, L. F. Olivera-Fragoso, A. C. Keller, V. Balasubramaniam, P. A. Watson, J. E. Reusch // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2013. – Vol. 304, № 12. – P. H1624-H1633.
362. Mizuno, S. Endogenous Asymmetric Dimethylarginine Pathway in High Altitude Adapted Yaks / S. Mizuno, T. Ishizaki, H. Toga, A. Sakai, J. Isakova, E. Taalaibekova, Z. Baiserkeev, B. Kojonazarov, A. Aldashev // *Biomed. Res. Int.* – 2015. – Vol. 2015. – P. 196904.

363. Miyaji, Y. Distribution of KAI-9803, a novel δ -protein kinase C inhibitor, after intravenous administration to rats / Y. Miyaji, S. Walter, L. Chen, A. Kurihara, T. Ishizuka, M. Saito, K. Kawai, O. Okazaki // *Drug Metab. Dispos.* – 2011. – Vol. 39, № 10. – P. 1946-1953.
364. Moraga, F. A. Periodic breathing and oxygen supplementation in Chilean miners at high altitude (4200m) / F. A. Moraga, D. Jiménez, J. P. Richalet, M. Vargas, J. Osorio // *Respir. Physiol. Neurobiol.* – 2014. – Vol. 203. – P. 109-115.
365. Morciano, G. Molecular identity of the mitochondrial permeability transition pore and its role in ischemia-reperfusion injury / G. Morciano, C. Giorgi, M. Bonora, S. Punzetti, R. Pavasini, M. R. Wieckowski, G. Campo, P. Pinton // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2015. – Vol. 78. – P. 142-153.
366. Morel, S. Brief reoxygenation episodes during chronic hypoxia enhance posthypoxic recovery of LV function: role of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. / S. Morel, G. Milano, K. M. Ludunge, A. F. Corno, M. Samaja, S. Fleury, C. Bonny, L. Kappenberger, L. K. von Segesser, G. Vassalli // *Basic Res Cardiol.* – 2006. – V. 101, № 4. – P. 336-345.
367. Moscarelli, M. Remote ischaemic preconditioning: is it a flag on the field? / M. Moscarelli, G. D. Angelini, S. Suleiman, F. Fiorentino, P. P. Punjabi // *Perfusion.* – 2015. – Vol. 30, № 6. – P. 438-447.
368. Mourouzis, I. Morphine administration at reperfusion fails to improve postischaemic cardiac function but limits myocardial injury probably via heat-shock protein 27 phosphorylation / I. Mourouzis, T. Saranteas, P. Perimenis, C. Tesseromatis, G. Kostopanagiotou, C. Pantos, D. V. Cokkinos // *Eur. J. Anaesthesiol.* – 2009. – Vol. 26, № 7. – P. 572-581.
369. Movassagh, M. Simplified apoptotic cascades. / M. Movassagh, R. S. Foo // *Heart Fail. Rev.* – 2008. – Vol. 13, № 2. – P. 111-119.
370. Munday, M. K. Pharmacological examination of contractile responses of the guinea-pig isolated ileum produced by mu-opioid receptor antagonists in the presence of, and following exposure to, morphine. / M. K. Munday, A. Ali, R. Mason, V. G. Wilson // *Br. J. Pharmacol.* – 2000. – Vol. 131, №5. – P. 893-902.
371. Murray, A. J. Energy metabolism and the high-altitude environment / A. J. Murray // *Exp. Physiol.* – 2016. – Vol. 101, № 1. – P. 23-27.

372. Murry, C. E. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. / Murry C.E., Jennings R.B., Reimer K.A. // *Circulation*. – 1986. – Vol. 74. – P. 1124-1136.
373. Musial, K Matrix metalloproteinases and soluble Fas/FasL system as novel regulators of apoptosis in children and young adults on chronic dialysis. / K. Musial D. Zwolinska // *Apoptosis*. – 2011. – Vol.16, № 7. – 653-659.
374. Myers, M. L. Enhancement of recovery of myocardial function by oxygen free-radical scavengers after reversible regional ischemia / M. L. Myers, R. Bolli, R.F. Lekich, C. J. Hartley, R. Roberts // *Circulation*. – 1985. — Vol. 72. – P. 915–921.
375. Nakagawa, T. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis / T. Nakagawa, J. J. Yuan // *Cell. Biol.* – 2000. – Vol. 150. – P. 887-894.
376. Namekata, I. Reduction by SEA0400 of myocardial ischemia-induced cytoplasmic and mitochondrial Ca²⁺ overload. / I. Namekata, H. Shimada, T. Kawanishi, H. Tanaka, K. Shigenobu // *Eur. J. Pharmacol.* – 2006. – Vol. 543. – P. 108–115.
377. Naumenko, S. E. Ischemic preconditioning and metabolism of myocardial adrenaline. / S. E. Naumenko, T. V. Latysheva, M. A.Gilinskii // *Kardiologia*. – 2010. – Vol. 50, № 6. – P. 48-52.
378. Nazareth, W. Inhibition of anoxia-induced injury in heart myocytes by cyclosporin-A. / W. Nazareth, N. Yafei, M. Crompton // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 1991. – Vol. 23. – P. 1351–1354.
379. Neckar, J. Acute but not chronic tempol treatment increases ischemic and reperfusion ventricular arrhythmias in open-chest rats. / J. Neckar, B. Ost'adal, F. Kolar // *Physiol. Res.* – 2008. – Vol. 57. – P. 653-656.
380. Neckar, J. Brief daily episode of normoxia inhibits cardioprotection conferred by chronic continuous hypoxia. Role of oxidative stress and BKCa channels. / J. Neckar, G. H. Borchert, P. Hlousková, P. Mícová, O. Novakova, F. Novak, M. Hroch, F. Papousek, B. Ost'adal, F. Kolár // *Curr. Pharm. Des.* – 2013. – Vol. 19, № 39. – P. 6880-6889.
381. Neckar, J. Cardioprotective effects of chronic hypoxia and ischaemic preconditioning are not additive / J. Neckar, F. Papousek, O. Novakova, B. Ost'adal, F. Kolar // *Basic Res. Cardiol.* – 2002. – V. 97, № 2. – P. 161-167.

382. 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, № 4. – P. H1566- H1572.
383. Neckar, J. Myocardial infarct size-limiting effect of chronic hypoxia persists for five weeks of normoxic recovery. / J. Neckar, B. Ostadal, F. Kolar // *Physiol Res.* – 2004. – Vol. 53, № 6. – P. 621-628.
384. Neckar, J. Protective effects of dexrazoxane against acute ischaemia/reperfusion injury of rat hearts. / J. Neckar, A. Boudikova, P. Mandíková, M. Sterba, O. Popelova, I. Mikšík, L. Dabrowska, J. Mraz, V. Gersl, F. Kolar // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 2012. – Vol. 90, № 9. – P. 1303-1310.
385. Neely, J. R. Metabolic products and myocardial ischemia / J.R. Neely, D. Feuvray // *Am. J. Pathol.* – 1981. – Vol.102. – P. 282–291.
386. Ng, L. L. Proenkephalin and prognosis after acute myocardial infarction / L. L. Ng, J. K. Sandhu, H. Narayan, P. A. Quinn, I. B. Squire, J. E. Davies, A. Bergmann, A. Maisel, D. J. Jones // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2014. – Vol. 63, № 3. – P. 280-289.
387. Nishida, M. G alpha(i) and G alpha(o) are target proteins of reactive oxygen species / M. Nishida, Y. Maruyama, R. Tanaka, K. Kontani, T. Nagao, H. Kurose // *Nature.* – 2000. – Vol. 408. – P. 492–495.
388. Nisoli, E Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide / E. Nisoli, E. Clementi, C. Paolucci, V. Cozzi, C. Tonello, C. Sciorati, R. Bracale, A. Valerio, M. Francolini, S. Moncada, M.O. Carruba // *Science.* – 2003. – Vol. 299. – P. 896-899.
389. Nistri, S. A new low molecular weight, MnII-containing scavenger of superoxide anion protects cardiac muscle cells from hypoxia/reoxygenation injury / S. Nistri, G. Boccalini, A. Bencini, M. Becatti, B. Valtancoli, L. Conti, L. Lucarini, D. Bani // *Free Radic Res.* – 2015. – Vol. 49, № 1. – P. 67-77.
390. Obame, F. N. Cardioprotective effect of morphine and a blocker of glycogen synthase kinase 3 β , SB216763 [3-(2,4-dichlorophenyl)-4(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione], via inhibition of the mitochondrial permeability transition pore / F. N. Obame, C. Plin-Mercier, R. Assaly, R. Zini, J. L. Dubois-Randé, A. Berdeaux, D. Morin // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2008. – Vol. 326, № 1. – P. 252-258.

391. Oda, S. Macrophage Migration Inhibitory Factor Activates Hypoxia-Inducible Factor in a p53-Dependent Manner / S. Oda, T. Oda, K. Nishi, T. Satoshi, T. Wakamatsu, T. Tanaka, T. Adachi, K. Fukuda, G. L. Semenza, K. Hirota // PLoS ONE. – 2008. – Vol. 3, № 5. – P. e2215.
392. Oerlemans, M. I. Targeting cell death in the reperfused heart: pharmacological approaches for cardioprotection. / M. I. Oerlemans, S. Koudstaal, S. A. Chamuleau, D. P. de Kleijn, P. A. Doevendans, J. P. Sluijter // Int. J. Cardiol. – 2013. – Vol. 165, № 3. – P. 410-422.
393. Ong, S. B. Akt protects the heart against ischaemia-reperfusion injury by modulating mitochondrial morphology / S. B. Ong, A. R. Hall, R. K. Dongworth, S. Kalkhoran, A. Pyakurel, L. Scorrano, D. J. Hausenloy // Thromb. Haemost. – 2015a. – Vol. 113, № 3. – P. 513-521.
394. Ong, S. B. Mitochondrial fusion and fission proteins as novel therapeutic targets for treating cardiovascular disease / S. B. Ong, S. B. Kalkhoran, H. A. Cabrera-Fuentes, D. J. Hausenloy // Eur. J. Pharmacol. – 2015b. – Vol. 763, № Pt A. – P. 104-114.
395. Ong, S. B. New roles for mitochondria in cell death in the reperfused myocardium / S. B. Ong, A. B. Gustafsson // Cardiovasc. Res. – 2012. – Vol. 94, № 2. – P. 190-196.
396. Ong, S. B. The mitochondrial permeability transition pore and its role in myocardial ischemia reperfusion injury / S. B. Ong, P. Samangouei, S. B. Kalkhoran, D. J. Hausenloy // J. Mol. Cell Cardiol. – 2015c. – Vol. 78. – P. 23-34.
397. Ong, S. G. HIF-1 reduces ischaemia-reperfusion injury in the heart by targeting the mitochondrial permeability transition pore / S. G. Ong, W. H. Lee, L. Theodorou, K. Kodo, S. Y. Lim, D. H. Shukla, T. Briston, S. Kiriakidis, M. Ashcroft, S. M. Davidson, P. H. Maxwell, D. M. Yellon, D. J. Hausenloy // Cardiovasc. Res. – 2014. – Vol. 104, № 1. – P. 24-36.
398. Onishi, A. Sevoflurane confers additive cardioprotection to ethanol preconditioning associated with enhanced phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 β and inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening / A. Onishi, M. Miyamae, H. Inoue, K. Kaneda, C. Okusa, Y. Inamura, M. Shiomi, S. Koshinuma, Y. Momota, V. M. Figueredo // J. Cardiothorac. Vasc. Anesth. – 2013. – Vol. 27, № 5. – P. 916-924.

399. Orogo, A. M. Cell death in the myocardium: my heart won't go on / A. M. Orogo, A. B. Gustafsson // *IUBMB Life*. – 2013. – Vol. 65, № 8. – P. 651-656.
400. Ortega-Alvaro, A. Antinociception produced by the peptidase inhibitor, RB 101, in rats with adrenal medullary transplant into the spinal cord / A. Ortega-Alvaro, A. J. Chover-Gonzalez, R. Lai-Kuen, J. A. Mico, J. Gibert-Rahola, M. C. Fournie-Zaluski, B. P. Roques, R. Maldonado // *Eur. J. Pharm.* – 1998. – Vol. 356, № 2-3. – P. 139-148.
401. Ostergaard, L. Diminished NO release in chronic hypoxic human endothelial cells / L. Ostergaard, E. Stankevicius, M. R. Andersen, Y. Eskildsen-Helmond, Th. Ledet, M. J. Mulvany, U. Simonsen // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2007. – Vol. 293. – P. H2894–H2903.
402. Oudit, G. Y. Cardiac regulation by phosphoinositide 3-kinases and PTEN. / G. Y. Oudit, J. M. Penninger // *Cardiovasc. Res.* – 2009. – Vol. 82. – P. 250–260.
403. Ovize, M. Myocardial conditioning: opportunities for clinical translation / M. Ovize, H. Thibault, K. Przyklenk // *Circ. Res.* – 2013. – Vol. 113, № 4. – P. 439–450.
404. Pabla, R. Nitric oxide attenuates neutrophil-mediated myocardial contractile dysfunction after ischemia and reperfusion. / R. Pabla, A. J. Buda, D. M. Flynn, S.A. Blesse, A. M. Shin, M. J. Curtis, D. J. Lefer // *Circ. Res.* – 1996. – Vol. 78. – P. 65-72.
405. Pain, T. Opening of mitochondrial K(ATP) channels triggers the preconditioned state by generating free radicals. / T. Pain, X. M. Yang, S. D. Critz, Y. Yue, A. Nakano, G. S. Liu // *Circ. Res.* – 2000. – Vol. 87, № 6. – P. 460–466.
406. Painschab, M. S. Association between serum concentrations of hypoxia inducible factor responsive proteins and excessive erythrocytosis in high altitude peru / M. S. Painschab, G. E. Malpartida, V. G. Dávila-Roman, R.H. Gilman, T. M. Kolb, F. León-Velarde, J. J. Miranda, W. Checkley // *High altitude medicine & biology*. – 2015. – Vol. 16, № 1. – P. 26-33.
407. Papp, Z. Calpain-I induced alterations in the cytoskeletal structure and impaired mechanical properties of single myocytes of rat heart. / Z. Papp, J. van der Velden, G. J. Stienen // *Cardiovasc. Res.* – 2000. – Vol. 45, № 4. – P. 981-93.
408. Park, A. M. Acute intermittent hypoxia activates myocardial cell survival signaling. / A. M. Park, H. Nagase, S. Vinod Kumar, Y. J. Suzuki // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2007. – Vol. 292, № 2. – P. H751-H757.

409. Park, K. J. Upregulation of Beclin-1 expression and phosphorylation of Bcl-2 and p53 are involved in the JNK-mediated autophagic cell death. / K. J. Park, S. H. Lee, C. H. Lee, J. Y. Jang, J. Chung, M. H. Kwon, Y. S. Kim // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2009. – Vol. 382, № 4. – P. 726-729.
410. Pasdois, P. The role of oxidized cytochrome c in regulating mitochondrial reactive oxygen species production and its perturbation in ischaemia. / P. Pasdois, J. E. Parker, E. J. Griffiths, A. P. Halestrap // *Biochemistry Journal.* – 2011. – Vol. 436. – 493–505.
411. Pasternak, G. W. Mix and match: heterodimers and opioid tolerance. / G. W. Pasternak, Y. X. Pan // *Neuron.* – 2011. – Vol. 69, № 1. – P. 6-8.
412. Pearl, R. G. Erythropoietin and organ protection: lessons from negative clinical trials / R. G. Pearl // *Crit. Care.* – 2014. – Vol. 18, № 5. – P. 526.
413. Peart, J. N. Impaired p38 MAPK/HSP27 signaling underlies aging-related failure in opioid-mediated cardioprotection. / J. N. Peart, E. R. Gross, J. P. Headrick, G. J. Gross // *J. Mol. Cell Cardiol.* – 2007. – Vol. 42, № 5. – P. 972-980.
414. Peart, J. N. Sustained ligand-activated preconditioning via δ -opioid receptors. / J. N. Peart, L. E. Hoe, G. J. Gross, J. P. Headrick // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2011. – Vol. 336, № 1. – P. 274-281.
415. Pedrozo, Z. Calpains and proteasomes mediate degradation of ryanodine receptors in a model of cardiac ischemic reperfusion. / Z. Pedrozo, G. Sánchez, N. Torrealba, R. Valenzuela, C. Fernández, C. Hidalgo, S. Lavandero, P. Donoso // *Biochim Biophys Acta.* – 2010. – Vol. 1802, № 3. – P. 356-362.
416. Peng, Y. J. Heterozygous HIF-1 α deficiency impairs carotid body-mediated systemic responses and reactive oxygen species generation in mice exposed to intermittent hypoxia / Y. J. Peng, G. Yuan, D. Ramakrishnan, S. D. Sharma, M. Bosch-Marce, G. K. Kumar, G. L. Semenza, N. R. Prabhakar // *J. Physiol.* – 2006. – Vol. 577, Pt 2. – P. 705-716.
417. Penna, C. Mitochondrial pathways, permeability transition pore, and redox signaling in cardioprotection: therapeutic implications. / C. Penna, M. G. Perrelli, P. Pagliaro // *Antioxid. Redox Signal.* – 2013. – Vol. 18, № 5. – P. 556-599.
418. Peppin, J. F. Delta opioid agonists: a concise update on potential therapeutic applications. / J. F. Peppin, R. B. Raffa // *J. Clin. Pharm. Ther.* – 2015. – Vol. 40, № 2. – P. 155-166.

419. Petersen, J. W. Quantification of myocardial segmental function in acute and chronic ischemic heart disease and implications for cardiovascular cell therapy trials: a review from the NHLBI-Cardiovascular Cell Therapy Research Network. / J. W. Petersen, J. R. Forder, J. D. Thomas, L. A. Moyé, M. Lawson, C. Loghin, J. H. Traverse, S. Baraniuk, G. Silva, C. J. Pepine // *JACC Cardiovasc. Imaging*. – 2011. – Vol. 4, № 6. – P. 671-679.
420. Pichon, A. Cardiac adaptation to high altitude in the plateau pika (*Ochotona curzoniae*) / A. Pichon, B. Zhenzhong, D. Marchant, G. Jin, N. Voituren, Y. Haixia, F. Favret, J. P. Richalet, R. L. Ge // *Physiol. Rep.* – 2013. – Vol.1, № 2. – P. e00032.
421. Ping, P. Demonstration of selective protein kinase C-dependent activation of Src and Lck tyrosine kinases during ischemic preconditioning in conscious rabbits. / P. Ping, J. Zhang, Y. T. Zheng, R. C. Li, B. Dawn, X. L. Tang, H. Takano, Z. Balafanova, R. Bolli // *Circ. Res.* – 1999. – Vol. 85. – P. 542–550.
422. Ping, P. Formation of protein kinase C(epsilon)-Lck signaling modules confers cardioprotection / P. Ping, C. Song, J. Zhang, Y. Guo, X. Cao, R. C. Li, W. Wu, T. M. Vondriska, J. M. Pass, X. L. Tang, W. M. Pierce, R. Bolli // *J. Clin. Invest.* – 2002. – Vol. 109. – P. 499–507.
423. Ping, P. Ischemic preconditioning induces selective translocation of protein kinase C isoforms epsilon and delta in the heart of conscious rabbits without subcellular redistribution of total protein kinase C activity. / P. Ping, J. Zhang, Y. Qiu, X. L. Tang, S. Manchikalapudi, X. Cao, R. Bolli // *Circ. Res.* – 1997. – Vol. 81. – P. 404–414.
424. Poras, H. New orally active dual enkephalinase inhibitors (DENKIs) for central and peripheral pain treatment. / H. Poras, E. Bonnard, E. Dangé, M. C. Fournié-Zaluski, B. P. Roques // *J. Med. Chem.* – 2014. – Vol. 57, № 13. – P. 5748-5763.
425. Portnychenko, A. G. Expression of HIF-1 α and HIF-3 α differentially changed in rat heart ventricles after hypoxic preconditioning. / A. G. Portnychenko, V. E. Dosenko, V. I. Portnichenko, O. O. Moybenko // *Proc. XXVIII European Section Meeting of the ISHR, Athens, Greece, May 28-31, 2008.* – Medimond Inter. Proc. 61-64. 2008.
426. Potz, B. A. Calpain inhibition decreases myocardial apoptosis in a swine model of chronic myocardial ischemia / B. A. Potz, A. A. Sabe, N. Y. Elmadhun, J. Feng, Y. Liu, H. Mitchell, P. Quesenberry, M. R. Abid, F. W. Sellke // *Surgery*. – 2015. – Vol. 158, № 2. – P. 445-452.

427. Poupa, O. Acclimatization to simulated high altitude and acute cardiac necrosis. / O. Poupa, K. Krofta, J. Prochazka, Z. Turek // *Federation Proc.* – 1966. – Vol. 25. – P. 1243-1246.
428. Powis, G. Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase. / G. Powis, R. Bonjouklian, M. M. Berggren, A. Gallegos, R. Abraham, C. Ashendel, L. Zalkow, W. F. Matter, J. Dodge, G. Grindey, et al. // *Cancer Res.* – 1994. – Vol. 54, № 9. – P. 2419-2423.
429. Przyklenk, K. Regional ischemic ‘preconditioning’ protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. / K. Przyklenk, B. Bauer, M. Ovize, R. A. Kloner, P. Whittaker // *Circulation.* – 1993. – Vol. 87, №3. – P. 893–899.
430. Qiao, S. Delayed anesthetic preconditioning protects against myocardial infarction via activation of nuclear factor- κ B and upregulation of autophagy / S. Qiao, H. Xie, C. Wang, X. Wu, H. Liu, C. Liu // *J. Anesth.* – 2013. – Vol. 27, № 2. – P. 251-260.
431. Qin, Q. Acetylcholine but not adenosine triggers preconditioning through PI3-kinase and a tyrosine kinase / Q. Qin, J. M. Downey, M. V. Cohen // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2003. – Vol. 284, № 2. – P. H727-H734.
432. Rabkin, S. W. Effect of D-Ala-2-Me-Phe-4-Gly-ol-5 enkephalin on epinephrine-induced arrhythmias in the rat and the interrelationship to the parasympathetic nervous system. / S. W. Rabkin // *Life Sci.* – 1989. – Vol. 45, № 12. – P. 1039-1047.
433. 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.
434. Ramjiawan, A. Roles of histone deacetylation and AMP kinase in regulation of cardiomyocyte PGC-1 α gene expression in hypoxia / A. Ramjiawan, R. A. Bagchi, A. Blant, L. Albak, M. A. Cavasin, T. R. Horn, T. A. McKinsey, M. P. Czubryt // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* – 2013. – Vol. 304, № 11. – P. C1064-C1072.
435. Ramos, M. Assessment of myocardial viability: review of the clinical significance. / M. Ramos, E. De Pasquale, N. L. Coplan // *Rev. Cardiovasc. Med.* – 2008. – Vol. 9, № 4. – P. 225-231.

436. Ramsay, R. R. Redox properties of the flavin cofactor of monoamine oxidases A and B and their relationship to the kinetic mechanism / R. R. Ramsay, S. O. Sablin, T. P. Singer // *Prog. Brain Res.* – 1995. – Vol. 106. – P. 33-39.
437. Ravens, U. Role of potassium currents in cardiac arrhythmias / U. Ravens, E. Cerbai // *Europace.* – 2008. – Vol. 10, № 10. – P. 1133-1137.
438. Ravingerova, T. Brief, intermediate and prolonged ischemia in the isolated crystalloid perfused rat heart: relationship between susceptibility to arrhythmias and degree of ultrastructural injury / T. Ravingerova, N. Tribulova, J. Slazak, M. J. Curtis // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 1995. – Vol. 27. – P. 1937–1951.
439. Ravingerova, T. Differential role of PI3K/Akt pathway in the infarct size limitation and antiarrhythmic protection in the rat heart. / T. Ravingerova, J. Matejíková, J. Neckar, E. Andelova, F. Kolar // *Mol. Cell Biochem.* – 2007. – Vol. 297, № 1-2. – P.111-120.
440. Rivolta, I. Interstitial pressure and lung oedema in chronic hypoxia. / I. Rivolta, V. Lucchini, M. Rocchetti, F. Kolar, F. Palazzo, A. Zaza, G. Miserocchi // *Eur. Respir. J.* – 2011. – Vol. 37, № 4. – P. 943-949.
441. Roberge, S. TNF- α -mediated caspase-8 activation induces ROS production and TRPM2 activation in adult ventricular myocytes / S. Roberge, J. Roussel, D. C. Andersson, A. C. Meli, B. Vidal, F. Blandel, J. T. Lanner, J. Y. Le Guennec, A. Katz, H. Westerblad, A. Lacampagne, J. Fauconnier // *Cardiovasc. Res.* – 2014. – Vol. 103, № 1. – P. 90-99.
442. Rochette, L. Effect of repeated regional myocardial ischemia in the rat heart on reperfusion arrhythmias and release of norepinephrine. / L. Rochette, D. Moreau, L. H. Opie // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* – 2001. – Vol. 38, № 1. – P. 78-89.
443. Rockenfeller, P. Fatty acids trigger mitochondrion-dependent necrosis / P. Rockenfeller, J. Ring, V. Muschett, A. Beranek, S. Buettner, D. Carmona-Gutierrez, T. Eisenberg, C. Khoury, G. Rechberger, S. D. Kohlwein, G. Kroemer, F. Madeo // *Cell Cycle.* – 2010. – Vol. 9, № 14. – P. 2836-2842.
444. Romero, J. CMR imaging for the evaluation of myocardial stunning after acute myocardial infarction: a meta-analysis of prospective trials / J. Romero, J. Kahan, I. Kelesidis, H. Makani, O. Wever-Pinzon, H. Medina, M. J. Garcia // *Eur. Heart J. Cardiovasc. Imaging.* – 2013. – Vol. 14, № 11. – P. 1080-1091.

445. Rong, F. Myocardial apoptosis and infarction after ischemia/reperfusion are attenuated by κ -opioid receptor agonist. / F. Rong, Z. Peng, M. X. Ye, Q. Y. Zhang, Y. Zhao, S. M. Zhang, H. T. Guo, B. Hui, Y. M. Wang, C. Liang, C. H. Gu, C. Tao, Q. Cui, S. Q. Yu, D. H. Yi, J. M. Pei // *Arch. Med. Res.* – 2009. – Vol. 40, № 4. – P. 227-234.
446. 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.
447. Rudyk, O. V. Sensitivity of phenylarsineoxide-induced mitochondrial permeability transition pore opening in the heart of old rats during intermittent hypoxic training. / O.V. Rudyk, H. L. Vavilova, N. A. Strutyns'ka, A. V. Kotsiuruba, V. F. Sahach // *Fiziol. Zh.* – 2004. – Vol. 50, № 5. – P. 29-37.
448. Ruiz-Meana, M. Mitochondrial Ca^{2+} uptake during simulated ischemia does not affect permeability transition pore opening upon simulated reperfusion. / M. Ruiz-Meana, D. Garcia-Dorado, E. Miro-Casas, A. Abellan, J. Soler-Soler // *Cardiovasc. Res.* – 2006. – Vol. 71. – P. 715-724.
449. Ruiz-Meana, M. Opening of mitochondrial permeability transition pore induces hypercontracture in Ca^{2+} overloaded cardiac myocytes / M. Ruiz-Meana, A. Abellan, E. Miró-Casas, D. Garcia-Dorado // *Basic Res. Cardiol.* – 2007. – Vol. 102, № 6. – P. 542-552.
450. 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.
451. Ryou, M. G. Hypoxic conditioning suppresses nitric oxide production upon myocardial reperfusion. / M. G. Ryou, J. Sun, K. N. Oguayo, E. B. Manukhina, H. F. Downey, R. T. Mallet // *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. – 2008. – Vol. 233, № 6. – P.766-774.
452. Saito, Y. Disruption of group IVA cytosolic phospholipase A(2) attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury partly through inhibition of TNF- α -mediated pathway / Y. Saito, K. Watanabe, D. Fujioka, T. Nakamura, J. E. Obata, K. Kawabata, Y. Watanabe, H. Mishina, S. Tamaru, Y. Kita, T. Shimizu, K. Kugiyama // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2012. – Vol. 302, № 10. – P. H2018-H2030.

453. Salman, S. Chronic exposure of neonatal rat adrenomedullary chromaffin cells to opioids in vitro blunts both hypoxia and hypercapnia chemosensitivity / S. Salman, J. Buttigieg, M. Zhang, C. A. Nurse // *J. Physiol.* – 2013. – Vol. 591. – P. 515–529.
454. Salman, S. Chronic opioids regulate K_{ATP} channel subunit Kir6.2 and carbonic anhydrase I & II expression in rat adrenal chromaffin cells via HIF-2 α and protein kinase A. / S. Salman, A. C. Holloway, C. A. Nurse // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2014. – Vol. 307, № 3. – P. C266-C277.
455. Sanchez, J. A. Effects of a reduction in the number of gap junction channels or in their conductance on ischemia-reperfusion arrhythmias in isolated mouse hearts. / J. A. Sánchez, A. Rodríguez-Sinovas, C. Fernández-Sanz, M. Ruiz-Meana, D. García-Dorado // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2011. – Vol. 301, № 6. – P. H2442- H2453.
456. Sasaki, H. Hypoxia/reoxygenation promotes myocardial angiogenesis via an NF kappa B-dependent mechanism in a rat model of chronic myocardial infarction. / H. Sasaki, P. S. Ray, L. Zhu, H. Otani, T. Asahara, N. Maulik // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2001. – Vol. 33, № 2. – P.283-294.
457. Sasaki, N. Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels by nitric oxide. / N. Sasaki, T. Sato, A. Ohler, B. O'Rourke, E. Marban // *Circulation.* – 2000. – Vol. 101. – P. 439-445.
458. Sato, T. Mitochondrial Ca^{2+} -activated K^+ channels in cardiac myocytes: a mechanism of the cardioprotective effect and modulation by protein kinase A. / T. Sato, T. Saito, N. Saegusa, H. Nakaya // *Circulation.* – 2005. – Vol. 111. – P. 198-203.
459. Sawicki, G. Degradation of myosin light chain in isolated rat hearts subjected to ischemia-reperfusion injury: a new intracellular target for matrix metalloproteinase-2. / G. Sawicki, H. Leon, J. Sawicka, M. Sariahmetoglu, C. J. Schulze, P. G. Scott // *Circulation.* – 2005. – Vol. 112. – P. 544-552.
460. Sazontova, T. G. Reactive oxygen species and redox-signaling during adaptation to changes of oxygen level. / T. G. Sazontova, N. A. Anchishkina, A. G. Zhukova, I. V. Bedareva, E. A. Pylaeva, N. A. Kriventsova, A. A. Polianskaia, A. R. Iurasov, Iu. V. Arkhipenko // *Fiziol. Zh.* – 2008. – Vol. 54, № 2. – P.18-32.
461. Scaduto, R. C. Measurement of Mitochondrial Membrane Potential Using Fluorescent Rhodamine Derivatives. / R. C. Scaduto, L. W. Grotyohann // *Biophys. J.* – 1999. – Vol. 76. – P. 469–477.

462. Schiller, P.W. TIPP[ψ]: a highly potent and stable pseudopeptide δ opioid receptor agonist with extraordinary δ selectivity. / P. W. Schiller, G. Weltrowska, T. M. Nguyen // *J. Med. Chem.* – 1993. – Vol. 36, № 21. – P. 3182-3187.
463. Schultz J. J., Ischemic preconditioning and morphine-induced cardioprotection involve the delta (delta)-opioid receptor in the intact rat heart. / J. J. Schultz, A. K. Hsu, G. J. Gross // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 1997b. – Vol. 29, № 8. – P. 2187-2195.
464. Schultz, J. E. Evidence for involvement of opioid receptors in ischemic preconditioning in rat hearts. / J. E. Schultz, E. Rose, Z. Yao, G. J. Gross // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 1995. – Vol. 268. – P. H2157-H2161.
465. Schultz, J. E. Glibenclamide-induced blockade of ischemic preconditioning is time dependent in intact rat heart. / J. E. Schultz, Z. Yao, I. Cavero, G. J. Gross // *Am. J. Physiol.* – 1997. – Vol. 272, № 6, Pt 2. – P. H2607-2615.
466. Schultz, J. E. J. Ischemic preconditioning in the intact rat heart is mediated by delta1- but not mu- or kappa-opioid receptors. / J. E. J. Schultz, A. K. Hsu, G. J. Gross // *Circulation.* – 1998. – Vol. 97. – P. 1282-1289.
467. Schultz, J. E. J. Morphine mimics the cardioprotective effect of ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in the rat heart. / J. E. J. Schultz, A. K. Hsu, G. J. Gross // *Circ. Res.* – 1996. – Vol. 78. – P. 1100-1104.
468. Schultz, J. E. J. TAN-67, a δ 1-opioid receptor agonist, reduces infarct size via activation of Gi/o proteins and KATP channels. / J. E. Schultz, A. K. Hsu, H. Nagase, G. J. Gross // *Am. J. Physiol.* – 1998. – Vol. 274, № 3 Pt 2. – P. H909-H914.
469. Schultz, J. J. Ischemic preconditioning is mediated by a peripheral opioid receptor mechanism in the intact rat heart. / J. J. Schultz, A. K. Hsu, G. J. Gross // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 1997a. – Vol. 29, № 5. – P.1355-1362.
470. Schulz, R. Ischemic preconditioning preserves connexin 43 phosphorylation during sustained ischemia in pig hearts in vivo. / R. Schulz, P. Gres, A. Skyschally, A. Duschin, S. Belosjorow, I. Konietzka, G. Heusch // *FASEB J.* – 2003. – Vol. 17. – P. 1355–1357.
471. Schulz, R. Tumor necrosis factor-alpha and its receptors 1 and 2: Yin and Yang in myocardial infarction? / R. Schulz, G. Heusch // *Circulation.* – 2009. – Vol. 119. – P. 1355–1357.

472. Selye, H. The Story of the Adaptation Syndrome. Montreal. Acta, Inc. Medical Publishers. 1952.
473. Semenza, G. L. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology / G. L. Semenza // *Annu. Rev. Pathol.* – 2013. – Vol. 9. – P. 47-71.
474. Semenza, G.L. Hypoxia-inducible factor 1 and cardiovascular disease. / G. L. Semenza // *Annu. Rev. Physiol.* – 2014. – Vol. 76. – P. 39-56.
475. Semenza, G.L. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. / G. L. Semenza // *Physiology.* – 2009. – Vol. 24. – P. 97-106.
476. Shatemirova, K. K. Catalytic properties of monoamine oxidases during adaptation to altitude chamber hypoxia. / K. K. Shatemirova, V. A. Zelenshchikova, Iu. V.Min'ko // *Kosm. Biol. Aviakosm. Med.* – 1990. – Vol. 24, № 2. – P. 54-56.
477. Shekher, A. Role of noradrenaline uptake inhibition and alpha-adrenoceptors in reperfusion ventricular arrhythmias in vivo and in vitro. / A. Shekher, P. L. Sharma, P. Pandhi, M. Singh // *Indian J. Exp. Biol.* – 1996. – Vol. 34, № 11. – P. 1085-1090.
478. Shen, J, Matrix metalloproteinase-2 contributes to tumor necrosis factor alpha induced apoptosis in cultured rat cardiac myocytes. / J. Shen, D. O'Brien, Y. Xu // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2006. – Vol. 347. – P. 1011–1020.
479. Shi, Z. Nuclear factor- κ B activation inhibitor attenuates ischemia reperfusion injury and inhibits Hmgb1 expression / Z. Shi, A. Lian, F. Zhang // *Inflamm. Res.* – 2014. – Vol. 63, № 11. – P. 919-925.
480. Shimizu, M. Transient limb ischaemia remotely preconditions through a humoral mechanism acting directly on the myocardium: evidence suggesting cross-species protection. / M. Shimizu, M. Tropak, R. J. Diaz, F. Suto, H. Surendra, E. Kuzmin, J. Li, G. Gross, G. J. Wilson, J. Callahan, A. N. Redington // *Clin. Sci. (Lond).* – 2009. – Vol. 117, № 5. – P.191-200.
481. Shintani-Ishida, K. Ischemia induces phospholamban dephosphorylation via activation of calcineurin, PKC- α , and protein phosphatase 1, thereby inducing calcium overload in reperfusion. / K. Shintani-Ishida, K. Yoshida // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2011. – Vol. 1812, № 7. – P. 743—751.
482. Shizukuda, Y. Hypoxic preconditioning of ischaemic canine myocardium. / Y. Shizukuda, R. T. Mallet, S. C. Lee, H. F. Downey // *Cardiovasc. Res.* – 1992. - Vol. 26, № 5. – P. 534-542.

483. Siemen, D. Ca^{2+} -activated K^+ channel of the BK-type in the inner mitochondrial membrane of a human glioma cell line. / D. Siemen, C. Loupatatzis, J. Borecky, E. Gulbins, F. Lang // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1999. – Vol. 257, № 2. – P. 549-554.
484. Simkhovich, B. Z. Direct evidence that ischemic preconditioning does not cause protein kinase C translocation in rabbit heart. / B. Z. Simkhovich, K. Przyklenk, S. L. Hale, M. Patterson, R. A. Kloner // *Cardiovasc. Res.* – 1996. – Vol. 32. – P. 1064–1070.
485. Simonson, T. S. Altitude adaptation: a glimpse through various lenses. / T. S. Simonson // *High altitude medicine & biology.* – 2015. – Vol. 16, № 2. – 125-137.
486. Singh, I. N. Time course of post-traumatic mitochondrial oxidative damage and dysfunction in a mouse model of focal traumatic brain injury: implications for neuroprotective therapy. / I. N. Singh, P. G. Sullivan, Y. Deng, L. H. Mbye, E. D. Hall // *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* – 2006. – Vol. 26, № 11. – P. 1407-1418.
487. Singh, M. Dietary nitrite attenuates oxidative stress and activates antioxidant genes in rat heart during hypobaric hypoxia / M. Singh, A. Arya, R. Kumar, K. Bhargava, N. K. Sethy // *Nitric Oxide.* – 2012. – Vol. 26, № 1. – P. 61-73.
488. Singh, R. B. Ischemia-reperfusion-induced changes in sarcolemmal Na^+/K^+ -ATPase are due to the activation of calpain in the heart. / R. B. Singh, N. S. Dhalla // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 2010. – Vol. 88, № 3. – P. 388-397.
489. Skrabalova, J. Antiarrhythmic effect of prolonged morphine exposure is accompanied by altered myocardial adenylyl cyclase signaling in rats / J. Skrabalova, J. Neckar, L. Hejnova, I. Bartonova, F. Kolar, J. Novotny // *Pharmacol. Rep.* – 2012. – Vol. 64, № 2. – P. 351-359.
490. Sobanski, P. The presence of μ -, δ -, and κ -opioid receptors in human heart tissue. / P. Sobanski, M. Krajnik, M. Shaqura, E. Bloch-Boguslawska, M. Schäfer, S. A. Mousa // *Heart Vessels.* – 2014. – Vol. 29, № 6. – P. 855-63.
491. Sobanski, P. The presence of μ -, δ -, and κ -opioid receptors in human heart tissue. / P. Sobanski, M. Krajnik, M. Shaqura, E. Bloch-Boguslawska, M. Schäfer, S. A. Mousa // *Heart Vessels.* – 2014. – Vol. 29, № 6. – P. 855-863.
492. Sofuoglu, M. δ -Opioid receptor binding in mouse brain: evidence for heterogeneous binding sites / M. Sofuoglu, P. S. Portoghesi, A. E. Takemori // *Eur. J. Pharmacol.* – 1992. – Vol. 216, № 2. – P. 273-277.

493. Solhjoo, S. Mitochondrial instability during regional ischemia-reperfusion underlies arrhythmias in monolayers of cardiomyocytes / S. Solhjoo, B. O'Rourke // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2015. – Vol. 78. – P. 90-99.
494. Stabel, S. Protein kinase C. / S. Stabel, P. J. Parker // *Pharmacol. Ther.* – 1991. – Vol. 51, №1. – P.71-95.
495. Stein, A. B. The late phase of ischemic preconditioning induces a prosurvival genetic program that results in marked attenuation of apoptosis. / A. B. Stein, R. Bolli, Y. Guo, O. L. Wang, W. Tan, W. J. Wu // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2007. – Vol. 42, № 6. – P. 1075-1085.
496. Stevens, W. C. Jr. Potent and selective indolomorphinan antagonists of the kappa-opioid receptor / W. C. Stevens Jr, R. M. Jones, G. Subramanian, T. G. Metzger, D. M. Ferguson, P. S. Portoghese // *J. Med. Chem.* – 2000. – Vol. 43, № 4. – P. 2759-2769.
497. 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, № 5. – P. 224-231.
498. Stowe, D. F. Cardiac mitochondrial preconditioning by Big Ca²⁺-sensitive K⁺ channel opening requires superoxide radical generation. / D. F. Stowe, M. Aldakkak, A. K. Camara, M. L. Riess, A. Heinen, S. G. Varadarajan, M. T. Jiang // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2006. – Vol. 290, № 1. – P. H434-H440.
499. Strehler, B. L. Adenosine-5'-triphosphate and Creatine Phosphate: Determination with Luciferase / B. L. Strehler // *Methods of Enzymatic Analysis.* – 2nd Ed. – Vol. 4, Bergmeyer, H. U. (Ed.). – Academic Press, New York. – 1974. – P. 2112-2115.
500. Strniskova, M. Changes in the expression and/or activation of regulatory proteins in rat hearts adapted to chronic hypoxia. / M. Strniskova, T. Ravingerova, J. Neckar, F. Kolar, S. Pastorekova, M. Barancek // *Gen Physiol Biophys.* – 2006. – Vol. 25, № 1. – P. 25-41.
501. Sukhodub, A. AMP-activated protein kinase mediates preconditioning in cardiomyocytes by regulating activity and trafficking of sarcolemmal ATP-sensitive K⁺ channels / A. Sukhodub, S. Jovanovic, Q. Du, G. Budas, A. K. Clelland, M. Shen, K. Sakamoto, R. Tian, A. Jovanović // *J. Cell. Physiol.* – 2007. – Vol. 210, № 1. – P. 224-236.

502. Suleman, N. Dual activation of STAT-3 and Akt is required during the trigger phase of ischaemic preconditioning. / N. Suleman, S. Somers, R. Smith, L. H. Opie, S. C. Lecour // *Cardiovasc. Res.* – 2008. – Vol. 79, № 1. – P. 127-133.
503. 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, № 9. – P. 1545-1551.
504. Surendra, H. Interaction of δ and κ opioid receptors with adenosine A1 receptors mediates cardioprotection by remote ischemic preconditioning. / H. Surendra, R.J. Diaz, K. Harvey, M. Tropak, J. Callahan, A. Hinek, T. Hossain, A. Redington, G. J. Wilson // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2013. – Vol. 60. – P. 142-150.
505. 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 Suppl.* – 2003. – Vol. 2, №1. – P. 53.
506. Szabo, B. Opioid peptides decrease noradrenaline release and blood pressure in the rabbit at peripheral receptors. / B. Szabo, L. Hedler, H. Ensinger, K. Starke // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* – 1986. – Vol. 332, № 1 – P. 50-56.
507. Tajima, M. Acute ischemic preconditioning and chronic hypoxia independently increase myocardial tolerance to ischemia / M. Tajima, D. Katajose, M. Bessho, S. Isoyama // *Cardiovasc. Res.* – 1994. – Vol. 28. – P. 312–319.
508. Takagi, H. Remote ischemic preconditioning for cardiovascular surgery: an updated meta-analysis of randomized trials / H. Takagi, T. Umemoto // *Vasc. Endovascular Surg.* – 2011. – Vol. 45, № 6. – P. 511–513.
509. Takagi, H. The role of autophagy in mediating cell survival and death during ischemia and reperfusion in the heart / H. Takagi, Y. Matsui, J. Sadoshima // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2007. – Vol. 9. – P. 1373–1382.
510. Takemori, A. E. Selective naltrexone-derived opioid receptor antagonists // A. E. Takemori, P.S. Portoghese // *Annual Reviews Inc.* – 1992. – Vol. 32. – P. 239-269.
511. Takeshita, D. A new calpain inhibitor protects left ventricular dysfunction induced by mild ischemia-reperfusion in in situ rat hearts / D. Takeshita, M. Tanaka, S. Mitsuyama, Y. Yoshikawa, G. X. Zhang, K. Obata, H. Ito, S. Taniguchi, M. Takaki // *J. Physiol. Sci.* – 2013. – Vol. 63. – № 2 – P. 113-123.

512. Tavernarakis, N. Cardiomyocyte necrosis: alternative mechanisms, effective interventions / N. Tavernarakis // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2007. – Vol. 1773. – P. 480–482.
513. Tennant, R. The effect of coronary occlusion on myocardial contractions / R. Tennant, C. J. Wiggers // *Am. J. Physiol.* – 1935. – Vol. 112. – P. 351-361.
514. Terenius, L. Characteristics of the "receptor" for narcotic analgesics in synaptic plasma membrane fraction from rat brain / L. Terenius // *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh).* – 1973. – Vol. 33. – № 5. – P. 377-384.
515. Thanawala, V. Enkephalinase inhibitors: potential agents for the management of pain / V. Thanawala, V. J. Kadam, R. Ghosh // *Curr. Drug Targets.* – 2008. – Vol. 9, № 10. – P. 887-894.
516. Thune, J. J. Left ventricular diastolic function following myocardial infarction / J. J. Thune, S. D. Solomon // *Curr. Heart Fail. Rep.* – 2006. – Vol. 3, № 4. – P. 170-174.
517. Tong, H. Ischemic preconditioning activates phosphatidylinositol-3- kinase upstream of protein kinase C / H. Tong, W. Chen, C. Steenbergen, E. Murphy // *Circ. Res.* – 2000. – Vol. 87, № 4. – P. 309–315.
518. 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, № 15. – P. 1223-1227.
519. Valdez, L. B. Complex I syndrome in myocardial stunning and the effect of adenosine / L. B. Valdez, T. Zaobornyj, S. Bombicino, D. E. Iglesias, A. Boveris, M. Donato, V. D'Annunzio, B. Buchholz, R. J. Gelpi // *Free Radic. Biol. Med.* – 2011. – Vol. 51, № 6. – P. 1203-1212.
520. Valen, G. Nuclear factor kappa-B and the heart. / G. Valen, Z. Q. Yan, G. K. Hansson // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2001. – Vol. 38, № 2. – P. 307-314.
521. Vander Heide, R. S. An in vitro model of myocardial ischemia utilizing isolated adult rat myocytes / R. S. Vander Heide, D. Rim, C. M. Hohl, C. E. Ganote // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 1990. – Vol. 22. – P. 165–181.
522. Ventura, C. Kappa and delta opioid receptor stimulation affects cardiac myocyte function and Ca^{2+} release from an intracellular pool in myocytes and neurons / C.

- Ventura, H. A. Spurgeon, E. G. Lakatta, C. Guarniernieri, M. C. Capogrossi // *Circ. Res.* – 1992. – Vol. 70. – P. 66-81.
523. Viappiani, S. Activation and modulation of 72 kDa matrix metalloproteinase-2 by peroxynitrite and glutathione / S. Viappiani, A. C. Nicolescu, A. Holt, G. Sawicki, B. D. Crawford, H. Leon [et al.] // *Biochem. Pharmacol.* – 2009. – Vol. 77. – P. 826–834.
524. Voelkel, N. F. Effect of hypoxia on density of beta-adrenergic receptors / N. F. Voelkel, J. Hegstrand, J. T. Reves, I. F. McMurfy, P. Molinoff // *J. Appl. Physiol.* – 1981. – Vol. 50. – P. 363-366.
525. Vrbjar, N. Influence of global ischemia on the sarcolemmal ATPases in the rat heart / N. Vrbjar, A. Dzurba, A. Ziegelhöffer // *Mol. Cell. Biochem.* – 1995. – Vol. 147, № 1/2. – P. 99-103.
526. Walsh, M. P. The early effects of chronic hypoxia on the cardiovascular system in the rat: role of nitric oxide / M. P. Walsh, J. M. Marshall // *J. Physiol.* – 2006. – Vol. 575, Pt. 1. – P. 263-275.
527. Wang, G. L. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia / G. L. Wang, G. L. Semenza // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 1993. – Vol. 90, № 9. – P. 4304-4308.
528. Wang, G. Y. Kappa- but not delta-opioid receptors mediate effects of ischemic preconditioning on both infarct and arrhythmia in rats / G. Y. Wang, S. Wu, J. M. Pei, X. C. Yu, T. M. Wong // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2001. – Vol. 280, № 1. – P. H384-H391.
529. Wang, K. Variations in the protein level of Omi/HtrA2 in the heart of aged rats may contribute to the increased susceptibility of cardiomyocytes to ischemia/reperfusion injury and cell death: Omi/HtrA2 and aged heart injury / K. Wang, J. Zhang, J. Liu, J. Tian, Y. Wu, X. Wang, L. Quan, H. Xu, W. Wang, H. Liu // *Age (Dordr)* . – 2013. – Vol. 35, № 3. – P. 733-746.
530. Wang, Q. Quaternary ammonium salt of U50488H, a new κ -opioid receptor agonist, protects rat heart against ischemia/reperfusion injury. / Q. Wang, Y. Sun, J. Li, W. Xing, S. Zhang, X. Gu, N. Feng, L. Zhao, R. Fan, Y. Wang, W. Yin, J. Pei // *Eur. J. Pharmacol.* – 2014. – Vol. 737. – P. 177-184.

531. Wang, Z. Hypoxia-inducible factor-1 α and vascular endothelial growth factor in the cardioprotective effects of intermittent hypoxia in rats / Z. Wang, L.Y. Si // *Ups. J. Med. Sci.* – 2013. – Vol. 118, № 2. – P. 65-74.
532. Wang, Z. H. Mitochondrial energy metabolism plays a critical role in the cardioprotection afforded by intermittent hypobaric hypoxia / Z. H. Wang, X. L. Cai, L. Wu, Z. Yu, J. L. Liu, Z. N. Zhou, J. Liu, H. T. Yang // *Exp. Physiol.* – 2012. – Vol. 97, № 10. – P.1105-1118.
533. Ward, J. P. Oxygen sensors in context / J. P. Ward // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2008. – Vol.1777, № 1. – P. 1-14.
534. Waskova-Arnostova, P. Chronic hypoxia enhances expression and activity of mitochondrial creatine kinase and hexokinase in the rat ventricular myocardium / P. Waskova-Arnostova, D. Kasparova, B. Elsnicova, J. Novotny, J. Neckar, F. Kolar, J. Zurmanova // *Cell. Physiol. Biochem.* – 2014. – Vol. 33, № 2. – P. 310-320.
535. Waskova-Arnostova, P. Right-to-left ventricular differences in the expression of mitochondrial hexokinase and phosphorylation of Akt / P. Waskova-Arnostova, B. Elsnicova, D. Kasparova, O. Sebesta, J. Novotny, J. Neckar, F. Kolar, J. Zurmanova // *Cell. Physiol. Biochem.* – 2013. – Vol. 31, № 1. – P. 66-79.
536. West, J. B. Recent advances in high altitude medicine and biology / J. B. West // *High altitude medicine & biology.* – 2015. – Vol. 16, № 2. – P. 73-73.
537. White, S. K. Remote ischemic conditioning reduces myocardial infarct size and edema in patients with ST-segment elevation myocardial infarction / S. K. White, G. M. Frohlich, D. M. Sado, V. Maestrini, M. Fontana, T. A. Treibel, S. Tehrani, A. S. Flett, P. Meier, C. Ariti, J. R. Davies, J. C. Moon, D. M. Yellon, D. J. Hausenloy // *JACC Cardiovasc. Interv.* – 2015. – Vol. 8, № 1 Pt B. – P. 178-88.
538. Williams, I. A. The rise of [Na⁽⁺⁾]_i during ischemia and reperfusion in the rat heart-underlying mechanisms / I. A. Williams, X. H. Xiao, Y. K. Ju, D. G. Allen // *Pflugers Arch.* – 2007. – Vol. 454, № 6. – P. 903—912.
539. Williams-Pritchard, G. Myocardial opioid receptors in conditioning and cytoprotection / G. Williams-Pritchard, J. P. Headrick, J. N. Peart // *Pharmaceuticals.* – 2011. – Vol. 4. – P. 470-484.

540. Winkler, C. Arrhythmias in patients with acute coronary syndrome in the first 24 hours of hospitalization / C. Winkler, M. Funk, D. M. Schindler, J. Z. Hemsey, R. Lampert, B. J. Drew // *Heart Lung*. – 2013. – Vol. 42, № 6. – P. 422-427.
541. Wolff, M. The Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (ARNT/HIF-1 β) is influenced by hypoxia and hypoxia-mimetics / M. Wolff, W. Jelkmann, J. Dunst, Depping R. // *Cell. Physiol. Biochem.* – 2013. – Vol. 32, № 4. – P. 849-858.
542. Wong, A. K. AMP-activated protein kinase pathway: a potential therapeutic target in cardiometabolic disease / A.K. Wong, J. Howie, J. R. Petrie, C. C. Lang // *Clin. Sci. (Lond)*. – 2009. – Vol. 116, № 8. – P. 607-620.
543. Wong, G. T. Cardioprotection from remote preconditioning involves spinal opioid receptor activation / G. T. Wong, Y. Lu, B. Mei, Z. Xia, M. G. Irwin // *Life Sci.* – 2012. – Vol. 91, № 17-18. – P. 860-865.
544. Woods D.R., Cardiac arrhythmias at high altitude / D. R. Woods, C. Boos, P. R. Roberts // *J. R. Army. Med. Corps.* – 2011. – Vol. 157, № 1. – P. 59-62.
545. Wu, J. Chronic intermittent hypoxia decreases pain sensitivity and increases the expression of HIF1 α and opioid receptors in experimental rats / J. Wu, P. Li, X. Wu, W. Chen // *Sleep Breath.* – 2015. – Vol. 19, № 2. – P. 561-568.
546. Wu, X. U50,488H inhibits neutrophil accumulation and TNF- α induction induced by ischemia-reperfusion in rat heart / X. Wu, B. Zhang, R. Fan, L. Zhao, Y. Wang, S. Zhang, A. D. Kaye, L. Huang, J. Pei // *Cytokine.* – 2011. – Vol. 56, № 2. – P. 503-507.
547. Wu, Y. The effect of butorphanol postconditioning on myocardial ischaemia reperfusion injury in rats. *Interact* / Y. Wu, J. Wan, W. Z. Zhen, L. F. Chen, J. Zhan, J. J. Ke, Z. Z. Zhang, Y. L. Wang // *Cardiovasc. Thorac. Surg.* – 2014. – Vol. 18, № 3. – P. 308-312.
548. Xi, L. Evidence that NOS2 acts as a trigger and mediator of late preconditioning induced by acute systemic hypoxia / L. Xi, D. Tekin, E. Gursoy, F. Salloum, J. E. Levasseur, R. C. Kukreja // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2002. – Vol. 283, № 1. – P. H5-H12
549. Xi, L., Loss of myocardial ischemic postconditioning in adenosine A1 and bradykinin B2 receptors gene knockout mice / L. Xi, A. Das, Z. Q. Zhao, V. F. Merino, M Bader, R. C.Kukreja // *Circulation.* – 2008. – Vol. 118. – P. 32-37.

550. Xiao, R. - P. Opioid peptide stimulation reverses β -adrenergic effects in rat heart cells / R.-P. Xiao, S. Pepe, H. A. Spurgeon, M. C. Capogrossi, E. G. Lakatta // *Am. J. Physiol.* - 1997. - Vol. 272. - P. H797-H805.
551. Xie, L. Depletion of PHD3 protects heart from ischemia/reperfusion injury by inhibiting cardiomyocyte apoptosis / L. Xie, X. Pi, Z. Wang, J. He, M. S. Willis, C. Patterson // *J. Mol. Cell. Cardiol.* - 2015. - Vol. 80. - P. 156-165.
552. Xin, W. All preconditioning-related G protein-coupled receptors can be demonstrated in the rabbit cardiomyocyte / W. Xin, X. Yang, T. C. Rich, T. Krieg, R. Barrington, M. V. Cohen, J. M. Downey // *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* - 2012. - Vol. 17, № 2. - P. 190-198.
553. Xin, W. Improved cardiac function after sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase gene transfer in a heart failure model induced by chronic myocardial ischaemia / W. Xin, X. Li, X. Lu, K. Niu, J. Cai // *Acta Cardiol.* - 2011. - Vol. 66, № 1. - P. 57-64.
554. Xu, J. The molecular mechanism underlying morphine-induced Akt activation: roles of protein phosphatases and reactive oxygen species. / J. Xu, W. Tian, X. Ma, J. Guo, Q. Shi, Y. Jin, J. Xi, Z. Xu // *Cell. Biochem. Biophys.* - 2011. - Vol. 61, № 2. - P. 303-311.
555. Xu, L. Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. / L. Xu, J. P. Eu, G. Meissner, J.S. Stamler // *Science.* - 1998. - Vol. 279. - P. 234-237
556. Xu, W. Cytoprotective role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in the cardiac inner mitochondrial membrane / W. Xu, Y. Liu, S. Wang, T. McDonald, J. E. Van Eyk, A. Sidor, B. O'Rourke // *Science.* - 2002. - Vol. 298, № 5595. - P. 1029-1033.
557. Xu, X. Primary culture of adult rat heart myocytes [electronic resource] / X. Xu, H. Colecraft // *J. Vis. Exp.* - 2009. - Vol. 28. - P. 1308.
558. Xu, Y. C. κ -Opioid receptors are involved in enhanced cardioprotection by combined fentanyl and limb remote ischemic preconditioning / Y. C. Xu, R. P. Li, F. S. Xue, X. L. Cui, S. Y. Wang, G. P. Liu, G. Z. Yang, C. Sun, X. Liao // *J. Anesth.* - 2015. - Vol. 29, № 4. - P. 535-543.
559. Yamamura, K Protein kinase C and preconditioning: role of the sarcoplasmic reticulum. / K. Yamamura, C. Steenbergen, E. Murphy // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* - 2005. - Vol. 289. - P. H2484-H2490.

560. Yaman, M. O. The effects of acute intermittent hypoxia on cardiovascular parameters in normotensive and chronic hypobaric hypoxia-induced hypertensive rabbits. / M. O. Yaman, I. Guner, H. Uzun, G. Sahin, N. Yelmen // *Gen. Physiol. Biophys.* – 2014. – Vol. 33, № 2. – P. 243-250.
561. Yang, C Early ischaemic preconditioning requires Akt- and PKA-mediated activation of eNOS via serine1176 phosphorylation. / C. Yang, M. A. Talukder, S. Varadharaj, M. Velayutham, J. L. Zweier // *Cardiovasc. Res.* – 2013. – Vol. 97. – P. 33–43.
562. Yang, C. Analysis of hypoxia-induced metabolic reprogramming. / C. Yang, L. Jiang, H. Zhang, L. A. Shimoda, R. J. DeBerardinis, G. L. Semenza // *Methods Enzymol.* – 2014. – Vol. 542. – P. 425-455.
563. 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, № 8. – P. 1428-1438.
564. Yang, X. Mechanism of cardioprotection by early ischemic preconditioning / X. Yang, M. V. Cohen, J. M. Downey // *Cardiovasc. Drugs. Ther.* – 2010. – Vol. 24, №3. – P. 225-234.
565. Yao, H. The cardioprotection of the insulin-mediated PI3K/Akt/mTOR signaling pathway / H. Yao, X. Han, X. Han // *Am. J. Cardiovasc. Drugs.* – 2014. – Vol. 14, № 6. – P. 433-442.
566. Yellon, D. M. Preconditioning the human myocardium. / D. M. Yellon, A. M. Alkhulaifi, W. B. Pugsley // *Lancet.* – 1993. – Vol. 342, № 8866. – P. 276–277.
567. 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.
568. Yelmen, N. The effects of chronic long-term intermittent hypobaric hypoxia on blood rheology parameters / N. Yelmen, S. Ozdemir, I. Guner, S. Toplan, G. Sahin, O. M. Yaman, S. Sipahi // *Gen. Physiol. Biophys.* – 2011. – Vol. 30, № 4. – P. 389-395.
569. Yin, X. Cardiac response to chronic intermittent hypoxia with a transition from adaptation to maladaptation: the role of hydrogen peroxide. / X. Yin, Y. Zheng, Q. Liu, J. Cai, L. Cai // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2012. – Vol. 2012. – P. 569520.

570. Yoshikawa, Y. Cardioprotective effects of a novel calpain inhibitor SNJ-1945 for reperfusion injury after cardioplegic cardiac arrest / Y. Yoshikawa, G. X. Zhang, K. Obata, Y. Ohga, H. Matsuyoshi, S. Taniguchi, M. Takaki // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2010. – Vol. 298, № 2. – P. H643-651.
571. Younès A. Cardiac synthesis, processing, and coronary release of enkephalin-related peptides. / A. Younes, S. Pepe, B. A. Barron, H. A. Spurgeon, E. G. Lakatta, J. L. Caffrey // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* - 2000.- Vol. 279, № 4. – P. H1989-98.
572. Yuan, G. Ca^{2+} /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.
573. Yuan, G. Induction of HIF-1 α expression by intermittent hypoxia: involvement of NADPH oxidase, Ca^{2+} signaling, prolyl hydroxylases and mTOR / G. Yuan, J. Nanduri, S. Khan, G. L. Semenza, N. R. Prabhakar // *J. Cell. Physiol.* – 2008. – Vol. 217. – P. 674-685.
574. Yui, H. Comparative effects of verapamil, nifedipine, and nitroglycerin on myocardial ischemia-reperfusion injury [electronic resource] / H. Yui, U. Imaizumi, H. Beppu, M. Ito, M. Furuya, H. Arisaka, K. Yoshida // *Anesthesiol. Res. Pract.* – 2011. – Vol. 2011. – Article ID 521084, [6] p.
575. Zaobornyj, T. Mitochondrial nitric oxide metabolism during rat heart adaptation to high altitude: effect of sildenafil, L-NAME, and L-arginine treatments. / T. Zaobornyj, L. B. Valdez, D. E. Iglesias, M. Gasco, G. F. Gonzales, A. Boveris // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* - 2009. - Vol. 296, № 6. - P. H1741-1747.
576. Zaobornyj, T. Strategic localization of heart mitochondrial NOS: a review of the evidence / T. Zaobornyj, P. Ghafourifar // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2012. – Vol. 303. – № 11. – P. H1283-H1293.
577. 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, № 3. – P. H1444–H1451.

578. Zeng, X. Opioid $\delta(1)$ and $\delta(2)$ receptor agonist attenuate myocardial injury via mPTP in rats with acute hemorrhagic shock. / X. Zeng, X. Zhao, Y. Yang, J. Kuai, C. Gao, D. Yu, H. Zhao, W. Chai, L. Yao // *J. Surg. Res.* – 2011. – Vol. 169, № 2. – P. 267-276.
579. Zhang, Q. L. MAPK and PI3K pathways regulate hypoxia-induced atrial natriuretic peptide secretion by controlling HIF-1 alpha expression in beating rabbit atria / Q. L. Zhang, B. R. Cui, H. Y. Li, P. Li, L. Hong, L. P. Liu, D. Z. Ding, X. Cui // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2013. – Vol. 438, № 3. – P. 507-512.
580. Zhang, R. Effect of morphine-induced postconditioning in corrections of tetralogy of fallot. / R. Zhang, L. Shen, Y. Xie, L. Gen, X. Li, Q. Ji // *J. Cardiothorac. Surg.* – 2013. – Vol. 8. – P. 76.
581. Zhang, W. M. Multiplicity of kappa opioid receptor binding in the rat cardiac sarcolemma / W. M. Zhang, W. Q. Jin, T. M. Wong // *J. Mol. Cell. Cardiol.* - 1996. - Vol. 28, № 7. – P.1547-1554
582. Zhang, X. Natural antioxidant-isoliquiritigenin ameliorates contractile dysfunction of hypoxic cardiomyocytes via AMPK signaling pathway / X. Zhang, P. Zhu, X. Zhang, Y. Ma, W. Li, J. M. Chen, H. M. Guo, R. Bucala, J. Zhuang, J. Li // *Mediators Inflamm.* – 2013. – Vol. 2013. – P. 390890.
583. Zhang, Y. Oxidative stress and antioxidant status in a lizard *Phrynocephalus vlangalii* at different altitudes or acclimated to hypoxia / Y. Zhang, S. Liang, J. He, Y. Bai, Y. Niu, X. Tang, D. Li, Q. Chen // *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* – 2015. – Vol. 190. – P. 9-14.
584. Zhang, Y. Remifentanil mimics cardioprotective effect of ischemic preconditioning via protein kinase C activation in open chest of rats / Y. Zhang, Z. W. Chen, M. Girwin, T.M. Wong // *Acta Pharmacol. Sin.* – 2005. – Vol. 26, № 5. – P. 546-550.
585. Zhang, Y. Remifentanil preconditioning confers cardioprotection via cardiac kappa- and delta-opioid receptors. / Y. Zhang, M. G. Irwin, T. M. Wong, M. Chen, C. M. Cao // *Anesthesiology.* – 2005a. – Vol. 102, № 2. – P. 371-388.
586. 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 // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2003. – Vol. 285, № 2. – P. H579–588.
587. Zheng, D. Calpain-1 induces endoplasmic reticulum stress in promoting cardiomyocyte apoptosis following hypoxia/reoxygenation / D. Zheng, G. Wang, S. Li, G. C. Fan, T. Peng // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2015. – Vol. 1852, № 5. – P. 882-892.
588. Zhong, H. Modulation of hypoxia-inducible factor 1 expression by the epidermal growth factor/ phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics / H. Zhong, K. Chiles, D. Feldser, E. Laughner, C. Hanrahan, M. M. Georgescu, J. W. Simons, G. L. Semenza // *Cancer Res.* – 2000. – Vol. 60. – P. 1541–1545.
589. Zhou, F. Bcl-2 and Bcl-xL play important roles in the crosstalk between autophagy and apoptosis / F. Zhou, Y. Yang, D. Xing // *FEBS J.* – 2011. – Vol. 278, № 3. – P. 403-413.
590. Zhou, J. J. Chronic intermittent hypobaric hypoxia prevents cardiac dysfunction through enhancing antioxidation in fructose-fed rats / J. J. Zhou, Y. Wei, L. Zhang, J. Zhang, L. Y. Guo, C. Gao, D. P. Li, Y. Zhang // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 2013. – Vol. 91, № 5. – P. 332-337.
591. Zhou, J. J. Chronic intermittent hypobaric hypoxia prevents cardiac dysfunction through enhancing antioxidation in fructose-fed rats / J. J. Zhou, Y. Wei, L. Zhang, J. Zhang, L. Y. Guo, C. Gao, D. P. Li, Y. Zhang // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 2013. – Vol. 91, № 5. – P. 332-337.
592. Zhou, J. J. The anti-arrhythmic effect of chronic intermittent hypobaric hypoxia in rats with metabolic syndrome induced with fructose / J. J. Zhou, H. J. Ma, Y. Liu, Y. Guan, L. N. Maslov, D. P. Li, Y. Zhang // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 2015. – Vol. 93, № 4. – P. 227-232.
593. Zhu, H. F. ATP-dependent potassium channels involved in the cardiac protection induced by intermittent hypoxia against ischemia/reperfusion injury / H. F. Zhu, J. W. Dong, W. Z. Zhu, H. L. Ding, Z. N. Zhou // *Life Sci.* – 2003. – Vol. 73, № 10. – P. 1275-1287.
594. Zhu, M. Activation of delta-opioid receptors reduces excitatory input to putative gustatory cells within the nucleus of the solitary tract. / M. Zhu, Y. K. Cho, C. S. Li // *J. Neurophysiol.* – 2009. – Vol. 101, № 1. – P. 258-268.

595. 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 // *J. Mol. Cell. Cardiology*. – 2006. – Vol. 40. – P. 96–106.
596. Zidar, N. Caspases in myocardial infarction / N. Zidar, J. Jera, J. Maja, S. Dusan // *Adv. Clin. Chem.* – 2007. – Vol. 44. – P. 1-33.