

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ТОМСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ
ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

УДК: 61:577.1

№ государственной регистрации: АААА-А15-115120910024-0

Уникальный номер научной темы: 0550-2014-0116

Инв.№

УТВЕРЖДАЮ
Решением Ученого совета
Томского НИМЦ
Протокол № 1
от «26» января 2017 г.
Председатель Ученого совета
директор Томского НИМЦ,
академик РАН
Е.Л. Чойнзонов



Е.Л. Чойнзонов
26 января 2017 г.

Отчет о научно-исследовательской работе
**РЕЦЕПТОРНЫЕ И СИГНАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ КАРДИОПРОТЕКТОРНОГО
ЭФФЕКТА СРОЧНОЙ И ДОЛГОВРЕМЕННОЙ АДАПТАЦИИ К ГИПОКСИИ**
(промежуточный)

Шифр работы: 029

Директор НИИ кардиологии Томского НИМЦ,
д-р мед. наук, профессор, академик РАН

С.В. Попов
С.В. Попов
«25» января 2016 г.

Руководитель темы, зав. лабораторией
экспериментальной кардиологии НИИ кардиологии
Томского НИМЦ, д-р мед. наук, профессор

Л.Н. Маслов
Л.Н. Маслов
«25» января 2016 г.

Ученый секретарь НИИ кардиологии
Томского НИМЦ, д-р мед. наук

И.Ю. Ефимова
И.Ю. Ефимова
«25» января 2016 г.

Томск - 2016

Список исполнителей

Руководитель темы,

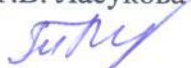


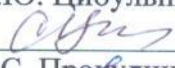

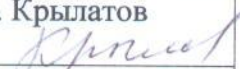
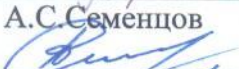

Руководитель лаборатории экспериментальной кардиологии,
доктор медицинских наук, профессор

Л.Н. Маслов

Ответственный исполнитель:

Старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной
кардиологии, кандидат медицинских наук

Н.В. Нарыжная

Исполнители темы:	
Старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной кардиологии, доктор биологических наук	Т.В. Ласукова 
Старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной кардиологии, доктор медицинских наук	В.А. Казаков 
Старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной кардиологии, кандидат медицинских наук	А.С. Горбунов 
Старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной кардиологии, кандидат медицинских наук	С.Ю. Цибульников 
Младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной кардиологии, кандидат медицинских наук	Е.С. Прекудина 
Лаборант исследователь лаборатории экспериментальной кардиологии, кандидат медицинских наук	А.В. Крылатов 
Лаборант	А.С. Семенов 
Лаборант	А.В. Мухомедзянов 

РЕФЕРАТ

Отчёт 38 с, рис., 5 табл. 5, 54 источников

Ключевые слова: СЕРДЦЕ, ИШЕМИЯ, РЕПЕРФУЗИЯ, АДАПТАЦИЯ, ГИПОКСИЯ

Объектом исследования являются крысы линии Вистар.

Цель работы – выяснить, с активацией каких рецепторов и сигнальных путей связаны кардиопротекторные эффекты срочной и долговременной адаптации к гипоксии.

В процессе работы проводились экспериментальные исследования направленные на изучение роли опиоидных рецепторов и сопряженных с ними внутриклеточных сигнальных механизмов в кардиопротекторном эффекте гипоксического прекондиционирования (срочная адаптация) и длительной адаптации к непрерывной нормобарической гипоксии.

Установлено, что срочная адаптация к гипоксии оказывает умеренные инфаркт-лимитирующий эффект, а хроническая непрерывной нормобарической гипоксии вызывает выраженное уменьшение размеров экспериментального инфаркта.

В результате исследования было впервые установлено, что опиоидные рецепторы играют важную роль в адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии, но не участвуют в инфаркт-лимитирующем эффекте гипоксического прекондиционирования.

Степень внедрения: монография – 1, патент на изобретение - 1, статьи в центральных российских и международных журналах – 22

СОДЕРЖАНИЕ

Список исполнителей	2
Реферат	3
Содержание	4
Использованная терминология	5
Обозначения и сокращения	6
Введение	9
1. Обзор литературы	10
2. Методы исследования	13
3. Результаты исследования и их обсуждение	19
3.1. Участие опиоидных рецепторов в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта адаптации к непрерывной нормобарической гипоксии.	19
3.2. Исследование участия опиоидных рецепторов и внутриклеточных регуляторных киназ в реализации кардиопротекторного действия гипоксического прекондиционирования	26
Заключение	30
Список публикаций за 2016 год	31
Список использованных источников	34

Использованная терминология

Адаптация к хронической непрерывной нормобарической гипоксии – состояние резистентности к гипоксии, вызванное хроническим пребыванием животных в атмосфере с пониженным содержанием кислорода;

Гипоксическое preconditionирование (срочная адаптация к гипоксии) - это повышение толерантности органов и тканей к действию тяжелой длительной гипоксии (ишемии) с помощью предварительного воздействия одного или нескольких сеансов кратковременной гипоксии и реоксигенации;

Ишемическое postconditionирование сердца – срочная адаптация сердца к реперфузии с помощью нескольких кратковременных сеансов реперфузии и ишемии после длительной ишемии;

Кардиопротекторный эффект – эффект, направленный на уменьшение ишемического-реперфузионного повреждения ткани сердца;

Инфаркт-лимитирующий эффект – эффект, направленный на уменьшение размера инфаркта

Киназы – внутриклеточные ферменты, фосфорилирующие белки-мишени, активация которых связана с повышением устойчивости миокарда к ишемии-реперфузии.

Обозначения и сокращения

5-ГД- 5-гидроксидеканоат;

AIF1 - Apoptosis Inducing Factor - 1, фактор индукции апоптоза-1;

Akt- anti-apoptotic kinase;

ANT - адениннуклеотидтранслоказа; **Araf1** - apoptosis protease-activating factor 1, активатор проапоптотических протеаз-1;

Araf- apoptosis protease-activating factor;

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;

eNOS - эндотелиальная NO-синтаза;

ERK- extracellular signal regulating;

FADD - Fas-associated death domain, Fas-связанный домен клеточной гибели;

Fas – Fas-антиген, белок клеточной поверхности 45-kD, синонимы - CD95, APO-1;

FasL – Fas-Ligand, лиганд Fas-антигена; **GKS-3β** - glycogen kinase synthase, киназа гликоген синтазы -3β;

GSK- glycogen synthase kinase;

HSP70 – белок теплового шока-70;

JAК- Janus kinase;

JNK - c-Jun N-terminal kinase;

МСС – максимальная скорость сокращения;

МСП – максимальная скорость расслабления;

mPTP- mitochondrial permeability transition pore;

NAD – никотинамидадениндинуклеотид;

NCX - sodium/calcium exchanger, Na⁺/Ca²⁺-антипортер;

NHE - sodium/hydrogen exchanger, Na⁺/H⁺-антипортер;

No-reflow – феномен невозстановленного кровотока;

PI3K – phosphatidylinositol-3-kinase, фосфоинозитол трифосфат-активируемая протеинкиназа;

PiC - inorganic phosphate carrier, фосфатный канал;

PKC - протеинкиназа C;

PKG - протеинкиназа G;

RISK - reperfusion injury signalling kinase;

SERCA2a - sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2a, Ca²⁺-АТФаза саркоплазматического ретикулума 2a;

STAT- signal transduced and activator of transcription;

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

TNFRs- tumor necrosis factor receptors;

TUNEL- terminal deoxyribonucleotide transferase-mediated dUTP nick end labeling

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

АКМ- активированные кислородные метаболиты;

АМФ – аденозинмонофосфат;

АФК – активные формы кислорода;

АФК - активные формы кислорода;

ГК – гексокиназа;

ГФДГ - глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа;

ГЦ – гуанилатциклаза;

ДРЛЖ – давление, развиваемое левым желудочком изолированного сердца;

ИП - ишемическое посткондиционирование;

ИР- ишемические и реперфузионные, ишемия и реперфузия;

K_{АТФ}-канал- АТФ-чувствительный K⁺-канал;

КДД – конечное диастолическое давление;

КФК – креатинфосфокиназа;

ЛДГ- лактатдегидрогеназа;

МАПК - митоген-активируемая протеинкиназа;

МДА - малоновый диальдегид;

МитоСОД - митохондриальная супероксиддисмутаза;

НАД – никотинамиддинуклеотид;

ОИМ - острый инфаркт миокарда;

ОР - опиоидные рецепторы;

ПД - потенциал действия;

ПОЛ - перекисное окисление липидов;

РИ/ОР - соотношение размер инфаркта/область риска;

СПР - саркоплазматический ретикулум;

цГМФ - циклический гуанозинмонофосфат;

ЧСС - частота сердечных сокращений;

ЭПР - эндоплазматический ретикулум.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. В России внутриспитальная летальность при остром инфаркте миокарда (ОИМ) составляет 13,8% [Сыркина А.Г. и др., 2013]. Среди пациентов, перенесших ОИМ, 22% вынуждены уменьшить объём или квалификацию труда, а 23% полностью утратили трудоспособность [Николаева Н.В. и др., 1997]. Эти данные свидетельствуют о большой социальной значимости разработки методов профилактики ишемических и реперфузионных повреждений сердца, вызванных ОИМ. Вполне очевидно, что назрела настоятельная необходимость в разработке принципиально новых подходов к профилактике ишемических и реперфузионных повреждений сердца. Особый интерес в этом отношении представляет способность организма включать мощные врожденные защитные механизмы с помощью адаптивных воздействий, таких как гипоксическое прекондиционирование и долговременной адаптации к гипоксии.

Срочная адаптация к гипоксии. Гипоксическое прекондиционирование (ГП) - это повышение толерантности органов и тканей к действию тяжелой длительной гипоксии (ишемии) после одного продолжительного (2,5 – 3 ч) или нескольких кратковременных сеансов гипоксии (2 – 10 мин) и реоксигенации (2 – 10 мин). Различают раннее ГП, при котором кардиопротекторный эффект проявляется сразу же после прекондиционирования [Маслов Л.Н. и др. 2010; 2011; 2013; Shizukuda Y. et al., 1992; 1993], и задержанное ГП, при котором повышение толерантности сердца к ишемии и реперфузии выявляется через 24 ч после прекондиционирования [Beguín P.C. et al., 2005; Cai Z. et al., 2003; Sasaki H. et al., 2002; Xi L. et al., 2002]. Большинство публикаций по ГП – это работы по позднему ГП [Портниченко А.Г. и др., 2008; Beguín P.C. et al., 2005; Cai Z. et al., 2003; Sasaki H. et al., 2002; Xi L. et al., 2002] и только единичные работы посвящены раннему ГП [Маслов Л.Н. и др. 2010; 2011; 2013; Shizukuda Y. et al., 1992]. Некоторые исследователи отрицают сам факт существования раннего ГП [Cai Z. et al., 2003]. Однако нам удалось показать, что раннее ГП существует и оказывает более выраженный инфаркт-лимитирующий эффект, чем позднее ГП [Маслов Л.Н. и др., 2013]. Раннее ГП имеет важное преимущество перед хронической гипоксией: повышение толерантности сердца к ишемии-реперфузии формируется очень быстро (в течение 1 - 3 ч), поэтому такое воздействие может найти свое применение в качестве предоперационной подготовки у пациентов, которым предстоит произвести кардиоплегическую остановку сердца (тотальная ишемия) с применением искусственного кровообращения. Рецепторный, сигнальный механизмы, конечный эффектор раннего ГП пока остаются неизученными, а между тем знание о природе этих механизмов помогли бы в создании принципиально новых кардиопротекторных препаратов. Согласно нашим предварительным данным, триггерами раннего ГП являются активные формы кислорода.

Долговременная адаптация к гипоксии. Показано, что адаптация крыс к хронической непрерывной нормобарической гипоксии (ХННГ) ограничивает размер инфаркта при коронароокклюзии и реперфузии *in vivo* [Neckar J. et al., 2003; Maslov L.N. et al., 2013] и повышает устойчивость изолированного сердца к действию глобальной ишемии-реперфузии [Tajima M. et al., 1994]. При этом выраженность проявления инфаркт-лимитирующего эффекта у крыс, адаптированных к ХННГ, значительно больше, чем при адаптации к прерывистой гипоксии [Neckar J. et al., 2003]. Продолжительность указанного эффекта достигает 4–5 недель [Neckar J. et al., 2004]. Однако количество публикаций по кардиопротекторному эффекту ХННГ ограничено всего тремя статьями [Tajima M. et al., 1994; Neckar J. et al., 2003; Maslov L.N. et al., 2013]. В отличие от адаптации к прерывистой гипоксии, рецепторный и сигнальный механизм кардиопротекторного действия адаптации к ХННГ остается малоизученным. Сигнальный механизм ХННГ остаётся не изученным, неизвестен конечный эффектор ХННГ. Неясно, участвуют ли аденозиновые и другие рецепторы в реализации ХННГ-индуцированного повышения толерантности сердца к ишемии-реперфузии или же в протекторном эффекте ХННГ задействованы исключительно опиоидные рецепторы (ОР). Вполне вероятно, что ХННГ ввиду сложности моделирования и продолжительности воздействия не найдет применения в клинической практике. Однако изучение рецепторных и сигнальных механизмов инфаркт-лимитирующего эффекта ХННГ может послужить основой для разработки новых патофизиологически обоснованных подходов для создания лекарственных препаратов.

Цель работы: выяснить, с активацией каких рецепторов и сигнальных путей связаны кардиопротекторные эффекты срочной и долговременной адаптации к гипоксии.

Задача работы в 2016 году: Оценить роль опиоидных рецепторов в инфаркт-лимитирующем эффекте срочной и долговременной адаптации к гипоксии.

1. Обзор литературы

В середине 60-х годов прошлого столетия группа профессора О. Роура (Чехословакия) обнаружила, что адаптация крыс к высотной гипоксии увеличивает толерантность изолированного миокарда к аноксии [Musil J. et al., 1966; Roura O. et al., 1965; 1966a; 1966b]. Группа профессора Ф.З. Меерсона подтвердила эти наблюдения и установила, что адаптация крыс к периодической высотной гипоксии в 5 – 6 раз снижает летальность у крыс с коронароокклюзией и уменьшает размер ишемического некроза на 35% [Meerson F.Z. et al., 1973], одновременно снижается частота возникновения желудочковых аритмий [Meerson F.Z. et al., 1987; 1989].

Адаптация к гипоксии представляет особый интерес для врачей и исследователей, поскольку её легко моделировать у человека и кардиопротекторный эффект этой адаптации сохраняется несколько дней [Дудко В.А. и Соколов А.А., 2000; Меерсон Ф.З. и Малышев И.Ю., 1993; Меерсон Ф.З. и Пшенникова М.Г., 1988]. Согласно данным С.М. Fitzpatrick и соавт. [Fitzpatrick С.М. et al., 2005], кардиопротекторный эффект адаптации к хронической гипоксии у новорожденных кроликов может сохраняться в течение 30 дней после последнего сеанса гипоксии, а по данным В. Ostadal и соавт. [Ostadal В. et al., 1995], защитный эффект адаптации к гипоксии может сохраняться в течение 4-х месяцев. Планируя это исследование, мы предположили, что молекулярный механизм протекторного эффекта адаптации и механизм положительного действия отсроченного ИП (second window) может быть сходен. Как при адаптации к гипоксии, так и в случае «второго окна» прекондиционирования появление необратимых повреждений кардиомиоцитов задерживается, сократимость миокарда в реперфузионном периоде улучшается, а частота возникновения ишемических и реперфузионных аритмий снижается [Колар Ф. и др., 2008; Лишманов Ю.Б. и др., 2003б; Нарыжная Н.В. и др., 2009; Ding H.L. et al., 2004; Fitzpatrick С.М. et al., 2005; Kolar F. et al., 2005; Neckar J. et al., 2002a; 2002b; 2005; Yellon D.M., Baxter G.F., 1995]. Однако кардиопротекторный эффект отсроченного прекондиционирования реализуется через 24 ч после кратковременной коронароокклюзии и реперфузии сердца, а для формирования адаптационного повышения толерантности сердца к действию ишемии-реперфузии требуется несколько дней.

Следовательно, нельзя исключить возможность того, что рецепторный и сигнальный механизмы ишемического прекондиционирования и адаптации к гипоксии различны. Хорошо известно, что аденозин, опиоиды и брадикинин участвуют в механизме развития ишемического прекондиционирования и могут имитировать ишемическое прекондиционирование [Yellon D.M. и Downey J.M., 2003]. В формировании кардиопротекторного эффекта отсроченного прекондиционирования важное значение имеют NO-синтаза и циклооксигеназа-2 [Yellon D.M. и Downey J.M., 2003]. Существуют данные о том, что в ИП важную роль играют протеинкиназа С, тирозинкиназы, ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase) [Yellon D.M. и Downey J.M., 2003] и PI3-киназа (PI3, от phosphatidylinositol-3-kinase) [Ban K. et al., 2008; Yang X.M. et al., 2010].

Молекулярный механизм кардиопротекторного и антиаритмического действия адаптации к периодической гипоксии остается изученным недостаточно. Установлено, что K_{ATP} -каналы и протеинкиназа С также участвуют в кардиопротекторном эффекте адаптации к периодической гипоксии [Ding H.L. et al., 2004; Fitzpatrick С.М. et al., 2005; Kolar F. et al., 2005; Neckar J. et al., 2002b; 2005]. Активация K_{ATP} -каналов обеспечивает улучшение сократимости сердца во время реперфузии у крыс, адаптированных к гипоксии [Zhu H.F. et al., 2003]. Чешские и российские

исследователи получили данные о том, что митохондриальные K_{ATP} -каналы (мит K_{ATP} -каналы) кардиомиоцитов принимают участие в антиаритмическом эффекте адаптации к хронической периодической гипоксии [Нарыжная Н.В. и др., 2009; Asemu G. et al., 1999; Kolar F. et al., 2005]. Российские физиологи установили, что антиаритмический эффект адаптации к периодической гипоксии связан с активацией опиоидных рецепторов [Лишманов и др., 2003б]. Китайская группа получила данные о том, что активация NO-синтазы в кардиомиоцитах крыс, адаптированных к прерывистой гипоксии, способствует улучшению сократимости сердца в реперфузионном периоде [Ding H.L. et al., 2005]. Сходные данные были получены другими исследователями [Fitzpatrick S.M. et al., 2005; Manukhina E.V. et al., 2006; Xi L. et al., 2002]. Таким образом установлено, что опиоидные рецепторы, K_{ATP} -каналы, протеинкиназа C, NO-синтаза играют важную роль в кардиопротекторном эффекте адаптации к прерывистой гипоксии. Задействованы ли, аденозиновые, брадикининовые рецепторы, NO-синтаза и ряд протеинкиназ в инфаркт-лимитирующем эффекте адаптации к непрерывной гипоксии – неизвестно.

2. Методы исследования

Планируемое исследование состояло из двух фрагментов: *in vivo* и *in vitro*. Первая часть работы выполнена на белых крысах-самцах линии Вистар массой 200–250 г, наркотизированных хлоралозой и диэтиловым эфиром (январь-октябрь 2016 г). На модели коронароокклюзии и реперфузии исследованы рецепторные и сигнальные механизмы инфаркт-лимитирующего действия адаптации к гипоксии или гипоксического preconditionирования.

Адаптация к хронической нормобарической гипоксии. Дизайн исследования представлен на рисунке 2. Животных подвергали адаптации к хронической гипоксии, помещая их в герметичную камеру при 12% O₂ и нормальном атмосферном давлении на протяжении 21 дня [Neckar J. et al. 2003]. Объем гипоксической камеры составлял 1,5 м³, концентрацию O₂ поддерживали на уровне 11,75—12,25%, концентрацию CO₂ - на уровне 0,03% системой «Био-нова-204G4R1» (НТО Био-нова, Россия, г. Москва). Давление O₂ и CO₂ внутри камеры постоянно контролировалось датчиками TCO₂-IR и OLC 20 (Oldham, Франция), через блок управления MX32 (Oldham, Франция).

Моделирование 20-минутной коронароокклюзии и 180-минутной реперфузии. Протокол исследования представлен на рисунке 2. Во время проведения эксперимента животные находились под наркозом пентобарбитал натрия в условиях искусственной вентиляции легких. Пентобарбитал натрия вводили внутривенно в дозе 50 мг/кг [Neckar J. et al. 2003]. Животных интубировали через трахеотомическое отверстие. Вентиляцию легких осуществляли комнатным воздухом с частотой дыхания 60 – 65 уд/мин с помощью модифицированного аппарата РО-6 (Петербург, Россия). Левостороннюю торакотомию производили в пятом межреберье на 2–3 мм кнаружи от грудины. В образовавшееся отверстие «вывихивали» сердце. Лигатуру накладывали на левую переднюю нисходящую коронарную артерию на 2 мм ниже предсердия и возвращали сердце обратно в грудную полость [Neckar J. et al. 2003]. Коронароокклюзию верифицировали по появлению эпикардального цианоза и подъему сегмента ST. Реперфузию осуществляли путем снятия лигатуры с коронарной артерии [Neckar J. et al. 2003]. Восстановление кровотока подтверждали по появлению эпикардальной гиперемии. Во время периода ишемии и в течение 30 минут после возобновления коронарного кровообращения проводили запись ЭКГ.

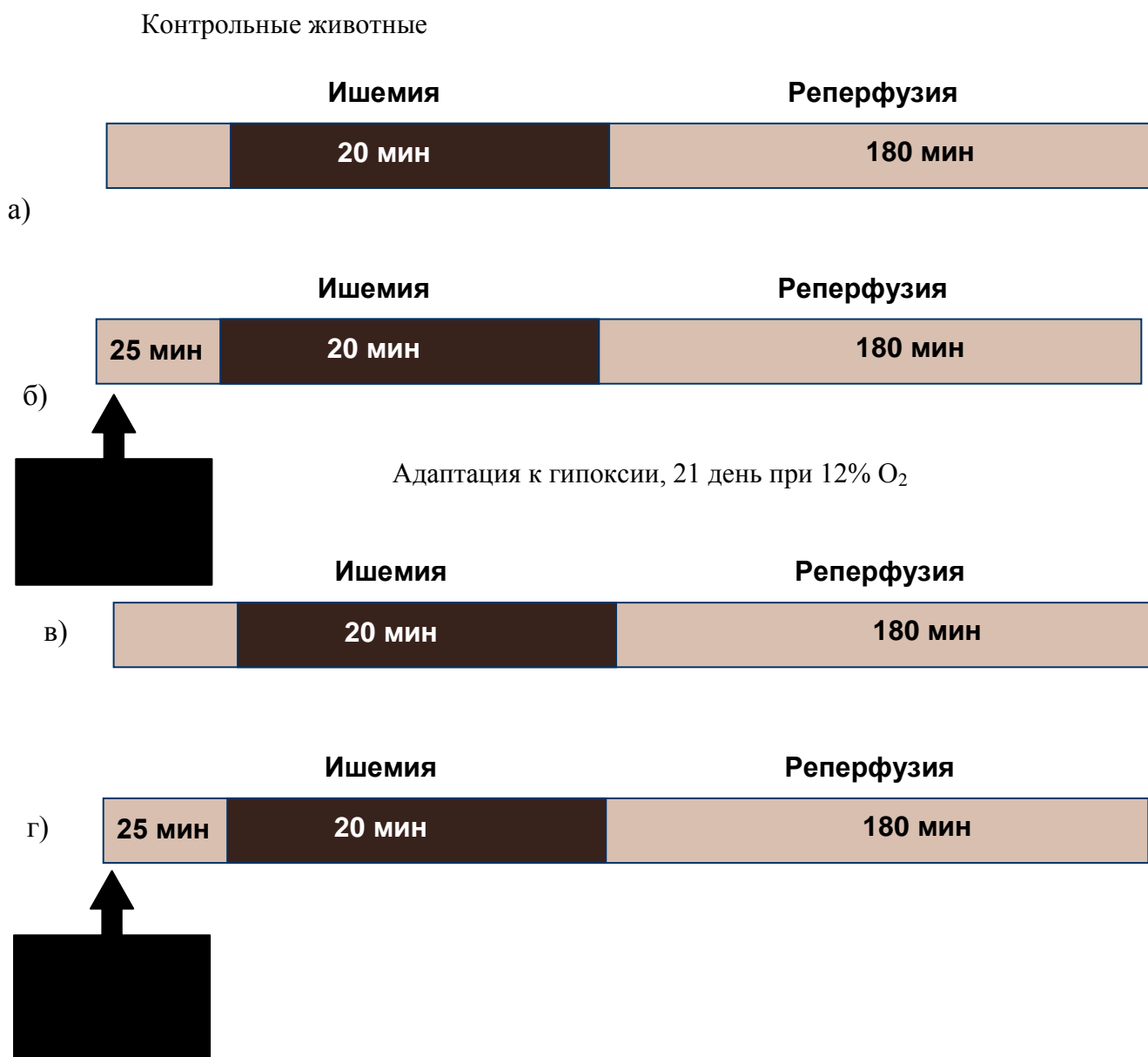


Рисунок 2 – Дизайн исследования хронической нормобарической гипоксии.

Примечание - (а) контроль, (б) контроль с блокатором, (в) хроническая нормобарическая гипоксия (г) хроническая нормобарическая гипоксия с блокатором.

Каждая экспериментальная группа включала 15 животных

Фармакологические инструменты. В экспериментах с моделированием хронической нормобарической гипоксии крысам контрольной группы за 25 мин до перевязки коронарной артерии внутривенно вводили 0,2 мл физиологического раствора. Неселективный антагонист опиоидных рецепторов налтрексон (растворяли в 0,9% растворе NaCl и вводили внутривенно в дозе 5 мг/кг [Maslov L.N. et al., 2009]. Синтезирован в компании «Sigma-Aldrich» (St. Louis, США). Блокатор δ -опиоидных рецепторов TIPP(ψ) (Н-Тур-Тис ψ [CH₂NH]Phe-Phe-OH). Растворяли в 0,9%

растворе NaCl, вводили внутривенно в дозе 0,5 мг/кг за 25 мин до коронароокклюзии [Schiller P.W. et al., 1993]. Синтезирован в компании “Multiple Peptide Systems”, (San Diego, США). Селективный антагонист δ_1 -опиоидных рецепторов 7-Benzylidenenaltrexone maleate (BNTX) растворяли в 0,1 мл DMSO. Полученный раствор в объеме 10 ml добавляли к 1 мл 20%-раствора hydroхурпроуyl- β -cyclodextrin (200 мг hydroхурпроуyl- β -cyclodextrin растворяли в 1 мл H₂O). Вводили внутривенно в дозе 0,7 мг/кг за 25 минут до коронароокклюзии [Maslov L.N. et al., 2009]. Синтезирован в компании 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 μ l добавляли к 1 мл 20%-раствора hydroхурпроуyl- β -cyclodextrin (200 мг hydroхурпроуyl- β -cyclodextrin растворяли в 1 мл H₂O). Вводили внутривенно в дозе 0,3 мг/кг за 25 минут до коронароокклюзии [Maslov L.N. et al., 2009]. Синтезирован в компании Tocris Bioscience (Bristol, Великобритания). Антагонист μ -опиоидных рецепторов СТАР (Н-D-Phe-Cys-Тур-D-Trp-Arg-Thr-Pen-Thr-NH₂) растворяли в 0,9% растворе NaCl, вводили внутривенно в дозе 0,1 мг/кг за 25 мин до ишемии [Abbruscato T.J. et al., 1997]; Синтезирован в компании “Multiple Peptide Systems”, (San Diego, США). Для инактивации κ -ОР использовали антагонист κ -опиоидных рецепторов норбиналторфимин [Birch P.J. et al., 1987], который растворяли в 0,9% растворе NaCl и вводили внутривенно в дозе 9 мг/кг за 90 минут до ишемического воздействия. Синтезирован в компании Research Triangle Institute (Research Triangle Park, США).

Моделирование гипоксического прекондиционирования. Дизайн исследования представлен на рисунке 2. Для моделирования гипоксического прекондиционирования крысу на 10 мин помещали в герметичную банку объёмом 3,3 литра, где в течение 1 мин создавали воздушную среду, содержащую 8% O₂, 0,9% CO₂ и 91,1% N₂. Через 10 мин концентрация кислорода снижалась до 7,3%, а уровень CO₂ повышался до 1,3%. Уровень кислорода и углекислого газа определяли с помощью газоанализатора Stat Profile M (Nova Biomedical Corporation, Waltham, США). За гипоксией следовала 10-минутная реоксигенации. Как показали наши предварительные эксперименты [Маслов Л.Н. и др. 2013] шесть циклов гипоксии-реоксигенации по 20 мин обеспечивают снижение соотношения ЗИ/ЗР на 24%, не оказывают влияния на гемодинамику при коронароокклюзии и не изменяют частоту возникновения ишемических и реперфузионных аритмий. Интервал времени между последним сеансом гипоксии и последующим моделированием коронароокклюзии составлял 15 мин.

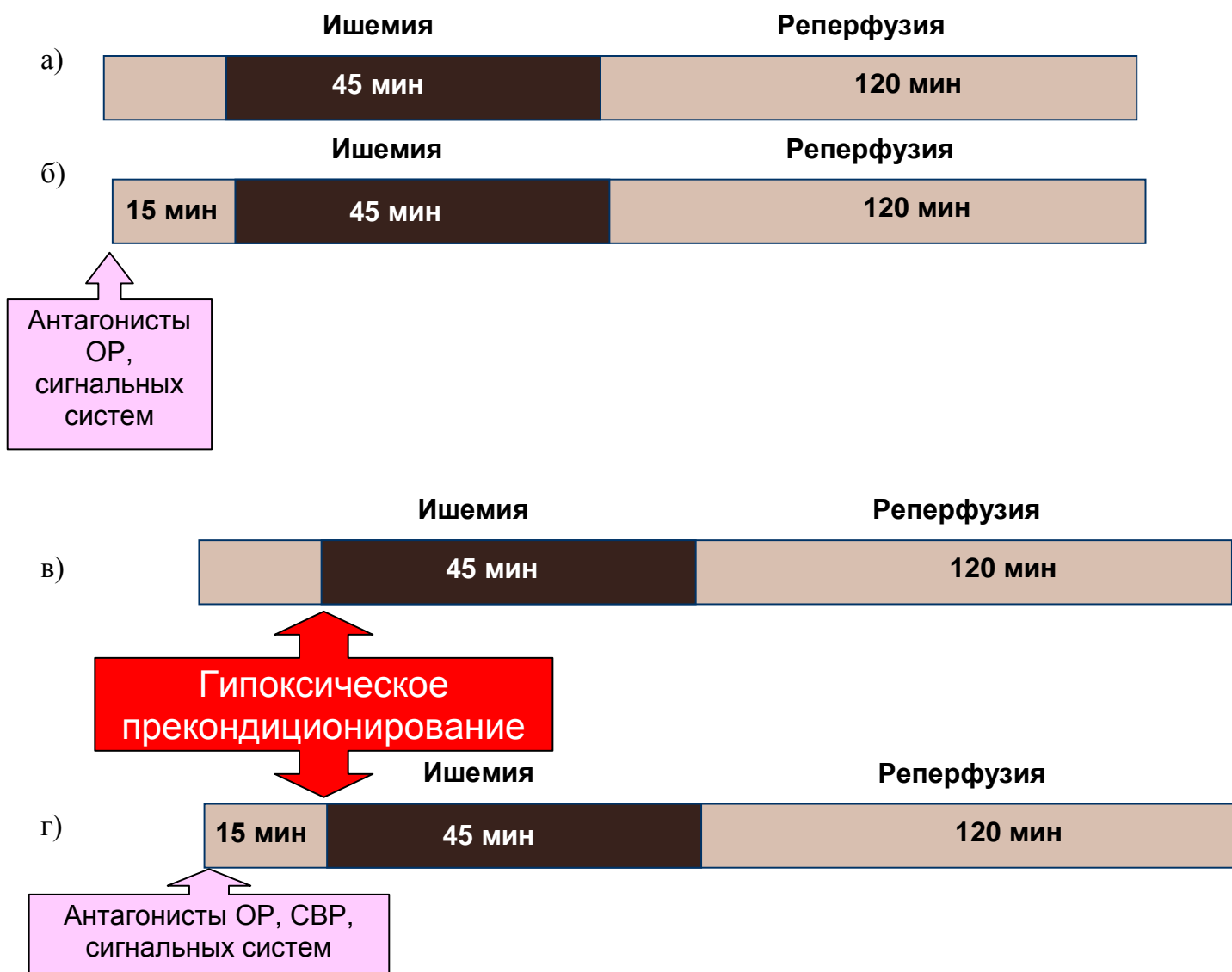


Рисунок 2 – Дизайн исследования гипоксического прекондиционирования.

Примечание - (а) контроль, (б) контроль с блокатором, (в) гипоксическое прекондиционирование (г) гипоксическое прекондиционирование с блокатором.

Каждая экспериментальная группа включала 15 животных

Моделирование 45-минутной коронароокклюзии и 120-минутной реперфузии. Исследования будут выполняться на крысах-самцах линии Вистар массой 250 – 300 г. Крысы будут наркотизированы α -хлоралозой (50 мг/кг, внутривенно, Sigma) и подключены к аппарату искусственной вентиляции легких (ИВЛ) “SAR-830 Series” (CWE Inc. США), осуществляющему ИВЛ комнатным воздухом с частотой 68 вдохов/минуту. Будет выполняться левосторонняя

торакотомия и перикард будет удален, чтобы видеть местоположение левой нисходящей коронарной артерии. Лигатуру на левую нисходящую коронарную артерию будет накладываться на 1-2 мм ниже ушка левого предсердия по методу группы проф. G.J. Gross [Fryer R.M. et al., 1999a; Schultz J.E. et al., 1997a]. Коронароокклюзия будет верифицирована по появлению эпикардального цианоза и подъему сегмента ST. Правая сонная артерия будет канюлирована для измерения артериального давления (АД), которое регистрируют с помощью датчика давления SS13L (Biopac System Inc., Goleta, Калифорния, США), сопряженного с аппаратом для электрофизиологических исследований MP35 (Biopac System Inc., Goleta, США). Этот же аппарат будет использован для записи ЭКГ. Количественную обработку полученных данных осуществляют с помощью программного обеспечения INSTBSL-W компании Biopac System Inc., (Goleta, США). После 45 минут ишемии лигатура будет ослаблена и восстановление кровотока будет подтверждено появлением эпикардальной гиперемии. Продолжительность реперфузии будет составлять 2 часа. Выявление зоны некроза и зоны риска будут проводить по методу, предложенному J. Neckar и соавт. [Neckar J. et al., 2003]. После реперфузии сердца будут удалять из грудной клетки и промывать с помощью шприца через канюлированную аорту физиологическим раствором, содержащим 125 МЕ/мл гепарина. Для определения области риска (ОР) лигатура будет вновь затянута и миокард будет окрашен струйно через аорту 5% перманганатом калия, после промывки с помощью слайсера HSRA001-1 (Zivic Instruments, Pittsburgh, США) будут сделаны срезы сердца толщиной в 1 мм перпендикулярно к продольной оси. Зона некроза будет выделена из зоны риска путем окрашивания 1%-ым раствором 2,3,5-трифенил тетразолия хлорида в течение 30 минут при 37°C. После окончания окраски срезы будут помещены в 10% раствор формальдегида на 1 сутки. На следующий день после окрашивания правый желудочек будет удален и срезы отсканированы с обеих сторон сканером HP Scanjet G2710. Область риска и зона инфаркта (ЗИ) будут определяться компьютеризированным планиметрическим методом с применением оригинальной программы. Размер зоны инфаркта будет выражен в процентах от размера зоны гипоперфузии (области риска), как соотношение ЗИ/ОР.

Поскольку после 45-минутной коронароокклюзии реперфузионные аритмии практически не возникают [Maslov L.N. et al., 2009], то для моделирования реперфузионных аритмий будут использовать 10-минутную коронароокклюзию и последующую реперфузию [Fryer R.M. et al., 1999a; Schultz J.E. et al., 1997a]. Электрокардиограмму и АД будут записывать с помощью аппарата MP35 (Biopac System Inc., Goleta, США) непрерывно в течение 10 мин ишемии и 10 мин реперфузии.

Фармакологические инструменты. В экспериментах с моделированием гипоксического preconditionирования фармакологические агенты вводили внутривенно за 10 мин до гипоксического preconditionирования, либо после ГП за 10 мин до ишемии. Каждая экспериментальная группа включала 13 - 25 животных. Антагонист всех типов ОР налтрексон применяли в дозе 2 мг/кг [Maslov L.N. et al., 2009].

Методы статистической обработки результатов. Анализ данных производился с помощью программы STATISTICA 6.0. Для проверки гипотезы о равенстве средних для цифровых данных, распределение которых не соответствует нормальному, использовали критерий Манна-Уитни. Статистически значимыми считались различия при $\alpha < 0,05$. Результаты всех экспериментов приведены в таблицах в виде $X \pm SEM$, где X – среднее, SEM – стандартная ошибка среднего (standard error of means), n – объем анализируемой подгруппы, p – достигнутый уровень значимости. Статистическую обработку качественных признаков (частота возникновения аритмий) осуществляли с помощью критерия Пирсона χ^2 .

3. Результаты исследования и их обсуждение

3.1. Участие опиоидных рецепторов в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта адаптации к непрерывной нормобарической гипоксии.

Острая коронароокклюзия во всех сериях экспериментов вызывала образование зоны гипоперфузии (зона риска, ЗР) размером 40% от массы левого желудочка без достоверных различий между группами (Рис. 1). Одинаковая величина зоны риска указывает на воспроизводимость результатов и отсутствие изменения коллатерального кровотока под влиянием использованных воздействий и препаратов. Из таблицы 2 видно, что 56,5% от массы зоны риска после окончания реперфузии у животных контрольной группы оказывалось (Табл. 1, Рис. 3).

Под действием хронической нормобарической гипоксии у крыс значительно возрастала масса правого желудочка, с 207 ± 15 мг в контрольной группе, до $256 \pm 12,6$ мг у адаптированных животных, то есть прирост массы составил 20% ($p < 0,05$) (Табл. 1). Изменение размера левого желудочка не было статистически значимым.

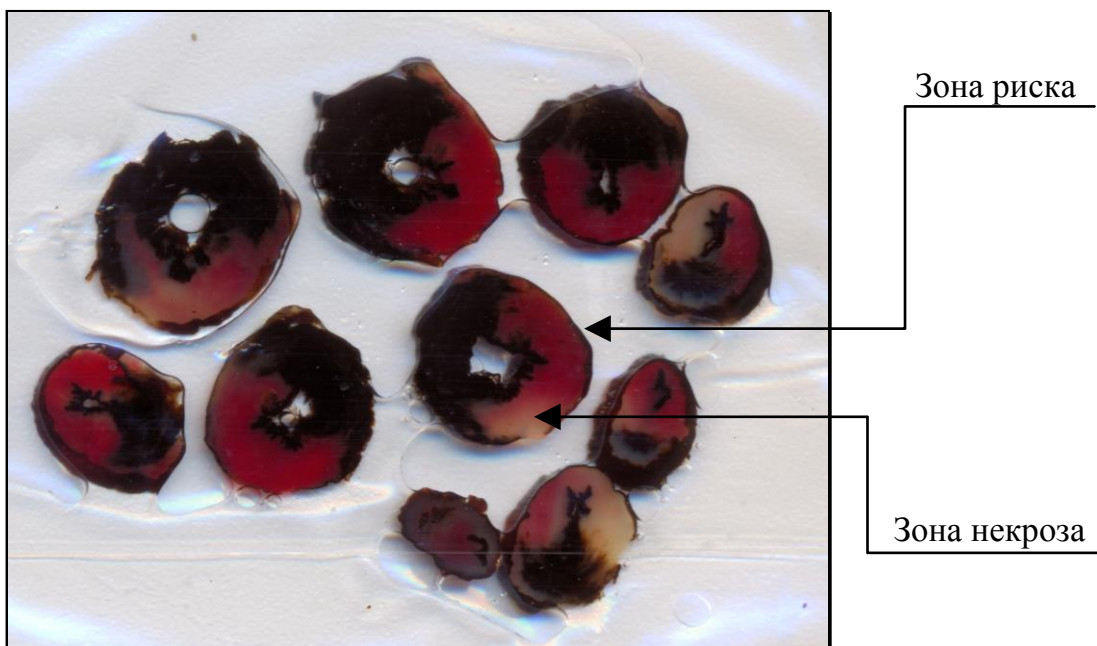


Рисунок 3 – Некроз миокарда при экспериментальной коронароокклюзии-реперфузии.

Исследования показали, что зона ишемического некроза миокарда у крыс, подвергнутых хронической гипоксии, составила 20,4% от зоны риска, что достоверно ($p < 0,01$) отличалось от соответствующего показателя контрольной группы (Табл. 1). Следовательно, при воздействии ХННГ соотношение зоны некроза к зоне риска уменьшалось на 63% по отношению к контролю.

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

Таблица 1 - Влияние ХННГ на размер зоны некроза при 20-минутной коронароокклюзии и 180-минутной реперфузии у крыс (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	56,5 ± 2,9

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

В наших исследованиях был подтвержден известный факт того, что хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия способствует увеличению устойчивости сердца к повреждающему действию ишемии и реперфузии [Tajima M, 1994, Neckar J. et al., 2003]. При этом гипертрофия правого желудочка у крыс, подвергнутых хронической гипоксии, обнаруживается в большинстве исследований и является показателем приспособления организма к условиям хронической гипоксии [Neckar J., et al., 2004]. Как было показано выше, воздействие гипоксии сопровождалось изменениями гематокрита, повышением уровня гемоглобина и содержания эритроцитов, что так же характерно для животных в состоянии адаптации к гипоксии [Neckar J., et al., 2003]. Таким образом, в результате применяемого гипоксического воздействия были достигнуты основные значимые параметры адаптации к гипоксии: изменение показателей периферической крови, ремоделирование миокарда и кардиопротекция, исследованию механизмов которой и посвящена настоящая работа.

Как показано в таблице 2, введение антагонистов опиоидных рецепторов интактным животным не оказывало кардиопротекторного эффекта. Этот факт свидетельствует о возможности использования выбранных блокаторов опиоидных рецепторов в качестве фармакологических инструментов для исследования роли ОР в реализации кардиопротекторного эффекта ХННГ

Блокада ОР неселективным антагонистом налтрексом в дозе 5 мг/кг, проведенная за 25 мин до коронароокклюзии у крыс, подвергнутых ХННГ, приводила к увеличению индекса зона некроза/зона риска (ЗН/ЗР) с 20,4% до 52,8%, что оказалось идентично показателю контрольной группы (Табл. 3). Следовательно, блокада всех типов ОР устраняет кардиопротекторный эффект хронической непрерывной нормобарической гипоксии. Как видно из таблицы 4, блокада δ -ОР селективным антагонистом Т1РР(ψ) в дозе 0,5 мг/кг за 25 мин до ишемии приводила к увеличению соотношения ЗН/ЗР более чем на 30% по отношению к таковым показателям группы животных,

адаптированных к ХННГ (Табл. 3). В результате, соотношение ЗН/ЗР оказалась равной таковой в контрольной группе. Эти данные свидетельствуют о том, что δ -ОР принимают участие в формировании кардиопротекторного эффекта гипоксии. Дельта-ОР подразделяются на два субтипа: δ_1 -ОР и δ_2 -ОР, и дальнейшие эксперименты позволили выявить роль этих субтипов в адаптационной кардиопротекции. Оказалось, что на фоне блокады δ_1 -ОР селективным антагонистом BNTX в дозе 0,7 мг/кг, размер зоны некроза относительно показаний животных, подвергнутых ХННГ, не изменялся, то есть защитный эффект хронической непрерывной нормобарической гипоксии сохранялся (Табл. 3). В то время как «выключение» δ_2 -ОР селективным блокатором этого субтипа ОР налтрибеном в дозе 0,3 мг/кг приводило к увеличению соотношения ЗН/ЗР с 20,4% у животных с ХННГ до 54,9% в группе ХННГ + налтрибен, этот показатель не имел достоверных отличий от группы нормоксического контроля (Табл. 3). Полученные данные свидетельствуют о том, что в реализации кардиопротекторного эффекта хронической нормобарической гипоксии важную роль играют δ_2 -, но не δ_1 -ОР. Предварительная блокада μ -ОР селективным блокатором СТАР в дозе 0,1 мг/кг за 25 минут до коронароокклюзии приводила к увеличению соотношения ЗН/ЗР на 28%, что также указывало на устранение кардиопротекторного эффекта ХННГ (Табл. 3, Рис. 4). Этот факт говорит о том, что μ -ОР также участвуют в адаптационной устойчивости сердца к ишемии и реперфузии. Предварительное введение антагониста к-ОР норбиналторфимина в дозе 9 мг/кг за 90 мин до ишемии не изменяла соотношения ЗН/ЗР у особей, подвергнутых ХННГ (Табл. 3, Рис. 4). Следовательно, к-ОР не принимают участия в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта хронической непрерывной нормобарической гипоксии.

Таблица 2 - Влияние блокады опиоидных рецепторов на размер зоны некроза при 20-минутной коронароокклюзии и 180-минутной реперфузии у неадаптированных крыс (M±SEM)

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

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

Таблица 3 - 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	56,5 ± 2,9
ХННГ	18	256,1 ± 12,8 P<0,05	760,5 ± 28,2	360,4 ± 23,6	142,9 ± 23,5	20,4 ± 1,7 P<0,01
ХННГ + налтрексон 5 мг/кг	12	277,5 ± 12,5 P<0,05	828,8 ± 26,1	376,5 ± 21,1	198,9 ± 23,7	52,8 ± 5,7 P1<0,01
ХННГ + TIPP (ψ) 0,5мг/кг	13	293,2 ± 12,6 P<0,05	831,4 ± 32,8	372,9 ± 17,5	209,1 ± 13,8	56,1 ± 4,1 P1<0,01
ХННГ + налтрибен 0,3 мг/кг	11	275,3 ± 7,1 P<0,05	885,5 ± 37,4	266,4 ± 24,3	146,6 ± 18,4	54,9 ± 4,1 P1<0,01
ХННГ + BNTX 0,7 мг/кг	11	276,6 ± 7,8 P<0,01	848,4 ± 24,2	293 ± 33,6	34,4 ± 5,9	13,6 ± 3,07 P<0,01
ХННГ + СТАР 0,1 мг/кг	12	307,5 ± 8,8 P<0,05	896,8 ± 33,7	369,6 ± 32,5	181,7 ± 36,9	49 ± 9,3 P1<0,01
ХННГ + норбиналтор фимин 9 мг/кг	12	240,1 ± 11,3 P<0,05	805,7 ± 35,8	312,9 ± 50,9	50,5 ± 9,5	18,7 ± 3,8 P<0,01

Примечание - ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия.

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

p – уровень достоверности относительно группы контроля

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

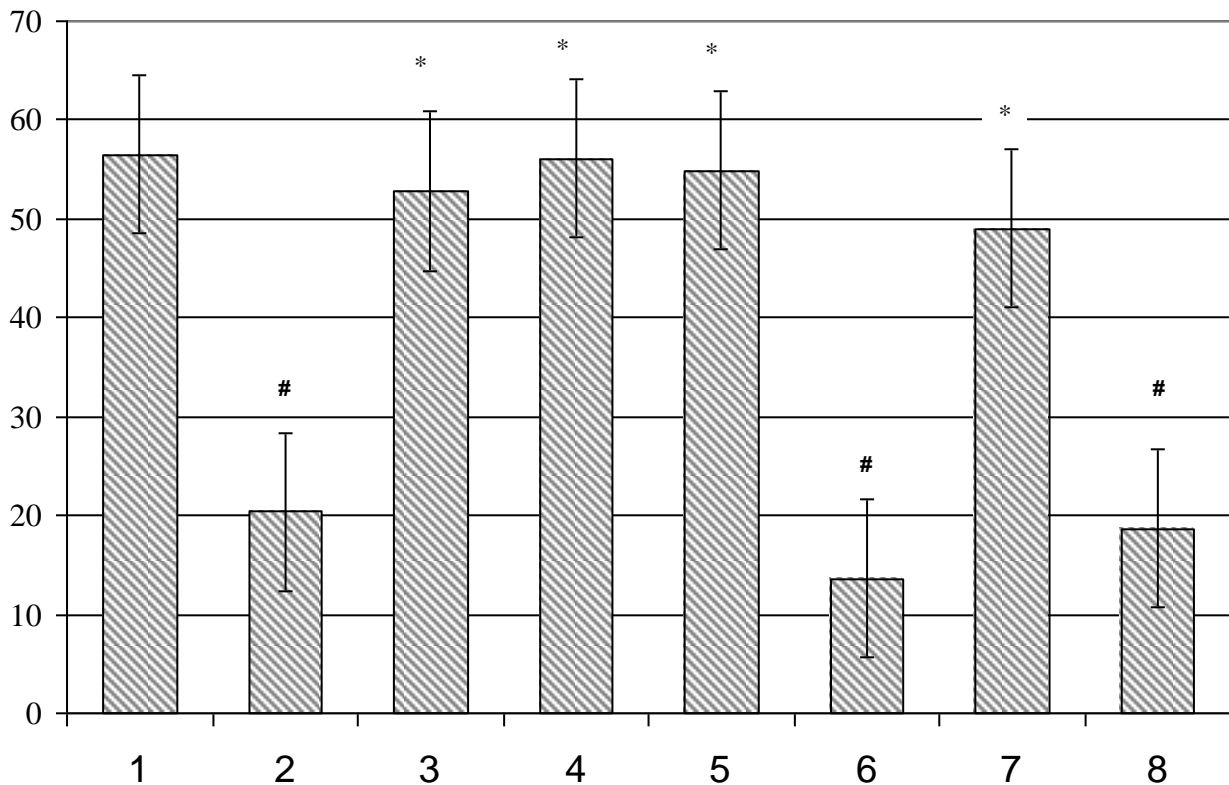


Рисунок 4 - Влияние блокады опиоидных рецепторов на размер зоны некроза при 20-минутной коронароокклюзии и 180-минутной реперфузии у крыс после курса адаптации к непрерывной нормобарической гипоксии (M ± SEM).

Примечание - ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия

1 – Контроль; 2 – ХННГ; 3 - ХННГ + налтрексон; 4 - ХННГ + TiPP; 5 - ХННГ + Налтрибен; 6 - ХННГ + BNTX; 7 - ХННГ + СТАР; 8 - ХННГ + норбинаторфимин

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

Заключение к разделу 3.1.

Для выяснения роли опиоидных рецепторов в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта хронической непрерывной нормобарической гипоксии, были проведены экспериментальные исследования по оценке кардиопротекторного эффекта ХННГ в условиях блокады опиоидных рецепторов. Блокада ОР неселективным антагонистом налтрексоном у крыс после ХННГ приводила к увеличению индекса зона некроза/зона риска, следовательно, блокада всех типов ОР устраняла кардиопротекторный эффект хронической непрерывной нормобарической гипоксии. Блокада δ -ОР селективным антагонистом TiPP[ψ] приводила к увеличению соотношения ЗН/ЗР. Это свидетельствует о том, что δ -ОР принимают участие в формировании кардиопротекторного эффекта ХННГ. Дельта-ОР подразделяются на два субтипа: δ_1 -ОР и δ_2 -ОР, и дальнейшие эксперименты позволили оценить роль этих субтипов в адапционной кардиопротекции.

Оказалось, что на фоне блокады δ_1 -ОР селективным антагонистом BNTX индекс ЗН/ЗР у животных, адаптированных к ХННГ не изменялся, то есть защитный эффект адаптации к гипоксии сохранялся. В то время как «выключение» δ_2 -ОР селективным блокатором налтрибеном этого субтипа ОР приводило к увеличению соотношения ЗН/ЗР. Полученные данные свидетельствуют о том, что в реализации кардиопротекторного эффекта хронической непрерывной нормобарической гипоксии важную роль играют δ_2 -, но не δ_1 -ОР. Предварительная блокада μ -ОР селективным блокатором СТАР приводила к увеличению соотношения ЗН/ЗР, что также указывало на устранение кардиопротекторного эффекта ХННГ. Этот факт говорит о том, что μ -ОР также участвуют в адаптационной устойчивости сердца к ишемии и реперфузии. Обнаружено, что κ -ОР не принимают участия в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта хронической непрерывной нормобарической гипоксии. Таким образом, в механизме кардиопротекторного действия хронической непрерывной нормобарической гипоксии существенную роль играют δ_2 и μ -ОР.

3.2. Исследование участия опиоидных рецепторов в реализации кардиопротекторного действия гипоксического preconditionирования

Общеизвестно, что кардиомиоциты чрезвычайно чувствительны к действию ишемии и начинают гибнуть спустя 10 мин после ее начала [Trost S.U. et al., 1998]. В бассейне подвергшейся окклюзии артерии, т. е. внутри области риска, образовывалась зона, в которой кардиомиоциты оказывались не жизнеспособными. Эта область получила название «зона некроза». Соотношение «зона некроза/область риска» (ЗН/ОР) позволяло судить о величине инфаркта миокарда при ишемии-реперфузии. В наших исследованиях острая коронароокклюзия и последующая реперфузия вызывали развитие некроза (инфаркта) миокарда, составляющего $58,7 \pm 1,5\%$ от размера зоны гипоперфузии (зоны риска) (Табл. 4). В группе крыс, которым коронароокклюзию-реперфузию моделировали после гипоксического preconditionирования (ГП), это соотношение составляло $41,8 \pm 1,8\%$ (Рис. 5). Следовательно, ГП обладает значительным кардиопротекторным эффектом *in vivo*, что выражается в уменьшении соотношения ЗН/ОР (Рис. 5).

Таблица 4 - Влияние гипоксического preconditionирования на размер инфаркта у крыс при коронароокклюзии-реперфузии

	Масса ЛЖ, мг	Зона нормальной перфузии, мг	Зона риска, мг	Зона некроза, мг	Индекс ЗН/ЗР, %
Контроль (n=14)	587,4±8,7	304,4±5,0	283,1±6,8	165,4±3,6	58,7±1,5
ГП (n=14)	597,3±6,6	306,5±2,9	291,8±5,1	* 122,2±6,1	* 41,8±1,8

Примечание - ГП - гипоксическое preconditionирование; ЗН – зона некроза; ЗР – зона риска; * $p < 0,001$ – статистически значимые отличия по отношению к контролю

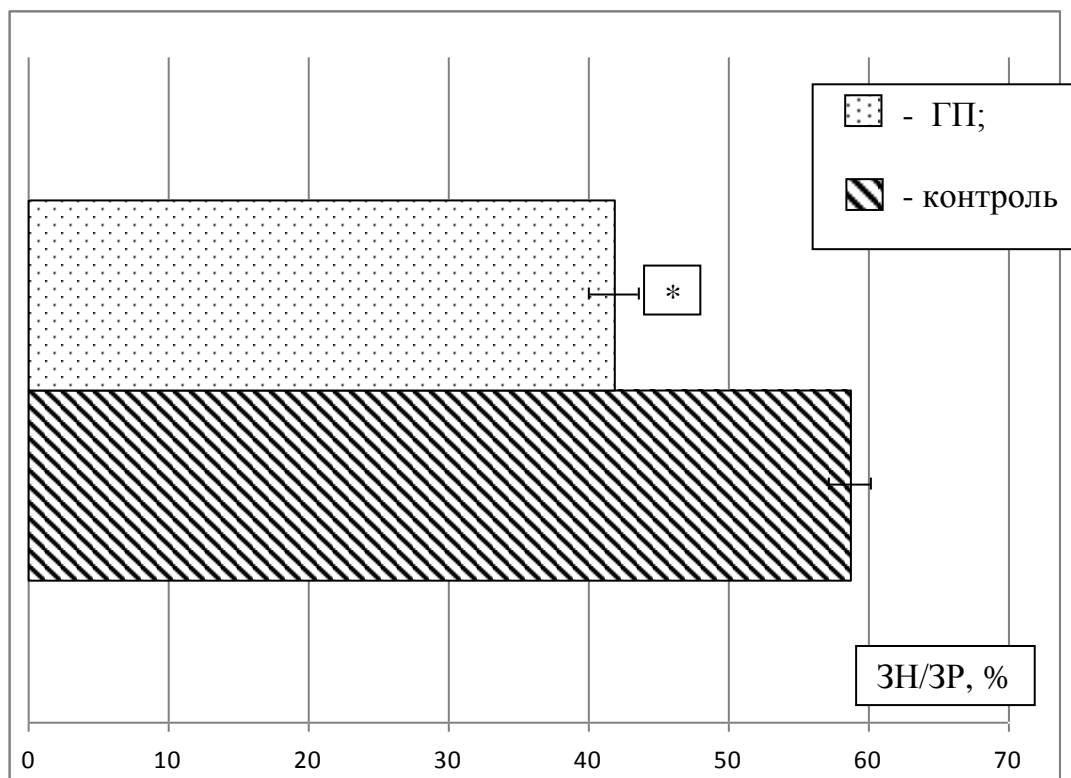


Рисунок 5 - Инфаркт-лимитирующий эффект гипоксического preconditionирования.

Примечание - контрольная группа (n=14) – острая коронароокклюзия (45 мин) и реперфузия (120 мин); ГП (n=14) – 6 сеансов гипоксии (10 мин) и реоксигенации (10 мин) с последующей острой коронароокклюзией (45 мин) и реперфузией (120 мин); ЗН – зона некроза; ЗР – зона риска; * p<0,001 – статистически значимые отличия по отношению к контролю

Исследование роли ОР в сигнальном механизме ГП проводилось с использованием неселективного ингибитора ОР налтрексона в дозе 2 мг/кг, вводимым внутривенно либо до ГП, либо после него за 10 мин до ишемии. Нами было установлено, что после моделирования ГП с последующей 45-минутной ишемией и 120-минутной реперфузией сердца, размер области некроза составил $47,0 \pm 2,5\%$ от величины области гипоперфузии (Табл. 5). Введение налтрексона за 10 минут до ГП значимо не влияло на соотношение ЗН/ОР, размер которого составил $46,8 \pm 2,4\%$. В том случае, когда препарат вводили после завершения процедуры гипоксического preconditionирования, значимых изменений величины зоны некроза также не наблюдалось, индекс ЗН/ОР составлял $42,9 \pm 1,6\%$. (Табл. 5).

Таблица 5 - Влияние блокатора опиоидных рецепторов налоксона на размер зоны некроза при 45-минутной ишемии реперфузии у крыс после гипоксического preconditionирования (M±SEM)

	Масса ЛЖ, мг	Зона нормальной перфузии, мг	Зона риска, мг	Зона некроза, мг	Соотношение ЗН\ЗР, %
Контроль (n=14)	587,4±8,7	304,4±5,0	283,1±6,8	165,4±3,6	58,7±1,5
ГП (n=16)	572,5±9,4	299,9±5,2	272,6±5,3	119,8±6,5	43,9±2,1*
ГП + налтрексон, введение за 10 мин до ГП, (n=15)	583,8±7,5	301,8±4,4	283,9±4,3	132,4±6,1	46,8±2,4
ГП + налтрексон, введение после ГП, (n=15)	579,3±9,1	299,3±4,3	280,1±5,3	120,1±4,9	42,9±1,6

Примечание - ГП – раннее гипоксическое preconditionирование налтрексон вводили в дозе 2 мг/кг; * p<0,001 – статистически значимые отличия по отношению к контролю. n – количество животных в группе. ЗН – зона некроза; ЗР – зона риска

Таким образом, применение налтрексона в выбранной дозировке не оказало существенного влияния на инфаркт-лимитирующий эффект ГП. Полученные результаты свидетельствуют о том, что опиоидные рецепторы не принимают участие в сигнальном механизме феномена гипоксического preconditionирования.

Заключение к разделу 3.2.

Кардиопротекторный эффект ГП проявляется как на уровне целого организма, так и на уровне отдельных органов, тканей и в культурах клеток [Shizukuda Y. et al., 1992; Vanden Hoek T.L. et al., 1998; Tani M. et al., 1999; Cai Z. et al., 2003]. Однако анализ литературных источников показал, что механизм реализации инфаркт-лимитирующего действия ГП остается до конца не раскрытым. Не существует единого протокола исследований, позволяющего моделировать гипоксическое preconditionирование, и каждый отдельный коллектив авторов при исследовании этого адаптивного феномена опирается, прежде всего, на собственные уникальные исследования. Это, в свою очередь, ведет к накоплению противоречивой информации в отношении ГП, поскольку снижает повторяемость результатов экспериментов. К примеру, у некоторых авторов вызывает сомнение само существование феномена раннего ГП [Cai Z. et al., 2003], но есть и работы, говорящие об обратном [Shizukuda Y. et al., 1992; Vanden Hoek T.L. et al., 1998; Arstall M.A. et al., 1998]. Также неясно, существует ли ограничение на применение этого феномена в

отношении стареющих организмов, как было показано в эксперименте М. Тани и соавт. [Tani M. et al., 1999].

Ввиду отсутствия единого протокола, нами разработана собственная схема экспериментов, позволяющая моделировать феномен гипоксического прекондиционирования на живых крысах. Используя данный протокол (6 сеансов гипоксии-реоксигенации: гипоксия - 10 мин, 8% O₂; реоксигенация - 10 мин, 21% O₂), мы установили, что ГП оказывает инфаркт-лимитирующее воздействие на миокард живых крыс, значительно уменьшая соотношение зоны инфаркта к области гипоперфузии (зоне риска). Наши исследования, в которых изучали влияние ГП на частоту возникновения нарушений сердечного ритма, показали, что этот адаптивный феномен не обладал ни выраженным антиаритмическим эффектом, ни аритмогенными свойствами.

Известно, что эндогенные агонисты опиоидных рецепторов участвуют в реализации адаптивного феномена классического и отсроченного ишемического прекондиционирования [Schultz J.J. et al., 1997; Schultz J.E. et al., 1998; Gross G.J. et al., 2003]. Однако участие опиоидных рецепторов в механизме ГП остается малоизученным. Согласно результатам нашего исследования, ни предварительное введение неселективного блокатора опиоидных рецепторов налтрексона, ни применение налтрексона после прекондиционирования не оказывает существенного влияния на инфаркт-лимитирующий эффект ГП. Таким образом, нам не удалось подтвердить участие ОР в рецепторном механизме ГП.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты наших исследований свидетельствуют о важной роли эндогенных агонистов δ_2 - и μ -опиоидных рецепторов в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии, что согласуется с существующими представлениями о роли опиоидных рецепторов в адаптации к кардиомиоцитов к гипоксии-реоксигенации [Gross G.J. et al., 2003]. Вместе с тем, есть определённые противоречия между нашими данными и результатами других исследователей. Так, согласно данным G.J. Gross [Gross G.J. et al., 2003], в механизме инфаркт-лимитирующего эффекта ишемического прекондиционирования решающую роль играют агонисты δ_1 -рецепторов, в то время, как по нашим данным, инфаркт-лимитирующий эффект ХННГ зависит от стимуляции δ_2 - и μ -опиоидных рецепторов. Кроме того, мы установили, что инфаркт-лимитирующий эффект гипоксического прекондиционирования не зависит от состояния эндогенной опиоидной системы. Причина указанного противоречия остаётся неизвестной.

ВЫВОДЫ

1. Инфаркт-лимитирующий эффект хронической непрерывной нормобарической гипоксии связан с активацией μ - и δ_2 -опиоидных рецепторов.
2. Кардиопротекторный эффект гипоксического прекондиционирования не зависит от опиоидных рецепторов.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ЗА 2016

1. Maslov L.N., Naryzhnaya N.V., Podoksenov Yu.K., Mrochek A.G., Gorbunov A.S., Tsibulnikov S.Yu. Opioids as triggers of the adaptive phenomenon of ischemic preconditioning of the heart // *Neurosci. Behav. Physiol.* – 2016. - 46(3). P. 319-327.
2. Лишманов Ю.Б., Маслов Л.Н., Мухомедзянов А.В. Роль β -адренорецепторов и Ca^{2+} -каналов L-типа в механизме реперфузионного повреждения сердца // *Бюлл. exper. биол. и медицины.* – 2016. - 161(1). С. 28-30.
3. Маслов Л.Н., Цибульников С. Ю., Мухомедзянов А.В., Семенцов А.С., Цепокина А.В., Хуторная М.В., Кутихин А.Г., Нам И.Ф. Посткондиционирование сердца. Анализ экспериментальных и клинических данных // *Вестник РАМН.* – 2016. - 71(1). – С. 40-45.
4. Маслов Л.Н., Подоксенов Ю.К., Цибульников С.Ю., Горбунов А.С., Цепокина А.В., Хуторная А.В., Кутихин А.Г., Жанг И., Пей Ж.-М. Феномен дистантного преко́ндиционирования сердца и его основные проявления // *Росс. физиол. жур.* – 2016. - 102(4) .- С. 398-410.
5. Лишманов Ю.Б., Горбунов А.С., Маслов Л.Н. Участие протеинкиназы С- δ в реализации кардиопротективного эффекта ишемического посткондиционирования // *Бюлл. exper. биол. и медицины.* – 2016. - 161(3). – С. 318-320.
6. Maslov L.N., Vychuzhanova E.A. The role of the sympathoadrenal system in adaptation to cold // *Neurosci. Behav. Physiol.* – 2016. - 46(5). – P. 589-600.
7. Lasukova T.V., Maslov L.N., Gorbunov A.S. The role of the opioid system of the myocardium in mediating the cardioprotective effect of postconditioning // *Neurosci. Behav. Physiol.* – 2016. - 46(5). – P. 548-551.
8. Нарыжная Н.В., Маслов Л.Н., Цепокина А.В., Хуторная М.В., Кутихин А.Г., Нам И.Ф., Жанг И., Пей Ж.-М. Значение опиоидных рецепторов в цитопротекторном действии адаптации к хронической гипоксии при аноксии-реоксигенации кардиомиоцитов // *Росс. физиол. жур.* – 2016. - 102(6). - С. 688-697.
9. Маслов Л.Н., Цибульников С.Ю., Нарыжная Н.В., Иванов В.В., Цибульникова М.Р. Хроническое воздействие холода – адаптация без стресса // *Пат. физиол. exper. терап.* 2016. - № 1. - С.28-31.
10. Нарыжная Н.В., Маслов Л.Н. Роль синтеза оксида азота в реализации ранней (первой) фазы ишемического преко́ндиционирования миокарда // *Росс. физиол. жур.* – 2016. - 102(7). – 7С. 92-806.
11. Maslov L.N., Khaliulin I., Zhang Y., Krylatov A.V., Naryzhnaya N.V., Mechoulam R., De Petrocellis L., Downey J.M. Prospects for creation of cardioprotective drugs based on cannabinoid receptor agonists // *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* – 2016. - 21(3). – P. 262-272.

12. Маслов Л.Н., Нарыжная Н.В., Семенцов А.С., Мухомедзянов А.В., Горбунов А.С. Влияние посткондиционирования сердца на некроз, апоптоз, онкоз и аутофагию кардиомиоцитов // Пат. физиол. экспер. терап. – 2016. - 60(2). – С. 94-100.

13. Маслов Л.Н., Мухомедзянов А.В., Лишманов Ю.Б. Роль эндогенной опиоидной системы в регуляции функционального состояния сердца // Росс. физиол. жур. – 2016. - 102(9). – С. 1017-1029

14. Maslov L.N., Khaliulin I., Oeltgen P.R., Naryzhnaya N.V., Pei J.-M., Brown S.A., Lishmanov Y.B., Downey J.M. Prospects of creation of cardioprotective and antiarrhythmic drugs based on opioid receptor agonists // Med. Res. Rev. – 2016. - 36(5). – С. 871-923.

15. Мухомедзянов А.В., Маслов Л.Н., Цибульников С.Ю., Pei J.M. Эндоморфины и β -эндорфин не влияют на устойчивость сердца к патогенному действию реперфузии.. Бюлл. экспер. биол. и медицины // 2016. - 162(7). – С. 29-32.

16. Цибульников С.Ю., Маслов Л.Н., Нарыжная Н.В., Иванов В.В., Лишманов Ю.Б. Особенности адаптации крыс к хроническому воздействию холода // Доклады АН. Биологические науки. – 2016. - 470(1). – С. 1-3.

17. Guan Y., Li N., Tian Y.M., Zhang L., Ma H.J., Maslov L.N., Wang S., Zhang Y. Chronic intermittent hypobaric hypoxia antagonizes renal vascular hypertension by enhancement of vasorelaxation via activating $ВК_{Ca}$ // Life Sci. – 2016. – P. 157: 74-81.

18. Мухомедзянов А.В., Маслов Л.Н., Овчинников М.В., Сидорова М.В., Pei J.M., Цибульников С.Ю., Цепочкина А.В., Хуторная М.В., Кутихин А.Г. Влияние дельторфина и его ретро-энантиоаналога на устойчивость сердца к действию ишемии и реперфузии. Бюлл. экспер. биол. и медицины // 2016 - 162(9). - С. 284-288.

19. Маслов Л.Н., Лишманов Ю.Б. Кардиопротекторный эффект посткондиционирования сердца (экспериментальные и клинические аспекты). Изд-во Томского гос. университета систем управления и радиоэлектроники, Томск, 2016. - 271 с.

20. Маслов Л.Н., Цибульников С.Ю., Мухомедзянов А.В., Нарыжная Н.В. Халиулин И.Г. Перспективы применения агонистов аденозиновых, опиоидных и брадикининовых рецепторов для фармакологической имитации феномена посткондиционирования сердца // Экспер. клин. фармакол. – 2016. - 79(6). – С. 36-44.

21. Маслов Л.Н., Цибульников С.Ю., Цепочкина А.В., Хуторная М.В., Кутихин А.Г., Цибульникова М.Р., Басалай М.В., Мрочек А.Г. Феномен дистантного прекодиционирования. Перспективы применения при патологии легких и желудочно-кишечного тракта // Клин. мед. – 2016 - 94(5) – С. 395-400.

22. Маслов Л.Н. Основные проявления феномена дистантного посткондиционирования сердца. Клиническое применение посткондиционирования // Ангиол. сосуд. хир. – 2016. - 22(3). – С. 16-24.

23. Прокудина Е.С., Маслов Л.Н., Бушова Ю.В., Коробов М.В., Подольский А.А., Ванг Ш., Лишманов Ю.Б. Участие опиоидных рецепторов в повышении устойчивости сердца и митохондрий к действию ишемии-реперфузии после адаптации к хронической непрерывной гипоксии // Росс. физиол. жур. – 2016. - 102(10). – С. 1195-1205.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Дудко В.А., Соколов А.А. Моделирование гипоксии в клинической практике .-Томск: STT, 2000.- 352с
2. Колар Ф., Некар Я., Остадал Б., Маслов Л.Н., Стахеев Д.Л., Нарыжная Н.В., Таюрская А.С., Лишманов Ю.Б. Значение АТФ-чувствительных K^+ -каналов в механизме антиаритмического и кардиопротекторного действия адаптации к периодической гипобарической гипоксии // Росс. физиол. жур. – 2008. - 94(4). – С. 448-455.
3. Маслов Л.Н., Лишманов Ю.Б., Емельянова Т.В., Прут Д.А., Колар Ф., Портниченко А.Г., Подоксёнов Ю.К., Халиулин И.Г., Ванг Х., Пей Ж.-М. Гипоксическое прекондиционирование, как новый подход к профилактике ишемических и реперфузионных повреждений головного мозга и сердца // Ангиол. сосуд. Хирургия. – 2011. - 17(3). – С. 27-36.
4. Маслов Л.Н., Лишманов Ю.Б., Колар Ф., Портниченко А.Г., Подоксёнов Ю. К., Халиулин И.Г., Ванг Х., Пей Ж.-М. Гипоксическое прекондиционирование - феномен, обеспечивающий повышение толерантности кардиомиоцитов к гипоксии-реоксигенации // Росс. физиол. жур. – 2010. - 96(12). С. 1170-1189.
5. Маслов Л.Н., Лишманов Ю.Б., Крылатов А.В., Семенцов А.С., Портниченко А.Г., Подоксёнов Ю.К., Халиулин И.Г. Сравнительный анализ кардиопротекторной и антиаритмической эффективности раннего и позднего гипоксического прекондиционирования // Бюлл. экспер. биол. и мед. – 2013. - 156(12). С. 705-708.
6. Меерсон Ф.З., Пожаров В.П., Миняленко Т.Д., Голубева Л.Ю. Адаптация к стрессу может повышать резистентность животных к сублетальной гипоксии в большей мере, чем адаптация к гипоксии // Бюлл. экспер. биол. и мед. – 1993. - No 12. – С. 574-576.
7. Меерсон Ф.З., Пшенникова М.Г. Адаптация к стрессорным ситуациям и физическим нагрузкам. М.: Медицина, 1988. - 256с.
8. Нарыжная Н.В., Некар Я., Маслов Л.Н., Лишманов Ю.Б., Колар Ф., Ласукова Т.В. Роль сарколеммальных и митохондриальных K_{ATP} -каналов в реализации кардиопротекторного и антиаритмического эффектов разных режимов гипобарической адаптации // Росс. физиол. жур. – 2009. - 95(8). – С. 837-849.
9. Николаева Н.В., Федоров В.В., Привалова В.Ю., Гальянов А.А. Трудовой прогноз больных инфарктом миокарда // Кардиология. – 1997. - 37(3). С. 73.
10. Портниченко А.Г., Василенко М.І., Мойбенко О.О. Роль калієвих каналів в ефекторних механізмах кардіопротекції при пізньому прекондиціюванні серця щурів // Патологія. – 2008. - 5(3). – С. 61-62.

11. Сыркина А.Г., Белокопытова Н.В., Марков В.А., Эрлих А.Д. Как выполняются Национальные клинические рекомендации по лечению острого коронарного синдрома с подъемом сегмента ST в среднеурбанизированном городе Сибири по данным регистра РЕКОРД,2 // Сиб. мед. жур.(Томск). – 2013. - Т. 28, № 3. – С. 19-23.
12. Abbruscato T.J., Thomas S.A., Hruby V.J., Davis T.P. Blood-brain barrier permeability and bioavailability of a highly potent and mu-selective opioid receptor antagonist, CTAP: comparison with morphine // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 1997. - 280(1).- P. 402-409.
13. Arstall M.A., Zhao Y.Z., Hornberger L. et al. Human ventricular myocytes in vitro exhibit both early and delayed preconditioning responses to simulated ischemia // J. Mol. Cell. Cardiol. – 1998. - 30(5). - P. 1019-1025.
14. Ban K., Cooper A.J., Samuel S., Bhatti A., Patel M., Izumo S., Penninger J.M., Backx P.H., Oudit G.Y., Tsushima R.G. Phosphatidylinositol 3-kinase gamma is a critical mediator of myocardial ischemic and adenosine-mediated preconditioning // Circ. Res. – 2008. - 103(6). – P. 643-653.
15. Beguin P.C., Joyeux-Faure M., Godin-Ribuot D. et al. Acute intermittent hypoxia improves rat myocardium tolerance to ischemia // J. Appl. Physiol. – 2005. - 99(3). – P. 1064-1069.
16. Birch P.J., Hayes A.G., Sheehan M.J., Tyers M.B. Norbinaltorphimine: antagonist profile at κ opioid receptors // Eur. J. Pharmacol. – 1987. - 144 (3). – P. 405-408.
17. Cai Z., Manalo D.J., Wei G. et al. Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury // Circulation. – 2003. - 108(1). – P. 79-85.
18. Ding H.L., Zhu H.F., Dong J.W., Zhu W.Z., Zhou Z.N. Intermittent hypoxia protects the rat heart against ischemia/reperfusion injury by activating protein kinase C // Life Sci. – 2004. - 75(21). – P. 2587-2603.
19. Fitzpatrick C.M., Shi Y., Hutchins W.C., Su J., Gross G.J., Ostadal B., Tweddell J.S., Baker J.E. Cardioprotection in chronically hypoxic rabbits persists on exposure to normoxia: role of NOS and K_{ATP} channels // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2005. - 288(1). – P. H62-H68.
20. Fryer R.M., Hsu A.K., Eells J.T., Nagase H., Gross G.J. Opioid-induced second window of cardioprotection: potential role of mitochondrial K_{ATP} channels // Circ. Res. – 1999. - 84(7). – P. 846-851
21. Gross G.J. Role of opioids in acute and delayed preconditioning // J. Mol. Cell. Cardiol. – 2003. - 35(7). - P. 709-718.
22. Kolar F., Neckar J., Ostadal B. MCC-134, a blocker of mitochondrial and opener of sarcolemmal ATP-sensitive K^+ channels, abrogates cardioprotective effects of chronic hypoxia // Physiol. Res. – 2005. - 54(4). – P. 467-471.

23. Manukhina E.B., Downey H.F., Mallet R.T. Role of nitric oxide in cardiovascular adaptation to intermittent hypoxia // *Exp. Biol. Med* (Maywood). – 2006. - 231(4). – P. 343-365.
24. Maslov L.N., Lishmanov Yu.B., Oeltgen P.R., Barzakh E.I., Krylatov A.V., Govindaswami M., Brown S.A. 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 // *Life Sci.* – 2009. - 84(19-20). – P. 657-663.
25. Maslov L.N., Naryzhnaya N.V., Tsibulnikov S.Yu., Kolar F., Zhang Y., Wang H., Gusakova A.M., Lishmanov Yu.B. Role of endogenous opioid peptides in the infarct size-limiting effect of adaptation to chronic continuous hypoxia // *Life Sci.* – 2013. - 93(9-11). – P. 373-379.
26. Meerson F.Z., Gomzakov O.A., Shimkovich M.V. Adaptation to high altitude hypoxia as a factor preventing development of myocardial ischemic necrosis // *Am. J. Cardiol.* – 1973. - 31(1). – P. 30-34.
27. Meerson F.Z., Malyshev I.Yu. Adaptation to stress increases the heart resistance to ischemic and reperfusion arrhythmias // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 1989. – 21. – P. 299-303.
28. Meerson F.Z., Ustinova E.E., Manukhina E.B. Prevention of cardiac arrhythmias by adaptation to hypoxia: regulatory mechanisms and cardiotropic effect // *Biomed. Biochim. Acta.* – 1989. - 48(2-3). – P. S83-S88.
29. Meerson F.Z., Ustinova E.E., Orlova E.H. Prevention and elimination of heart arrhythmias by adaptation to intermittent high altitude hypoxia // *Clin. Cardiol.* – 1987. - 10(12). – P. 783-789.
30. Musil J., Prochazka J., Krofta K., Rakusan K., Poupa O. Effect of chronic systemic hypoxia of the methaemoglobin type on the rat myocardium and its resistance to anoxia // *Physiol. Bohemoslov.* – 1966. - 15(4). – P. 357-361.
31. Neckar J., Markova I., Novak F., Novakova O., Szarszoi O., Ost'adal B., Kolar F. Increased expression and altered subcellular distribution of PKC- δ in chronically hypoxic rat myocardium: involvement in cardioprotection // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2005. - 288(4). – P. H1566-H1572.
32. Neckar J., Ostadal B., Kolar F. Myocardial infarct size-limiting effect of chronic hypoxia persists for five weeks of normoxic recovery // *Physiol. Res.* – 2004. - 53(6). – P. 621-628.
33. Neckar J., Papousek F., Novakova O., Ost'adal B., Kolar F. Cardioprotective effects of chronic hypoxia and ischaemic preconditioning are not additive // *Basic Res. Cardiol.* - 2002a. - 97(2). – P. 161-167.
34. Neckar J., Szarszoi O., Herget J., Ostadal B., Kolar F. Cardioprotective effect of chronic hypoxia is blunted by concomitant hypercapnia // *Physiol. Res.* – 2003. - 52(2). – P. 171-175.

35. Neckar J., Szarszoi O., Koten L., Papousek F., Ost'adal B., Grover G.J., Kolar F. Effects of mitochondrial K_{ATP} modulators on cardioprotection induced by chronic high altitude hypoxia in rats // *Cardiovasc. Res.* - 2002b. - 55(3). – P. 567-575.
36. Ostadal B., Kolar F., Pelouch V., Widimsky J. Ontogenetic differences in cardiopulmonary adaptation to chronic hypoxia // *Physiol. Res.* – 1995. - 44(1). – P. 45-51.
37. Poupa O., Krofta K., Prochazka J., Chvapil M. The resistance of the myocardium to anoxia in animals acclimated to simulated altitude // *Physiol. Bohemoslov.* – 1965. – 14. – P. 233-237.
38. Poupa O., Krofta K., Prochazka J., Turek Z. Acclimation to simulated high altitude and acute cardiac necrosis // *Fed. Proc.* - 1966b. - 25(4). – P. 1243-1246.
39. Poupa O., Krofta K., Rakusan K., Prochazka J., Barbashova Z.I. Myoglobin content of the heart and resistance of the isolated myocardium to anoxia in vitro during adaptation to high altitude hypoxia // *Physiol. Bohemoslov.* - 1966a. - 15(5). – P. 450-453.
40. Sasaki H., Fukuda S., Otani H. et al. Hypoxic preconditioning triggers myocardial angiogenesis: a novel approach to enhance contractile functional reserve in rat with myocardial infarction // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2002. - 34(3). – P. 335-348.
41. Schiller P.W., Weltrowska G., Nguyen T.M.-D., Wilkes B.C., Chung N.N., Lemieux C. TIPP[ψ]: a highly potent and stable pseudopeptide δ opioid receptor antagonist with extraordinary δ selectivity // *J. Med. Chem.* – 1993. - 36(21). – P. 3182-3187.
42. Schultz J.E., Hsu A.K., Gross G.J. Ischemic preconditioning in the intact rat heart is mediated by δ_1 - but not μ - or κ -opioid receptors // *Circulation.* – 1998. - 97(13). – P. 1282-1289.
43. Schultz J.E.J., Yao Z., Cavero I., Gross G.J. Glibenclamide induced blockade of ischemic preconditioning is time dependent in intact rat heart // *Am. J. Physiol.* - 1997a. – 272. – P. H2607-H2615.
44. Schultz J.J., Hsu A.K., Gross G.J. Ischemic preconditioning and morphine-induced cardioprotection involve the delta (δ)-opioid receptor in the intact rat heart // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 1997. - 29(8). – P. 2187-2195.
45. Shizukuda Y., Iwamoto T., Mallet R.T., Downey H.F. Hypoxic preconditioning attenuates stunning caused by repeated coronary artery occlusions in dog heart // *Cardiovasc. Res.* – 1993. - 27(4). – P. 559-564.
46. Shizukuda Y., Mallet R.T., Lee S.C., Downey H.F. Hypoxic preconditioning of ischaemic canine myocardium // *Cardiovasc. Res.* – 1992. - 26(5). – P. 534-542.
47. Tajima M., Katayose D., Bessho M., Isoyama S. Acute ischaemic preconditioning and chronic hypoxia independently increase myocardial tolerance to ischaemia // *Cardiovasc. Res.* – 1994. - 28(3). – P. 312-319.

48. Tani M., Honma Y., Takayama M. et al. Loss of protection by hypoxic preconditioning in aging Fischer 344 rat hearts related to myocardial glycogen content and Na⁺ imbalance // *Cardiovasc. Res.* – 1999. - 41(3). – P. 594-602.
49. Trost S.U., Omens J.H., Karlson W.J., Meyer M., Mestril R., Covell J.W., Dillmann W.H. Protection against myocardial dysfunction after a brief ischemic period in transgenic mice expressing inducible heat shock protein 70 // *J. Clin. Invest.* – 1998. - 101(4). – P. 855-862.
50. Vanden Hoek T.L., Becker L.B., Shao Z., Li C., Schumacker P.T. Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes // *J. Biol. Chem.* – 1998. - 273(29). – P. 18092-18098.
51. Xi L., Tekin D., Gursoy E. et al. Evidence that NOS2 acts as a trigger and mediator of late preconditioning induced by acute systemic hypoxia // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2002. - 283(1). – P. H5-H12.
52. Yang X., Cohen M.V., Downey J.M. // *Cardiovasc. Drugs Ther.* – 2010. - 24(3). – P. 225-234.
53. Yellon D.M., Baxter G.F. A "second window of protection" or delayed preconditioning phenomenon: future horizons for myocardial protection? // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 1995. - 27(4). – P. 1023-1034.
54. Yellon D.M., Downey J.M. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology // *Physiol. Rev.* – 2003. - 83(4). – P. 1113-1151