

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель темы:
Заведующий лабораторией
экспериментальной кардиологии,
д-р мед. наук, профессор

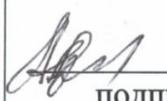
 21.12.2018г
подпись, дата

Л.Н. Маслов
(планирование
исследований,
оформление статей)

Ответственный исполнитель:
Ведущий научный сотрудник
лаборатории экспериментальной
кардиологии, д-р мед. наук

 21.12.2018г
подпись, дата

Н.В. Нарыжная
(выполнение
экспериментов,
статистическая
обработка данных,
оформление статей)

Исполнители темы:		
Заведующий лабораторией молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики, д-р мед. наук, профессор	 21.12.2018г подпись, дата	С.А. Афанасьев (планирование исследований, оформление статей)
Старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной кардиологии, д-р биол. наук	 21.12.2018г подпись, дата	Т.В. Ласукова (планирование исследований, оформление статей)
Старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной кардиологии, канд. мед. наук	 21.12.2018г подпись, дата	А.С. Горбунов (выполнение экспериментов, статистическая обработка данных, оформление статей)
Старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной кардиологии, канд. мед. наук	 21.12.2018г подпись, дата	С.Ю. Цибульников (выполнение экспериментов, статистическая обработка данных, оформление статей)
Ведущий научный сотрудник отделения сердечно-сосудистой хирургии, д-р мед. наук	 21.12.2018г подпись, дата	Ю.К. Подоксенов (планирование исследований, оформление статей)
Младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной кардиологии, канд. мед. наук	 21.12.2018г подпись, дата	Е.С. Прокудина (выполнение экспериментов, статистическая обработка данных, оформление статей)
Лаборант - исследователь лаборатории экспериментальной кардиологии, канд. мед. наук	 21.12.2018г подпись, дата	А.В. Крылатов (выполнение экспериментов)

<p>Младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной кардиологии</p>	 21.12.2018г подпись, дата	<p>А.С. Семенов (выполнение экспериментов, статистическая обработка данных, оформление статей)</p>
<p>Младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной кардиологии</p>	 21.12.2018г подпись, дата	<p>А.В. Мухомедзянов (выполнение экспериментов, статистическая обработка данных, оформление статей и промежуточного отчёта)</p>

РЕФЕРАТ

Отчёт 77 с, 12 рис., 14 табл., 130 источн.

СЕРДЦЕ, ИШЕМИЯ, РЕПЕРFUЗИЯ, 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 в механизме цитопротекторного действия хронической непрерывной нормобарической гипоксии, а также в изменении биоэнергетики миокарда после ишемии и реперфузии сердца у контрольных и адаптированных крыс

Установлено, что в реализации антинекротического эффекта адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии после глобальной ишемии и реперфузии изолированного сердца крысы принимают участие кардиальные δ_2 - и μ -опиоидные рецепторы, которые в свою очередь также вносят значимый вклад в улучшение постишемического восстановления сократительной активности изолированного сердца у адаптированных крыс.

В адаптационном поддержании энергетической функции митохондрий при действии глобальной ишемии и реперфузии на изолированное сердце крысы важную роль играют кардиальные δ_2 - и μ -опиоидные рецепторы.

После адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии повышение устойчивости МРТ-пор митохондрий к избытку ионов кальция после ишемии и реперфузии изолированного сердца происходит с участием кардиальных δ_2 - и μ -опиоидных рецепторов.

Степень внедрения: публикации 5 статей в центральных российских и международных журналах.

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ.....	2
РЕФЕРАТ.....	4
СОДЕРЖАНИЕ.....	5
ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ.....	6
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	7
ВВЕДЕНИЕ.....	9
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	15
1. Материалы и методы исследования.....	15
2. Результаты исследования и их обсуждение.....	23
2.1 Кардиопротекторный эффект адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии.....	23
2.1.1 Антинекротический эффект адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии.....	23
2.1.2 Влияние адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии на восстановление сократительной функции изолированного сердца после моделирования глобальной ишемии и реперфузии.....	24
2.1.3 Влияние адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии на функциональное состояние митохондрий миокарда после ишемии и реперфузии изолированного сердца у крыс.....	28
2.2 Исследование участия кардиальных опиоидных рецепторов в изменении устойчивости сердца и митохондрий к ишемии-реперфузии при адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии.....	35
2.2.1 Влияние блокады кардиальных опиоидных рецепторов на реализацию антинекротического эффекта адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии.....	35
2.2.2 Участие кардиальных опиоидных рецепторов в восстановлении сократительной активности изолированного сердца после ишемии-реперфузии у крыс, адаптированных к хронической непрерывной нормобарической гипоксии.....	35
2.2.3 Участие кардиальных опиоидных рецепторов в повышении устойчивости митохондрий к ишемии-реперфузии при адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии.....	43
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	55
ВЫВОДЫ.....	62
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ЗА 2018 ГОД.....	63
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	65

ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ

В данном отчете о НИР применяют следующие термины с соответствующими определениями:

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

Гипоксическое прекондиционирование (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;

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

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

Цитопротекторный эффект - повышение устойчивости изолированных кардиомиоцитов к гипоксии-реоксигенации;

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

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В данном отчете о НИР применяют следующие обозначения и сокращения:

2-МПП – 2-меркаптопропионил глицин;

5-ГД – 5-гидроксидеканоат;

8-SPT – 8-(p-сульфофенил)теофиллин;

Акт-киназа–киназа, выделенная из AKRthymomacells;

DMSO – диметилсульфоксид;

EGFR-рецептор – рецептор к эндотелиальному фактору роста;

GPCR – $G_{i/o}$ -белок сопряженные рецепторы;

GSK3 β –киназагликогенсинтазы 3

HIF1 α – гипоксия-индуцируемый фактор транскрипции 1

HMR – HMR 1098 (Clamikalantsodium);

iNOS – индуцибельная NO-синтаза;

L-NAME – N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride;

mPTP – поры, изменяющие проницаемость митохондрий;

NO – оксид азота;

NOS – синтаза оксида азота;

PI3-киназа – фосфатидилинозитол-3 киназа, phosphatidylinositol-3-kinase;

АФК – активные формы кислорода;

БСА – бычий сывороточный альбумин, V фракция;

ВНС – вегетативная нервная система;

ГП – гипоксическое preconditionирование;

ГЦ – гуанилатциклаза;

ЗИ/ОР – соотношение зоны инфаркта к области риска;

ИП – ишемическое preconditionирование;

K⁺_{АТФ}-канал – АТФ-чувствительный калиевый канал;

ЛДГ – лактатдегидрогеназа;

митоK⁺_{АТФ}– митохондриальный АТФ-зависимый K⁺ канал;

MPT-пора – пора, изменяющая проницаемость митохондрий,

mitochondrialpermeabilitytransitionpore;

ОИМ – острый инфаркт миокарда;

ОР – опиоидные рецепторы;

ПОЛ – перекисное окисление липидов;

ПКГ – протеинкиназаG;

ПКС – протеинкиназа C;

САС – симпатоадреналовая система;

СОД – супероксиддисмутаза;

ТК – тирозинкиназа;

ХННГ– хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия;

цАМФ– циклический аденозинмонофосфат.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. В России внутриспитальная летальность при остром инфаркте миокарда (ОИМ) составляет 13,8% [1]. Среди пациентов, перенесших ОИМ, 22% вынуждены уменьшить объём или квалификацию труда, а 23% полностью утратили трудоспособность [2]. 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.

Долговременная адаптация к гипоксии. Известно, что миокард животных, подвергнутых хронической непрерывной нормобарической гипоксии (ХННГ), становится устойчивым к повреждающему действию ишемии и реперфузии [3,4, 5]. Ранее нами было показано, что инотропный, инфаркт-лимитирующий и антинекротический эффекты ХННГ зависят от активации опиоидных рецепторов (ОР) [4, 5]. Между тем, локализация опиоидных рецепторов и внутриклеточные механизмы, обеспечивающие реализацию кардиопротекторного эффекта хронической гипоксии, остаются малоизученными. Есть основание считать, что одним из таких механизмов может служить активация опиоидных рецепторов кардиомиоцитов и связанного с ними каскада протеинкиназ, участвующих в передаче сигнала от Gi/o-белок-связанных рецепторов (опиоидных, брадикининовых, аденозиновых) на внутриклеточные эффекторы: mPTP-пора (mitochondrial permeability transition pore), K^+ _{АТФ}-канал (АТФ-чувствительный К-канал) [6, 7, 8]. Такая гипотеза базируется на результатах анализа литературы [9, 6, 7, 10, 11, 12], посвященной механизмам ишемического прекондиционирования, кардиопротекторный эффект которого реализуется через активацию PI3-протеинкиназы (phosphatidylinositol-3-kinase), тирозинкиназы и протеинкиназы С (ПКС). Основываясь на сходстве основных проявлений (антинекротический, антиаритмический, инотропный эффекты) кардиопротекторного действия хронической гипоксии и прекондиционирования, мы предположили, что в реализации защитного влияния ХННГ при аноксии-реоксигенации кардиомиоцитов могут быть также задействованы опиоидные рецепторы кардиомиоцитов, тирозинкиназы, PI3-киназа и протеинкиназа С.

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 [13] - [17], и задержанное ГП, при котором повышение толерантности сердца к ишемии и реперфузии выявляется через 24 ч после прекондиционирования [18] - [21]. Большинство публикаций по ГП – это работы по позднему ГП [22, 18, 19, 20] и только единичные работы посвящены раннему ГП [13] - [16]. Некоторые исследователи отрицают сам факт существования раннего ГП [19]. Однако нам удалось показать, что раннее ГП существует и оказывает более выраженный инфаркт-лимитирующий эффект, чем позднее ГП [15]. 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 и конечный эффектор раннего ГП пока остаются неизученными, а между тем знание о природе этих механизмов помогли бы в создании принципиально новых кардиопротекторных препаратов.

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

Задачи работы в 2018 году:

1. В экспериментах на изолированном перфузируемом сердце, подвергнутых действию ишемии-реперфузии, исследовать роль опиоидных рецепторов, в механизме цитопротекторного действия хронической непрерывной нормобарической гипоксии.

2. Выяснить роль опиоидных рецепторов в изменении биоэнергетики миокарда после ишемии и реперфузии сердца у контрольных и адаптированных к хронической непрерывной нормобарической гипоксии крыс.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Адаптация к хронической нормобарической гипоксии. Еще 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 [23]. Эти данные были подтверждены и дополнены работами отечественного физиолога Ф.З. Меерсона [24] и ряда других исследователей [25, 26, 27].

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 [28, 29]. 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 [30, 25, 26, 27, 31, 32, 34, 35]. 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 [36] - [41]. 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 [42] - [47], [25, 48, 49, 26, 50, 27].

В 1994 г в Японии на модели тотальной ишемии изолированного миокарда было впервые показано кардиопротекторное действие хронической нормобарической гипоксии [51]. Дальнейшие работы показали, что такой способ адаптации сопровождается развитием выраженного инфаркт-лимитирующего эффекта [3, 4]. 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 [24].

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 [52, 53, 54, 55, 57, 58, 59, 60, 13, 61]. В пользу такой точки зрения говорят такие факты, как (1) возрастание уровня опиоидов в крови и тканях крыс при адаптации к стрессу [52]; (2) уменьшение чрезмерной реакции организма на экстремальные факторы под действием экзогенных опиоидов [53, 54, 57]; (3) наличие кардиопротекторной, инфаркт-лимитирующей и антиаритмической активности у природных и синтетических лигандов опиоидных рецепторов [53, 58, 59, 60, 13]. Об этом же свидетельствует и увеличение плотности опиоидных рецепторов на мембранах кардиомиоцитов и структур головного мозга у животных, адаптированных к стрессу [62]. Участие опиоидных рецепторов в формировании кардиопротекторного влияния ишемического пре- или посткондиционирования [7, 63], в том числе и на модели изолированного сердца [64, 61], 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 (мито K^+ _{АТФ}-каналы) и mPTP-поры (mitochondrialpermeabilitytransitionpore) [15]. Можно предполагать, что этот 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 [65], а также гексокиназы и фосфорилированной (активированной) Akt-киназы (киназа, выделенная из AKRthymomacells) [33, 34], в миокарде экспериментальных животных. Одновременно с этим в кардиомиоцитах происходит активация синтеза противоапоптотических белков, ферментов антиоксидантной системы и энергетического метаболизма [66, 34, 67]. Инфаркт-лимитирующий эффект хронической гипоксии не усиливается введением донора оксида азота [32], 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.

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.

Гипоксическое прекондиционирование. Литературные данные о рецепторном механизме кардиопротекторного действия гипоксического прекондиционирования немногочисленны и противоречивы. Так, обнаружено, A1-аденозиновые рецепторы не участвуют в механизмах сохранения сократительной функции миокарда под действием гипоксического прекондиционирования при ишемии-реперфузии изолированного сердца крысы. Вместе с тем обнаружена важная роль аденозиновых рецепторов в развитии инфаркт-лимитирующего эффекта ГП на модели изолированного сердца кролика [68] и кардиопротекторного действия ГП на изолированном сердце крысы [69]. Можно предположить, что ключевую роль в формировании кардиопротекторного эффекта ГП играют аденозиновые A2-рецепторы, однако экспериментов, подтверждающих это предположение в условиях *in vivo* не проводилось.

Роль опиоидных рецепторов, которые, к примеру, участвуют в формировании адаптивной реакции ишемического прекондиционирования [70, 71], не исследована.

Об участии активные формы кислорода (АФК) в механизмах формирования адаптивных реакция миокарда впервые сообщили в 1988 г. [72]. Позднее было установлено, что АФК являются триггерами кардиопротекторного действия ишемического прекондиционирования [73]. Однако участие АФК в кардиопротекторном эффекте ГП обнаружено лишь *in vitro*, в опытах на изолированных кардиомиоцитах цыпленка [74]. Оказалось, что ГП повышает выживаемость клеток сердца при аноксии-реоксигенации кардиомиоцитов, а добавление перед ГП восстановителя тиольных групп 2-меркаптопропионил глицина или ингибитора цитозольной супероксиддисмутазы (СОД) диэтилдитиокарбомата полностью устраняет этот эффект [74]. Сходные результаты

получены на модели гипоксии-реоксигенации изолированных неонатальных кардиомиоцитов крысы [75]. Интересные данные были опубликованы G. Lebuffe и соавт. в 2003 г. [76]. Добавление к культуре клеток сердца эмбриона цыпленка экзогенные NO или H₂O₂ уменьшило гибель клеток при 60-минутной ишемии и 180-минутной реоксигенации кардиомиоцитов, то есть имитировало ГП [76]. Важной находкой этого исследования явилось то, что антиоксидант (2-меркаптопропионил) глицина (2-МПП) или блокатор АТФ-чувствительных калиевых каналов (K⁺_{АТФ}-каналов) глибенкламид полностью устраняли цитопротекторное действие экзогенного NO. Эти данные позволили авторам публикации сделать вывод о том, что эффектором кардиопротекторного эффекта ГП является активация K⁺_{АТФ}-каналов, а триггерами – выработка NO и АФК [76]. Помимо этих данных участие оксида азота и NO-синтазы в механизме реализации протекторного эффекта ГП подтверждено рядом исследовательских работ, выполненных *invitro* на срезах сердца крысы [77], модели изолированного сердца мыши [21], изолированных кардиомиоцитах. Однако остается неподтвержденным участие NO-синтазы в инфаркт-лимитирующем действии ГП и неясным, какие субтипы NO-синтазы участвуют в реализации этого эффекта.

О роли АТФ-зависимых калиевых каналов (K⁺_{АТФ}-каналов) в механизме ГП свидетельствует ряд исследований [74, 76, 75, 77]. В экспериментах на изолированных кардиомиоцитах крысы показано, что блокада K⁺_{АТФ}-каналов перед ГП приводит к предупреждению формирования цитопротекторного эффекта [74], и наоборот, добавление в среду инкубации активатора данных каналов увеличивает устойчивость клеток к действию длительной аноксии и реоксигенации [74, 76]. Подтверждение этим данным приводят Gong K.Z. и соавт. (2004) [75]. G. Lebuffe и соавт. в 2003 г. [76] обнаружили, что защитный эффект, аналогичный влиянию ГП, возникал при 10-минутной инкубации культуры клеток в присутствии активатора K⁺_{АТФ}-каналов пинацидила [76]. Однако эти предположения требуют дополнительной верификации, к тому же роль K⁺_{АТФ}-каналов в механизме ГП *in vivo* остается малоизученной.

Приведенные данные позволяют предполагать участие аденозиновых и опиоидных рецепторов, активных форм кислорода, NO-синтазы и K⁺_{АТФ}-каналов в механизме формирования инфаркт-лимитирующего действия ГП, однако эта гипотеза требует экспериментального обоснования.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1 Материалы и методы исследования

Работа выполнена на белых крысах-самцах линии Вистар массой 200–250 г. Все болезненные процедуры проводили на наркотизированных крысах. Дизайн исследования одобрен этическим комитетом НИИ кардиологии.

Дизайн исследования. Исследование роли кардиальных опиоидных рецепторов в повышении устойчивости сердца и митохондрий после адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии проводилось на модели глобальной ишемии и реперфузии изолированного сердца крысы с последующим изучением функционального состояния митохондрий, выделенных из данного миокарда. В работе использовались неселективные и селективные антагонисты опиоидных рецепторов. Все животные были разделены на 16 экспериментальных групп. Общее количество животных составило 192 (таблица 1).

Таблица 1 – Распределение животных по экспериментальным группам

№ группы	Описание экспериментальной группы	Количество животных в группе
1	Интактные крысы, нормоксическая перфузия изолированного сердца	12
2	Адаптированные крысы, нормоксическая перфузия изолированного сердца	20
3	Интактные крысы, ишемия-реперфузия изолированного сердца	12
4	Адаптированные крысы, ишемия-реперфузия изолированного сердца	12
5	Интактные крысы, ишемия-реперфузия изолированного сердца + налоксон (300 нмоль/л)	12
6	Адаптированные крысы, ишемия-реперфузия изолированного сердца + налоксон (300 нмоль/л)	12
7	Интактные крысы, ишемия-реперфузия изолированного сердца + TIPP(ψ) (30 нмоль/л)	12
8	Адаптированные крысы, ишемия-реперфузия изолированного сердца + TIPP(ψ) (30 нмоль/л)	12
9	Интактные крысы, ишемия-реперфузия изолированного сердца + BNTX (1 нмоль/л)	12
10	Адаптированные крысы, ишемия-реперфузия изолированного сердца + BNTX (1 нмоль/л)	12
11	Интактные крысы, ишемия-реперфузия изолированного сердца + налтрибен (1 нмоль/л)	12
12	Адаптированные крысы, ишемия-реперфузия изолированного сердца + налтрибен (1 нмоль/л)	12
13	Интактные крысы, ишемия-реперфузия изолированного сердца + СТАР (100 нмоль/л)	12

Продолжение таблицы 1		
14	Адаптированные крысы, ишемия-реперфузия изолированного сердца + СТАР (100 нмоль/л)	12
15	Интактные крысы, ишемия-реперфузия изолированного сердца + норбиналторфимин (3 нмоль/л)	12
16	Адаптированные крысы, ишемия-реперфузия изолированного сердца + норбиналторфимин (3 нмоль/л)	12

На модели глобальной ишемии и реперфузии изолированного сердца оценивались параметры сократительной активности миокарда. Использование данной экспериментальной модели позволяет исключить влияние на сердце вегетативной нервной системы, а также циркулирующих в крови гуморальных факторов. После ишемии-реперфузии из миокарда изолировались митохондрии и изучалось их функциональное состояние: дыхание, трансмембранный потенциал и кальций-связывающая способность митохондрий. Кроме того, в миокарде определялось содержание АТФ.

Адаптация крыс к хронической непрерывной нормобарической гипоксии. Животные экспериментальной группы непрерывно находились в гипоксической камере при 12% O₂ и нормальном атмосферном давлении на протяжении 21 дня [3]. Объем гипоксической камеры составлял 1,5 м³, концентрация O₂ поддерживалась на уровне 11,75—12,25%, концентрация CO₂ – на уровне 0,03% системой «Био-нова-204G4R1» (НТО Био-нова, Россия). Давление O₂ и CO₂ внутри камеры постоянно контролировалось датчиками TCOD-IR и OLC 20 (Oldham, France), подключенными к блоку управления MX32 (Oldham, France). Показано, что такой курс хронической нормобарической гипоксии способствовал повышению толерантности сердца крыс к воздействию острой ишемии и реперфузии [3].

Моделирование глобальной ишемии и реперфузии изолированного сердца. Моделирование глобальной ишемии и реперфузии изолированного сердца проводилось у крыс спустя 12-24 ч после завершения курса адаптации к ХННГ. Животные наркотизировались эфиром, после чего у них с грудной клетки удалялся ножницами кожный покров. Грудная клетка вскрывалась тремя разрезами: два – вдоль грудины, один – поперек. Пинцетом захватывались подходящие к сердцу сосуды, затем они отсекались выше места захвата. Выделенное сокращающееся сердце переносилось в охлажденный до +4 °С раствор Кребса-Хензелейта. После этого сердце помещалось в термостабилизированную увлажненную камеру; в восходящую дугу аорты вводилась канюля, через которую подавался перфузионный раствор. Изотонический раствор Кребса-

Хензелайта, используемый в работе, был следующего состава (ммоль/л): NaCl – 120; KCl – 4,8; CaCl₂ – 2,0; MgSO₄ – 1,2; KH₂PO₄ – 1,2; NaHCO₃ – 20; глюкоза – 10. Перфузионный раствор насыщался газовой смесью (95% O₂ и 5% CO₂). Для приготовления раствора Кребса-Хензелайта использовалась деионизованная вода, очищенная на установке «Simplicity» (Millipore, Франция), и реактивы, произведенные компаниями «Sigma-Aldrich» (Сент-Луис, США) и «MP Biomedicals» (Ирвин, США).

Перфузия изолированного сердца проводилась по методу Лангендорфа по открытому контуру [78]; температура раствора поддерживалась 37 ± 0,5 °С, перфузионное давление – 52 мм рт. ст., рН = 7,5. После 20 минут нормоксической перфузии изолированного сердца моделировалась 45-минутная глобальная ишемия и 30-минутная реперфузия. В отдельных сериях экспериментов за 10 минут до моделирования глобальной ишемии изолированное сердце перфузировали растворами антагонистов ОР (рисунок 1).



(а) нормоксическая перфузия изолированного сердца (95 минут), (б) моделирование глобальной ишемии (45 минут) и реперфузии (30 минут) на изолированном сердце, (в) перфузия изолированного сердца раствором антагониста ОР за 10 минут до моделирования глобальной ишемии и реперфузии.

Рисунок 1 – Схема протокола эксперимента на изолированном сердце крысы

Измерение параметров сократительной активности изолированного сердца. Для регистрации параметров сократительной активности изолированного сердца в полость левого желудочка вводился катетер с латексным баллончиком, заполненным дистиллированной водой. Объем баллончика регулировался для создания конечного диастолического давления 10-15 мм рт. ст. Показатели насосной функции сердца измерялись в изоволюмическом режиме с использованием датчика давления SS13L (BiopacSystemInc., Goleta, Калифорния, США). Запись изменения давления в левом

желудочке осуществлялась с помощью аппарата для электрофизиологических исследований MP35 (BiopacSystemInc., Goleta, США). Количественная обработка данных проводилась с использованием программного обеспечения INSTBSL-W (BiopacSystemInc., Goleta, США). Значения параметров сокращения изолированного сердца записывались в период нормоксической перфузии, в начале ишемии, а также на 5-й, 15-й и 30-й минутах реперфузии. Кривые сокращения сердца отображались на экране монитора компьютера в режиме реального времени и сохранялись на жёстком диске компьютера для дальнейшей обработки.

Измерялись следующие параметры сократимости изолированного сердца:

– Частота сердечных сокращений (ЧСС, уд/мин) – число сокращений сердца в течение одной минуты.

– Давление, развиваемое левым желудочком (ДРЛЖ, мм рт. ст.) – вычисляется как разница между систолическим и диастолическим давлением; характеризует силу сокращений изолированного сердца. Уменьшение данного параметра в период постишемического восстановления перфузии является одним из показателей тяжести повреждения миокарда.

– Конечное диастолическое давление (КДД, % от исходного значения) – используется для оценки степени расслабления миокарда, характеризует контрактуру сердца. Так как контрактура зависит от содержания ионов кальция в миоплазме, то КДД можно рассматривать как косвенный показатель содержания Ca^{2+} в цитоплазме кардиомиоцита [79].

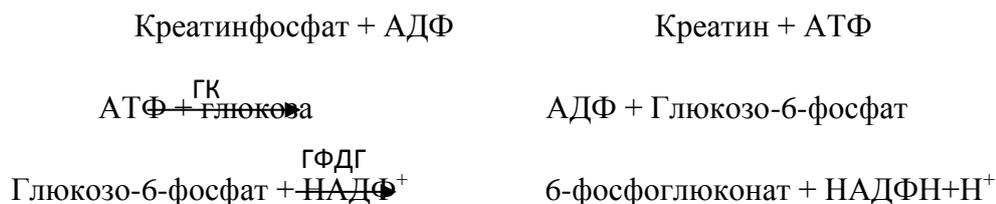
– Максимальная скорость сокращения (МСС, мм рт.ст./с) – рассчитывается как максимум производной первого порядка от кривой развития давления в левом желудочке.

– Максимальная скорость расслабления (МСР, мм рт.ст./с) – характеризует состояние процесса расслабления сердечной мышцы.

Оценка степени некротического повреждения миокарда. Степень некроза миокарда в ответ на ишемию и реперфузию оценивалась по измерению активности фермента креатинфосфокиназы (КФК) в перфузионном растворе, оттекающем от сердца в период реперфузии изолированного сердца. Активность КФК в перфузате измерялась с использованием коммерческих энзиматических наборов СК-NAc фирмы «AnalyticonBiotechnologies» (Lichtenfels, Германия) на спектрофотометре SmartSpec Plus (Bio-Rad, Калифорния, США) при длине волны 340 нм. Метод основан на увеличении поглощения света длиной волны 340 нм, которое пропорционально активности КФК в образце, вносимом в кювету с инкубационной смесью. Это так называемый



«трехступенчатый метод»:



В состав инкубационной среды входит глюкоза, гексокиназа (ГК), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (ГФДГ) и никотинамиддинуклеотидфосфат (НАДФ⁺). Образующийся на первом этапе АТФ включается в реакцию фосфорилирования глюкозы с получением глюкозо-6-фосфата. На третьем этапе глюкозо-6-фосфат участвует в восстановлении НАДФ⁺ до НАДФН. В результате, скорость образования НАДФН, измеряемая на спектрофотометре (длина волны 340 нм), пропорциональна активности КФК.

В термостатируемую кювету к 1 мл реакционной смеси добавляли 0,1 мл перфузата и инкубировали при 30 °С, измеряя оптическую плотность на 3-й и 5-й минутах от начала инкубации. Активность КФК вычисляли по формуле:

$$KФК\left(\frac{мкмоль\text{NADH}}{мин \times л}\right) = \frac{(A_{нач} - A_{конеч}) \times V \times 1000}{6,22 \times P \times 2},$$

где $A_{нач}$ – оптическая плотность раствора на 3 минуте инкубации пробы,

$A_{конеч}$ – оптическая плотность раствора на 5 минуте инкубации пробы,

V – общий объем (мл),

P – объем пробы (мл), 6,22 – коэффициент молярной экстинкции НАДН при длине волны 340 нм,

1000 – коэффициент пересчета на литр.

Для более удобного представления данных активность КФК выражается в условных единицах (Ед) и пересчитывается на единицу массы сердца (г).

Выделение митохондрий из миокарда. Изоляция митохондрий проводилась методом дифференциального центрифугирования [80, 81]. Для достижения высокого качества выделяемых органелл, все процедуры проводились при температуре 4°С. Миокард измельчали ножницами и гомогенизировали с помощью диспергатора Ultra-TurraxT10 (IKA–Werke, Staufen, Германия) в 20 мл раствора, содержащего (ммоль/л): сахараза – 70, маннитол – 210, EGTA – 6, NEPES – 10 и БСА – 5 мг/мл (рН 7,4). Гомогенат

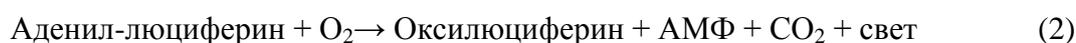
центрифугировали 10 минут при 900 g. Супернатант собирали, пропускали через нейлоновый фильтр, и повторно центрифугировали 10 минут при 12000 g. Осадок ресуспендировали в 20 мл изоляционного буфера с добавлением 0,1 ммоль/л EGTA, а затем центрифугировали 10 минут при 12000 g. Полученный в итоге осадок, содержащий митохондрии, ресуспендировали в 200 мкл изоляционного буфера без EGTA и БСА. Концентрацию белка в конечной суспензии митохондрий определяли по методу Бредфорд [82].

Оценка дыхания митохондрий. Дыхание митохондрий оценивали при температуре 25°C с помощью кислород-чувствительного электрода типа Кларка ДКТП–02.4 и пробора «Эксперт-001» (Эконикс-эксперт, Москва, Россия) в термостатируемой камере при постоянном перемешивании [83]. Митохондрии (0,4 мг белка/мл) инкубировали в буфере, содержащем 200 ммоль/л сахарозы, 10 ммоль/л Tris-HCl, 5 ммоль/л K_2HPO_4 , 0,01 ммоль/л EGTA, 2,5 мг/мл БСА, а также 3 ммоль/л пирувата и 3 ммоль/л малата – для оценки НАДН-зависимого дыхания, либо 5 ммоль/л сукцината – для оценки ФАД-зависимого дыхания (рН 7,37). Дыхание митохондрий оценивалось в состоянии 2 (в присутствии субстратов дыхания), в состоянии 3 (в присутствии АДФ, 200 нмоль/л), в состоянии 4 (после завершения образования АТФ из АДФ) [84]. Рассчитывались коэффициенты дыхательного контроля (состояние 3/состояние 4) и АДФ/О. Для оценки максимальной скорости дыхания митохондрий в состоянии разобщения, в инкубационную смесь добавляли 100 нмоль/л carbonylcyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP, Sigma–Aldrich, США). Скорость поглощения кислорода митохондриями выражали в нмоль O_2 /мг белка в минуту.

Измерение трансмембранного потенциала митохондрий ($\Delta\psi$). Трансмембранный потенциал митохондрий измеряли на спектрофлуориметре Shimadzu RF-5301-PC (Shimadzu Corporation, Kyoto, Япония) с использованием катионного флюоресцентного зонда этилового эфира тетраметилпродамина (TMRE; Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, США); длина волны возбуждения $\lambda_{\text{Ex}}=550$ нм, длина волны излучения $\lambda_{\text{Em}}=575$ нм [85, 83]. Реакция инициировалась добавлением суспензии митохондрий (2 мг белка) в кювету спектрофлуориметра к 3 мл буфера, содержащего 200 ммоль/л сахарозы, 10 ммоль/л Tris-HCl, 5 ммоль/л K_2HPO_4 , 0,01 ммоль/л EGTA, 2,5 мг/мл БСА, 5 ммоль/л сукцината (рН 7,37, 25 °C), 40 нмоль/л TMRE. О величине трансмембранного потенциала судили по падению интенсивности флюоресценции после добавления в среду инкубации 100 нмоль/л FCCP. Величина трансмембранного потенциала митохондрий представлялась как разница интенсивности флюоресценции до и после добавления FCCP (ΔA , Ед) в пересчете на единицу массы белка в суспензии митохондрий (мг).

Оценка кальций-связывающей способности митохондрий (КСС). Кальций-связывающая способность митохондрий оценивалась с использованием Ca^{2+} -чувствительного флуоресцентного красителя CalciumGreen-5N (MolecularProbes, Invitrogen, Eugene, США) на спектрофлуориметре ShimadzuRF-5301-PC (Shimadzu Corporation, Kyoto, Япония); длина волны возбуждения $\lambda_{\text{Ex}}=555$ нм; длина волны излучения $\lambda_{\text{Em}}=577$ нм [86]. Изолированные митохондрии (1 мг белка/мл) инкубировались в буфере, содержащем 200 ммоль/л сахарозы, 10 ммоль/л Tris-HCl, 5 ммоль/л KH_2PO_4 , 0,01 ммоль/л EGTA, 2,5 мг/мл БСА, 5 ммоль/л сукцината (pH 7,37, 25°C); концентрация CalciumGreen-5N составила 100 нмоль/л. Каждые 3 минуты в среду инкубации митохондрий добавляли по 100 нмоль CaCl_2 и регистрировали возрастание флуоресценции, которая затем снижалась, что соответствовало поглощению кальция митохондриями. Порции раствора CaCl_2 добавлялись до тех пор, пока не регистрировалось резкое возрастание флуоресценции CalciumGreen-5N, что соответствовало открытию МРТ-поры и выходу ионов Ca^{2+} из митохондрий. Кальций-связывающая способность митохондрий вычислялась по максимальному количеству аккумулярованного митохондриями Ca^{2+} в расчете на 1 мг белка (нмоль CaCl_2 /мг белка) [86].

Определение содержания АТФ в миокарде. Содержание АТФ в миокарде определяли после моделирования ишемии и реперфузии изолированного сердца. По окончании реперфузии фрагменты миокарда массой 80-100 мг иссекали из левого желудочка и замораживали в жидком азоте. Образцы миокарда гомогенизировали в жидком азоте, добавляя 2 мл 3% трихлоруксусной кислоты, охлажденной до 2°C. Гомогенат центрифугировали 10 минут при 3000 g и температуре 2°C. Надосадочную жидкость отбирали, нейтрализовали 1M Trizma base и доводили объем образца деионизованной водой до 2 мл [87]. Определение АТФ проводили с использованием биолюминесцентных наборов «ATP Bioluminescent Assay Kit» фирмы Sigma-Aldrich (США) на хемилюминометре Lucy-2 (Anthos Labtec Instruments, Salzburg, Austria). Реакция протекает в два этапа:



Реакция (1) обратимая и ее равновесие сдвинуто в правую сторону; реакция (2) необратима. Таким образом, содержание АТФ в исходном образце является лимитирующим фактором реакции и количество выделяющегося света прямо пропорционально содержанию АТФ [88].

Неселективные и селективные антагонисты опиоидных рецепторов. Для исследования участия кардиальных опиоидных рецепторов в реализации кардиопротекторного эффекта адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии применялась перфузия изолированных сердец крыс неселективными и селективными антагонистами ОР за 10 минут до моделирования глобальной ишемии. Были использованы следующие препараты:

1) Налоксон – неселективный антагонист всех типов опиоидных рецепторов использовался в конечной концентрации 300 нмоль/л [89].

2) Селективный антагонист δ -опиоидных рецепторов TIPP(ψ)(*H-Tyr-Tic* ψ [CH₂-NH]Phe-Phe-OH) использовался в конечной концентрации 30 нмоль/л [90].

3) Селективный антагонист δ_1 -опиоидных рецепторов 7-Benzylidenenaltrexone maleate (BNTX) использовался в дозировке 1 нмоль/л [91, 92].

4) Селективный антагонист δ_2 -опиоидных рецепторов налтрибен (17-(Cyclopropylmethyl)-6,7-didehydro-3,14 β -dihydroxy-4,5 α -epoxy-6,7-2',3'-benzo[*b*]furanomorphinan mesylate) использовался в конечной концентрации 1 нмоль/л [92, 91, 93].

5) Селективный антагонист μ -опиоидных рецепторов СТАР (D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Arg-Thr-Pen-Thr-NH₂) использовался в конечной концентрации 100 нмоль/л [94].

6) Селективный антагонист κ -опиоидных рецепторов норбиналторфимин (nor-Binaltorphiminedihydrochloride) использовался в концентрации 3 нмоль/л [95].

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 $\bar{X} \pm SEM$, где \bar{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 - 2.

2 Результаты исследования и их обсуждение

2.1 Кардиопротекторный эффект адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии

Кардиопротекторный эффект адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии (ХННГ) оценивался по ее способности уменьшать степень некроза кардиомиоцитов при моделировании глобальной ишемии и реперфузии изолированного сердца у крыс, а также по улучшению реперфузионного восстановления сократимости миокарда. С целью изучения внутриклеточных механизмов реализации защитного эффекта адаптации к ХННГ оценивалась устойчивость функционального состояния кардиальных митохондрий к ишемии-реперфузии.

2.1.1 Антинекротический эффект адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии

Исследование антинекротического эффекта адаптации к ХННГ проводилось на основании оценки активности внутриклеточного фермента креатинфосфокиназы (КФК) в перфузионном растворе, оттекающем от сердца в период реперфузии. Эксперименты на изолированных перфузируемых сердцах показали повышение активности КФК в перфузионном растворе после моделирования глобальной 45-минутной ишемии и 30-минутной реперфузии. У неадаптированных животных данный показатель составил $49,45 \pm 3,96$ Ед/г (таблица 2), что в 4,6 раза превышает активность КФК в условиях нормоксической перфузии изолированного сердца крысы (таблица 2). Такой выброс КФК объясняется некротической гибелью кардиомиоцитов в результате их ишемического и реперфузионного повреждения. Некроз кардиомиоцитов сопровождается разрывом сарколеммы и выходом содержимого клеток в перфузат, в том числе конституитивного внутриклеточного фермента КФК [96].

У адаптированных к ХННГ крыс активность КФК в перфузионном растворе, оттекающем от изолированного сердца после ишемии и реперфузии, составила $19,02 \pm 1,08$ Ед/г, что было на 61,5% ниже, по сравнению с аналогичным показателем у неадаптированных животных (таблица 2). Это свидетельствует о выраженном антинекротическом эффекте адаптации к ХННГ.

Таблица 2 – Активность креатинфосфокиназы (Ед/г) в перфузионном растворе (M±SEM)

Группа животных	Неадаптированные	Адаптированные
Нормоксия	10,76 ± 2,18	8,96 ± 0,91
Ишемия + реперфузия	49,45 ± 3,96#	19,02 ± 1,08 *†

Примечание – # - статистически значимые различия по сравнению с группой «Неадаптированные + нормоксия», $p = 0,0002$; * - статистически значимые различия по сравнению с группой «Адаптированные + нормоксия», $p = 0,0002$; † - статистически значимые различия по сравнению с группой «Неадаптированные + ишемия-реперфузия», $p = 0,0003$. Количество особей в каждой группе – 12.

2.1.2 Влияние адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии на восстановление сократительной функции изолированного сердца после моделирования глобальной ишемии и реперфузии

Исследование параметров сократительной активности изолированного сердца в период нормоксической перфузии как у адаптированных, так и у интактных крыс не показало достоверных различий ($p > 0,05$): предишемические значения частоты сердечных сокращений (ЧСС), давления, развиваемого левым желудочком (ДРЛЖ), конечного диастолического давления (КДД), максимальной скорости сокращения (МСС) и максимальной скорости расслабления (МСР) не отличались в двух исследуемых группах (таблица 3).

Моделирование глобальной ишемии приводило к остановке сокращений изолированного сердца крысы (данные не представлены). Однако после возобновления перфузии сократительная активность изолированного сердца постепенно восстанавливалась, при этом измерение параметров сократимости миокарда осуществлялось на 5, 15 и 30 минутах реперфузии.

Таблица 3 – Параметры сократительной активности изолированного сердца крысы в период нормоксической перфузии (M±SEM)

Параметр	Неадаптированные (n = 12)	Адаптированные (n = 12)
ЧСС, уд/мин	201,3 ± 9,9	192,6 ± 12,9
ДРЛЖ, мм рт. ст.	77,1 ± 4,3	90,0 ± 8,2
КДД, мм рт. ст.	13,3 ± 0,7	11,5 ± 0,8
МСС, мм рт. ст./с	1712,3 ± 123,5	1716,2 ± 90,1
МСР, мм рт. ст./с	1324,3 ± 56,0	1352,7 ± 90,0

Примечание – ЧСС – частота сердечных сокращений, ДРЛЖ – давление, развиваемое левым желудочком, КДД – конечное диастолическое давление, МСС – максимальная скорость сокращения, МСР – максимальная скорость расслабления.

Восстановление ЧСС после моделирования глобальной ишемии изолированного сердца у неадаптированных крыс протекало постепенно, начиная с $20,6 \pm 3,7$ % на 5-ой минуте реперфузии, $24,4 \pm 4,1$ % – на 15-ой, достигнув к 30-ой минуте $37,7 \pm 6,1$ % от исходного значения (таблица 4). В группе адаптированных особей наблюдалось более выраженное восстановление ЧСС – она в 1,1, 1,8 и 1,8 раз превышала эти показатели у интактных животных, соответственно, на 5, 15 и 30 минутах реперфузии изолированного сердца (таблица 4).

Было обнаружено, что как у адаптированных, так и у неадаптированных крыс, происходило неполное восстановление параметров сократимости изолированного сердца в период реперфузии. Однако если у интактных крыс ДРЛЖ к 30-ой минуте реперфузии восстанавливалось лишь на $20 \pm 2,1$ % от исходного (рисунок 2), то у предварительно адаптированных животных этот показатель достигал $64 \pm 8,1$ % от предишемических значений (рисунок 2). Такое восстановление ДРЛЖ у адаптированных животных после ишемии-реперфузии, превосходящее аналогичный показатель у интактных особей в 3 раза, позволяет судить о выраженной способности адаптации к ХННГ улучшать постишемическое восстановление сократительной активности изолированного сердца у крыс.

Таблица 4 – Предишемические и реперфузионные значения частоты сердечных сокращений (уд/мин), ($M \pm SEM$.)

Период	Неадаптированные (n = 12)	Адаптированные (n = 12)
До ишемии	$201,3 \pm 9,9$	$192,6 \pm 12,9$
Реперфузия (5 минут)	$41,4 \pm 7,4$	$43,6 \pm 3,4$
Реперфузия (15 минут)	$49,1 \pm 8,2$	$83,6 \pm 7,7^*$ ($p=0,0026$)
Реперфузия (30 минут)	$75,9 \pm 12,2$	$135,5 \pm 10,8^*$ ($p=0,0007$)

Примечание – * – Статистически значимые различия по сравнению с группой неадаптированных крыс после моделирования ишемии-реперфузии изолированного сердца.

Таким образом, при адаптации к ХННГ не только увеличивается степень реперфузионного восстановления сократимости изолированного сердца (о чем можно было судить по величине ДРЛЖ), но этот процесс происходит быстрее, по сравнению с интактными крысами, о чем свидетельствует значительный подъем ЧСС в период реперфузии.

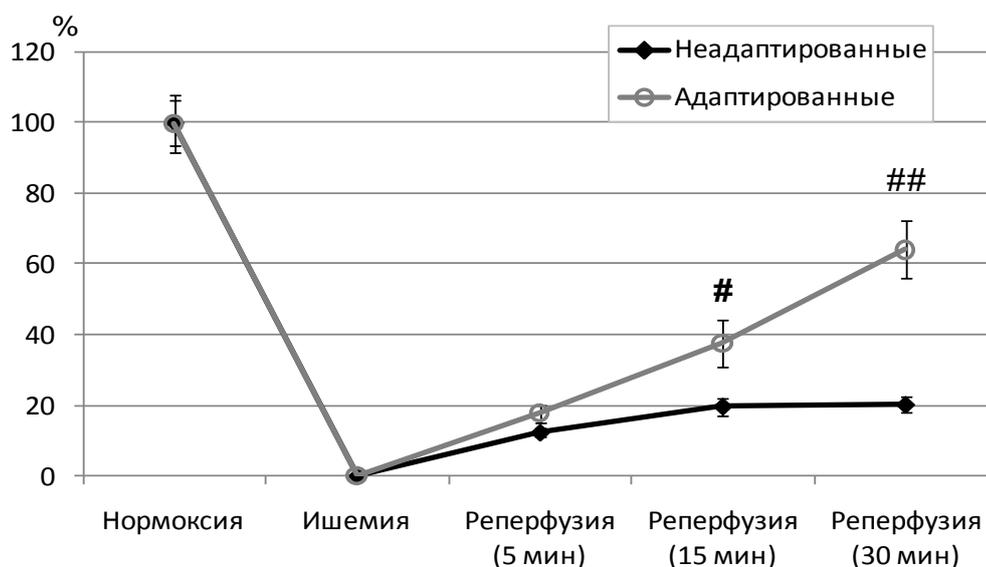


Рисунок 2 – Давление, развиваемое левым желудочком (в % от исходного значения), после моделирования 45-минутной ишемии и 30-минутной реперфузии изолированного сердца у неадаптированных (n = 12) и адаптированных к ХННГ крыс (n = 12). # - статистически значимые различия по сравнению с группой неадаптированных крыс (p = 0,002); ## - статистически значимые различия по сравнению с группой неадаптированных крыс (p = 0,0001)

Как известно, одним из признаков реперфузионного повреждения миокарда является развитие его контрактуры [97]. Для оценки степени контрактуры изолированного сердца использовалось конечное диастолическое давление (КДД, мм рт. ст.). Таким образом, чем меньше нарастает КДД в период реперфузии, тем больше сохранена диастолическая функция сердца. Как представлено на Рисунке 3, КДД у неадаптированных крыс на 5-ой минуте реперфузии увеличивается в 4,5 раза по сравнению с исходными значениями и, снижаясь к концу реперфузии, остается в 3,7 раз выше, чем до ишемии. Адаптация к ХННГ предупреждает развитие столь выраженной контрактуры, о чем свидетельствует лишь 1,5-кратное увеличение КДД на 30-ой минуте реперфузии (рисунок 3).

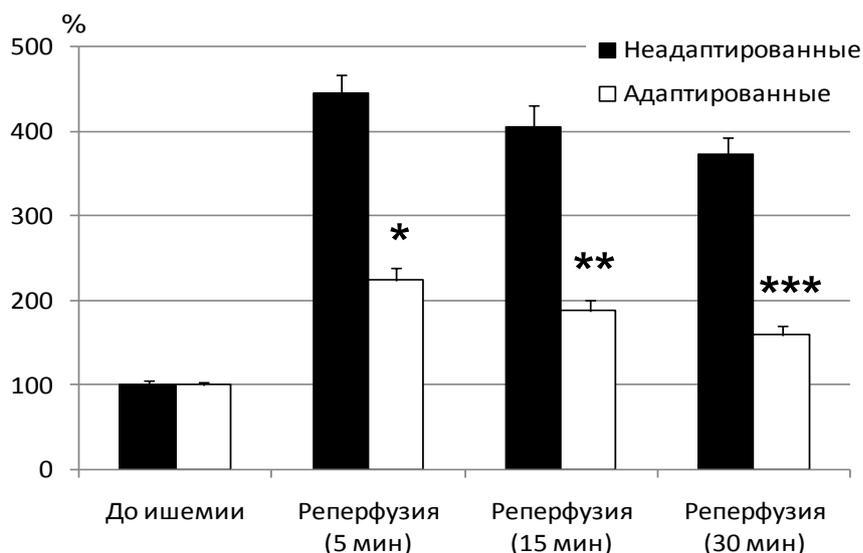


Рисунок 3 – Конечное диастолическое давление (в % от исходного значения) после моделирования 45-минутной ишемии и 30-минутной реперфузии изолированного сердца у неадаптированных (n = 12) и адаптированных к ХННГ крыс (n = 12). * – статистически значимые различия по сравнению с группой неадаптированных крыс (p = 0,0003); ** – статистически значимые различия по сравнению с группой неадаптированных крыс (p = 0,0004); *** – статистически значимые различия по сравнению с группой неадаптированных крыс (p = 0,0002)

О реперфузионном восстановлении как сократительной, так и диастолической функции миокарда судили также по изменению показателей МСС и МСР в период реперфузии (таблица 5). До моделирования глобальной ишемии изолированного сердца эти параметры не различались в группах интактных и предварительно адаптированных к гипоксии крыс (таблица 5). У неадаптированных крыс МСС к 30-минуте реперфузии достигала лишь $15,6 \pm 3,3$ % от исходного, в то время как у адаптированных особей этот показатель был выше в 2,7 раза и составил $42,6 \pm 5,6$ % от доишемического значения (таблица 5). При исследовании восстановления диастолической функции сердца наблюдалась сходная динамика – МСР у неадаптированных крыс достигала к концу реперфузии лишь $16,9 \pm 1,5$ % от исходных значений, а у адаптированных особей этот показатель был в 2,6 раза выше (таблица 5).

Таким образом, адаптация к ХННГ обладает выраженной способностью к реперфузионному восстановлению работы изолированного сердца у крыс, что выражается как в увеличении сократимости, так и в улучшении расслабления миокарда.

Таблица 5 – Предишемические и реперфузионные значения максимальной скорости сокращения (МСС) и максимальной скорости расслабления (МСР) изолированного сердца у крыс (M±SEM)

	Период	Неадаптированные (n = 12)	Адаптированные (n = 12)
МСС, мм рт.ст./с	До ишемии	1712,3 ± 123,5	1716,2 ± 90,1
	Реперфузия (5 мин)	176,3 ± 39,2	311,0 ± 39,4
	Реперфузия (15 мин)	224,8 ± 36,1	397,0 ± 59,2* (p=0.02)
	Реперфузия (30 мин)	267,5 ± 56,6	731,2 ± 95,4* (p=0.00015)
МСР, мм рт.ст./с	До ишемии	1324,3 ± 56,0	1352,7 ± 90,0
	Реперфузия (5 мин)	123,1 ± 9,9	233,6 ± 13,7* (p=0,001)
	Реперфузия (15 мин)	150,1 ± 15,0	306,5 ± 27,4* (p=0,0001)
	Реперфузия (30 мин)	223,3 ± 20,4	595,0 ± 42,3* (p=0,00002)

Примечание – *Статистически значимые различия по сравнению с группой неадаптированных крыс.

Исходя из изложенных выше результатов, можно заключить, что адаптация к хронической непрерывной нормобарической гипоксии обладает выраженным кардиопротекторным эффектом, проявляющимся в ее способности уменьшать некроз кардиомиоцитов после моделирования ишемии-реперфузии *in vitro*, а также в улучшении реперфузионного восстановления сократительной функции изолированного сердца у крыс.

3.1.3 Влияние адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии на функциональное состояние митохондрий миокарда после ишемии и реперфузии изолированного сердца у крыс

Особый интерес в изучении защитных свойств ХННГ представляют внутриклеточные механизмы их реализации. Одним из конечных эффектов адаптации к хронической гипоксии является изменение функционального состояния кардиальных митохондрий. Исследование функционального состояния митохондрий миокарда включало в себя оценку параметров дыхания митохондрий (НАДН-зависимого и ФАД-зависимого путей дыхания) и трансмембранного потенциала, а также устойчивости МРТ-поры к кальциевой нагрузке, о чем судили по кальций-связывающей способности митохондрий. Кроме того, оценивалось содержание аденозинтрифосфата (АТФ) в миокарде у крыс.

Исследование параметров митохондриального дыхания показало отсутствие статистически значимых различий между неадаптированными и адаптированными

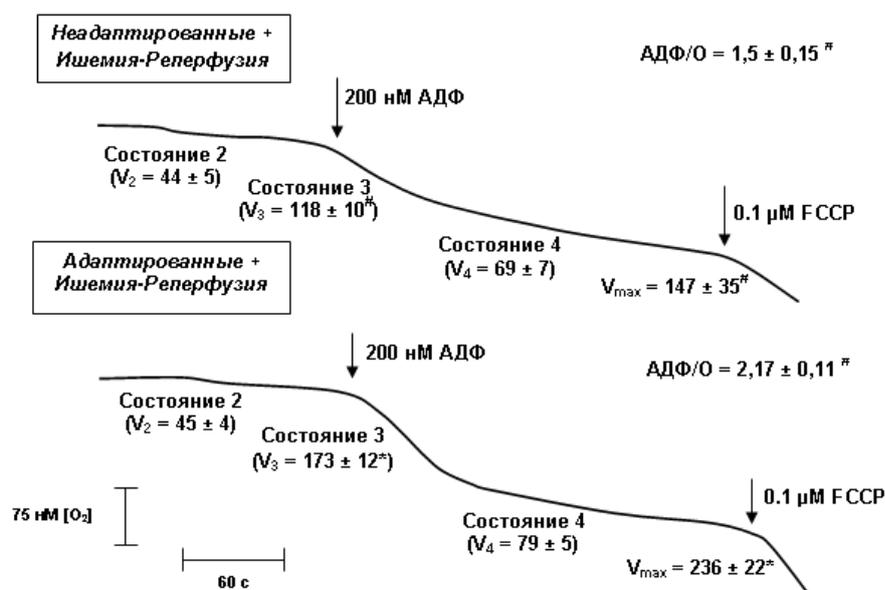
группами интактных крыс (таблица 6). Достоверных различий между группами не наблюдалось как в случае НАДН-зависимого, так и в случае ФАД-зависимого пути дыхания митохондрий ($p > 0,05$; таблица 6).

Таблица 6 – Предишемические значения параметров НАДН- и ФАД-зависимого пути дыхания митохондрий миокарда ($M \pm SEM$)

Параметр	Неадаптированные (n = 12)		Адаптированные (n = 12)	
	НАДН-зависимое дыхание	ФАД-зависимое дыхание	НАДН-зависимое дыхание	ФАД-зависимое дыхание
V_2 , нМ [O ₂]/мг/мин	42 ± 4	58 ± 5	47 ± 6	53 ± 6
V_3 , нМ [O ₂]/мг/мин	173 ± 14	206 ± 12	194 ± 16	233 ± 7
V_4 , нМ [O ₂]/мг/мин	84 ± 11	123 ± 7	84 ± 6	130 ± 12
V_{max} , нМ [O ₂]/мг/мин	269 ± 23	277 ± 16	298 ± 25	283 ± 20
АДФ/О, нМ АДФ/нМ атом[О]	2,31 ± 0,1	1,7 ± 0,1	2,32 ± 0,1	1,8 ± 0,2

Примечание – V_2 – скорость дыхания митохондрий в состоянии 2 (в присутствии субстратов); V_3 – скорость дыхания митохондрий в состоянии 3 (АДФ-стимулированное дыхание); V_4 – скорость дыхания митохондрий в состоянии 4 (когда завершается синтез АТФ); V_{max} – максимальная скорость дыхания митохондрий при разобщении в присутствии 0,1 μ М FCCP; АДФ/О – «эффективность дыхания», соотношение количества потребленного митохондриями АДФ [нМ] к количеству поглощенного кислорода [нМ]. НАДН-дыхание – субстратами являются 3 мМ малат и 3 мМ пируват. ФАД-дыхание – субстратом является 5 мМ сукцинат.

Иная картина наблюдалась после моделирования ишемии-реперфузии изолированного сердца у крыс в случае НАДН-зависимого дыхания митохондрий (рисунок 4). У неадаптированных особей после ишемии-реперфузии происходило 1,5-кратное снижение скорости 3 (V_3) стимулированного дыхания митохондрий, а также падение максимальной скорости дыхания (V_{max}) в 1,8 раз (рисунок 4) по сравнению с аналогичными показателями у интактных животных (таблица 6). Коэффициент АДФ/О, при этом, у неадаптированных крыс после ишемии-реперфузии снижался в 1,54 раза (рисунок 4). У адаптированных к гипоксии животных после ишемии-реперфузии также наблюдалось снижение скорости V_3 , однако эти значения в 1,5 раза превышали аналогичные показатели у неадаптированных крыс (рисунок 4).



V_2 – скорость дыхания митохондрий в состоянии 2 (в присутствии субстратов), нМ $[O_2]$ /мг белка/мин; V_3 – скорость дыхания митохондрий в состоянии 3 (АДФ-стимулированное дыхание), нМ $[O_2]$ /мг белка/мин; V_4 – скорость дыхания митохондрий в состоянии 4 (когда завершается синтез АТФ), нМ $[O_2]$ /мг белка/мин; V_{max} – максимальная скорость дыхания митохондрий при разобщении в присутствии $0,1 \mu\text{M}$ FCCP, нМ $[O_2]$ /мг белка/мин; АДФ/О – «эффективность дыхания», соотношение количества потребленного митохондриями АДФ [нМ] к количеству поглощенного кислорода [нМ], нМ АДФ/нМ атом[О]. # - статистически значимые различия по сравнению с интактными крысами (Таблица 6); * - статистически значимые различия по сравнению с группой «Неадаптированные + ишемия-реперфузия».

Рисунок 4 – Кривые дыхания изолированных митохондрий

Схожая ситуация наблюдалась и в случае V_{max} : данный показатель в группе адаптированных был в 1,6 раз выше, чем у неадаптированных. Коэффициент АДФ/Оу адаптированных крыс после ишемии-реперфузии в 1,45 раз превосходил эти значения в группе неадаптированных особей (рисунок 4).

В случае ФАД-зависимого пути окисления субстратов моделирование ишемии-реперфузии изолированного сердца у крыс также приводило к снижению показателей дыхания митохондрий, однако статистически значимых различий между группами адаптированных и неадаптированных особей обнаружено не было (данные не представлены).

Таким образом, хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия повышает устойчивость митохондриального дыхания к действию ишемии-реперфузии на изолированное сердце у крыс, и основные адаптационные изменения при этом затрагивают компоненты НАДН-зависимого пути окисления субстратов.

Исследование трансмембранного потенциала (ТМП) митохондрий показало отсутствие значимых различий между интактными группами неадаптированных и

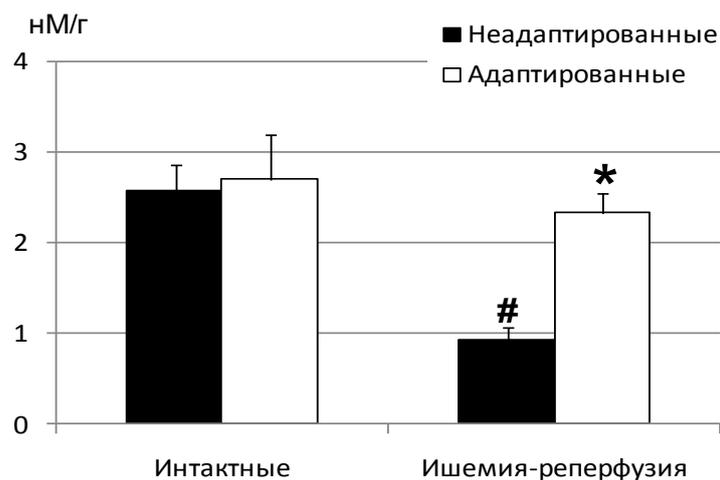
адаптированных крыс (таблица 7). Моделирование глобальной ишемии и реперфузии изолированного сердца у крыс приводило к снижению значений ТМП в двух исследуемых группах (таблица 7). Вероятной причиной этого является замедление работы дыхательной цепи, а также повреждение внутренней мембраны митохондрий активными формами кислорода [98]. Однако если у неадаптированных крыс ТМП снижался в 2,3 раза по сравнению с начальным значением, то у адаптированных особей это снижение составило лишь 1,2 раза и показатель достоверно не отличался от исходного (таблица 7).

Таблица 7 – Трансмембранный потенциал митохондрий (Ед/мг белка), (M ± SEM)

Группа	Неадаптированные (n = 12)	Адаптированные (n = 12)
Интактные	24,9 ± 3,2	27,9 ± 1,9
Ишемия-реперфузия	10,7 ± 0,5 ⁺	23,0 ± 2,8 [*]

Примечание – ⁺статистически значимые различия по сравнению с группой неадаптированных интактных крыс (p = 0,00013); * - статистически значимые различия по сравнению с группой неадаптированных крыс после моделирования ишемии-реперфузии изолированного сердца (p = 0,0016).

Выявленные изменения показателей дыхания и трансмембранного потенциала изолированных митохондрий свидетельствуют о способности адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии предупреждать ишемическое-реперфузионное повреждение энергетической функции митохондрий. Одним из доказательств этого факта послужило исследование содержания АТФ в миокарде левого желудочка. Было обнаружено, что моделирование глобальной ишемии и реперфузии изолированного сердца приводит к статистически значимому снижению концентрации АТФ в миокарде у неадаптированных крыс (с 2,58 ± 0,28 нМ/г до 0,92 ± 0,15 нМ/г, p = 0,001, рисунок 5).

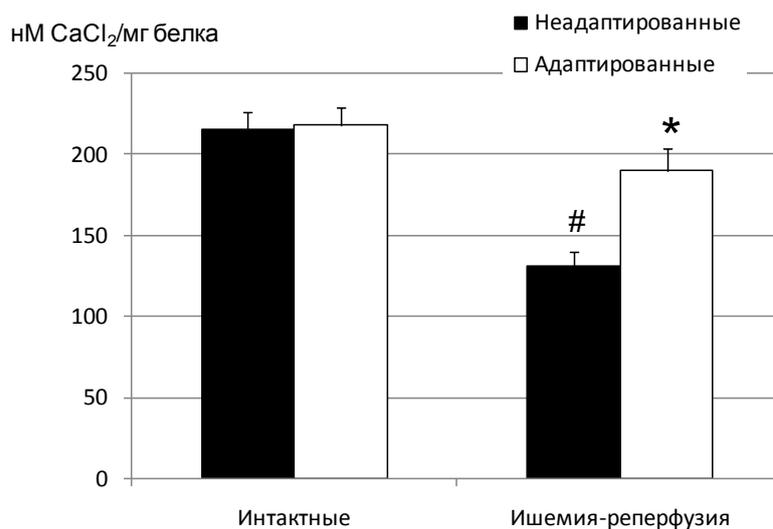


«Интактные» – крысы без моделирования ишемии-реперфузии изолированного сердца. «Ишемия-реперфузия» – крысы с моделированием ишемии (45 мин) и реперфузии (30 мин) изолированного сердца. Количество особей в каждой группе составило 12. # - статистически значимые различия по сравнению с группой интактных неадаптированных крыс ($p < 0,01$); * - статистически значимые различия по сравнению с группой неадаптированных крыс с ишемией-реперфузией ($p < 0,01$).

Рисунок 5 – Содержание АТФ в миокарде левого желудочка изолированного сердца крысы (нМ/г ткани)

Эти данные согласуются с результатами работы Z.-H. Wang и соавт. [99], в которой было показано, что после моделирования 30-минутной ишемии изолированного сердца крысы, содержание АТФ в реперфузию достигает лишь 40 % от исходного значения. У адаптированных крыс содержание АТФ в миокарде после ишемии и реперфузии не уменьшалось (рисунок 5). Таким образом, адаптация к хронической непрерывной нормобарической гипоксии предупреждает ишемическое-реперфузионное нарушение способности митохондрий синтезировать АТФ и сохраняет энергетический потенциал клетки.

Исследование состояния МРТ-поры митохондрий показало отсутствие различий в кальций-связывающей способности между интактными группами адаптированных и неадаптированных крыс (рисунок 6).



«Интактные» – группы адаптированных и неадаптированных крыс с нормоксической перфузией (95 мин) изолированного сердца; «Ишемия-реперфузия» – адаптированные и неадаптированные крысы с моделированием ишемии (45 мин) и реперфузии (30 мин) изолированного сердца. Количество особей в каждой группе составило 12. # - статистически значимые различия по сравнению с группой интактных неадаптированных крыс ($p = 0,001$); * - статистически значимые различия по сравнению с группой неадаптированных крыс с ишемией-реперфузией ($p = 0,002$)/

Рисунок 6 – Кальций-связывающая способность митохондрий (нМ CaCl_2 /мг белка)

Моделирование глобальной ишемии и реперфузии изолированного сердца у неадаптированных крыс приводило к снижению кальций-связывающей способности митохондрий миокарда в 1,6 раз по сравнению с исходным значением (рисунок 6). Предварительная адаптация животных к хронической гипоксии повышала устойчивость МРТ-пор к Ca^{2+} – кальций-связывающая способность кардиальных митохондрий после ишемии-реперфузии достоверно не отличалась от доишемических значений (рисунок 6). Полученные результаты свидетельствуют о выраженной способности адаптации к ХННГ повышать устойчивость МРТ-пор митохондрий к перегрузке ионами кальция.

На основе результатов исследований показателей реперфузионного восстановления сократительной активности изолированного сердца, а также функционального состояния митохондрий миокарда, был проведен корреляционный анализ данных параметров. Как у неадаптированных крыс, так и в группе адаптированных особей было обнаружено, что давление, развиваемое левым желудочком (ДРЛЖ), в период реперфузии изолированного сердца находится в прямой зависимости от скорости АДФ-стимулированного дыхания митохондрий в состоянии 3 (V_3 , таблица 8). Этот факт свидетельствует о зависимости силы сокращения изолированного сердца от функционального состояния митохондрий миокарда.

Аналогичная корреляция была обнаружена и при сопоставлении ДРЛЖ с кальций-связывающей способностью митохондрий (КСС, таблица 8), причем она наблюдалась как у неадаптированных, так и у адаптированных к гипоксии животных. Таким образом, положительное инотропное влияние адаптации к ХННГ зависит от функционального состояния дыхания митохондрий и устойчивости МРТ-пор к перегрузке ионами кальция.

Таблица 8 – Коэффициенты корреляции между ДРЛЖ и параметрами функционального состояния митохондрий

Группа	Параметры	Коэффициент корреляции (r)	Достоверность (p)
Неадаптированные + ишемия-реперфузия	ДРЛЖ и V_3	0,75	0,005
	ДРЛЖ и КСС	0,67	0,016
Адаптированные + ишемия-реперфузия	ДРЛЖ и V_3	0,81	0,001
	ДРЛЖ и КСС	0,69	0,014

Примечание – ДРЛЖ – давление, развиваемое левым желудочком; V_3 – скорость АДФ-стимулированного дыхания митохондрий в состоянии 3; КСС – кальций-связывающая способность митохондрий.

Поводя итог к данному разделу, можно заключить, что защитный эффект адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии, проявляющийся выраженным антинекротическим эффектом и ее способностью улучшать реперфузионное восстановление сократимости изолированного сердца, реализуется за счет изменения функционального состояния митохондрий миокарда, а именно предупреждения нарушений НАД-зависимого дыхания митохондрий и трансмембранного потенциала, усиления синтеза АТФ митохондриями в состоянии 3 и повышенной устойчивости МРТ-пор к перегрузке ионами кальция.

Оставался нерешенным вопрос о рецепторном механизме реализации кардиопротекторного эффекта адаптации к ХННГ. Ранее в нашей лаборатории были получены данные об увеличении содержания эндогенных опиоидных пептидов в сыворотке крови и миокарде у крыс, адаптированных к хронической непрерывной нормобарической гипоксии [4]. Кроме того, существуют доказательства участия опиоидных рецепторов в реализации защитного эффекта адаптации к прерывистой гипоксии [100, 101]. Однако до сих пор неизвестно, связана ли активация кардиальных опиоидных рецепторов с изменением устойчивости митохондрий миокарда к ишемии-реперфузии и какие субтипы ОР могут принимать участие в реализации защитного эффекта адаптации к ХННГ.

2.2. Исследование участия кардиальных опиоидных рецепторов в изменении устойчивости сердца и митохондрий к ишемии-реперфузии при адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии

Об участии кардиальных δ_1 , δ_2 , μ и κ -опиоидных рецепторов (ОР) в реализации защитных эффектов адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии судили после неселективной и селективной блокады ОР путем перфузии растворами антагонистов ОР изолированного сердца крысы за 10 минут до моделирования глобальной ишемии.

2.2.1 Влияние блокады кардиальных опиоидных рецепторов на реализацию антинекротического эффекта адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии

В главе 2.1.1 было показано, что адаптация к хронической непрерывной нормобарической гипоксии обладает выраженным антинекротическим эффектом, проявляющимся уменьшением выброса креатинфосфокиназы в 2,6 раза из некротизированных кардиомиоцитов после ишемии-реперфузии изолированного сердца у адаптированных крыс по сравнению с группой неадаптированных особей (таблицы 2, 9).

Перфузия изолированных сердец неселективными и селективными антагонистами ОР у неадаптированных крыс не влияла на степень некроза миокарда после моделирования глобальной ишемии и реперфузии – активность КФК в перфузате таких сердец была выше, чем у интактных крыс, однако не отличалась от ишемического контроля (таблица 9). Это свидетельствует об отсутствии самостоятельного кардиопротекторного действия у использованных в эксперименте антагонистов ОР. Перфузия изолированных сердец адаптированных крыс неселективным антагонистом всех типов ОР налоксоном вызывала увеличение активности КФК в перфузате после ишемии-реперфузии в 2,1 раза по сравнению с адаптированным контролем ($p < 0,05$, таблица 9). В условиях блокады δ -опиоидных рецепторов Т1РР(ψ), а также при селективной блокаде δ_2 -ОР налтрибеном или ингибировании μ -ОР пептидом СТАР активность КФК в перфузионном растворе оставалась высокой и не отличалась от неадаптированного контроля с ишемией-реперфузией изолированного сердца (таблица 9).

Таблица 9 – Активность креатинфосфокиназы (Ед/г) в перфузионном растворе, оттекающем от изолированного сердца крыс после перфузии антагонистов ОР ($M \pm SEM$)

Группа животных	Неадаптированные	Адаптированные
Нормоксия	10,76 \pm 2,18	8,96 \pm 0,91
Ишемия-реперфузия	49,45 \pm 3,96 $p_1 = 0,0002$	19,02 \pm 1,08 $p_1 = 0,0002$ $p_2 = 0,0003$

Продолжение таблицы 9		
Налоксон + ишемия-реперфузия	43,78 ± 3,17 p ₁ = 0,0004	39,78 ± 5,29 p ₃ = 0,001
ГИРР (ψ) + ишемия-реперфузия	49,7 ± 3,67 p ₁ = 0,0001	51,43 ± 3,06 p ₃ = 0,0002
BNTX + ишемия-реперфузия	47,19 ± 5,58 p ₁ = 0,0002	18,81 ± 1,99 p ₃ = 0,591
Налтрибен + ишемия-реперфузия	43,12 ± 4,84 p ₁ = 0,0004	46,53 ± 3,7 p ₃ = 0,0003
СТАР + ишемия-реперфузия	43,89 ± 4,24 p ₁ = 0,006	45,16 ± 3,22 p ₃ = 0,0003
Норбинаторфимин + ишемия-реперфузия	49,94 ± 4,46 p ₁ = 0,006	16,25 ± 1,81 p ₃ = 0,25

Примечание – p₁ - различия по сравнению с группой «нормоксия»; p₂ - различия по сравнению с группой «неадаптированные + ишемия-реперфузия»; p₃ - различия по сравнению с группой «адаптированные + ишемия-реперфузия». Количество особей в каждой группе составило 12.

Блокада кардиальных δ₁-ОР BNTX или κ-ОР норбинаторфимином у адаптированных особей не влияла на проявление антинекротического эффекта адаптации к гипоксии – КФК в перфузате, оттекающем от сердца, у таких крыс не отличалась от адаптированного контроля (таблица 9).

Анализ полученных данных свидетельствует об участии δ₂ и μ-субтипов кардиальных опиоидных рецепторов в реализации антинекротического эффекта адаптации к ХННГ. Эти результаты согласуются со сведениями о роли данных субтипов ОР в реализации инфаркт-лимитирующего [4] и цитопротекторного эффектов адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии [102].

2.2.2 Участие кардиальных опиоидных рецепторов в восстановлении сократительной активности изолированного сердца после ишемии-реперфузии у крыс, адаптированных к хронической непрерывной нормобарической гипоксии

В главе 2.1.2 была показана способность адаптации к ХННГ улучшать состояние сократительной функции миокарда у крыс после моделирования глобальной ишемии и реперфузии изолированного сердца. Об участии кардиальных опиоидных рецепторов в реализации защитного эффекта адаптации к гипоксии судили после неселективной и селективной блокады ОР перед моделированием ишемии-реперфузии изолированного сердца у крыс.

Исследование реперфузионного восстановления частоты сердечных сокращений (ЧСС, уд/мин) показало более высокие значения у адаптированных к гипоксии крыс по сравнению с неадаптированными особями (таблицы 4, 10). Перфузия изолированных сердец неадаптированных крыс неселективными и селективными антагонистами ОР не влияла на показатель ЧСС, т.е. использованные в экспериментах блокаторы ОР в данных

концентрациях не обладают самостоятельным хронотропным эффектом (таблица 10). Блокада всех типов кардиальных ОР налоксоном устраняла защитный эффект адаптации к ХННГ – ЧСС у таких крыс на 15-ой минуте реперфузии была в 1,8 раз меньше ($p < 0,05$), а на 30-ой минуте – в 2,75 раз меньше ($p < 0,05$) по сравнению с адаптированным контролем (таблица 10).

Таблица 10 – Реперфузионные значения частоты сердечных сокращений (уд/мин) изолированного сердца у крыс ($M \pm SEM$)

Период регистрации параметров	Неадаптированные	Адаптированные
Исходные значения		
	201,3 ± 9,9	192,6 ± 12,9
Ишемия-реперфузия		
5 мин реперфузии	41,4 ± 7,4	43,6 ± 3,4
15 мин реперфузии	49,1 ± 8,2	83,6 ± 7,7* ($p=0,0026$)
30 мин реперфузии	75,9 ± 12,2	135,5 ± 10,8* ($p=0,0007$)
Налоксон + ишемия-реперфузия		
5 мин реперфузии	32,1 ± 5,1	35,9 ± 5,8
15 мин реперфузии	37,8 ± 9,4	45,5 ± 7,9# ($p=0,00074$)
30 мин реперфузии	84,3 ± 11,9	49,3 ± 7,1# ($p=0,000022$)
ГИРР (ψ) + ишемия-реперфузия		
5 мин реперфузии	43,1 ± 9,4	25,7 ± 8,6
15 мин реперфузии	48,1 ± 4,0	46,8 ± 10,1# ($p=0,029$)
30 мин реперфузии	76,5 ± 18,5	79,7 ± 10,4# ($p=0,01$)
ВНТХ + ишемия-реперфузия		
5 мин реперфузии	33,3 ± 3,7	76,0 ± 13,5
15 мин реперфузии	58,2 ± 2,8	124,0 ± 17,4* ($p=0,027$)
30 мин реперфузии	93,8 ± 10,1	144,0 ± 12,8* ($p=0,0086$)
Налтрибен + ишемия-реперфузия		
5 мин реперфузии	39,5 ± 5,5	32,4 ± 2,9# ($p=0,047$)
15 мин реперфузии	50,9 ± 5,6	39,9 ± 9,7# ($p=0,007$)
30 мин реперфузии	85,0 ± 9,5	70,6 ± 8,7# ($p=0,0005$)
СТАР + ишемия-реперфузия		
5 мин реперфузии	28,1 ± 7,9	30,7 ± 4,6# ($p=0,048$)
15 мин реперфузии	38,7 ± 5,3	39,2 ± 6,5# ($p=0,001$)
30 мин реперфузии	54,1 ± 11,0	74,0 ± 13,3# ($p=0,0023$)
Норбиналторфимин + ишемия-реперфузия		
5 мин реперфузии	28,3 ± 2,9	34,7 ± 4,0
15 мин реперфузии	60,0 ± 6,2	74,5 ± 8,0
30 мин реперфузии	95,7 ± 6,7	132,1 ± 12,2* ($p=0,0052$)

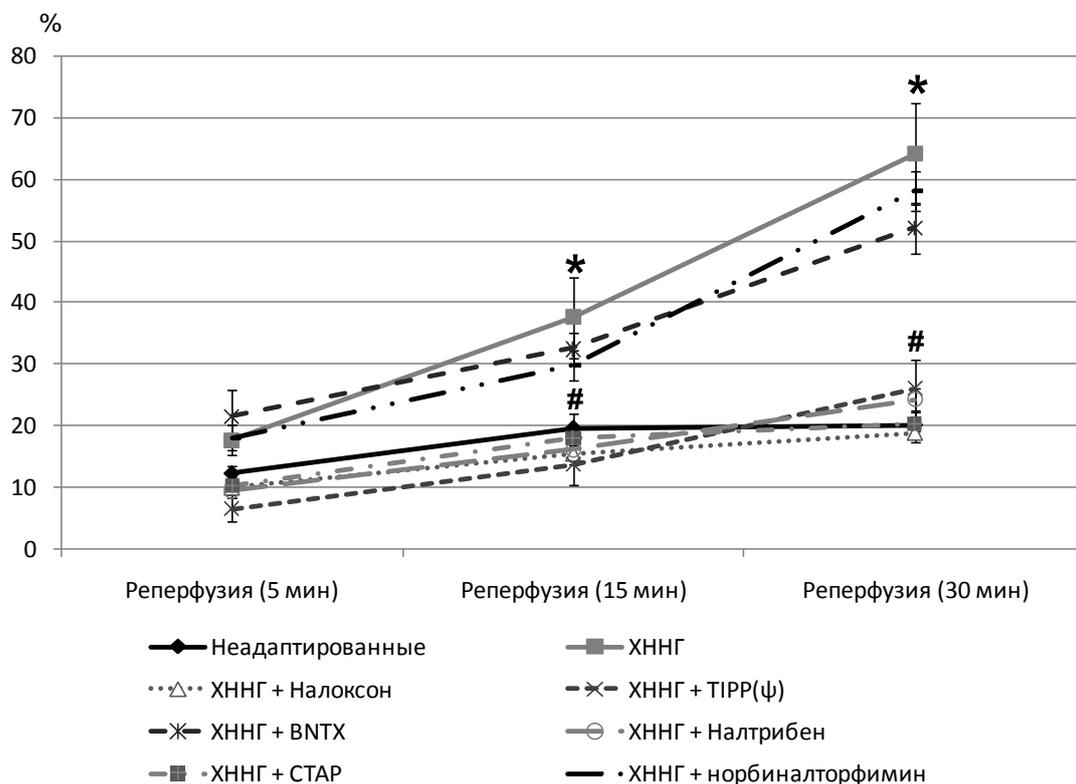
Примечание – * Статистические значимые различия по сравнению с группой «Неадаптированные + ишемия-реперфузия»; # - статистически значимые различия по сравнению с группой «Адаптированные + ишемия-реперфузия». Количество особей в каждой группе составило 12.

Положительный хронотропный эффект адаптации к хронической гипоксии устранялся после реперфузии изолированного сердца селективным δ -ОР-антагонистом

ТІРР(ψ), а также δ_2 -ОР-антагонистом налтрибеном – значения ЧСС в этих группах исследования на 15 и 30 минутах реперфузии не отличались от таковых у неадаптированных крыс с ишемией-реперфузией сердца (таблица 10). Аналогичная ситуация наблюдалась и при блокаде μ -субтипа кардиальных ОР пептидом СТАР – ЧСС уже на 5 минуте реперфузии изолированного сердца адаптированных крыс была в 1,4 раза ниже ($p=0,048$) по сравнению с адаптированным контролем; на 15 минуте реперфузии различие в ЧСС достигало 2,1 раза ($p=0,001$), а к концу данного периода составило 1,8 раз ($p=0,0023$) по сравнению с группой адаптированных к гипоксии крыс (таблица 10).

Перфузия изолированных сердец адаптированных крыс перед моделированием глобальной ишемии блокатором δ_1 -ОР ВNTX или κ -ОР норбиналторфимином не влияла на восстановление ЧСС – значения данного показателя на всем протяжении реперфузии не отличались от таковых в группе адаптированного контроля (таблица 10). На основании полученных данных можно сделать вывод об участии кардиальных δ_2 - и μ -субтипов ОР в реализации положительного хронотропного эффекта адаптации к ХННГ в ответ на ишемию-реперфузию изолированного сердца у крыс.

Как было показано в главе 2.1.2, давление, развиваемое левым желудочком (ДРЛЖ), у адаптированных к гипоксии крыс в период постишемической реперфузии восстанавливалось в большей степени, чем у неадаптированных особей (рисунок 2, 7). Перфузия изолированных сердец неадаптированных особей неселективными и селективными антагонистами кардиальных ОР не оказывала влияния на реперфузионные значения ДРЛЖ, т.е. используемые блокаторы не проявляли инотропных свойств (данные не представлены).



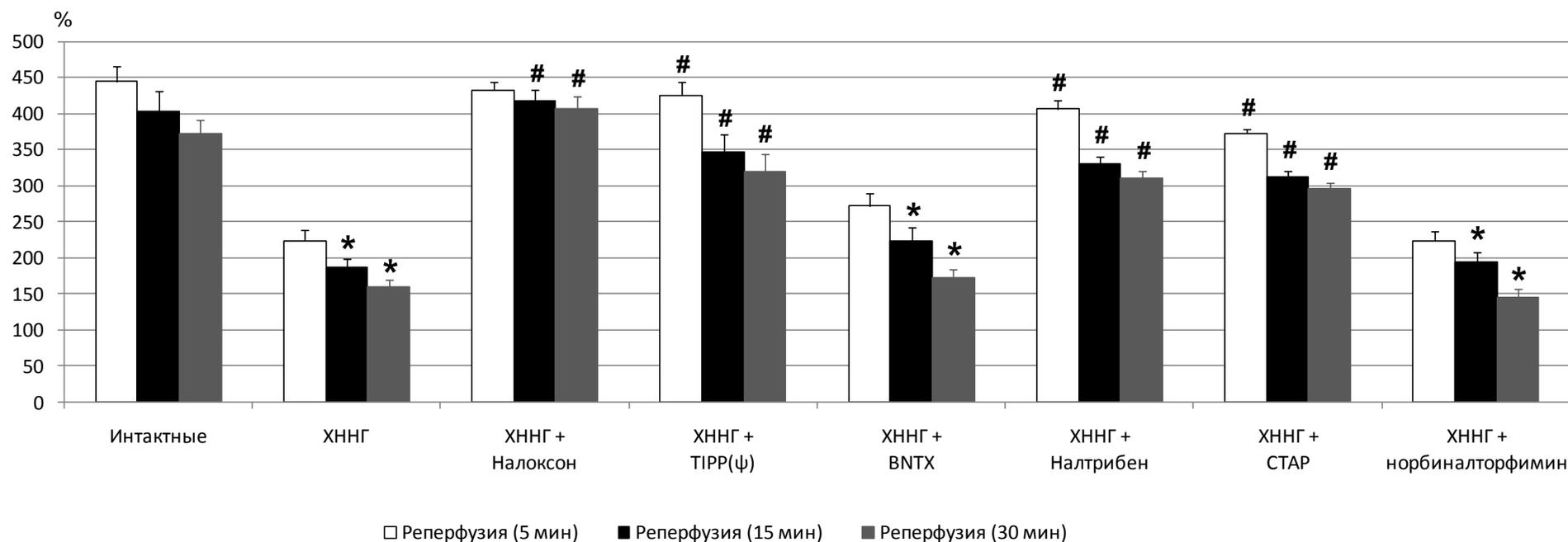
ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия. Налоксон (300 нМ/л) – неселективный антагонист ОР. TIPP(ψ) (30 нМ/л) – селективный антагонист δ-ОР. BNTX (1 нМ/л) – селективный антагонист δ₁-ОР. Налтрибен (1 нМ/л) – селективный антагонист δ₂-ОР. СТАР (100 нМ/л) – селективный антагонист μ-ОР. Норбинаторфимин (3 нМ/л) – селективный антагонист κ-ОР. * - статистически значимые различия по сравнению с группой «Неадаптированные» (p < 0,01); # - статистически значимые различия по сравнению с группой «ХННГ» (p < 0,01). Количество особей в каждой группе составило 12.

Рисунок. 7 – Давление, развиваемое левым желудочком изолированного сердца крысы в период восстановления перфузии (5, 15 и 30 минута реперфузии; % от исходного значения)

Блокада всех типов ОР налоксоном устраняла защитный эффект хронической гипоксии – ДРЛЖ адаптированных особей оставалось низким на всем протяжении реперфузии и не отличалось от аналогичного параметра у неадаптированного контроля (рисунок 7). Перфузия изолированного сердца адаптированных к ХННГ крыс пептидом TIPP(ψ), налтрибеном или СТАР также способствовала снижению процента постишемического восстановления ДРЛЖ по сравнению с адаптированным контролем (рисунок 7). В то же время, в условиях селективной блокады кардиальных δ₁- или κ-ОР, соответственно, BNTX или норбинаторфимином, восстановление ДРЛЖ на 5, 15 и 30 минутах реперфузии не отличалось от такового по сравнению с адаптированным контролем и было достоверно выше, чем у неадаптированных к гипоксии крыс (рисунок 7). Таким образом, кардиальные δ₂- и μ-субтипы ОР принимают участие в реализации

защитного эффекта адаптации к ХННГ, проявляющегося улучшением реперфузионного восстановления силы сокращений изолированного сердца у крыс.

Наряду с улучшенным восстановлением частоты и силы сердечных сокращений, адаптация к ХННГ уменьшает и степень постишемической контрактуры миокарда (глава 2.1.2), т.е. в период реперфузии изолированного сердца у адаптированных к гипоксии крыс снижается значение конечного диастолического давления (КДД; рисунок 3, 8). Защитный эффект хронической гипоксии устранялся после неселективной блокады кардиальных ОР налоксоном – КДД на 15 и 30 минутах реперфузии значительно превосходило аналогичные показатели у адаптированных к ХННГ особей (рисунок 8). Перфузия изолированного сердца адаптированных крыс антагонистом δ -ОР ТИРР(ψ) либо селективным антагонистом δ_2 -ОР налтрибеном также способствовала увеличению КДД, измеренного на 5, 15 и 30 минутах реперфузии миокарда (рисунок 8). Аналогичный эффект наблюдался и в условиях блокады кардиальных μ -ОР пептидом СТАР – значения КДД в период реперфузии изолированного сердца значительно превосходили аналогичные показатели у адаптированных к гипоксии особей (рисунок 8).



Интактные – неадаптированные крысы с моделированием ишемии-реперфузии изолированного сердца; ХННГ – крысы, адаптированные к хронической непрерывной нормобарической гипоксии, с моделированием ишемии-реперфузии изолированного сердца. Налоксон (300 нМ/л) – неселективный антагонист ОР. TIPP(ψ) (30 нМ/л) – селективный антагонист δ-ОР. BNTX (1 нМ/л) – селективный антагонист δ₁-ОР. Налтрибен (1 нМ/л) – селективный антагонист δ₂-ОР. СТАР (100 нМ/л) – селективный антагонист μ-ОР. Норбинаторфимин (3 нМ/л) – селективный антагонист κ-ОР. * - статистически значимые различия по сравнению с группой «Интактные» (p < 0,01); # - статистически значимые различия по сравнению с группой «ХННГ» (p < 0,01). Количество особей в каждой группе составило 12.

Рисунок 8 – Конечное диастолическое давление (% от исходного значения) на 5, 15 и 30 минуте реперфузии изолированного сердца у крыс

Селективная блокада δ_1 -ОР антагонистом BNTX и κ -ОР норбинаторфимином не влияла на КДД на всем протяжении постишемической реперфузии изолированного сердца у адаптированных к хронической гипоксии крыс – значения данного параметра не отличались от таковых в группе адаптированного контроля (рисунок 8). На основании полученных данных можно заключить, что кардиальные δ_2 - и μ -опиоидные рецепторы принимают участие в реализации защитного эффекта адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии, направленного на уменьшение степени постишемической контрактуры изолированного сердца у крыс.

В главе 2.1.2 было показано, что адаптация к хронической гипоксии улучшает восстановление максимальной скорости сокращения (МСС) и максимальной скорости расслабления (МСП) миокарда после моделирования глобальной ишемии и реперфузии изолированного сердца у крыс (таблица 5, 11). Используемые в исследовании антагонисты ОР налоксон (300 нМ/л), TIPP (ψ) (30 нМ/л), налтрибен (1 нМ/л), BNTX (1 нМ/л), СТАР (100 нМ/л) и норбинаторфимин (3 нМ/л) в указанных концентрациях не влияли на показатели МСС и МСП у интактных особей (данные не представлены).

Перфузия изолированных сердец адаптированных к гипоксии крыс налоксоном, TIPP(ψ), налтрибеном или СТАР за 10 минут до моделирования 45-минутной глобальной ишемии устраняла защитный эффект адаптации – значения МСС и МСП в период реперфузии миокарда значительно снижались по сравнению с таковыми в группе адаптированного контроля (таблица 11). Блокада δ_1 -ОР BNTX или κ -ОР норбинаторфимином не влияла на показатели МСС и МСП изолированного сердца у адаптированных животных – реперфузионные значения данных параметров превосходили аналогичные у неадаптированных особей и не отличались от адаптированного контроля (таблица 11). Таким образом, защитный эффект адаптации к ХННГ, проявляющийся улучшенным восстановлением МСС и МСП в период реперфузии изолированного сердца у крыс, реализуется через активацию кардиальных δ_2 и μ -опиоидных рецепторов.

Таблица 11 – Максимальная скорость сокращения (МСС) и максимальная скорость расслабления (МСП) после моделирования ишемии-реперфузии изолированного сердца у крыс в условиях блокады кардиальных опиоидных рецепторов (M \pm SEM)

Период регистрации параметров	МСС (мм рт. ст./с)	МСП (мм рт. ст./с)
Неадаптированные + ишемия-реперфузия		
5 мин реперфузии	176,3 \pm 39,2	123,1 \pm 9,9
15 мин реперфузии	224,8 \pm 36,1	150,1 \pm 15,0
30 мин реперфузии	267,5 \pm 56,6	223,3 \pm 20,4
ХННГ + ишемия-реперфузия		
5 мин реперфузии	311,0 \pm 39,4	233,6 \pm 13,7* (p=0,001)

Продолжение таблицы 11		
15 мин реперфузии	397,0 ± 59,2* (p=0,02)	306,5 ± 27,4* (p=0,0001)
30 мин реперфузии	731,2 ± 95,4* (p=0,00015)	595,0 ± 42,3* (p=0,00002)
Налоксон + ХННГ + ишемия-реперфузия		
5 мин реперфузии	127,4 ± 25,0 # (p = 0,047)	100,2 ± 10,3 # (p = 0,0003)
15 мин реперфузии	212,8 ± 45,1 # (p = 0,03)	184,8 ± 17,7 # (p = 0,001)
30 мин реперфузии	345,8 ± 60,7 # (p = 0,0053)	227,5 ± 16,2 # (p = 0,0001)
ГРР (ψ) + ХННГ + ишемия-реперфузия		
5 мин реперфузии	167,7 ± 36,2	135,0 ± 17,3 # (p = 0,014)
15 мин реперфузии	182,1 ± 36,0 # (p = 0,0024)	148,6 ± 19,1 # (p = 0,0006)
30 мин реперфузии	352,1 ± 99,6 # (p = 0,011)	254,9 ± 39,8 # (p = 0,00017)
BNTX + ХННГ + ишемия-реперфузия		
5 мин реперфузии	348,3 ± 53,3	215,3 ± 21,0 * (p = 0,021)
15 мин реперфузии	406,5 ± 64,2 *(p = 0,019)	312,0 ± 33,5 * (p = 0,0003)
30 мин реперфузии	607,6 ± 43,2 *(p = 0,0009)	504,1 ± 31,0 * (p = 0,00017)
Налтрибен + ХННГ + ишемия-реперфузия		
5 мин реперфузии	134,7 ± 14,0 # (p = 0,037)	112,8 ± 11,0 # (p = 0,0002)
15 мин реперфузии	211,8 ± 19,9 # (p = 0,001)	163,7 ± 9,9 # (p = 0,0007)
30 мин реперфузии	302,4 ± 25,8 # (p = 0,0001)	214,3 ± 18,1 # (p = 0,0002)
СТАР + ХННГ + ишемия-реперфузия		
5 мин реперфузии	132,5 ± 13,6 # (p = 0,017)	116,2 ± 13,3 # (p = 0,0003)
15 мин реперфузии	204,6 ± 51,2 # (p = 0,001)	148,0 ± 10,9 # (p = 0,0004)
30 мин реперфузии	286,8 ± 42,3 # (p = 0,0002)	213,1 ± 28,4 # (p = 0,00035)
Норбиналторфимин + ХННГ + ишемия-реперфузия		
5 мин реперфузии	292,0 ± 32,0	211,5 ± 22,2 * (p = 0,011)
15 мин реперфузии	379,1 ± 62,7 * (p = 0,003)	273,2 ± 35,9 * (p = 0,0007)
30 мин реперфузии	714,0 ± 65,6 * (p = 0,0003)	518,1 ± 51,1 * (p = 0,00017)

Примечание - *Статистически значимые различия по сравнению с группой «Неадаптированные + ишемия-реперфузия»; # - статистически значимые различия по сравнению с группой «ХННГ + ишемия-реперфузия».

Резюмируя описанные в данном разделе результаты, можно заключить, что способность адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии улучшать реперфузионное восстановление сократительной функции изолированного сердца у крыс реализуется через активацию кардиальных δ_2 и μ -субтипов опиоидных рецепторов.

2.2.3 Участие кардиальных опиоидных рецепторов в повышении устойчивости митохондрий к ишемии-реперфузии при адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии

Изучение рецепторной специфичности реализации защитного эффекта адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии, направленного на изменение функционального состояния митохондрий миокарда, проводилось в условиях неселективной и селективной блокады кардиальных опиоидных рецепторов.

В главе 2.1.3 было показано, что адаптация к ХННГ предупреждает ишемическое-реперфузионное нарушение функции дыхания митохондрий миокарда, что проявлялось

достоверным увеличением скорости АДФ-стимулированного дыхания (V_3), максимальной скорости дыхания (V_{max}), а также коэффициента АДФ/О, характеризующего эффективность митохондриального дыхания. Эти адаптационные изменения митохондрий наблюдались лишь в случае НАД-зависимого пути окисления субстратов (таблицы 6, 12, рисунок 4). Применение неселективных, а также селективных антагонистов ОР не влияло на параметры дыхания митохондрий у неадаптированных крыс после ишемии-реперфузии изолированного сердца (таблица 12).

Таблица 12 – Параметры НАД-зависимого дыхания митохондрий в условиях неселективной и селективной блокады опиоидных рецепторов ($M \pm SEM$)

Параметр дыхания митохондрий	Неадаптированные	Адаптированные
Интактные		
V_3 , нМ [O ₂]/мг/мин	173 ± 14	194 ± 16
V_{max} , нМ [O ₂]/мг/мин	269 ± 23	298 ± 25
АДФ/О, нМ АДФ/нМ атом[О]	2,31 ± 0,1	2,32 ± 0,1
Ишемия-реперфузия		
V_3 , нМ [O ₂]/мг/мин	118 ± 10 ⁺ (p = 0,01)	173 ± 12 * (p = 0,016)
V_{max} , нМ [O ₂]/мг/мин	147 ± 35 ⁺ (p = 0,006)	236 ± 22 * (p = 0,01)
АДФ/О, нМ АДФ/нМ атом[О]	1,5 ± 0,15 ⁺ (p = 0,0005)	2,17 ± 0,11 * (p = 0,003)
Налоксон + ишемия-реперфузия		
V_3 , нМ [O ₂]/мг /мин	93 ± 8	101 ± 4 # (p = 0,0004)
V_{max} , нМ [O ₂]/мг /мин	141 ± 18	133 ± 11 # (p = 0,0003)
АДФ/О, нМ АДФ/нМ атом[О]	1,61 ± 0,11	1,77 ± 0,12 # (p = 0,003)
ТИРР(ψ) + ишемия-реперфузия		
V_3 , нМ [O ₂]/мг/мин	109 ± 16	108 ± 8 # (p = 0,0013)
V_{max} , нМ [O ₂]/мг /мин	133 ± 12	142 ± 13 # (p = 0,009)
АДФ/О, нМ АДФ/нМ атом[О]	1,45 ± 0,09	1,63 ± 0,08 # (p = 0,0013)
ВНТХ + ишемия-реперфузия		
V_3 , нМ [O ₂]/мг/мин	109 ± 15	169 ± 11 * (p = 0,02)
V_{max} , нМ [O ₂]/мг/мин	135 ± 16	242 ± 24 * (p = 0,01)
АДФ/О, нМ АДФ/нМ атом[О]	1,53 ± 0,09	2,0 ± 0,13 * (p = 0,032)
Налтрибен + ишемия-реперфузия		
V_3 , нМ [O ₂]/мг/мин	104 ± 11	106 ± 6 # (p = 0,0018)

Продолжение таблицы 12		
V_{\max} , нМ [O ₂]/мг/мин	151 ± 12	151 ± 14 # (p = 0,007)
АДФ/О, нМ АДФ/нМ _{атом} [О]	1,62 ± 0,1	1,67 ± 0,08 # (p = 0,004)
СТАР + ишемия-реперфузия		
V_3 , нМ [O ₂]/мг/мин	106 ± 2	118 ± 5 # (p = 0,002)
V_{\max} , нМ [O ₂]/мг/мин	138 ± 16	128 ± 17 # (p = 0,0005)
АДФ/О, нМ АДФ/нМ _{атом} [О]	1,58 ± 0,15	1,69 ± 0,07 # (p = 0,002)
Норбиналторфимин + ишемия-реперфузия		
V_3 , нМ [O ₂]/мг/мин	116 ± 6	178 ± 11 * (p = 0,0015)
V_{\max} , нМ [O ₂]/мг/мин	134 ± 14	215 ± 23 * (p = 0,02)
АДФ/О, нМ АДФ/нМ _{атом} [О]	1,58 ± 0,15	1,98 ± 0,06 * (p = 0,03)

Примечание – V_3 – скорость дыхания митохондрий в состоянии 3; V_{\max} – максимальная скорость дыхания митохондрий; АДФ/О – «эффективность дыхания»; + - статистически значимые отличия по сравнению с группой «Интактные»; * - статистически значимые отличия по сравнению с группой «Неадаптированные + ишемия-реперфузия»; # - статистически значимые различия по сравнению с группой «Адаптированные + ишемия-реперфузия». Количество особей в каждой группе – 12.

Блокада всех типов кардиальных ОР налоксоном у адаптированных к гипоксии крыс вызвала снижение значений параметров дыхания митохондрий после ишемии-реперфузии сердца: скорость АДФ-стимулированного дыхания (V_3) была ниже в 1,7 раз, максимальная скорость дыхания (V_{\max}) снижалась в 1,8 раз, а коэффициент АДФ/О был в 1,23 раза меньше по сравнению с аналогичными показателями у особей из группы адаптированного контроля (таблица 12). Схожая ситуация наблюдалась и при селективной блокаде кардиальных δ -ОР TIPP(ψ): V_3 и V_{\max} были меньше, чем в контроле в 1,6 и 1,7 раз соответственно, а АДФ/О – в 1,33 раза ниже, чем у адаптированных крыс с ишемией-реперфузией изолированного сердца (таблица 12).

Перфузия изолированных сердец адаптированных крыс селективными антагонистами δ_2 -ОР налтрибеном или μ -ОР СТАР также устраняла защитный эффект ХННГ – исследуемые параметры митохондриального дыхания были значительно ниже по сравнению с таковыми в группе адаптированного контроля после ишемии-реперфузии (таблица 12). Однако блокада кардиальных δ_1 -ОР BNTX или κ -ОР норбиналторфимином перед моделированием ишемии-реперфузии сердца у адаптированных крыс не устраняла

защитный эффект ХННГ – параметры дыхания изолированных митохондрий не отличались от таковых у адаптированных к гипоксии крыс (таблица 12).

Таким образом, в реализации кардиопротекторного эффекта адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии, направленного на предупреждение ишемических-реперфузионных нарушений функции дыхания изолированных митохондрий миокарда, принимают участие δ_2 и μ -субтипы кардиальных опиоидных рецепторов.

Ранее (см. главу 2.1.3) нами обсуждалось, что одним из проявлений кардиопротекторного эффекта адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии является предупреждение падения трансмембранного потенциала (ТМП) митохондрий после моделирования ишемии-реперфузии изолированного сердца у крыс (таблицы 7, 13). Перфузия изолированных сердец неадаптированных крыс неселективными и селективными антагонистами опиоидных рецепторов не влияла на реперфузионные значения трансмембранного потенциала митохондрий (таблица 13).

Таблица 13 – Трансмембранный потенциал митохондрий (Ед/мг белка) при неселективной и селективной блокаде кардиальных опиоидных рецепторов (M \pm SEM)

Группа	Неадаптированные (n = 12)	Адаптированные (n = 12)
Интактные	24,9 \pm 3,2	27,9 \pm 1,9
Ишемия-реперфузия	10,7 \pm 0,5 ⁺ (p = 0,00013)	23,0 \pm 2,8 * (p = 0,0016)
Налоксон + ишемия-реперфузия	10,5 \pm 0,7	12,3 \pm 1,0 # (p = 0,003)
ГИРР(ψ) + ишемия-реперфузия	10,3 \pm 1,2	11,0 \pm 1,0 # (p = 0,0013)
BNTX + ишемия-реперфузия	11,6 \pm 1,5	20,7 \pm 1,6 * (p = 0,005)
Налтрибен + ишемия-реперфузия	11,2 \pm 0,9	11,0 \pm 0,9 # (p = 0,002)
СТАР + ишемия-реперфузия	8,5 \pm 0,6	9,6 \pm 0,6 # (p = 0,0001)
Норбиналторфимин + ишемия-реперфузия	12,5 \pm 1,0	20,7 \pm 1,1 * (p = 0,0003)

Примечание - статистически значимые различия по сравнению с группой «Интактные»; * - статистически значимые различия по сравнению с группой «Неадаптированные + ишемия-реперфузия»; # - статистически значимые отличия по сравнению с группой «Адаптированные + ишемия-реперфузия». Количество особей в каждой группе составило 12.

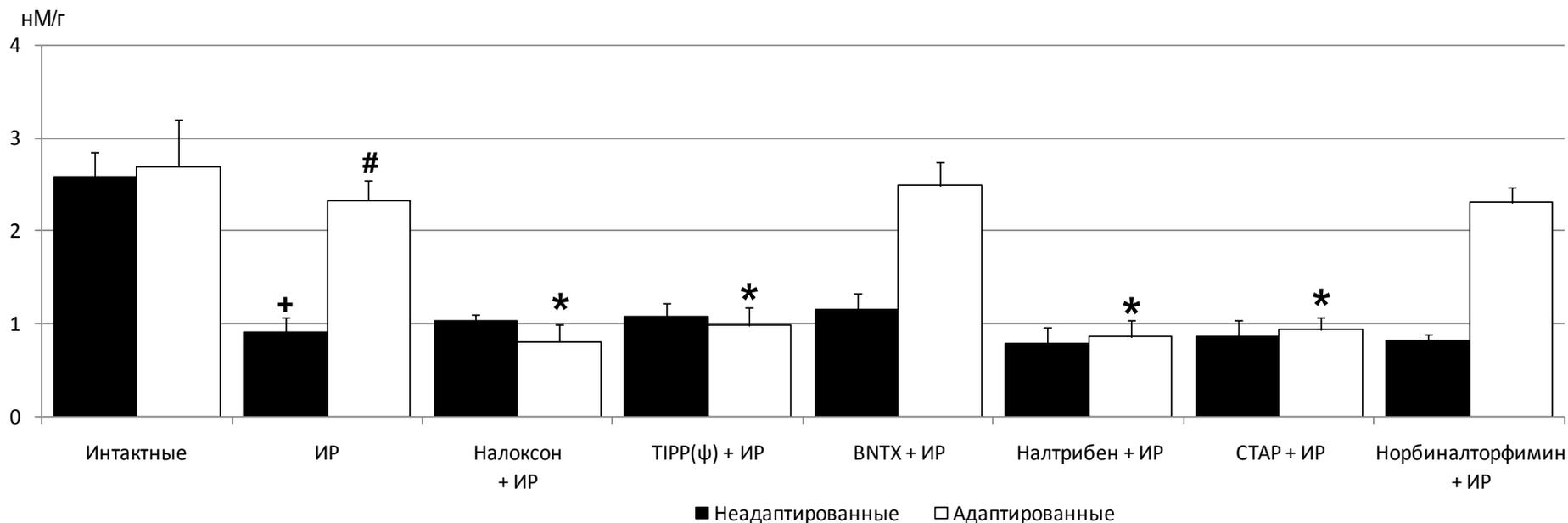
Изучение рецепторной специфичности защитного феномена адаптации показало, что неселективная блокада кардиальных опиоидных рецепторов налоксоном приводит к реперфузионному падению трансмембранного потенциала митохондрий, изолированных

из миокарда адаптированных крыс – значение ТМП в данной группе было на 46% ниже, чем в контроле (таблица 13).

Применение у адаптированных к гипоксии крыс селективных антагонистов δ -ОР TIPP(ψ) или δ_2 -ОР налтрибена приводило к падению постишемического значения ТМП на 52%, а блокада μ -ОР СТАР – на 58% по сравнению с контролем (таблица 13). В случае блокады кардиальных δ_1 -ОР BNTX или κ -ОР норбинаторфимином постишемические значения трансмембранного потенциала митохондрий не отличались от таковых в группе адаптированного контроля (таблица 13).

Суммируя данные о рецепторной специфичности адаптационной устойчивости дыхания и трансмембранного потенциала митохондрий к ишемии-реперфузии миокарда, можно заключить, что кардиальные δ_2 и μ -ОР принимают участие в реализации защитного эффекта ХННГ, направленного на предупреждение нарушений энергетической функции данных органелл. Подтверждением этому служат результаты исследования содержания АТФ в миокарде у крыс, изолированные сердца которых перфузировали антагонистами опиоидных рецепторов перед моделированием глобальной ишемии и реперфузии (рисунок 9).

Ранее в главе 2.1.3 было продемонстрировано, что содержание АТФ в миокарде левого желудочка после ишемии-реперфузии изолированного сердца у адаптированных к хронической гипоксии крыс в 2,5 раза выше, чем у неадаптированных особей (рисунок 5). Перфузия изолированных сердец неадаптированных крыс антагонистами опиоидных рецепторов не оказывала влияния на реперфузионную концентрацию АТФ в миокарде левого желудочка – значения данного показателя были неотличимы от таковых в группе неадаптированных крыс с ишемией-реперфузией изолированного сердца (рисунок 9). Неселективная блокада всех типов кардиальных ОР налоксоном приводила к снижению содержания АТФ в миокарде у адаптированных к ХННГ животных – этот показатель был в 2,8 раз ниже по сравнению с адаптированным контролем (рисунок 9).



Интактные – крысы без моделирования ишемии-реперфузии изолированного сердца; ИР - крысы с моделированием глобальной ишемии и реперфузии изолированного сердца. Налоксон (300 нМ/л) – неселективный антагонист ОР. ТИРР(ψ) (30 нМ/л) – селективный антагонист δ-ОР. ВНТХ (1 нМ/л) – селективный антагонист δ₁-ОР. Налтрибен (1 нМ/л) – селективный антагонист δ₂-ОР. СТАР (100 нМ/л) – селективный антагонист μ-ОР. Норбинаторфимин (3 нМ/л) – селективный антагонист κ-ОР. + - статистически значимые различия по сравнению с группой «Интактные» (p < 0,01); # - статистически значимые различия по сравнению с группой «Неадаптированные + ИР» (p < 0,01); * - статистически значимые различия по сравнению с группой «Адаптированные + ИР» (p < 0,01). Количество особей в каждой группе составило 12.

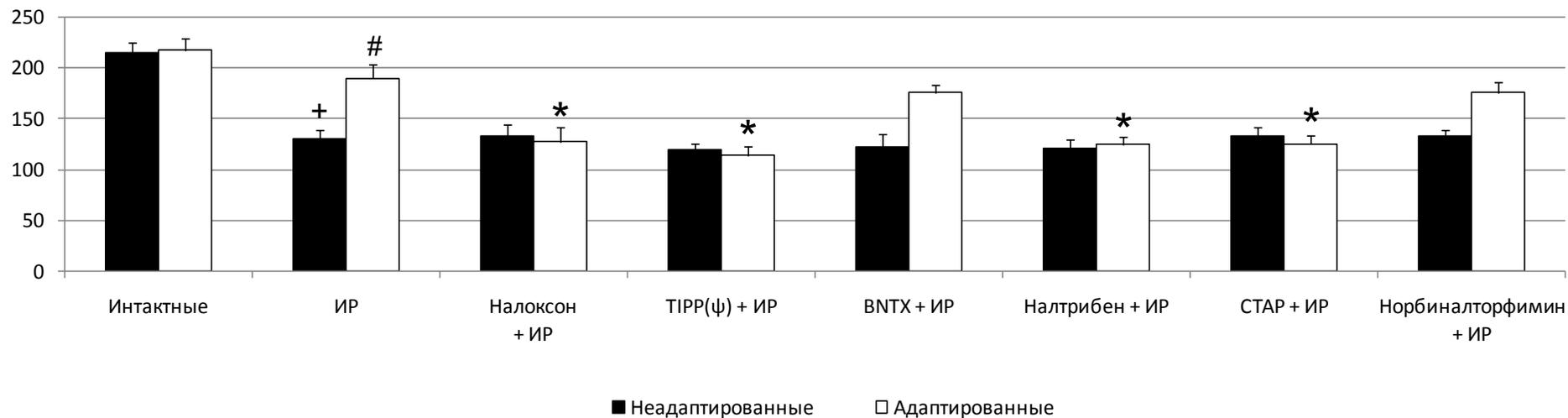
Рисунок 9 – Содержание АТФ в миокарде левого желудочка изолированного сердца крысы (нМ/г ткани)

Аналогичное падение концентрации АТФ в миокарде левого желудочка адаптированных крыс наблюдалось и при перфузии сердца селективными антагонистами δ -ОР ТИРР(ψ), δ_2 -ОР – налтрибеном или μ -ОР – СТАР в 2,35 раз, 2,7 раз и 2,5 раза соответственно по сравнению с группой контроля (рисунок 9). Селективная блокада кардиальных δ_1 -ОР ВNTX или κ -ОР норбиналторфимином не влияла на постишемическое содержание АТФ в миокарде у адаптированных к хронической гипоксии крыс – значения данного показателя были неотличимы от таковых в группе сравнения (рисунок 9).

Таким образом, совокупность данных о рецепторной природе адаптационных изменений в митохондриях, направленных на предупреждение ишемических-реперфузионных нарушений энергетической функции этих органелл (функция дыхания, трансмембранный потенциал митохондрий, синтез АТФ), подтверждает участие δ_2 и μ -субтипов опиоидных рецепторов в реализации кардиопротекторного эффекта ХННГ.

О способности адаптации к ХННГ повышать устойчивость МРТ-пор митохондрий к нагрузке ионами кальция сообщалось в главе 2.1.3. Кальций-связывающая способность (КСС) митохондрий, выделенных из сердец адаптированных крыс после ишемии-реперфузии, была на 31% выше, чем у неадаптированных особей (рисунки 10). Перфузия изолированных сердец неадаптированных крыс неселективными или селективными антагонистами ОР не влияла на КСС митохондрий после ишемии-реперфузии – значения данного показателя не отличались от такового в группе неадаптированного контроля (рисунок 10). В случае перфузии изолированных сердец адаптированных крыс антагонистом ОР налоксоном, постишемическое значение КСС митохондрий снижалось на 33% по сравнению с адаптированным контролем (рисунок 10). Селективная блокада кардиальных δ -ОР с помощью пептида ТИРР(ψ), δ_2 -ОР налтрибеном или μ -ОР пептидом СТАР также приводила к падению устойчивости МРТ-пор к нагрузке ионами кальция у адаптированных особей – КСС митохондрий миокарда была ниже, чем в группе сравнения, на 40%, 34% и 34% соответственно (рисунок 10).

нМ CaCl₂/мг белка



Интактные – крысы без моделирования ишемии-реперфузии изолированного сердца; ИР - крысы с моделированием глобальной ишемии и реперфузии изолированного сердца. Налоксон (300 нМ/л) – неселективный антагонист ОР. ТПП(ψ) (30 нМ/л) – селективный антагонист δ-ОР. BNTX (1 нМ/л) – селективный антагонист δ₁-ОР. Налтрибен (1 нМ/л) – селективный антагонист δ₂-ОР. СТАР (100 нМ/л) – селективный антагонист μ-ОР. Норбинаторфимин (3 нМ/л) – селективный антагонист κ-ОР. + - статистически значимые различия по сравнению с группой «Интактные» (p < 0,01); # - статистически значимые различия по сравнению с группой «Неадаптированные + ИР» (p < 0,01); * - статистически значимые различия по сравнению с группой «Адаптированные + ИР» (p < 0,01). Количество особей в каждой группе составило 12.

Рисунок 10 – Кальций-связывающая способность митохондрий (нМ CaCl₂/мг белка)

Перфузия изолированных сердец адаптированных крыс δ_1 -антагонистом BNTX или антагонистом κ -ОР норбиналторфимином не устраняла защитный эффект ХННГ – КСС митохондрий оставалась такой же высокой, как и в группе адаптированного контроля (рисунок 10). В результате получается, что δ_2 и μ -субтипы кардиальных опиоидных рецепторов принимают участие в реализации защитного эффекта адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии, проявляющегося повышенной устойчивостью МРТ-пор митохондрий к нагрузке ионами кальция.

На основании представленных в данном разделе результатов можно заключить, что δ_2 и μ -субтипы кардиальных опиоидных рецепторов играют важную роль в повышении устойчивости функционального состояния митохондрий миокарда к ишемии и реперфузии изолированного сердца у крыс в условиях адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии.

Как и в разделе 2.1, по результатам исследования показателей реперфузионного восстановления сократительной активности изолированного сердца у крыс, а также функционального состояния митохондрий миокарда в условиях блокады кардиальных опиоидных рецепторов, был проведен корреляционный анализ данных параметров. Ранее было продемонстрировано, что между давлением, развиваемым левым желудочком (ДРЛЖ) изолированного сердца крысы, и скоростью АДФ-стимулированного дыхания митохондрий (V_3) имеется прямая корреляционная зависимость (таблица 8). Аналогичная взаимосвязь была показана для ДРЛЖ и кальций-связывающей способности (КСС) митохондрий миокарда (таблица 8).

В случае применения неселективных и селективных антагонистов опиоидных рецепторов было обнаружено, что ДРЛЖ также находится в прямой корреляционной зависимости от АДФ-стимулированного дыхания митохондрий (таблица 14). Причем эта взаимосвязь наблюдалась как в группах неадаптированных крыс, так и у особей, адаптированных к хронической непрерывной нормобарической гипоксии.

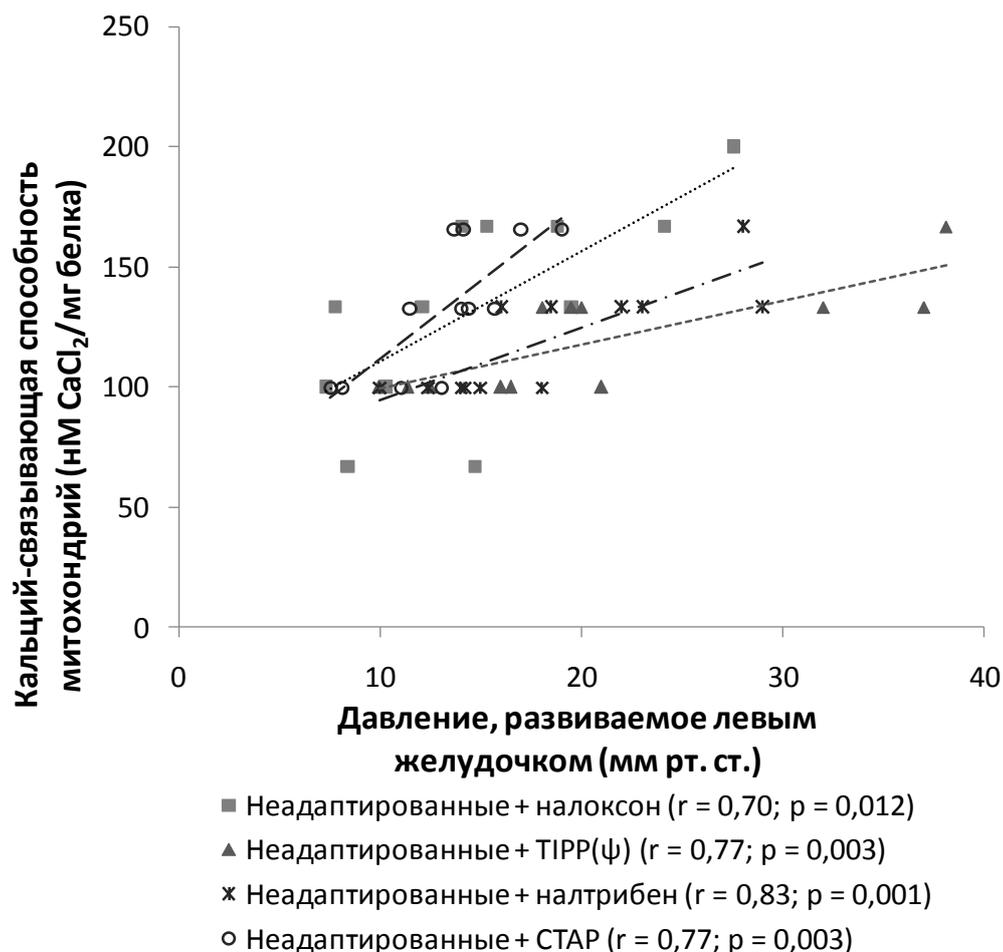
Таблица 14. Корреляционная зависимость силы сокращения изолированного сердца (ДРЛЖ) и скорости АДФ-стимулированного дыхания митохондрий (V_3) миокарда у крыс

Группа	Коэффициент корреляции (r)	Уровень значимости (p)
Неадаптированные+ ИР + налоксон	0,80	0,002
Адаптированные+ ИР +налоксон	0,68	0,014

Продолжение таблицы 14		
Неадаптированные + ИР + ТИРР (ψ)	0,64	0,026
Адаптированные + ИР + ТИРР (ψ)	0,64	0,025
Неадаптированные + ИР + налтрибен	0,85	0,001
Адаптированные + ИР + налтрибен	0,64	0,027
Неадаптированные + ИР + СТАР	0,64	0,024
Адаптированные + ИР + СТАР	0,77	0,004

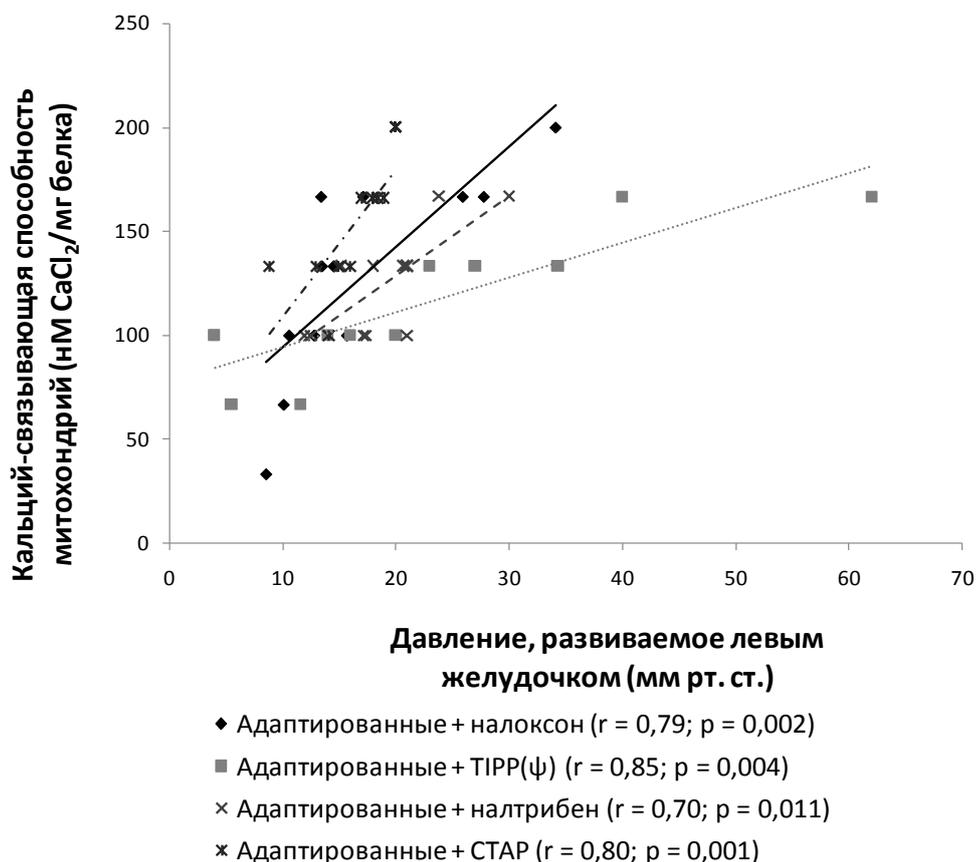
Примечание – ИР – ишемия-реперфузия; ДРЛЖ – давление, развиваемое левым желудочком. Налоксон – неселективный антагонист всех типов ОР; ТИРР(ψ) – селективный антагонист δ -ОР; налтрибен – селективный антагонист δ_2 -ОР; СТАР – селективный антагонист μ -ОР. Достоверным уровнем значимости принимался $p < 0,05$.

Анализ корреляционной зависимости кальций-связывающей способности митохондрий и реперфузионных значений ДРЛЖ также показал наличие прямой корреляции между изучаемыми параметрами в условиях неселективной и селективной блокады опиоидных рецепторов как у неадаптированных, так и у адаптированных к ХННГ животных (рисунки 11, 12).



R – коэффициент корреляции; p – уровень значимости. Налоксон – неселективный антагонист всех типов ОР; TIPP(ψ) – селективный антагонист δ -ОР; налтрибен – селективный антагонист δ_2 -ОР; СТАР – селективный антагонист μ -ОР. Достоверным принимался уровень значимости $p < 0,05$.

Рисунок 11 – Корреляционная зависимость кальций-связывающей способности митохондрий и силы сокращения изолированного сердца у неадаптированных крыс



R – коэффициент корреляции; p – уровень значимости. Налоксон – неселективный антагонист всех типов ОР; TIPP(ψ) – селективный антагонист δ -ОР; налтрибен – селективный антагонист δ_2 -ОР; СТАР – селективный антагонист μ -ОР. Достоверным принимался уровень значимости $p < 0,05$.

Рисунок 12 – Корреляционная зависимость кальций-связывающей способности митохондрий и силы сокращения изолированного сердца у адаптированных к ХННГ крыс

Таким образом, положительное инотропное влияние адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии зависит от состояния функции дыхания митохондрий и устойчивости МРТ-пор к перегрузке ионами кальция и в реализации данного эффекта ключевую роль играет активация кардиальных δ_2 и μ -опиоидных рецепторов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные результаты являются подтверждением того, что адаптация к хронической непрерывной нормобарической гипоксии обладает выраженным кардиопротекторным эффектом и повышает устойчивость сердца и митохондрий к ишемическому-реперфузионному повреждению. Несмотря на то, что показатели сократительной функции изолированных сердец у интактных и адаптированных крыс не отличались между собой, реперфузионное восстановление сократимости происходило быстрее у особей после курса ХННГ. Кроме того, у адаптированных к гипоксии крыс наблюдалось достоверное снижение реперфузионного некроза кардиомиоцитов, о чем судили по активности фермента креатинфосфокиназы в перфузионном растворе, оттекающем от изолированного сердца. Выявленный антинекротический эффект адаптации к ХННГ согласуется с полученными ранее данными о способности хронической нормобарической гипоксии ограничивать размер инфаркта в ответ на коронароокклюзию и реперфузию у крыс *in vivo* [4], а также уменьшать гибель кардиомиоцитов после моделирования аноксии и реоксигенации *invitro* [102]. О способности адаптации к хронической нормобарической гипоксии улучшать восстановление сократимости после моделирования 15-минутной глобальной ишемии изолированного сердца крысы впервые сообщалось в работе М. Tajima и соавт. [51]. Данный защитный эффект хронической нормобарической гипоксии был подтвержден и позднее на модели 30-минутной глобальной ишемии и 35-минутной реперфузии изолированного сердца кролика [103, 104].

Таким образом, адаптация к хронической непрерывной нормобарической гипоксии обладает выраженным антинекротическим эффектом и улучшает реперфузионное восстановление сократительной функции изолированного сердца у крыс.

Отдельного внимания заслуживает тот факт, что защитный эффект хронической гипоксии продолжительный и сохраняется, по разным данным, от 30 дней [104] до 35 дней [3] нахождения адаптированных особей в нормоксических условиях. В этом случае реализация кардиопротекторного эффекта адаптации к хронической гипоксии возможна за счет устойчивых структурных и метаболических изменений, происходящих, прежде всего, на внутриклеточном уровне.

Исследование внутриклеточных механизмов адаптации к гипоксии включало в себя оценку устойчивости функционального состояния кардиальных митохондрий к ишемии-реперфузии изолированного сердца у крыс. Исходные показатели дыхания митохондрий не различались в группах интактных и адаптированных к гипоксии животных. Сходные данные, демонстрирующие отсутствие изменений в параметрах митохондриального

дыхания, были получены на модели адаптации крыс к хронической прерывистой гипоксии [105]. На модели 7-дневной гипобарической гипоксии у крыс M.F. Essop и соавт. [106] продемонстрировали снижение параметров митохондриального дыхания. В то же время на модели гипоксии у новорожденных кроликов группа физиологов под руководством профессора G.J. Gross [103] показала улучшение дыхательной и АТФ-синтетической функции митохондрий миокарда. Аналогично на модели хронической гипобарической гипоксии у крыс в работе M. Zungu и соавт.[107] сообщается о возрастании исходных показателей митохондриального дыхания по сравнению с интактными особями. Однако в исследовании L.C. Heather и соавт. [108], выполненном на модели хронической нормобарической гипоксии (3 недели), было обнаружено снижение скорости дыхания митохондрий в состоянии 3 в присутствии как НАДН-зависимых субстратов (пируват, глутамат), так и ФАД-зависимого субстрата (сукцинат). Возможной причиной таких различий является выбор модели адаптации к хронической гипоксии, в том числе продолжительность гипоксического воздействия.

Моделирование глобальной ишемии и реперфузии изолированного сердца у крыс приводило к снижению скорости АДФ-стимулированного дыхания митохондрий. Однако после адаптации к ХННГ состояние дыхания митохондрий оказалось более устойчивым к ишемии-реперфузии, причем эти изменения наблюдались лишь в случае НАДН-зависимого окисления субстратов (малат и пируват). Предполагается, что в условиях хронического гипоксического воздействия этот защитный эффект реализуется за счет качественных изменений, происходящих с дыхательным комплексом I митохондрий – НАДН-дегидрогеназой, сродство которого к его субстрату (НАДН) возрастает [109, 110]. В меньшей степени такая модификация затрагивает комплекс II дыхательной цепи митохондрий (сукцинатдегидрогеназу). Это связано с тем, что сукцинатдегидрогеназный путь играет роль срочного компенсаторного механизма в условиях острого гипоксического воздействия, но не участвует в формировании долгосрочных механизмов адаптации [109, 110].

Наряду с угнетением митохондриального дыхания, моделирование ишемии-реперфузии изолированного сердца сопровождалось падением трансмембранного потенциала митохондрий. Вероятной причиной этого является замедление работы дыхательной цепи и повреждение внутренней мембраны митохондрий [98]. Однако у адаптированных к гипоксии крыс это снижение было менее выражено, чем в группе интактных особей. Высокие реперфузионные значения параметров митохондриального дыхания и трансмембранного потенциала у адаптированных крыс указывают на сохранность энергетической (АТФ-синтазной) функции митохондрий. Действительно,

исследование содержания АТФ в миокарде левого желудочка изолированного сердца крыс показало снижение данного показателя после моделирования ишемии-реперфузии. Однако у адаптированных к гипоксии крыс реперфузионный уровень АТФ в миокарде оставался выше, чем у неадаптированных особей. Сходные результаты были опубликованы Z.-H. Wang со авт. [99], выполнявших работу на модели хронической гипобарической гипоксии. Исследователи сообщают о двукратном снижении содержания АТФ в миокарде после 30-минутной глобальной ишемии и 45-минутной реперфузии изолированного сердца у крыс. В случае адаптированных к гипоксии животных – реперфузионное значение данного показателя было выше, чем в группе нормоксического контроля [99].

На основе полученных данных можно заключить, что адаптация к хронической непрерывной нормобарической гипоксии повышает устойчивость энергетической функции митохондрий миокарда к действию ишемии и реперфузии.

Кроме защиты дыхания митохондрий и трансмембранного потенциала, адаптация к ХННГ способствует сохранению кальций-связывающей способности митохондрий миокарда после моделирования ишемии-реперфузии изолированного сердца, что свидетельствует о повышенной устойчивости МРТ-пор к нагрузке органелл ионами кальция. Однако адаптация к гипоксии не изменяла кальций-связывающую способность митохондрий интактного миокарда. Это указывает на отсутствие прямого влияния адаптации к ХННГ на снижение чувствительности МРТ-пор к ионам кальция. Сходные данные были получены в исследовании защитного эффекта хронической гипобарической гипоксии в экспериментах на изолированном сердце у крыс [111]. Интересно, что наряду с увеличением устойчивости МРТ-пор митохондрий к нагрузке ионами кальция, авторы сообщают о повышении активности ферментов антиоксидантной защиты в левом желудочке сердца крыс [111]. Известно, что окислительный стресс, развивающийся во время ишемии-реперфузии, способствует открытию МРТ-пор и увеличивает гибель кардиомиоцитов [112]. В связи с этим представляется вполне вероятным, что повышенная инактивация активных форм кислорода ферментами антиоксидантной защиты уменьшает чувствительность МРТ-пор к кальцию и препятствует их преждевременному открытию у животных, адаптированных к хронической гипоксии.

Таким образом, у крыс, адаптированных к хронической непрерывной нормобарической гипоксии, повышается устойчивость МРТ-пор митохондрий к избытку ионов кальция после моделирования ишемии и реперфузии изолированного сердца.

На этапе исследования участия кардиальных опиоидных рецепторов в реализации кардиопротекторного эффекта адаптации к ХННГ было обнаружено, что перфузия

изолированных сердец неселективным антагонистом опиоидных рецепторов налоксоном перед моделированием 45-минутной ишемии устраняет антинекротический эффект, а также уменьшает реперфузионное восстановление сократимости миокарда у адаптированных крыс и снижает устойчивость функционального состояния митохондрий к ишемическому-реперфузионному повреждению. Аналогичный эффект наблюдался при блокаде кардиальных δ_2 -ОР налтрибеном или μ -ОР пептидом СТАР. В отличие от этого, перфузия изолированных сердец селективными антагонистами δ_1 -ОР BNTX или κ -ОР норбиналторфимином не влияла на проявление кардиопротекторного эффекта адаптации к ХННГ. Ранее в нашей лаборатории было показано, что у особей, адаптированных к хронической нормобарической гипоксии увеличивается содержание эндогенных опиоидных пептидов в сыворотке крови и миокарде [15]. Кроме того, инфаркт-лимитирующий эффект хронической нормобарической гипоксии *in vivo* устранялся после введения крысам перед моделированием коронароокклюзии и реперфузии антагониста всех типов ОР налоксона, либо при селективной блокаде δ_2 -ОР налтрибеном или μ -ОР СТАР [15]. Сходные данные были получены на изолированных кардиомиоцитах крыс [102]. Инкубация *in vitro* кардиомиоцитов адаптированных к ХННГ крыс с налоксоном, налтрибеном или пептидом СТАР уменьшала выживаемость клеток после моделирования аноксии/реоксигенации [102].

Таким образом, кардиальные δ_2 - и μ -опиоидные рецепторы играют ключевую роль в реализации антинекротического эффекта в условиях адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии.

Существует немало доказательств того, что активация опиоидных рецепторов эндогенными и экзогенными агонистами оказывает кардиопротекторный эффект в различных формах пре- и посткондиционирования миокарда [113, 114, 115]. В экспериментах с использованием агониста опиоидных рецепторов морфина был продемонстрирован его кардиопротекторный эффект [116, 117, 118]. В недавно опубликованной работе Н. Не и соавт. [116] сообщается, что перфузия изолированного сердца крысы раствором, содержащим морфин (1 мкМ), перед началом моделирования 30-минутной ишемии и 2-часовой реперфузии уменьшала размер инфаркта и снижала высвобождение тропонина I в перфузат, оттекающий от сердца, а также улучшала постишемическое восстановление сократимости. Кроме того, морфин уменьшал реперфузионное падение трансмембранного потенциала кардиальных митохондрий и снижал выработку активных форм кислорода [116]. Установлено, что кардиопротекторный эффект морфина может реализоваться за счет увеличения скорости

АДФ-стимулированного дыхания митохондрий и повышения устойчивости МРТ-пор митохондрий к перегрузке ионами кальция [119, 118].

В отношении защитного действия на сердце селективных агонистов опиоидных рецепторов данные экспериментов несколько расходятся. Например, селективные агонисты δ -ОР [120, 121], δ_2 -ОР [60], а также μ -ОР [122] уменьшают степень постишемического некроза кардиомиоцитов в экспериментах с моделированием глобальной ишемии и реперфузии изолированного перфузируемого сердца у крыс. Перфузия изолированного сердца крыс селективными агонистами δ -ОР DPDPE и TAN-67 оказывает на него негативное инотропное и хронотропное влияние [89]. Однако если агонисты опиоидных рецепторов вводили внутривенно до изоляции сердца, они улучшали его сократимость в реперфузионном периоде [123]. Возможно, что указанный инотропный эффект опиоидов связан с появлением в крови подопытных животных опиоид-индуцированного гуморального фактора, который повышает его устойчивость к негативному действию ишемии-реперфузии *invitro*.

В исследовании, проведенном на свиньях, с использованием селективного агониста δ_2 -опиоидных рецепторов дельторфина D (1 мг/кг) была показана его способность ограничивать размер инфаркта в ответ на моделирование 45-минутной коронароокклюзии и 180-минутной реперфузии [124]. Позднее эти данные были подтверждены в нашей лаборатории в экспериментах на крысах [125]. Селективная активация периферических δ_2 -ОР дельторфином II (0,12 мг/кг) уменьшала соотношение зона инфаркта/область риска после моделирования коронароокклюзии-реперфузии. Инфаркт-лимитирующий эффект дельторфина II сохранялся после селективной блокады δ_1 -ОР BNTX и устранялся в результате селективной блокады δ_2 -ОР налтрибеном. Кроме того, кардиопротекторный эффект дельторфина II устранялся после селективной блокады периферических опиоидных рецепторов препаратом налоксона метийодид (5 мг/кг) [125]. Таким образом, активация периферических δ_2 -опиоидных рецепторов оказывает кардиопротекторный эффект.

В исследовании, проведенном в нашей лаборатории на изолированном перфузируемом сердце крысы, было выявлено, что селективный агонист μ -опиоидных рецепторов DAMGO уменьшает повреждение миокарда в ответ на моделирование глобальной ишемии-реперфузии [126]. Этот эффект был подтвержден и в последующих работах [122, 5]. Кроме того, в этих экспериментах было показано, что селективный агонист μ -ОР DALDA также способен предотвращать гибель кардиомиоцитов после глобальной ишемии-реперфузии сердца. В более позднем исследовании кардиопротекторного эффекта пептида DAMGO на модели глобальной ишемии-

реперфузии изолированного сердца крысы было обнаружено, что интраперитонеальное введение данного μ -ОР-агониста (0,1 мг/кг) уменьшает реперфузионный некроз кардиомиоцитов и улучшает постишемическое восстановление сократительной функции левого желудочка (ДРЛЖ) [123]. Однако активация кардиальных μ -ОР с помощью перфузии раствора DAMGO (170 нмоль/л) через изолированное сердце крысы за 10 минут до моделирования глобальной ишемии не влияла на некротическую гибель кардиомиоцитов и ухудшала реперфузионное восстановление сократимости миокарда [123]. Известно, что K_i пептида DAMGO для μ -ОР составляет 1,23 нмоль [127]. Таким образом, авторы не исключают возможности, что инотропный эффект DAMGO *ex vivo* реализуется в более низких концентрациях пептида. И в связи с этим предполагают, что кардиопротекторный эффект исследуемого агониста μ -ОР может быть связан с активацией данного типа периферических рецепторов, локализованных вне самого сердца [128]. Такое расхождение с полученными нами данными, вероятно, объясняется адаптационными изменениями, происходящими в миокарде после длительного воздействия гипоксии. Вполне вероятно, что у адаптированных к хронической гипоксии крыс изменяются экспрессия и свойства опиоидных рецепторов, их сродство к агонистам. Например, уже на 3-4 неделе адаптации к хронической прерывистой гипоксии в головном мозге у крыс увеличивается экспрессия мРНК как μ -, так и δ -опиоидных рецепторов [129], несмотря на то, что до сих пор наличие у крыс кардиальных μ -ОР остается предметом дискуссии.

Обобщая представленные выше данные, а также опираясь на результаты собственных исследований, можно сделать вывод, что улучшенное постишемическое восстановление сократительной активности изолированного сердца крысы при адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии также, как и уменьшение некроза кардиомиоцитов, происходит через активацию кардиальных δ_2 - и μ -опиоидных рецепторов.

Стоит отметить, что ингибирование открытия МРТ-пор митохондрий, вероятно, также вносит существенный вклад в реализацию опиоид-индуцированной кардиопротекции [119]. Кроме того, активация опиоидных рецепторов морфином способствует увеличению скорости АДФ-стимулированного и максимальной скорости дыхания митохондрий в кардиомиоцитах при их гипоксии-реоксигенации [118]. В нашем исследовании было продемонстрировано, что защитный эффект ХННГ, связанный с повышенной устойчивостью функции митохондриального дыхания, трансмембранного потенциала и синтеза АТФ митохондриями миокарда, не проявлялся в условиях неселективной блокады ОР, либо селективной блокады δ_2 - или μ -опиоидных рецепторов.

Схожая картина наблюдалась и при исследовании устойчивости МРТ-пор к избытку ионов кальция после ишемии-реперфузии в условиях ХННГ – защитный эффект ХННГ устранялся неселективной блокадой ОР, либо селективной блокадой δ_2 - или μ -опиоидных рецепторов.

Таким образом, кардиальные δ_2 - и μ -опиоидные рецепторы играют важную роль в сохранении энергетической функции митохондрий и в поддержании МРТ-пор в закрытом состоянии после ишемии-реперфузии изолированного сердца крысы в условиях адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии.

На заключительном этапе исследования была выявлена корреляционная зависимость между силой сокращения изолированного сердца и скоростью АДФ-стимулированного дыхания митохондрий миокарда. Эта взаимосвязь была обнаружена как у интактных, так и у адаптированных к ХННГ животных, в том числе в условиях блокады опиоидных рецепторов. Этот факт свидетельствует о том, что сократительная активность изолированного сердца в период реперфузии напрямую связана со способностью митохондрий сохранять энергетическую функцию в условиях адаптации к ХННГ в ответ на ишемию-реперфузию сердца, что подтверждается высокими реперфузионными значениями трансмембранного потенциала митохондрий и содержания АТФ в миокарде.

Аналогичная корреляция была обнаружена между реперфузионными значениями силы сокращения изолированного сердца и кальций-связывающей способностью митохондрий миокарда как у интактных, так и у адаптированных к ХННГ крыс. При блокаде опиоидных рецепторов взаимосвязь между исследуемыми параметрами также сохранялась. Таким образом, от способности митохондрий поддерживать МРТ-поры в закрытом состоянии напрямую зависит сократительная активность изолированного сердца в период реперфузии при адаптации к ХННГ

Остается неясным, посредством каких механизмов сигнал от опиоидных рецепторов передается на МРТ-поры митохондрий. Существует предположение, что этот путь включает активацию каскада киназных реакций, действующих на киназу гликоген-синтазы-3 β , которая, в свою очередь, предотвращает открытие МРТ-пор митохондрий [130], однако для детализации данного механизма необходимы дальнейшие исследования.

ВЫВОДЫ

1. В реализации антинекротического эффекта адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии после глобальной ишемии и реперфузии изолированного сердца крысы принимают участие кардиальные δ_2 - и μ -опиоидные рецепторы.

2. Кардиальные δ_2 - и μ -опиоидные рецепторы вносят значимый вклад в улучшение постишемического восстановления сократительной активности изолированного сердца у крыс, адаптированных к хронической непрерывной нормобарической гипоксии.

3. В адаптационном поддержании энергетической функции митохондрий при действии глобальной ишемии и реперфузии на изолированное сердце крысы важную роль играют кардиальные δ_2 - и μ -опиоидные рецепторы.

4. После адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии повышение устойчивости МРТ-пор митохондрий к избытку ионов кальция после ишемии и реперфузии изолированного сердца происходит с участием кардиальных δ_2 - и μ -опиоидных рецепторов.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ

1. Gua Sh., Hua H., Guo X., Jia Zh., Zhang Y., Maslov L.N., Zhang X., Maa H. PGC-1 α Participates in the Protective Effect of Chronic Intermittent Hypobaric Hypoxia on Cardiomyocytes // Cellular Physiology and Biochemistry.- 2018.-Vol.50, №5- P.1891-1902.
2. Krylatov A.V., Maslov L.N., Voronkov N.S., Boshchenko A.A., Popov S.V., Gomez L., Wang H., Jaggi A. S., Downey J.M. Reactive oxygen species as intracellular signaling molecules in the cardiovascular system // Current Cardiology Reviews. -2018. -V.14,№4. -P.290-300.
3. Singh L., Viridi J.K., Maslov L.N., Singh N., Jaggi A.S. Investigating the possible mechanisms involved in adenosine preconditioning-induced cardioprotection in rats // Cardiovascular Therapeutics. -2018. -V.36, №3. -P.1-29.
4. Tsibulnikov S.Y., Maslov L.N., Naryzhnaya N.V., Ma H., Lishmanov Y.B., Oeltgen P.R., Garlid K. Role of protein kinase C, PI3 kinase, tyrosine kinases, NO-synthase, KATP channels and MPT pore in the signaling pathway of the cardioprotective effect of chronic continuous hypoxia // General Physiology and Biophysics. -2018. -V.37,№5. -P.537-547.
5. Афанасьев С.А., Егорова М.В., Куцыкова Т.В., Попов С.В. Влияние свободных жирных кислот на поглощение кислорода изолированными кардиомиоцитами крыс при ишемическом или диабетическом поражении сердца // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. -2018. -Т.62,№1. -С.22-26.
6. Ласукова Т.В., Зыкова М.В., Белоусов М.В., Горбунов А.С., Логвинова Л.А., Дыгай А.М. Роль NO-синтазы в реализации кардиопротективного эффекта соединений гуминовой природы на модели ишемии и реперфузии изолированного сердца крыс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.- 2018.- Т.166, №11.- С.537-540.
7. Мандель И.А., Подоксенов Ю.К., Михеев С.Л., Свирко Ю.С., Суходоло И.В., Шипулин В.М., Каменщиков Н.О., Ярощевский А.И., Яворовский А.Г. Влияние гипоксическо-гипероксического прекондиционирования на развитие периоперационных осложнений и транспорт кислорода в коронарной хирургии с применением искусственного кровообращения // Анестезиология и реаниматология. -2018. -Т.63,№1. - С.38-45.
8. Маслов Л.Н., Воронков Н.С., Семенцов А.С., Джагги А.С., Де Петроцеллис Л., Ванг Х., Нестеров Е.А., Лишманов Ю.Б. Реперфузионное повреждение сердца. Основные звенья патогенеза // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. -2018. - Т.104,№8. -С.881-903.
9. Маслов Л.Н., Цибульников С.Ю., Прокудина Е.С., Бушов Ю.В., Нам И.Ф., Нестеров Е.А., Лишманов Ю.Б. Роль симпатoadреналовой системы в ишемическом

прекондиционировании сердца // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. -2018. -Т.104,№5. -С.521-535.

10. Прокудина Е.С., Маслов Л.Н., Зоткин Н.Н., Курбатов Б.К., Джагги А.С., Де Петроцеллис Л., Ма Х., Ванг Х. Роль активных форм кислорода в развитии повреждения сердца и желудка при стрессе // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. -2018. -Т.104, №1. -С.3-17.

11. Цибульников С.Ю., Маслов Л.Н., Нарыжная Н.В., Иванов В.В. Хроническое периодическое воздействие холода не влияет на артериальное давление и устойчивость сердца к действию ишемии и реперфузии // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. -2018. -Т.62,№1. -С.17-21.

12. Цибульников С.Ю., Мухомедзянов А.В., Маслов Л.Н., Овчинников М.В., Сидорова М.В., Кудрявцева Е.В., Бушов Ю.В., Лишманов Ю.Б., Халиулин И.Г. Синтез и инфаркт-лимитирующие свойства пептидных агонистов опиоидных рецепторов // Химико-фармацевтический журнал. -2018. -Т.52,№4. -С.3-6.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. 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 Г // Сибирский медицинский журнал (Томск). – 2013. - Т. 28, № 3. – С. 19-23.
2. Николаева Н.В., Федоров В.В., Привалова В.Ю., Гальянов А.А. Трудовой прогноз больных инфарктом миокарда // Кардиология. – 1997. – Т. 37, №3. – С. 73.
3. Neckar J., Szarszoi O., Herget J., Ostadal B., Kolar F. Cardioprotective effect of chronic hypoxia is blunted by concomitant hypercapnia // *Physiol. Res.* – 2003. – Vol.52, No.2. – P.171-175.
4. Maslov L.N., Naryzhnaya N.V., Tsibulnikov S.Yu., Kolar F., Zhang Yi., 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 science.* – 2013. – Vol. 93. – P. 373-379.
5. Maslov L.N., Lasukova T.V., Solenkova N.V., Lishmanov A.Iu., Bogomaz S.A., Tam S.V, Gross G.J. Participation of KATP-channels in cardioprotective effect of mu-opioid receptor agonists in acute ischemia and reperfusion of the isolated heart // *Eksp. Klin. Farmakol.* – 2001. – Vol. 64, No.5. – P. 23–27.
6. Шляхто Е.В., Нифонтов Е.М., Галагудза М.М. Пре- и посткондиционирование как способы кардиопротекции: патофизиологические и клинические аспекты // *Жур. сердечной недостаточности.* – 2008. – Т. 9, № 1. – С. 4-10.
7. Heusch G. Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning // *Circ. Res.* – 2015. – Vol. 116, No.4. – P.674-699.
8. Williams-Pritchard G., Headrick J.P., Peart J.N. Myocardial opioid receptors in conditioning and cytoprotection // *Pharmaceuticals.* – 2011. – Vol. 4. – P. 470-484.
9. Маслов Л.Н., Крылатов А.В., Горбунов А.С., Цибульников С.Ю., Семенцов А.С. Вазопротекторный эффект классического ишемического preconditionирования // *Сибирский медицинский журнал (Томск).* – 2012. – Т. 27, № 1. - С. 9-17.
10. Liu H., McPherson B.C., Yao Z. Preconditioning attenuates apoptosis and necrosis: role of protein kinase C epsilon and -delta isoforms // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2001. – Vol. 281. – P. H404–H410.
11. Oudit G.Y., Penninger J.M. Cardiac regulation by phosphoinositide 3-kinases and PTEN // *Cardiovasc. Res.* – 2009. – Vol. 82. – P. 250–260.

12. Tong H., Chen W., Steenbergen C., Murphy E. Ischemic preconditioning activates phosphatidylinositol-3- kinase upstream of protein kinase C // *Circ. Res.* – 2000. – Vol. 87, No.4. – P. 309–315.
13. 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. журнал.* – 2010. – Т.96, № 12. - С. 1170-1189.
14. 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. и сосуд.хирургия.* – 2011. – Т.17, № 3. – С. 27-36.
15. 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. exper. биол. и мед.* – 2013. – Т.156, № 12. – С. 705-708.
16. Shizukuda Y.R., Mallet T., Lee S.C., Downey H. F. Hypoxic preconditioning of ischaemic canine myocardium // *Cardiovasc. Res.* – 1992. – Vol.26, No.5. – P. 534-542.
17. 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. – Vol.27, No.4. – P. 559-564.
18. Beguin P.C., Joyeux-Faure M., Godin-Ribuot D. et al. Acute intermittent hypoxia improves rat myocardium tolerance to ischemia // *J. Appl. Physiol.* – 2005. – Vol.99, No.3. – P. 1064-1069.
19. Cai Z., Manalo D.J., Wei G. Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury // *Circulation.* – 2003. – Vol.108, No.1. – P. 79-85.
20. Sasaki H., Fukuda S., Otani H. Hypoxic preconditioning triggers myocardial angiogenesis: a novel approach to enhance contractile functional reserve in rat with myocardial infarction // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2002. – Vol.34, No.3. – P. 335-348.
21. Xi L., Tekin D., Gursoy E. Evidence that NOS2 acts as a trigger and mediator of late preconditioning induced by acute systemic hypoxia // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2002. – Vol. 283, No.1. – P. H5-H12.

22. Портниченко А.Г., Василенко М.И., Мойбенко О.О. Роль калієвих каналів в ефекторних механізмах кардіопротекції при пизньому прекодиціюванні серця щурів // Патологія. – 2008. – Т. 5, № 3. – С. 61-62.
23. Kopecky M., Daum S. Tissue adaptation to anoxia in rat myocardium // *Cs. Fysiol.* – 1958. – Vol. 7. – P. 518-521.
24. Меерсон Ф.З. Адаптация к стрессорным ситуациям и стресс-лимитирующие системы организма // Физиология адаптационных процессов: руководство по физиологии. – М.: Наука, 1986. – С. 521-631.
25. Wang Z., Si L.Y. Hypoxia-inducible factor-1 α and vascular endothelial growth factor in the cardioprotective effects of intermittent hypoxia in rats // *Ups. J. Med. Sci.* – 2013. – Vol. 118, No.2. – P. 65-74.
26. Ma H.J., Li Q., Ma H.J., Guan Y., Shi M., Yang J., Li D. P., Zhang Y. Chronic intermittent hypobaric hypoxia ameliorates ischemia/reperfusion-induced calcium overload in heart via Na/Ca²⁺ exchanger in developing rats // *Cell. Physiol. Biochem.* – 2014. – Vol. 34, No.2. – P. 313-324.
27. Zhou J.J., Ma H.J., Liu Y., Guan Y., Maslov L.N., Li D.P., Zhang Y. The anti-arrhythmic effect of chronic intermittent hypobaric hypoxia in rats with metabolic syndrome induced with fructose // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 2015. – Vol. 93, No.4. – P. 227-232.
28. Бернар К. (Bernard C.) Курс общей физиологии. Жизненные явления, общие животным и растениям. Пер. с франц.— Спб., 1878.— 316 с.
29. Гаркави Л.Х., Квакина Е.Б., Уколова М.А. Адаптационные реакции и резистентность организма.— Ростов н/Д: Изд. РГУ, 1990.— 224 с.
30. Yuan G., Nanduri J., Khan S., Semenza G.L., Prabhakar N.R. Induction of HIF-1 α expression by intermittent hypoxia: involvement of НАДФН oxidase, Ca²⁺ signaling, prolyl hydroxylases and mTOR // *J. Cell. Physiol.* – 2008. – Vol. 217. – P. 674-685.
31. Лишманов Ю.Б., Нарыжная Н.В., Маслов Л.Н. Опиоидергическое звено морфофункциональных изменений миокарда при стрессе и адаптации. – Томск: Изд-во “Красное знамя”, 2003. – 224 с.
32. Alanova P., Kolar F., Ostadal B, Neckar J. Role of NO/cGMP signaling pathway in cardiac ischemic tolerance of chronically hypoxic rats // *Physiol. Res.* – 2015. – Vol. 64, No.5. – P. 783-778.
33. Waskova-Arnostova P., Elsnicova B., Kasparova D., Sebesta O., Novotny J., Neckar J., Kolar F., Zurmanova J. Right-to-left ventricular differences in the expression of mitochondrial hexokinase and phosphorylation of Akt // *Cell. Physiol. Biochem.* – 2013. – Vol. 31, No.1. – P. 66-79.

34. Waskova-Arnostova P., Kasparova D., Elsnicova B., Novotny J., Neckar J., Kolar F., Zurmanova J. Chronic hypoxia enhances expression and activity of mitochondrial creatine kinase and hexokinase in the rat ventricular myocardium // *Cell. Physiol. Biochem.* – 2014. – Vol. 33, No.2. – P. 310-320.
35. Neckar J., Borchert G.H., Hlousková P., Mícová P., Novakova O., Novak F., Hroch M., Papousek F., Ost'ádal B., Kolár F. Brief daily episode of normoxia inhibits cardioprotection conferred by chronic continuous hypoxia. Role of oxidative stress and BKCa channels // *Curr. Pharm. Des.* – 2013. – Vol. 19, No.39. – P. 6880-6889.
36. Закощиков К.Ф., Катин С.О. Гипокситерапия – «Горный воздух» М.: «Бумажная галерея», 2005. – 66 с.
37. Barnholt K.E., Hoffman A.R., Rock P.B., Muza S.R., Fulco C.S., Braun B., Holloway L. S., Mazzeo R., Cymerman A., Friedlander A.L. Endocrine responses to acute and chronic high-altitude exposure , № 4,300 meters: modulating effects of caloric restriction // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2006. – Vol. 290, No.6. – P. E1078-E1088.
38. Pichon A., Zhenzhong B., Marchant D., Jin G., Voituron N., Haixia Y., Favret F., Richalet J.P., Ge R.L. Cardiac adaptation to high altitude in the plateau pika (*Ochotona curzoniae*) // *Physiol. Rep.* – 2013. – Vol. 1, No.2. – P. e00032.
39. West J.B. Recent advances in high altitude medicine and biology // *High altitude medicine & biology.* – 2015. – Vol. 16, No.2. – P. 73-73.
40. Simonson T.S. Altitude adaptation: a glimpse through various lenses // *High altitude medicine & biology.* – 2015. – Vol. 16, No.2. – 125-137.
41. Painschab M.S., Malpartida G.E., Dávila-Roman V.G., Gilman R.H., Kolb T.M., León-Velarde F., Miranda J.J., Checkley W. Association between serum concentrations of hypoxia inducible factor responsive proteins and excessive erythrocytosis in high altitude peru // *High altitude medicine & biology.* – 2015. – Vol. 16, No.1. – P. 26-33.
42. 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. – Vol. 31, No.1. – P. 30-34.
43. 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. – Vol. 10, No.12. – P. 783-789.
44. Merry T.L., Steinberg G.R., Lynch G.S., McConell G.K. Skeletal muscle glucose uptake during contraction is regulated by nitric oxide and ROS independently of AMPK // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2010. – Vol. 298, No.3. – P. E577-85.

45. Milano G., Corno A.F., Samaja M., Morel S., Vassalli G., Von Segesser L.K. Daily reoxygenation decreases myocardial injury and improves post-ischaemic recovery after chronic hypoxia // *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* – 2010a. – Vol. 37, No.4. – P. 942-949.
46. Milano G., Von Segesser L. K., Morel S., Joncic A., Bianciardi P., Vassalli G., Samaja M. Phosphorylation of phosphatidylinositol-3-kinase-protein kinase B and extracellular signal-regulated kinases 1/2 mediate reoxygenation-induced cardioprotection during hypoxia // *Exp. Biol. Med.* Maywood. – 2010б. – Vol. 235, No.3. – P. 401-410.
47. Borchert G.H., Yang C., Kolar F. Mitochondrial BKCa channels contribute to protection of cardiomyocytes isolated from chronically hypoxic rats // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2011. – Vol. 300, No.2. – P. H507-H513.
48. Meng X.Y., Yu H.L., Zhang W.C., Wang T.H., Mai X., Liu H.T., Xu R. C. ZFP580, a novel zinc-finger transcription factor, is involved in cardioprotection of intermittent high-altitude hypoxia against myocardial ischemia-reperfusion injury // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9, No.4. – P. e94635.
49. Jain K., Suryakumar G., Ganju L., Singh S.B. Differential hypoxic tolerance is mediated by activation of heat shock response and nitric oxide pathway // *Cell Stress Chaperones.* – 2014. – Vol. 19, No.6. – P. 801-812.
50. Murray A.J. Energy metabolism and the high-altitude environment // *Exp. Physiol.* – 2016. – Vol. 101, No.1. – P. 23-27.
51. Tajima M., Katajose D., Bessho M., Isoyama S. Acute ischemic preconditioning and chronic hypoxia independently increase myocardial tolerance to ischemia // *Cardiovasc. Res.* – 1994. – Vol. 28. – P. 312–319.
52. Маслова Л.В., Лишманов Ю.Б. Зависимость степени стрессорных повреждений сердца от изменения уровня эндогенного бета-эндорфина в ходе предварительной адаптации // *Бюлл. exper. биол. и мед.* – 1989. – № 6. – С. 662-665.
53. Лишманов Ю.Б. Использование энкефалинов для предупреждения стрессорных повреждений сердца в эксперименте // *Бюлл. exper. биол. и мед.* – 1986. – № 9. – С. 271-272.
54. Лишманов Ю.Б., Кондратьев Б.Ю. Взаимодействие опиоидной и симпатoadреналовой системы при ишемическом повреждении сердца // *Физиол. Журнал.* – 1995. – Т. 81, № 5. – С. 77-85.
55. Лишманов Ю.Б., Маслов Л.Н., Ускина Е.В., А. В. Крылатов А.В. О роли центральных мю- и дельта-опиатных рецепторов в реализации антиаритмического эффекта адаптации // *Бюлл. exper. биол. и мед.* – 1996. – Т. 122, № 10. – С. 378-381.

56. Chen Y., Long H., Wu Z., Jiang X., Ma L. EGF transregulates opioid receptors through EGFR-mediated GRK2 phosphorylation and activation // *Mol. Biol. Cell.* – 2008. – Vol. 19, No.7. – P.2973-2983.
57. Лишманов Ю.Б., Нарыжная Н.В., Ревинская Ю.Г., Маслов Л.Н. Модулирующее влияние лигандов μ -опиатных рецепторов на адренергическое звено патогенеза стрессорного повреждения сердца // *Бюлл. exper. биол. и мед.* – 1998. – Т. 126, № 11. – С. 510-512.
58. Маслов Л.Н., Лишманов Ю.Б., Нарыжная Н.В., Крылатов А.В., Там С.В. Лиганды опиатных рецепторов, сигма рецепторов и коррекция электрической нестабильности сердца при постинфарктном кардиосклерозе // *Экспер. и клин. фармакол.* – 2001. – Т. 64, № 1. – С. 38-41.
59. Маслов Л.Н., Мрочек И.А. Щепёткин И.А., Хедрик Дж.П., Хануш Л., Барзах Е.И., Лишманов А.Ю., Горбунов А.С., Цибульников С.Ю., Байков А.Н. Роль протеинкиназ в формировании адаптивного феномена ишемического посткондиционирования сердца // *Росс. физиол. журнал. им. И.М. Сеченова* – 2013. – Т. 99, № 4. – С. 433-452.
60. Маслов Л.Н., Барзах Е.И., Крылатов А.В., Браун С.А., Олтджен П.Р., Говиндашвами М, Чернышева Г.А., Соленкова Н.В., Лишманов А.Ю., Цибульников С.Ю., Криг Т., Жанг Е. Значение опиоидных рецепторов в регуляции толерантности сердца к патогенному действию длительной ишемии-реперфузии *in vivo* // *Росс. физиол. журнал. им. И.М. Сеченова.* – 2009. – Т. 95, № 6. – С. 563-572.
61. Ласукова Т. В., Маслов Л.Н., Горбунов А.С. О роли опиоидной системы миокарда в реализации кардиопротекторного эффекта посткондиционирования // *Росс. физиол. Журнал им. И.М. Сеченова.* – 2014. – Т. 100, № 12. – С. 1391-1398.
62. Варфоломеев С.О. Опиатные рецепторы у крыс с различной адаптацией к эмоциональному стрессу // *Клинические и орг. вопр. общей и судебной психиатрии.* – М., 1986. – С. 76-80.
63. Fraessdorf J., Hollmann M.W., Hanschmann I., Heinen A., Weber N.C., Preckel B., Huhn R., Fraessdorf J. Role of Endogenous Opioid System in Ischemic-Induced Late Preconditioning // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10, No.7. – P. e0134283.
64. Karck M., Tanaka S, Bolling S.F., Simon A., Su T.P., Oeltgen P.R., Haverich A.J. Myocardial protection by ischemic preconditioning and delta-opioid receptor activation in the isolated working rat heart // *Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 2001. –Vol. 122, No.5. – P. 986-992.

65. Holzerova K., Hlavackova M., Zurmanova J., Borchert G., Neckar J., Kolar F., Novak F., Novakova O. Involvement of PKCepsilon in cardioprotection induced by adaptation to chronic continuous hypoxia // *Physiol. Res.* – 2015. – Vol. 64, No.2. – P. 191-201.
66. Bohuslavova R., Kolar F., Kuthanova L., Neckar J., Tichopad A., Pavlinkova G. Gene expression profiling of sex differences in HIF1-dependent adaptive cardiac responses to chronic hypoxia // *J. Appl. Physiol.* – 2010 – Vol. 109, No.4. – P. 1195-1202.
67. Chytilova A., Borchert G.H., Mandíkova-Alánová P., Hlavackova M., Kopkan L., Khan J.D., Imig M.A., Kolar F., Neckar J. Tumour necrosis factor- α contributes to improved cardiac ischaemic tolerance in rats adapted to chronic continuous hypoxia // *Acta Physiol. (Oxf).* – 2015. – Vol. 214, No.1. – P. 97-108.
68. Walsh R.S., Borges M., Thornton J.D. Hypoxia preconditions rabbit myocardium by an adenosine receptor-mediated mechanism // *Can J Cardiol.* – 1995. – Vol. 11, No.2.- P. 141-6.
69. Tani M., Honma Y., Takayama M. Loss of protection by hypoxic preconditioning in aging Fischer 344 rat hearts related to myocardial glycogen content and Na⁺ imbalance // *Cardiovasc. Res.* – 1999. – Vol.41, No.3. – P. 594-602.
70. 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. – Vol.29, No.8. – P. 2187-2195.
71. Miki T., Cohen M.V., Downey J.M. Opioid receptor contributes to ischemic preconditioning through protein kinase C activation in rabbits // *Mol. Cell. Biochem.* – 1998. – Vol. 186, No.1-2. – P. 3-12.
72. Murry C.E, Jennings R.B, Reimer K.A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium // *Circulation.* – 1988. – Vol. 74, No.5. – P. 1124-1136.
73. Yellon D.M., Downey J.M. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology // *Physiol. Rev.* – 2003. – Vol.83, No.4. - P. 1113-1151.
74. Vanden Hoek T.L., Becker L.B., Hao Z., Li C., Schumacker P.T. Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273, No.29. – P. 18092-18098.
75. Gong K., Zhang Z.Z.G., Li A.H., Huang Y.F., Bu P., Dong F., Liu J. ROS-mediated ERK activation in delayed protection from anoxic preconditioning in neonatal rat cardiomyocytes // *Chin. Med. J.* – 2004. – Vol. 117, No.3. – P. 395-400.

76. Lebuffe G, Schumacker P.T., Shao Z.H., Anderson T, Iwase H, Vanden Hoek T.L. ROS and NO trigger early preconditioning: relationship to mitochondrial KATP channel // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* - 2003. – Vol. 284, No.1. – P. H299-H308
77. Cuong D.V., Warda M., Kim N., Park W.S., Ko J.H., Kim E., Han J. Dynamic changes in nitric oxide and mitochondrial oxidative stress with site-dependent differential tissue response during anoxic preconditioning in rat heart// *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*- 2006.- Vol.293, No.3.- P. H1457-465.
78. Минасян С.М., Галагудза М.М., Сонин Д.Л., Боброва Е.А., Зверев Д.А., Королев Д.В., Дмитриев Ю.В., Васильева М.С., Григорова Ю.Н., Власов Т.Д. Методика перфузии изолированного сердца крысы // *Регионарн. кровообр. и микроцирк.* – 2009. – Т.8, № 4(32). – С. 54–59
79. Капелько, В.И., Новикова Н.А. Связь диастолической упругости сердца с его приспособлением к нагрузкам // *Физиол. журнал СССР.* – 1988. – № 7. – С. 970–977.
80. Argaud L., Gateau-Roesch O., Raisky O., Loufouat J., Robert D., Ovize M. Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition // *Circulation.* – 2005. – Vol. 111, No 2. – P. 194–197.
81. Chen X., Jennings D.B., Medeiros D.M. Impaired cardiac mitochondrial membrane potential and respiration in copper-deficient rats // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 2002. – Vol. 34, No.5. – P. 397–406.
82. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilized the principle of protein dye binding // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.
83. Singh I.N., Sullivan P.G., Deng Y., Mbye L.H., Hall E.D. Time course of post-traumatic mitochondrial oxidative damage and dysfunction in a mouse model of focal traumatic brain injury: implications for neuroprotective therapy // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2006. – Vol. 26, No.11. – P. 1407–1418.
84. Chance B., Williams G.R. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state // *J. Biol. Chem.* – 1955. – Vol. 217. – P.409–427.
85. Scaduto R.C.Jr., Grotyohann L.W. Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives // *Biophys. J.* – 1999. – Vol. 76, No.1 (Pt.1). – P. 469–477.
86. Gomez L., Paillard M., Thibault H., Derumeaux G., Ovize M. Inhibition of GSK3 β by postconditioning is required to prevent opening of the mitochondrial permeability transition pore during reperfusion // *Circulation.* – 2008. – Vol. 117, No.21 – P. 2761–2768.

87. Chida J., Yamane K., Takei T., Kido H. An efficient extraction method for quantitation of adenosine triphosphate in mammalian tissues and cells // *Anal. Chim. Acta.* – 2012. – Vol. 727. – P. 8–12.
88. Strehler B.L. Adenosine-5'-triphosphate and Creatine Phosphate: Determination with Luciferase // *Methods of Enzymatic Analysis.* – 2nd Ed. – Vol. 4, Bergmeyer, H. U. (Ed.). – Academic Press, New York. – 1974. – P. 2112–2115.
89. Маслов Л.Н., Платонов А.А., Ласукова Т.В., Лишманов Ю.Б., Олтджен П., Нагаса Х., Подоксенов Ю.К, Подоксенов А.Ю. Активация δ -опиоидных рецепторов предупреждает появление необратимых повреждений кардиомиоцитов и усугубляет сократительную дисфункцию миокарда при ишемии-реперфузии // *Пат. физиол. и Экспер. тер.* – 2006. – № 4. – С. 13–17.
90. Schiller P.W., Weltrowska G., Nguyen T.M, Wilkes B.C., Chung N.N., Lemieux C. TIPP[psi]: a highly potent and stable pseudopeptide delta opioid receptor antagonist with extraordinary delta selectivity // *J. Med. Chem.* – 1993. – Vol. 36, No.21. – P. 3182–3187.
91. Sanchez-Blazquez P., Rodriguez-Diaz M., Frejo M.T., Garzon J. Stimulation of mu- and delta-opioid receptors enhances phosphoinositide metabolism in mouse spinal cord: evidence for subtypes of delta-receptors // *Eur. J. Neurosci.* – 1999. – Vol. 11, No.6. – P. 2059–2064.
92. Buzas B., Izenwasser S., Portoghese P.S., Cox B.M. Evidence for delta opioid receptor subtypes regulating adenylyl cyclase activity in rat brain // *Life Sci.* – 1994. – Vol. 54, No.7. – P. PL101–PL106.
93. Tang T., Kiang J.G., Cox B.M. Opioids acting through delta receptors elicit a transient increase in the intracellular free calcium concentration in dorsal root ganglion-neuroblastoma hybrid ND8-47 cells // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1994. – Vol. 270, No.1. – P. 40–6.
94. Hill-Pryor C., Lindsey D., Lapanowski K., Dunbar J.C. The cardiovascular responses to mu opioid agonist and antagonist in conscious normal and obese rats // *Peptides.* – 2006. – Vol. 27, No.6. – P. 1520–1526.
95. Heijna M.H., Padt M., Hogenboom F., Portoghese P.S., Mulder A.H, Schoffemeer A.N. Opioid receptor-mediated inhibition of dopamine and acetylcholine release from slices of rat nucleus accumbens, olfactory tubercule and frontal cortex // *Eur. J. Pharmacol.* – 1990. – Vol. 181, No.3. – P. 267–278.
96. Cordwell S.J., Edwards A.V., Liddy K.A., Moshkanbaryans L., Solis N., Parker B.L., Yong A.S., Wong C., Kritharides L., Hambly B.D., White M.Y. Release of tissue-specific

proteins into coronary perfusate as a model for biomarker discovery in myocardial ischemia/reperfusion injury // *J. Proteome Res.* – 2012. – Vol. 11, No.4. – P. 2114–2126.

97. Zhang J.Y., Tong W., Wu F., Bi S.H., Xu M., Jin Z.X., Yang Y., Jiang X.F., Zhou J.J. Different roles for contracture and calpain in calcium paradox-induced heart injury // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, No.12. – P. e52270.

98. Sanderson T.H., Reynolds C.A., Kumar R., Przyklenk K., Huttemann M. Molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury in brain: pivotal role of the mitochondrial membrane potential in reactive oxygen species generation // *Mol. Neurobiol.* – 2013. – Vol. 47, No.1. – P. 9–23.

99. Wang Z.H., Cai X.L., Wu L., Yu Z., Liu J.L., Zhou Z.N., Liu J., Yang H.T. Mitochondrial energy metabolism plays a critical role in the cardioprotection afforded by intermittent hypobaric hypoxia // *Exp. Physiol.* – 2012. – Vol. 97, No.10. – P. 1105–1118.

100. Mayfield K.P., D'Alecy L.G. Role of endogenous opioid peptides in the acute adaptation to hypoxia // *Brain Res.* – 1992. – Vol. 582, No.2. – P. 226–231.

101. Mayfield K.P., D'Alecy L.G. Delta-1 opioid receptor dependence of acute hypoxic adaptation // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1994. – Vol. 268, No.1. – P. 74–77.

102. Нарыжная Н.В., Цибульников С.Ю., Маслов Л.Н., Лишманов Ю.Б. Участие опиоидных рецепторов в реализации кардиопротекторного эффекта хронической нормобарической гипоксии // *Сибирский медицинский журнал (Томск).* – 2013. – Т. 28, № 4. – С. 102–106.

103. Eells J.T., Henry M.M., Gross G.J., Baker J.E. Increased mitochondrial K(ATP) channel activity during chronic myocardial hypoxia: is cardioprotection mediated by improved bioenergetics? // *Circ. Res.* – 2000. – Vol. 87, No.10. – P. 915–921.

104. 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. – Vol. 288, No.1. – P. H62–H68.

105. Zhu W.Z., Xie Y., Chen L., Yang H.T., Zhou Z.N. Intermittent high altitude hypoxia inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores against reperfusion injury // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2006. – Vol. 40, No.1. – P. 96–106.

106. Essop M.F., Razeghi P., McLeod C., Young M.E., Taegtmeyer H., Sack M.N. Hypoxia-induced decrease of UCP3 gene expression in rat heart parallels metabolic gene switching but fails to affect mitochondrial respiratory coupling // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2004. – Vol. 314, No.2. – P. 561–564

107. Zungu M., Alcolea M.P., Garcia-Palmer F.J., Young M.E., Essop M.F. Genomic modulation of mitochondrial respiratory genes in the hypertrophied heart reflects adaptive changes in mitochondrial and contractile function // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2007. – Vol. 293, No.5. – P. H2819–H2825.
108. Heather L.C., Cole M.A., Tan J.J., Ambrose L.J., Pope S., Abd-Jamil A.H., Carter E.E., Dodd M.S., Yeoh K.K., Schofield C.J., Clarke K. Metabolic adaptation to chronic hypoxia in cardiac mitochondria // *Basic Res. Cardiol.* – 2012. – Vol. 107, No.3. – P. 268.
109. Lukyanova L.D., Dudchenko A.V., Tsybina T.A., Germanova E.L., Tkachuk E.N., Erenburg I.V. Effect of intermittent hypoxia on kinetic properties of mitochondrial enzymes // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2008. – Vol. 144, No.6. – P. 795–801.
110. Lukyanova L.D., Kirova Y.I. Mitochondria-controlled signaling mechanisms of brain projection in hypoxia // *Front. Neurosci.* – 2015. – Vol. 9, No.320. – P.1–15.
111. Bu H.M., Yang C.Y., Wang M.L., Ma H.J., Sun H., Zhang Y. K(ATP) channels and MPTP are involved in the cardioprotection bestowed by chronic intermittent hypobaric hypoxia in the developing rat // *J. Physiol. Sci.* – 2015. – Vol. 65, No.4. – P. 367–376.
112. Seidlmayer L.K., Juettner V.V., Kettlewell S., Pavlov E.V., Blatter L.A., Dedkova E.N. Distinct mPTP activation mechanisms in ischaemia-reperfusion: contributions of Ca²⁺, ROS, pH, and inorganic polyphosphate // *Cardiovasc. Res.* – 2015. – Vol. 106, No.2. – P. 237–248.
113. Gross G.J. Role of opioids in acute and delayed preconditioning // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2003. – Vol. 35, No.7. – P. 709–718.
114. Lasukova T.V., Maslov L.N., Gorbunov A.S. On the role of opioid system of myocardium in the implementation of the cardioprotective effect of postconditioning. [Article in Russian] // *Russ. Fiziol. Zh. Im. I.M. Sechenova.* – 2014. – Vol. 100, No.12. – P. 1391–1398.
115. Peart J.N., Gross E.R., Gross G.J. Opioid-induced preconditioning: recent advances and future perspectives // *Vascul. Pharmacol.* – 2005. – Vol. 42, No.5–6. – P. 211–218.
116. He H., Huh J., Wang H., Kang Y., Lou J., Xu Z. Mitochondrial events responsible for morphine's cardioprotection against ischemia/reperfusion injury // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2016. – Vol. 290. – P. 66–73.
117. Kim J.S., Jin Y.G., Lemasters J.J. Reactive oxygen species, but not Ca²⁺-overloading, trigger pH- and mitochondrial permeability transition dependent death of adult rat myocytes after ischemia-reperfusion // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2006. – Vol. 290, No.5. – P. H2024–H2034.
118. Obame F.N., Plin-Mercier C., Assaly R., Zini R., Dubois-Rande J.L., Berdeaux A., Morin D. 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)-1Hpyrrole-2,5-dione], via inhibition of the mitochondrial permeability transition pore // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2008. – Vol. 326, No.1. – P. 252–258.

119. Kim S.J., Kuklov A., Crystal G.J. In vivo gene delivery of XIAP protects against myocardial apoptosis and infarction following ischemia/reperfusion in conscious rabbits // *Life Sci.* – 2011. – Vol. 88, No.13-14. – P. 572–577.

120. Kevelaitis E., Peynet J., Mouas C., Launay J.M., Menasche P. Opening of potassium channels: the common cardioprotective link between preconditioning and natural hibernation? // *Circulation.* – 1999. – Vol. 99, No.23. – P. 3079–3085.

121. Aitchison K.A., Baxter G.F., Awan M.M., Smith R.M., Yellon D.M., Opie L.H. Opposing effects on infarction of delta and kappa opioid receptor activation in the isolated rat heart: implications for ischemic preconditioning // *Basic Res. Cardiol.* – 2000. – Vol. 95, No.1. – P. 1–10.

122. Lasukova T.V., Maslov L.N., Lishmanov Iu.B., Tam S.V., Gross G.J. Effect of stimulation of μ -opiate receptors on contractility of the isolated heart in normal oxygenation and during ischemia-reperfusion // *Russ. Fiziol. Zh. Im. I. M. Sechenova.* – 2001. – Vol. 87, No.5. – P. 649–658.

123. Lasukova T.V., Maslov L.N., Gorbunov A.S. Effects of μ -Opioid Receptor Agonist DAMGO on Heart Contractility and Necrotic Injury to Cardiomyocytes during Ischemia and Reperfusion of Isolated Rat Heart // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2015. – Vol. 159, No.6. – P. 722–725.

124. Sigg D.C., Coles J.A. Jr., Oeltgen P.R., Laizzo P.A. Role of delta-opioid agonists on infarct size reduction in swine // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2002. – Vol. 282, No.6. – P. H1953–H1960.

125. Maslov L.N., Lishmanov Yu.B., Oeltgen P.R. Activation of peripheral δ_2 opioid receptors increases cardiac tolerance to ischemia/reperfusion injury: Involvement of protein kinase C, NO-synthase, KATP channels and the autonomic nervous system // *Life Sci.* – 2009. – Vol. 84, No.19-20 – P. 657-663.

126. Lasukova T.V., Rebrova T.Y., Tam S.V. Activation of μ -opiate receptors as a factor of regulation of heart resistance to ischemia-reperfusion and oxidative stress // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2000. – Vol. 130, No.8. – P. 752–755.

127. Maslov L.N., Lishmanov Y.B., Oeltgen P.R., Barzakh E.I., Krylatov A.V., Naryzhnaya N.V., Pei J.M., Brown S.A. Comparative analysis of the cardioprotective properties of opioid receptor agonists in a rat model of myocardial infarction // *Acad. Emer. Med.* – 2010. – Vol. 17, No.11. – P. 1239-1246.

128. Mousa S.A., Shaqura M., Schaper J., Huang W., Treskatsch S., Habazettl H., Abdul-Khaliq H., Schafer M. Identification of mu- and kappa-opioid receptors as potential targets to regulate parasympathetic, sympathetic, and sensory neurons within rat intracardiac ganglia // *J. Comp. Neurol.* – 2010. – Vol. 518, No.18. – P. 3836–3847.
129. Wu J., Li P., Wu X, Chen W. Chronic intermittent hypoxia decreases pain sensitivity and increases the expression of HIF1 α and opioid receptors in experimental rats // *Sleep Breath.* – 2015. – Vol. 19, No.2. – P. 561–568.
130. Cohen M.V., Downey J.M. Signalling pathways and mechanisms of protection in pre- and postconditioning: historical perspective and lessons for the future // *Br. J. Pharmacol.* – 2015. – Vol. 172, No.8. – P. 1913–1932.