

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ТОМСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ
ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
(Томский НИМЦ)

УДК 61:577.1

Рег. № НИОКТР: АААА-А15-115120910024-0

Рег. № ИКРБС

УТВЕРЖДАЮ

Директор Томского НИМЦ

Член-корр. РАН



В.А. Степанов

«20» января 2020 г.

ОТЧЕТ О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

РЕЦЕПТОРНЫЕ И СИГНАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ КАРДИОПРОТЕКТОРНОГО
ЭФФЕКТА СРОЧНОЙ И ДОЛГОВРЕМЕННОЙ АДАПТАЦИИ К ГИПОКСИИ
(промежуточный)


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

Л.Н. Маслов

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель НИР


Заведующий лаборатории
экспериментальной кардиологии, д-р
мед. наук, профессор


25.12.2019
подпись, дата

Л.Н. Маслов
руководство темой,
планирование
экспериментов,
подготовка статей

Ответственный исполнитель:

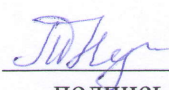
Ведущий научный сотрудник
лаборатории экспериментальной
кардиологии, д-р мед. наук


25.12.2019
подпись, дата

Н.В. Нарыжная
планирование
экспериментов,
подготовка статей,
оформление отчёта

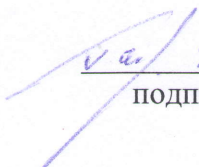
Исполнители:

Старший научный сотрудник
лаборатории экспериментальной
кардиологии, д-р биол. наук


25.12.2019
подпись, дата

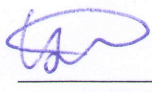
Т.В. Ласукова
планирование
экспериментов,
подготовка статей

Старший научный сотрудник
лаборатории экспериментальной
кардиологии, канд. мед. наук


25.12.2019
подпись, дата

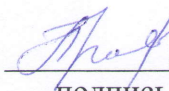
А.С. Горбунов
выполнение
экспериментов,
статистическая
обработка данных,
подготовка статей

Старший научный сотрудник
лаборатории экспериментальной
кардиологии, канд. мед. наук


25.12.2019
подпись, дата

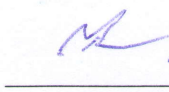
С.Ю. Цибульников
выполнение
экспериментов,
статистическая
обработка данных,
подготовка статей

Младший научный сотрудник
лаборатории экспериментальной
кардиологии, канд. мед. наук


25.12.2019
подпись, дата

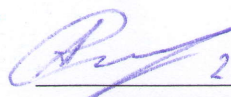
Е.С. Прокудина
статистическая
обработка данных,
подготовка статей

Лаборант - исследователь лаборатории
экспериментальной кардиологии,
кандидат медицинских наук


25.12.2019
подпись, дата

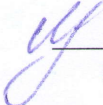
А.В. Крылатов
выполнение
экспериментов,
статистическая
обработка данных

Младший научный сотрудник
лаборатории экспериментальной
кардиологии


25.12.2019
подпись, дата

А.С. Семенцов
выполнение
экспериментов,
статистическая
обработка данных

Младший научный сотрудник
лаборатории экспериментальной



25.12.2019
подпись, дата

А.В. Мухомедзянов
выполнение

кардиологии

экспериментов,
статистическая
обработка данных,
подготовка статей

Нормоконтроль

 25.12.19

подпись, дата

Понгольская Л.В.

РЕФЕРАТ

Отчёт 58 с., 12 рис., 3 табл., 145 источн.

СЕРДЦЕ, ИШЕМИЯ, РЕПЕРФУЗИЯ, АДАПТАЦИЯ, ГИПОКСИЯ

Объектом исследования являются крысы линии Вистар.

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

В процессе работы проводились экспериментальные исследования, направленные на изучение роли опиоидных и аденозиновых рецепторов, активных форм кислорода, протеинкиназы С, NO-синтазы, а также K_{ATP} -каналов в механизме кардиопротекторного эффекта гипоксического preconditionирования

Установлено, что опиоидные и аденозиновые рецепторы, а также протеинкиназа С не участвуют в реализации кардиопротекторного эффекта гипоксического preconditionирования.

Инфаркт-лимитирующее действие гипоксического preconditionирования реализуется при участии активных форм кислорода, индуцибельной NO-синтазы и митохондриальных K_{ATP} -каналов.

Степень внедрения: публикации 15 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 Материал и методы исследования..... | 15 |
| 2 Результаты исследования и их обсуждение..... | 22 |
| 2.1. Роль аденозиновых и опиоидных рецепторов в механизме кардиопротекторного эффекта гипоксического preconditionирования.... | 22 |
| 2.2. Роль активных форм кислорода в механизме кардиопротекторного эффекта гипоксического preconditionирования..... | 24 |
| 2.3. Роль протеинкиназы С и других регуляторных киназ в механизме кардиопротекторного эффекта гипоксического preconditionирования..... | 30 |
| 2.4. Роль NO-синтазы в механизме кардиопротекторного эффекта гипоксического preconditionирования..... | 34 |
| 2.5. Роль K_{ATP} -каналов в механизме кардиопротекторного эффекта гипоксического preconditionирования..... | 36 |
| Заключение..... | 41 |
| Выводы..... | 42 |
| Список публикаций за 2019 год..... | 43 |
| Список использованных источников..... | 45 |

ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящем отчете о НИР применяют следующие термины с соответствующим определением:

| | |
|---|--|
| 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 настоящем отчете о НИР применяют следующие сокращения и обозначения:

АФК – активные формы кислорода

БСА – бычий сывороточный альбумин, V фракция

ВНС – вегетативная нервная система

ГП – гипоксическое прекондиционирование;

ГЦ – гуанилатциклаза

ЗИ/ОР – соотношение зоны инфаркта к области риска

ИП – ишемическое прекондиционирование;

К_{АТФ}-канал – АТФ-чувствительный калиевый канал

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

митоК_{АТФ}– митохондриальный АТФ-зависимый K⁺ канал

МРТ-пора – пора, изменяющая проницаемость митохондрий, mitochondrial permeability transition pore

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

Akt-киназа – киназа, выделенная из AKRthymomacells

DMSO – диметилсульфоксид

EGFR-рецептор – рецептор к эндотелиальному фактору роста

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

GSK3β – киназагликогенсинтазы 3β

HIF1α – гипоксия-индуцируемый фактор транскрипции 1α

HMR – HMR 1098 (Clamikalantsodium)

iNOS – индуцибельная NO-синтаза

L-NAME – Nω-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

2-МППГ – 2-меркаптопропионил глицин;

5-ГД – 5-гидроксидеканоат

8-SPT – 8-(p-сульфофенил)теофиллин;

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. В России внутригоспитальная 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 прекодиционирование 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 [3-5]. 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 G_i/o -белок-связанных рецепторов (опиоидных, брадикининовых, аденозиновых) на внутриклеточные эффекторы: mPTP-пора (mitochondrial permeability transition pore), K_{ATP} -каналы (АТФ-чувствительный K^+ -каналы) [6-8]. Такая гипотеза базируется на результатах анализа литературы [6, 7], [9-12], посвященной механизмам ишемического прекодиционирования, кардиопротекторный эффект которого реализуется через активацию PI3-протеинкиназы (phosphatidylinositol-3-kinase), тирозинкиназ и протеинкиназы С (ПКС). Основываясь на сходстве основных проявлений (антинекротический, антиаритмический, инотропный эффекты) кардиопротекторного действия хронической гипоксии и прекодиционирования, 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 (отсроченное) 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 отсроченному ГП [18-22] 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 2019 году:

1. Выяснить рецепторный механизм срочной адаптации к гипоксии

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 [25-27].

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 [30-34], [25-27]. 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 [35-40]. 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 [41-48], [25-27].

В 1994 г в Японии на модели тотальной ишемии изолированного миокарда было впервые показано кардиопротекторное действие хронической нормобарической гипоксии [49]. 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 [50-58], [13]. В пользу такой точки зрения говорят такие факты, как (1) возрастание уровня опиоидов в крови и тканях крыс при адаптации к стрессу [50]; (2) уменьшение чрезмерной реакции организма на экстремальные факторы под действием экзогенных опиоидов; (3) наличие кардиопротекторной, инфаркт-лимитирующей и антиаритмической активности у природных и синтетических лигандов опиоидных рецепторов [51, 55-57, 13]. Об этом же свидетельствует и увеличение плотности опиоидных рецепторов на мембранах кардиомиоцитов и структур головного мозга у животных, адаптированных к стрессу [59]. Участие опиоидных рецепторов в формировании кардиопротекторного влияния ишемического пре- или посткондиционирования, в том числе и на модели изолированного сердца, подтверждает возможную роль опиоидной системы в адаптивных процессах на органном и клеточном уровнях [7, 58, 60, 61].

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 К-каналы (митоK_{АТФ}-каналы) и mPTP-поры (mitochondrial permeability transition pore) [4]. 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 [62], а также гексокиназы и фосфорилированной (активированной) Акт-киназы (киназа, выделенная из AKR thymomacells) в миокарде экспериментальных животных [33, 34]. Одновременно с этим в кардиомиоцитах происходит активация синтеза противоапоптотических белков, ферментов антиоксидантной системы и энергетического метаболизма [34, 63, 64]. Инфаркт-лимитирующий эффект хронической гипоксии 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, А1-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 [65] и кардиопротекторного действия ГП на изолированном сердце крысы [66]. Можно предположить, что ключевую роль в формировании кардиопротекторного эффекта ГП играют аденозиновые А2-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, не исследована [67, 68].

Об участии активные формы кислорода (АФК) в механизмах формирования адаптивной реакции миокарда впервые сообщили в 1988 г. [69]. Позднее было установлено, что АФК являются триггерами кардиопротекторного действия ишемического прекондиционирования [70]. Однако участие АФК в кардиопротекторном эффекте ГП обнаружено лишь *in vitro*, в опытах на изолированных кардиомиоцитах цыпленка [71]. 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 [71]. Сходные результаты получены на модели гипоксии-реоксигенации изолированных неонатальных

кардиомиоцитов крысы [72]. Интересные данные были опубликованы G. Lebuffe и соавт. в 2003 г. [73]. 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 [73]. 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 [73]. Помимо этих данных участие оксида азота и NO-синтазы в механизме реализации протекторного эффекта ГП подтверждено рядом исследовательских работ, выполненных *in vitro* на срезах сердца крысы [74], модели изолированного сердца мыши, изолированных кардиомиоцитах [21]. Однако остается неподтвержденным участие NO-синтазы в инфаркт-лимитирующем действии ГП и неясным, какие изоформы NO-синтазы участвуют в реализации этого эффекта.

О роли АТФ-зависимых калиевых каналов (K_{АТФ}-каналов) в механизме ГП свидетельствует ряд исследований [72-76]. В экспериментах на изолированных кардиомиоцитах крысы показано, что блокада K_{АТФ}-каналов перед ГП приводит к предупреждению формирования цитопротекторного эффекта, и наоборот, добавление в среду инкубации активатора данных каналов увеличивает устойчивость клеток к действию длительной аноксии и реоксигенации [73, 75, 76]. Подтверждение этим данным приводят Gong K.Z. и соавт. [72]. В 2003 г. Lebuffe G. и соавт. обнаружили, что защитный эффект, аналогичный влиянию ГП, возникал при 10-минутной инкубации культуры клеток в присутствии активатора K_{АТФ}-каналов пинацидила [73]. 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 Материал 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. Инфаркт-лимитирующий эффект ГП исследовали на модели локальной 45-минутной коронароокклюзии и 120-минутной реперфузии *in vivo*. Коронароокклюзию проводили через 30 мин после окончания ГП. Величину повреждения миокарда оценивали по соотношению зоны инфаркта к области риска (ЗИ/ОР). Областью риска называли область миокарда, которая подверглась воздействию коронароокклюзии. Кардиопротекторный эффект раннего ГП заключался в уменьшении соотношения ЗИ/ОР относительно контрольных значений.

Для изучения роли опиоидных и аденозиновых рецепторов адаптированным животным за 15 мин до ГП вводили антагонисты соответствующих рецепторов. Участие протеинкиназы С и различных изоформ NO-синтазы в сигнальном механизме ГП определяли путем блокирования этих ферментов за 15 мин до адаптации, либо за 10 мин до коронароокклюзии соответствующими неселективными и селективными ингибиторами. О роли сарколеммальных и митохондриальных K_{ATP} -каналов судили, вводя селективные и неселективные блокаторы данных клеточных структур за 15 мин до адаптации, либо за 10 мин до коронароокклюзии. Роль АФК в сигнальном механизме ГП изучали, вводя внутривенно или внутривентально антиоксиданты за 10 мин до адаптации, либо за 10 мин до коронароокклюзии. Во всех случаях основным критерием оценки эффективности адаптации служило изменение инфаркт-лимитирующего эффекта ГП до и после использования различных фармакологических агентов. Участие кислородных радикалов в сигнальном механизме ГП дополнительно подтверждали, определяя общий уровень содержания АФК и количество перекиси водорода (H_2O_2) в тканях миокарда во время ГП.

Все животные были разделены на 30 экспериментальных групп. Общее количество животных составило 576 (таблица 1).

Таблица 1 – Распределение животных по экспериментальным группам

| № группы | Описание экспериментальной группы | Количество животных в группе |
|----------|--|------------------------------|
| 1 | Интактные крысы | 12 |
| 2 | Контрольные животные, коронароокклюзия-реперфузия | 132 |
| 3 | ГП, коронароокклюзия-реперфузия | 108 |
| 4 | ГП (1 цикл) | 12 |
| 5 | ГП (3 цикл) | 12 |
| 6 | ГП (6 цикл) | 12 |
| 7 | 8-(p-сульфофенил)теофиллин, коронароокклюзия-реперфузия | 12 |
| 8 | ГП, 8-(p-сульфофенил)теофиллин до адаптации, коронароокклюзия-реперфузия | 12 |
| 9 | ГП, 8-(p-сульфофенил)теофиллин после адаптации, коронароокклюзия-реперфузия | 12 |
| 10 | Налтрексон, коронароокклюзия-реперфузия | 12 |
| 11 | ГП, налтрексон до адаптации, коронароокклюзия-реперфузия | 12 |
| 12 | Налтрексон после адаптации, коронароокклюзия-реперфузия | 12 |
| 13 | N-(2-меркаптопропионил)глицин, коронароокклюзия-реперфузия | 12 |
| 14 | Темпол, коронароокклюзия-реперфузия | 12 |
| 15 | Тролокс, коронароокклюзия-реперфузия | 12 |
| 16 | Диметилтиомочевина, коронароокклюзия-реперфузия | 12 |
| 17 | ГП, N-(2-меркаптопропионил)глицин до адаптации, коронароокклюзия-реперфузия | 12 |
| 18 | ГП, N-(2-меркаптопропионил)глицин после адаптации, коронароокклюзия-реперфузия | 12 |
| 19 | ГП, темпол до адаптации, коронароокклюзия-реперфузия | 12 |
| 20 | ГП, тролокс до адаптации, коронароокклюзия-реперфузия | 12 |
| 21 | ГП, диметилтиомочевина до адаптации, коронароокклюзия-реперфузия | 12 |
| 22 | ГП, хелеритрин до адаптации, коронароокклюзия-реперфузия | 12 |
| 23 | ГП, L-NAME до адаптации, коронароокклюзия-реперфузия | 12 |
| 24 | ГП, L-NAME после адаптации, коронароокклюзия-реперфузия | 12 |
| 25 | ГП, S-метилтиомочевина до адаптации, коронароокклюзия-реперфузия | 12 |
| 26 | ГП, 7-нитронизадол до адаптации, коронароокклюзия-реперфузия | 12 |
| 27 | ГП, глибенкламид до адаптации, коронароокклюзия-реперфузия | 12 |
| 28 | ГП, глибенкламид после адаптации, коронароокклюзия-реперфузия | 12 |
| 29 | ГП, 5-гидроксидеканоат, коронароокклюзия-реперфузия | 12 |
| 30 | ГП, HMR 1098 до адаптации, коронароокклюзия-реперфузия | 12 |

Моделирование раннего гипоксического прекондиционирования. Раннее ГП моделировали, помещая крысу на 10 мин в герметичный сосуд объёмом 3,3 литра, где в течение 1 мин создавали воздушную среду, содержащую 8% O₂, 0,9% CO₂ и 91,1% N₂. Через 10 мин концентрация кислорода снижалась до 7,3%, а уровень CO₂ повышался до 1,3%. Уровень кислорода и углекислого газа определяли с помощью газоанализатора Stat Profile M (Nova Biomedical Corporation, Waltham, USA). За гипоксией следовала 10-минутная реоксигенация атмосферным воздухом. Для изучения сигнального механизма инфаркт-лимитирующего эффекта ГП моделировали 6 сеансов гипоксии-реоксигенации (рисунок 1).



Рисунок 1 – Дизайн исследования механизмов инфаркт-лимитирующего действия раннего гипоксического прекондиционирования

Примечание - заштрихованные области - периоды гипоксии.

Моделирование длительной локальной ишемии-реперфузии. Моделирование ишемии (45 мин) и реперфузии (120 мин) проводилось по методу J. E. J Schultz и соавт. [77].

В качестве наркоза использовалась α -хлоралоза, которую вводили внутривенно в дозе 60 мг/кг. Животных подключали к аппарату искусственной вентиляции легких SAR-830/P ("CWE, Inc.", Ardmore, PA19003 USA) посредством введения в трахеотомическое отверстие трубки для интубации. Животным проводили торакотомию на уровне 2 - 3 ребер и перевязывали левую нисходящую коронарную артерию на несколько мм ниже ее выхода из аорты.

Ишемию идентифицировали по наличию эпикардального цианоза, а также подъему сегмента ST [77]. У подопытных животных записывали показания электрокардиограммы (ЭКГ) на протяжении всего эксперимента. Регистрацию ЭКГ

проводили с помощью аппарата для электрофизиологических исследований MP-35 (“BIOPAC Systems, Inc.”, Goleta, California, USA). Возобновление коронарного кровотока после 45 мин ишемии воспроизводили за счет снятия лигатуры с коронарной артерии.

Определение размера инфаркта миокарда. По окончании реперфузии сердце вынимали из грудной клетки и промывали ретроградно через аорту физиологическим раствором. Для верификации зоны риска (ЗР) лигатуру вновь затягивали, и струйно через аорту сердце окрашивали 5% раствором перманганата калия [3]. Часть миокарда, которая подверглась действию коронароокклюзии и реперфузии определяется как зона риска. Затем сердце промывали от остатков перманганата калия физиологическим раствором и делали срезы толщиной в 1 мм перпендикулярно к продольной оси с помощью слайсера HSRA001-1 (ZivicInstruments, Pittsburgh, США). Для того, чтобы отграничить зону некроза от зоны риска производили окрашивание с помощью 1%-ого раствора 2,3,5-трифенил тетразолия хлорида в течение 30 минут при 37°C. Суть метода заключается в том, что 2,3,5-трифенил тетразолия хлорид способен приобретать стойкую окраску при переходе из окисленного состояния в восстановленное под действием дегидрогеназ. Поскольку в погибших кардиомиоцитах отсутствовали дегидрогеназы, некротизированный миокард не окрашивался. После окрашивания 2,3,5-трифенил тетразолия хлоридом срезы на 1 сутки помещали в 10% раствор формальдегида. На следующий день каждый срез сканировали с обеих сторон с помощью сканера HP Scanjet G4050. Размер ЗР и зоны инфаркта (ЗИ) определяли компьютеризированным планиметрическим методом, для этого использовалось оригинальное программное обеспечение. Размер ЗИ выражали в процентах от размера ЗР, как соотношение ЗИ/ЗР.

Метод определения активных форм кислорода в миокарде. Через 5 мин после последнего сеанса гипоксии крыс декапитировали под общим эфирным наркозом, сердце извлекали, подвешивали за аорту на канюле и ретроградно промывали 20 мМ буферным раствором Tris (+4 °C), удаляя остатки крови из коронарных сосудов и камер сердца. Состав промывочного буферного раствора: 137 мМ NaCl, 20 мМ Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane), pH 7,4 при +37 °C.

От миокарда левого желудочка и верхней части перегородки сердца отсекали образцы общей массой 200-250 мг, которые быстро гомогенизировали в 1,5 мл промывочного буфера механическим диспергатором Ultra-Turrax model T10B (“IKA-Werke GmbH & Co. KG”, Staufen, Germany). Гомогенизацию осуществляли в течение 30 с, скорость вращения насадки диспергатора составляла 10000 мин-1.

Из полученного гомогената отбирали 3 пробы: 1) проба на DCF – 700 мкл; 2) проба на Amplex Red – 700 мкл; 3) проба на белок – 100 мкл. В пробу на Amplex Red добавляли

7 мкл 2 М азиды натрия (NaN_3 ; ингибитор пероксидазы) и 7 мкл 0,15 М дефероксамина мезилата (deferoxamine mesylate; хелатор ионов железа). Пробы на DCF и Amplex Red центрифугировали 3 мин на 1000g (3800 об/мин) при $+4^\circ\text{C}$ и отбирали из них 500 мкл надосадочной жидкости. Все образцы немедленно замораживали вертикально в жидком азоте и хранили до конца исследования при -70°C .

Определение общего уровня АФК в пробах проводили, используя модифицированный метод окрашивания дигидродихлорфлуоресцеин диацетатом [78, 79]. Известно, что стабильный нефлуоресцирующий 2',3' дигидродихлорфлуоресцеин диацетат ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$) захватывается клетками, в присутствии внутриклеточных эстераз отсоединяет ацетатную группу и под действием различных типов АФК окисляется до флуоресцирующего 2',7'-дихлорфлуоресцина (DCF) [80].

Реагент $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ растворяли в этаноле в концентрации 12,5 мМ и хранили в темноте при -80°C . Непосредственно перед применением раствор $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ доводили калий-фосфатным буфером (0,1 М KH_2PO_4 , 0,1 М KOH , pH 7,4 при 37°C) до концентрации реагента 125 мкМ. В черный 96-луночный микропланшет вносили 140 мкл калий-фосфатного буфера, 20 мкл надосадка и 40 мкл 125 мкМ раствора $\text{H}_2\text{DCF-DA}$. Таким образом, после добавления в планшет конечная концентрация $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ составляла 25 мкМ. Определение проводили с внутренним стандартом, поскольку для полноценного свечения DCF-DA должен быть деэстерифицирован эстеразами ткани (надосадочной жидкости). Для стандартизации использовали 20 мкл 0,03% H_2O_2 (конечная концентрация после внесения в планшет – 0,003% или 0,0882 мМ/л). Флуоресценцию измеряли каждые 5 мин в течение 20 циклов (1,5 ч), температура инкубации в приборе составляла 37°C , длина волны возбуждения – 485 нм, излучения – 538 нм.

Содержание пероксида водорода (H_2O_2) в пробах определяли с помощью Amplex Red по методу, описанному S. Dikalov и соавт. [81, 82]. Известно, что не способный к флуоресценции N-ацетил-3,7-дегидроксифеноксазин (N-acetyl-3, 7-dihydroxyphenoxazine; Amplex Red) под действием продуктов реакции H_2O_2 с пероксидазой хрена переходит во флуоресцирующий резорифин (resorufin) [81, 83].

Как отмечалось ранее, после отбора супернатанта в пробы на Amplex Red вносили по 7 мкл 2 М NaN_3 и 0,15 М дефероксамина. Рабочий раствор (pH 7,4 при 37°C) содержал 145 мМ NaCl , 4,86 мМ KCl , 5,7 мМ NaH_2PO_4 , 0,54 мМ CaCl_2 , 1,22 мМ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 11 мМ глюкозы, 0,15 мМ дефероксамина мезилата и 20 мМ NaN_3 . Пероксидазу хрена предварительно разводили в рабочем растворе до концентрации 20 Е/мл, Amplex Red – в DMSO до концентрации 1 мМ. Реакционная смесь представляла собой рабочий раствор,

содержащий 0,2 Е/мл пероксидазы хрена и 10 мкМ Amplex Red. В качестве стандарта использовали свежеприготовленный раствор H_2O_2 со светопоглощением на 240 нм (коэффициент экстинкции 43,6 $M^{-1} \cdot cm^{-1}$). Определение проводили в черных микропланшетах, добавляя 100 мкл пробы, либо стандарта и 100 мкл реакционной смеси. Флуоресценцию измеряли каждые 2 мин в течение 30 мин, температура инкубации в приборе составляла 37°C, длина волны возбуждения – 530 нм, излучения – 590 нм.

Количество АФК в пробах нормализовали по содержанию белка в гомогенате. Определение количества белка производили по методу Бредфорда, с использованием спектрофотометра SmartSpec Plus (“Bio-Rad Laboratories, Inc.”, Hercules, USA) [84].

Исследование гемодинамики. Измерение артериального давления (АД) производили прямым методом путем канюлирования правой сонной артерии. Доступ к артерии осуществляли в области прикрепления грудино-ключично-сосцевидной мышцы. Под артерию подводили две лигатуры, дистальную лигатуру при этом затягивали. На 1 см проксимальнее затянутой лигатуры на артерию и близлежащие ткани накладывался зажим, и на участке между двумя лигатурами делали небольшой надрез. В просвет артерии вводили специальный расширитель и канюлю. Затем расширитель убирали, и канюлю фиксировали в артерии с помощью лигатуры. Канюлю подсоединяли к датчику давления SS13L (Biopac System Inc., Goleta, Калифорния, США) и перистальтическому насосу Minipuls Evolution (Gilson inc., Middleton, США), который осуществлял подачу физиологического раствора для предотвращения образования тромбов в канюле. Регистрация данных осуществляли с помощью аппарата для электрофизиологических исследований MP35 (Biopac System Inc., Goleta, США). Запись и обработку полученных данных осуществляли с помощью программного обеспечения INSTBSL-W компании Biopac System Inc., (Goleta, США).

Фармакологические агенты. Рецепторный механизм ГП изучали, используя следующие фармакологические агенты:

- 1) Налтрексон – неселективный антагонист всех типов опиоидных рецепторов использовался в дозе 2 мг/кг [85];
- 2) 8-SPT (8-(p-Sulfophenyl)theophylline hydrate solid) - неселективный антагонист всех типов аденозиновых рецепторов использовался в дозе 7,5 мг/кг [86, 87];
- 3) 2 – МППГ (N-(2-меркаптопропионил)глицин) – гидрофильный тиоловый антиоксидант использовался в дозе 20 мг/кг [88].
- 4) Тролокс ((±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid) – водорастворимый антиоксидант использовался в дозе 2,5 мг/кг [89];

- 5) Темпол (1-oxyl-2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine) – водорастворимый антиоксидант использовался в дозе 30 мг/кг [90];
- 6) Диметилтиомочевина (N,N'-Dimethylthiourea) – гидрофильный антиоксидант использовался в дозе 300 мг/кг внутрибрюшинно [91];
- 7) Хелеритрин (1,2-dimethoxy-N-methyl(1,3)benzodioxolo(5,6-c)phenanthridinium chloride) – ингибитор протеинкиназы C использовался в дозе 5 мг/кг [85];
- 8) L-NAME (N- ω -nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride) – неселективный ингибитор NO-синтазы использовался в дозе 10 мг/кг [92-94];
- 9) S-метилтиомочевина (S-Methylisothiourea hemisulfate salt; 2-Methyl-2-thiopseudourea hemisulfate salt; S-Methyl-ITU) - селективный ингибитор индуцибельной NO-синтазы (iNOS) использовался в дозе 3 мг/кг [95];
- 10) 7 – нитронидазол (7-Nitroindazole; 7-NI) - селективный ингибитор нейрональной NO-синтазы (nNOS) использовался в дозе 50 мг/кг [94];
- 11) Глибенкламид (5-chloro-N-[4-(cyclohexylureidosulfonyl)phenethyl]-2-methoxybenzamide; Glyburide; N-p-[2-(5-Chloro-2-methoxybenzamido)ethyl]benzenesulfonyl-N'-cyclohexylurea)) - блокатор всех типов K_{ATP} -каналов использовался в дозе 0,3 мг/кг [77, 85];
- 12) 5-гидроксидеканоат (5-hydroxydecanoic acid sodium salt) - блокатор митохондриальных K_{ATP} -каналов использовался в дозе 5 мг/кг [85, 96].
- 13) HMR 1098 (Clamikalant sodium) - блокатор сарколеммальных K_{ATP} -каналов использовался в дозе 10 мг/кг [97].

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

2 Результаты исследования и их обсуждение

2.1 Роль аденозиновых и опиоидных рецепторов в механизме кардиопротекторного эффекта гипоксическом preconditionировании

Общеизвестно, что в ишемическом preconditionировании (ИП), важную роль играет эндогенный аденозин [70]. В связи с этим исследователи, занимающиеся проблемой гипоксического preconditionирования, обратили свое внимание на этот нуклеозид. Так, физиологи попытались выяснить, участвует ли аденозин в ИП [66]. Их исследования, проведенные на изолированном перфузируемом сердце крысы, показали, что ИП (5-минут гипоксической перфузии перед 25-минутной глобальной ишемией) способствовало улучшению насосной функции сердца в реперфузионном периоде и обеспечивало уменьшение реперфузионного выброса ЛДГ и КФК. Антагонист аденозиновых рецепторов 8-(p-sulphophenyl)-theophylline (8SPT) устранял все указанные позитивные эффекты ИП [66]. Важная роль аденозина в ИП была подтверждена в независимых исследованиях, выполненных на изолированных кардиомиоцитах [98]. Исследователи из Чикаго в опытах на изолированных клетках сердца показали, что аденозин может имитировать феномен ИП [75]. Следует заметить, что все эти работы были проведены *in vitro* на изолированных кардиомиоцитах и изолированном сердце и до настоящего времени в литературе не было данных о роли аденозина в ИП *in vivo*. В нашем исследовании оценивали триггерную или медиаторную роль аденозиновых рецепторов в формировании инфаркт-лимитирующего действия раннего ИП *in vivo*. Инфаркт-лимитирующий эффект ИП проявлялся в снижении размера некроза миокарда после 45 мин ишемии и 120 мин реперфузии с 58% (от размера зоны риска) в контрольной группе (неpreconditionированные животные) до 35% в группе ИП. Таким образом размер инфаркта у крыс, подвергнутых ИП оказался меньше на 40%. Блокатор аденозиновых рецепторов 8-SPT не устранял инфаркт-лимитирующий эффект ИП, как при введении за 15 мин до начала моделирования ИП (размер некроза миокарда составлял 36% от зоны риска), так и в случае, когда 8-(p-сульфофенил)теофиллин применяли после адаптационного воздействия (размер некроза 36%) (рисунок 2). При этом ингибирование аденозиновых рецепторов у непреconditionированных крыс не повлияло на размер некроза миокарда, 8-(p-сульфофенил)теофиллин в использованных дозировках не обладал выраженным инфаркт-лимитирующим эффектом (рисунок 2). Полученные результаты не позволяют нам говорить об участии аденозина в формировании инфаркт-лимитирующего действия ИП.

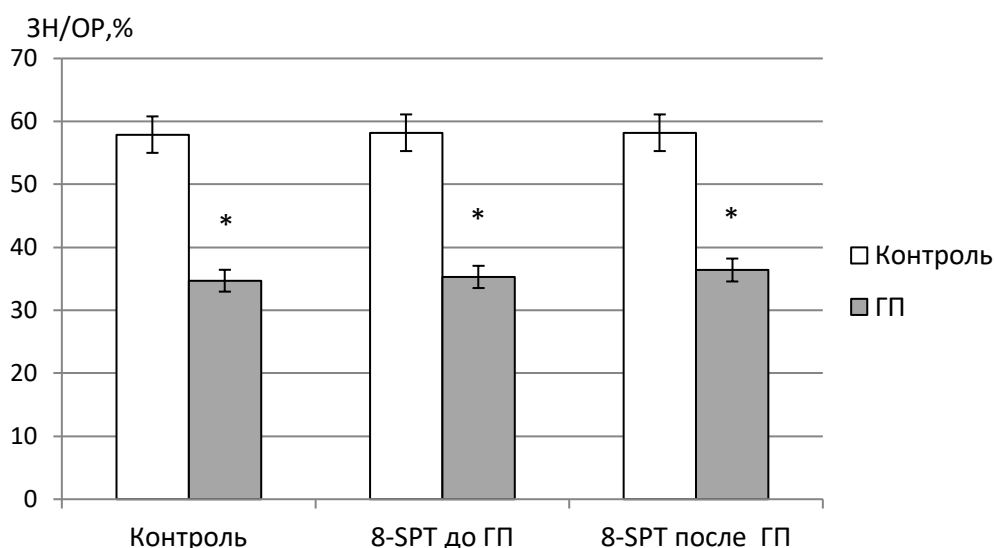


Рисунок 2 – Влияние блокатора аденозиновых рецепторов 8-(p-сульфофенил) теофиллина на размер инфаркта у крыс, подвергнутых гипоксическому прекондиционированию (M±SEM)

Примечание - ГП – раннее гипоксическое прекондиционирование; ЗН/ОР – отношение зоны некроза к области риска; 8-SPT – 8-(p-сульфофенил)теофиллин применяли в дозе 7,5 мг/кг, внутривенно за 15 мин до ГП, либо после ГП за 10 мин до коронароокклюзии; *p < 0,05 – уровень значимости различий.

Хорошо известно, что опиоидные рецепторы и эндогенные опиоидные пептиды вовлечены в реализацию срочных адаптивных феноменов ишемического прекондиционирования, ишемического посткондиционирования и дистантного прекондиционирования. Так, в 90-е годы прошлого века было обнаружено, что предварительное введение налоксона предупреждает развитие инфаркт-лимитирующего действия ИП на модели острой коронароокклюзии-реперфузии *in vivo* [99]. Группа ученых под руководством проф. G.J. Gross обнаружили периферическую локализацию ОР, опосредующих кардиопротекторный эффект ИП и впоследствии выявили рецепторную природу участия опиоидов в ИП, показав отсутствие кардиопротекторного эффекта ИП на фоне блокады δ -ОР [67, 77]. Эти данные были подтверждены на модели прекондиционирования кардиомиоцитов [100].

Таким образом, мы можем уверенно говорить об участии опиоидных рецепторов в процессах формирования устойчивости миокарда при кратковременных адаптирующих воздействиях. Однако в литературе не оказалось сведений о том, участвуют ли названные пептиды в гипоксическом прекондиционировании. Исследование участия опиоидных рецепторов в триггерном и медиаторном механизме инфаркт-лимитирующего эффекта раннего гипоксического прекондиционирования показали, что введение антагониста опиоидных рецепторов налтрексона как до моделирования ГП, так и перед началом ишемии миокарда, не изменяло размер некроза миокарда при коронароокклюзии-

реперфузии по сравнению с животными, подвергнутыми ГП (рисунок 3). Следует отметить, что налтрексон в указанных выше дозировках не обладал инфаркт-лимитирующим эффектом (рисунок 3), поэтому полученные нами данные нельзя объяснить собственным влиянием налтрексона на размер очага некроза.

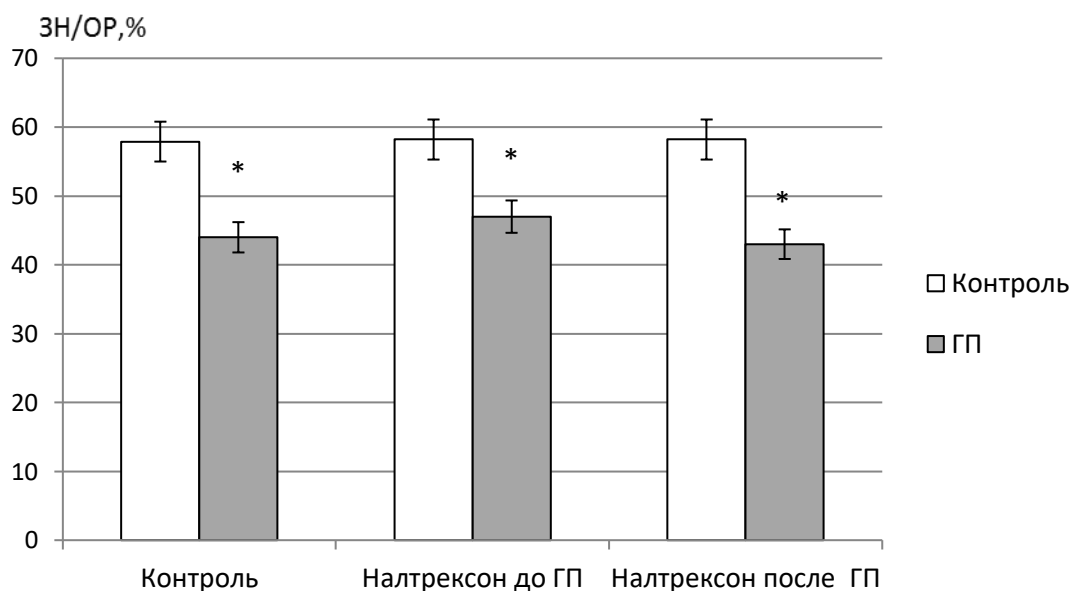


Рисунок 3 – Влияние блокатора опиоидных рецепторов налтрексона на размер инфаркта у крыс, подвергнутых гипоксическому прекондиционированию ($M \pm SEM$)

Примечание – ГП – раннее гипоксическое прекондиционирование; ЗН/ОР – отношение зоны некроза к области риска; налтрексон применяли в дозе 2 мг/кг, внутривенно за 15 мин до ГП, либо после ГП за 10 мин до коронароокклюзии; * $p < 0,05$ – уровень значимости различий.

На основании приведенных данных мы можем заключить, что опиоидные и аденозиновые рецепторы не принимают участие в триггерном или медиаторном механизмах формирования инфаркт-лимитирующего эффекта раннего ГП. Таким образом, рецепторное звено формирования инфаркт-лимитирующего действия ГП остается не выявленным. Возможно, оно представлено рецепторами брадикинина или каннабиноидными рецепторами, важная роль которых показана в формировании инфаркт-лимитирующего эффекта ишемического прекондиционирования [101]. Кроме того, была показана возможность «запуска» адаптивных изменений окситоцином и эритропоэтином [102].

2.2 Роль активных форм кислорода в механизме кардиопротекторного эффекта гипоксического прекондиционирования

Несмотря на устоявшееся мнение о том, что активные формы кислорода, образующиеся в миокарде при ишемии-реперфузии, усугубляют повреждение

кардиомиоцитов, в последние годы появился ряд работ, в которых обнаружена важная триггерная роль АФК в адапционных реакциях [103, 104]. Так, еще в 1988 г. в опытах на собаках было показано, что совместное применение супероксиддисмутазы и каталазы частично устраняет инфаркт-лимитирующий эффект ишемического прекондиционирования [69]. Позднее было показано, что активные формы кислорода (АФК) играют триггерную роль в ишемическом прекондиционировании [70] и в кардиопротекторном эффекте адаптации к гипоксии [105]. Неудивительно, что исследователи, занимающиеся проблемой ГП, обратили внимание на АФК [71, 72]. В 1998 г. были опубликованы результаты экспериментов на изолированных кардиомиоцитах цыпленка [71]. Клетки подвергали воздействию 60-минутной гипоксии и последующей реоксигенации. Гипоксическое прекондиционирование воспроизводили с помощью одного сеанса 10-минутной гипоксии. Продукцию АФК оценивали при помощи 2,3-дигидродихлофлуоресцина, который флуоресцирует при взаимодействии с H_2O_2 [71]. Оказалось, что ГП увеличивает выживаемость клеток сердца после ГР. Кроме того, при ГП было зафиксировано усиление флуоресценции 2,3-дигидродихлофлуоресцина. Добавление в среду инкубации кардиомиоцитов перед ГП восстановителя тиольных групп 2-меркаптопропионил глицина или ингибитора цитозольной супероксиддисмутазы (СОД) диэтилдитиокарбомата полностью устраняло цитопротекторный эффект ГП. Названные ингибиторы блокировали усиление продукции H_2O_2 во время прекондиционирования [71]. Ингибитор комплекса III дыхательной цепи митохондрий миксотиазол подавлял флуоресценцию 2,3-дигидродихлофлуоресцина. Более того, добавление экзогенной H_2O_2 имитировало феномен ГП [71]. Авторы полагают, что события в клетке при ГП развиваются следующим образом: ГП \rightarrow дыхательная цепь $\rightarrow O_2^{\cdot-} \uparrow \rightarrow$ СОД $\rightarrow H_2O_2 \uparrow \rightarrow$ активация редокс-чувствительных киназ \rightarrow кардиопротекция. Представленные факты говорят о том, что АФК играют триггерную роль в гипоксическом прекондиционировании. Однако участие АФК в механизме запуска или реализации инфаркт-лимитирующего действия ГП оставалось неизвестным.

Для оценки роли АФК в инфаркт-лимитирующем действии раннего ГП *in vivo* мы определяли содержание активных форм кислорода в ткани миокарда по флуоресценции 2,3-дигидродихлофлуоресцеина и селективного чувствительного к H_2O_2 флуоресцентного зонда AmplexRed (рисунок 4) и оценивали инфаркт-лимитирующее действие ГП при введении гидрофильного тиолового антиоксиданта 2-меркаптопропионил глицина (2-МППГ) за 15 мин до моделирования ГП и после окончания процедуры ГП, за 10 мин до ишемии (Рис. 4). Кроме того, инфаркт-лимитирующий эффект ГП оценивали на фоне применения прямых антиоксидантов тролокса (2,5 мг/кг),

темпола (30 мг/кг) и диметилтиомочевины (DMTU, 300 мг/кг), которые вводили крысам за 10 мин до моделирования ГП.



Рисунок 4 – Дизайн исследования участия активных форм кислорода в инфаркт-лимитирующем действии раннего гипоксического прекондиционирования

Результаты исследования показали двукратное возрастание АФК в ткани миокарда после 1 сеанса гипоксии-реоксигенации животного (Рис. 5). Высокий уровень АФК сохранялся после 3-го сеанса ГП, однако оказался снижен практически до интактных значений по окончании 6 сеанса прекондиционирования (рисунок 5). Применение антиоксиданта 2-МППГ предупреждало рост образования АФК в миокарде при моделировании ГП (Рис 5).

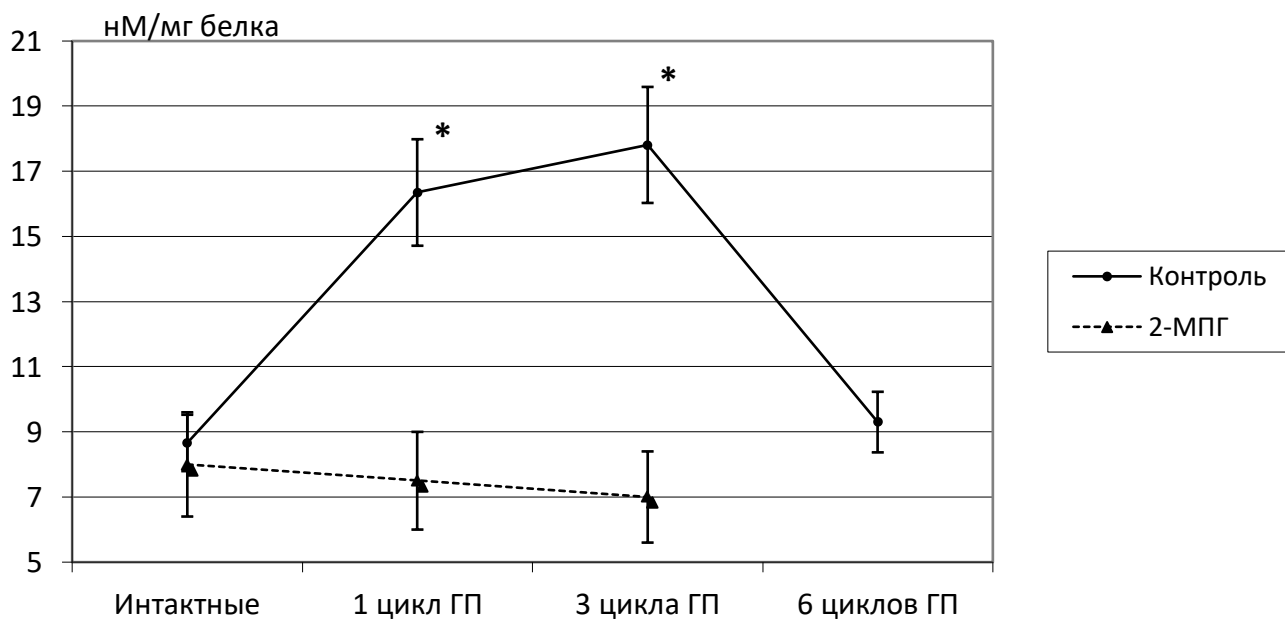


Рисунок 5 – Содержание активных форм кислорода в ткани миокарда крыс в динамике проведения гипоксического preconditionирования (M±SEM)

Примечания: - ГП – раннее гипоксическое preconditionирование; * - p<0,01 достоверность относительно интактных крыс. 2-МППГ – n-(2-меркаптопропионил)-глицин, вводили в дозе 20 мг/кг внутривенно за 15 минут до ГП.

Исследование содержания перекиси водорода в миокарде крыс показало ее значимое повышение после 3 цикла ГП (таблица 2). Применение 2-МППГ предупреждало рост этого радикала при ГП.

Таблица 2 – Содержание H₂O₂ в миокарде крыс в динамике ГП и на фоне применения антиоксиданта 2-МППГ (M ± SEM)

| Серии | H ₂ O ₂ , пМ/г белка |
|---------------------------|--|
| Интактные, n=12 | 0,013 ± 0,0015 |
| ГП 1 цикл, n=12 | 0,015 ± 0,0012 |
| ГП 3 цикла, n= 10 | 0,020 ± 0,0032, p=0,049 |
| ГП 6 циклов, n=11 | 0,016 ± 0,002 |
| ГП 3 цикла + 2-МППГ, n=12 | 0,011 ± 0,0017, p1=0,019 |

Примечания - Содержание перекиси водорода оценивали в реакции с AmplexRed (Invitrogen). P-значимость отличий к интактным крысам, p1 – к группе ГП. 2-МППГ – n-(2-меркаптопропионил)-глицин, вводили в дозе 20 мг/кг внутривенно за 15 минут до ГП.

Поскольку данные литературы свидетельствуют о кардиопротекторных свойствах антиоксидантов, нами был исследован их возможный инфаркт-лимитирующий эффект у интактных крыс. Как показано в таблице 3, 2-МППГ, тролокс, темпол или DMTU не влияли на размер инфаркта в используемых нами дозах. Это согласуется с данными других исследователей [88, 106], но противоречит распространённой точке зрения о том, что антиоксиданты повышают толерантность сердца к действию ишемии и реперфузии. Этому противоречию может быть два возможных объяснения: первое - OH• не проявляет цитотоксических свойств. Однако подобная трактовка представляется сомнительной, поскольку OH• как раз присущи цитотоксические свойства [107]. Второе – может быть, при ГП, коронароокклюзии и реперфузии OH• вырабатывается в количествах, достаточных для реализации сигнальных эффектов, но слишком малых для проявления кардиотоксического действия. В то же время мы выявили выраженное антиоксидантное действие 2-МППГ, введение этого препарата до моделирования ГП предупреждало образование АФК в ткани миокарда (таблица 3).

Таблица 3 – Влияние антиоксидантов на размер инфаркта неадаптированных крыс (M±SEM)

| Серия | Контроль | 2-МПП | Тролокс | Темпол | DMTU |
|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|
| ЗН/ОР (%) | 59,5 ± 2,3 | 61,5 ± 2,6 | 58,3 ± 1,9 | 57,2 ± 2,3 | 59,1 ± 3,3 |

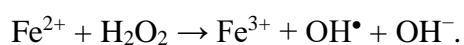
Примечание - Антиоксиданты 2-МПП – n-(2-меркаптопропионил)-глицин (20 мг/кг, n=14); тролокс (2,5 мг/кг, n=12); темпол (30 мг/кг, n=15); DMTU – диметилтиомочевина (300 мг/кг, n=12) вводили внутривенно за 10 мин до ИР.

Моделирование коронароокклюзии-реперфузии у крыс, подвергнутых ГП, приводило к формированию меньшего размера инфаркта, чем у контрольных животных. Этот инфаркт-лимитирующий эффект не наблюдали, если перед ГП крысам вводили антиоксидант 2-МПП (рисунок 6). Однако, если 2-МПП был введен после завершения процедуры ГП, инфаркт-лимитирующее действие ГП сохранялось. Полученные данные свидетельствуют о том, что выработка кардиомиоцитами АФК является триггерным, но не медиаторным звеном механизма инфаркт-лимитирующего действия раннего ГП.

Последующие исследования показали, что введение антиоксидантов тролокса или темпола перед ГП не предупреждают развитие инфаркт-лимитирующего действия раннего ГП. В то же время на фоне введения диметилтиомочевины (DMTU) инфаркт-лимитирующий эффект ГП не формируется (рисунок 7). Эти результаты становятся понятными, если принимать во внимание специфичность действия используемых антиоксидантов.

Известно, что 2-МПП является «ловушкой» гидроксильных радикалов (ОН•) [Bollì R., et al., 1989]. Следовательно, есть основание утверждать, что именно гидроксильный радикал явился триггером кардиопротекторного действия ГП. Диметилтиомочевина также устраняла инфаркт-лимитирующий эффект ГП. Принимая во внимание то, что ДМТМ также является «ловушкой» ОН• [108], приведенный факт можно трактовать как весомый аргумент в пользу триггерной роли ОН• в механизме инфаркт-лимитирующего эффекта ГП. Известно, что темпол является ловушкой O₂^{•-} [109], поэтому отсутствие его влияния на соотношение ЗИ/ОР говорит о том, что O₂^{•-} не играет существенной роли в обеспечении толерантности сердца к действию коронароокклюзии (45 мин) и реперфузии (6 ч) у крыс.

Источник ОН• остаётся неизвестен. Возможно, гидроксильный радикал образуется в реакции Фентона, в которой участвует негеминоное железо:



Или реакцией Габера-Вейса:



ОН•

Источником супероксидного радикала (O_2^{\bullet}) в миокарде может быть НАДФН-оксидаза или дыхательная цепь митохондрий [110].

Можно предполагать, что молекулярными мишенями для гидроксильного радикала являются редокс-чувствительные ферменты, например, протеинкиназа С киназы Акт и ERK1/2, играющие важную роль в адаптивном феномене ишемического preconditionирования [106, 111]. Мы предполагаем, что именно OH^{\bullet} , образующийся в ходе ГП, активирует редокс-чувствительные киназы.

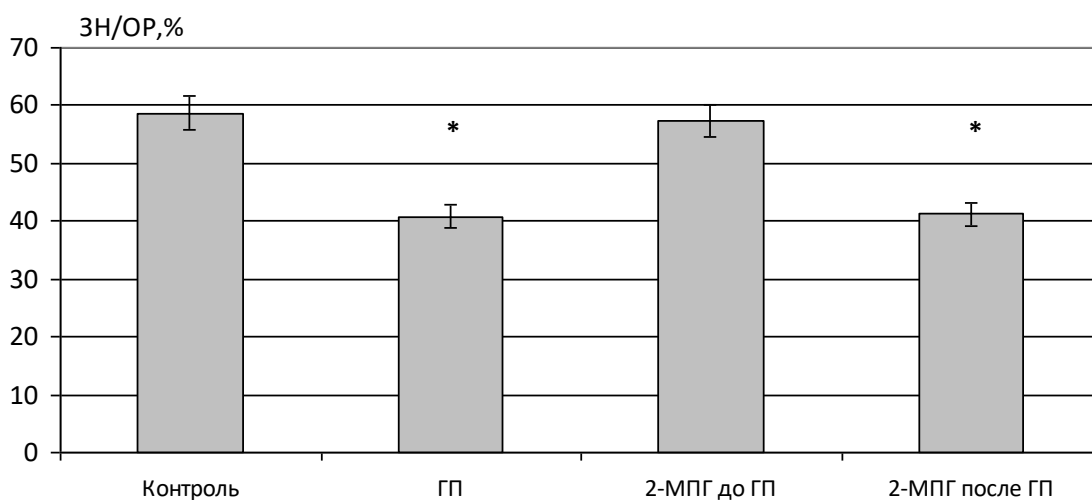


Рисунок 6 – Влияние n-(2-меркаптопропионил)-глицина на размер инфаркта у крыс, подвергнутых гипоксическому preconditionированию ($M \pm SEM$)

Примечание - 2-МППГ – n-(2-меркаптопропионил)-глицин, вводили в дозе 20 мг/кг внутривенно за 15 минут до ГП или после проведения ГП за 10 минут до коронароокклюзии. * - значимость различий по отношению к контрольной группе $p < 0.05$.

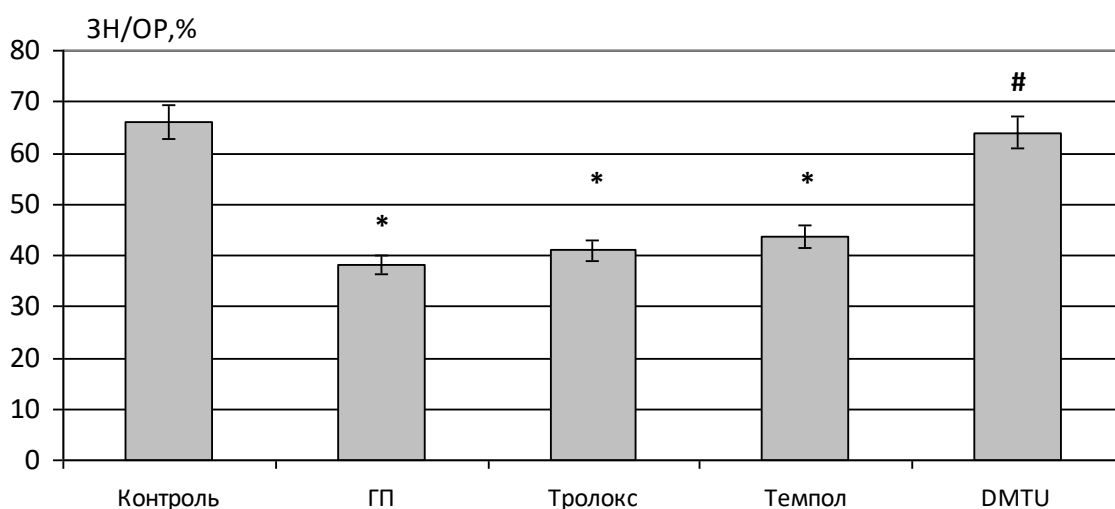


Рисунок 7 – Влияние антиоксидантов на размер инфаркта у крыс, повергнутых гипоксическому прекондиционированию ($M \pm SEM$).

Примечание - Контроль (n=15) – ишемия и реперфузия (ИР); раннее ГП (n=14) – 6 сеансов гипоксии (10 мин) и реоксигенации (10 мин); антиоксиданты тролокс (n=12) – в дозе 2,5 мг/кг; темпол (n=15) – в дозе 30 мг/кг; DMTU (n=12) – в дозе 300 мг/кг вводили за 10 мин до ГП; * $p < 0,05$ – уровень значимости различий по сравнению с контролем; # $p < 0,05$ – по сравнению с группой ГП.

2.3 Роль протеинкиназы С и других регуляторных киназ в механизме кардиопротекторного эффекта гипоксического прекондиционирования

Известно, что протеинкиназа С (ПКС) играет ключевую роль в кардиопротекторном эффекте ишемического прекондиционирования [70], поэтому не удивительно, что уже первые работы по сигнальным механизмам ГП были посвящены этому ферменту [98, 112, 113]. В 1998 г физиологи, выполняя эксперименты на изолированных кардиомиоцитах, получили данные о том, что ПКС участвует в гипоксическом прекондиционировании [98]. В 2002 г исследователи из Токио (Honma Y. et al., 2002) в экспериментах на изолированном перфузируемом сердце обнаружили, что ГП вызывает транслокацию ПКС- δ из цитоплазмы в ядро клетки. Этот факт рассматривается авторами работы, как доказательство участия ПКС- δ в ГП. Американские физиологи в экспериментах на изолированных кардиомиоцитах обнаружили, что ГП вызывает транслокацию ПКС- ϵ в митохондрии [114]. Они рассматривают эти данные, как доказательство участия ПКС- ϵ в прекондиционировании. Исследователи из Франции у крыс *in vivo* моделировали ГП, через 24 ч у подопытных животных изолировали сердца и воспроизводили глобальную ишемию (30 мин) и реперфузию (2 ч) [115]. В нашем исследовании введение ингибитора ПКС хелеритрина за 30 мин до ГП не влияло на его инфаркт-лимитирующий эффект при последующей коронароокклюзии-реперфузии *in vivo* [115]. Представленные данные говорят о том, что ПКС может участвовать в ГП *in vitro*, но

она не вовлечена в формирование повышенной толерантности сердца к ишемии-реперфузии при раннем ГП *in vivo*.

Как можно видеть, данные об участии ПКС в сигнальном механизме гипоксического preconditionирования противоречивы. С одной стороны, исследования на изолированном сердце и клеточных культурах указывают на важную роль, которую играет ПКС в механизме ГП, но, с другой стороны, этой точке зрения противоречат эксперименты, проведенные *in vivo* [112, 115, 116].

Согласно нашим данным, представленным на рисунке 8, в контрольной группе длительная локальная ишемия-реперфузия вызывала у животных развитие некроза миокарда, величина которого составила 58,5% от области гипоперфузии. После раннего ГП индекс ЗН/ОР уменьшился на 41,5%, достигнув величины 34,2%, что значительно меньше контрольного значения ($p < 0,05$). Применение ингибитора протеинкиназы С (5 мг/кг) за 15 мин до ГП не влияло на инфаркт-лимитирующий эффект ГП (Рис. 8). Таким образом, протеинкиназа С не является триггером или медиатором сигнального механизма раннего ГП.

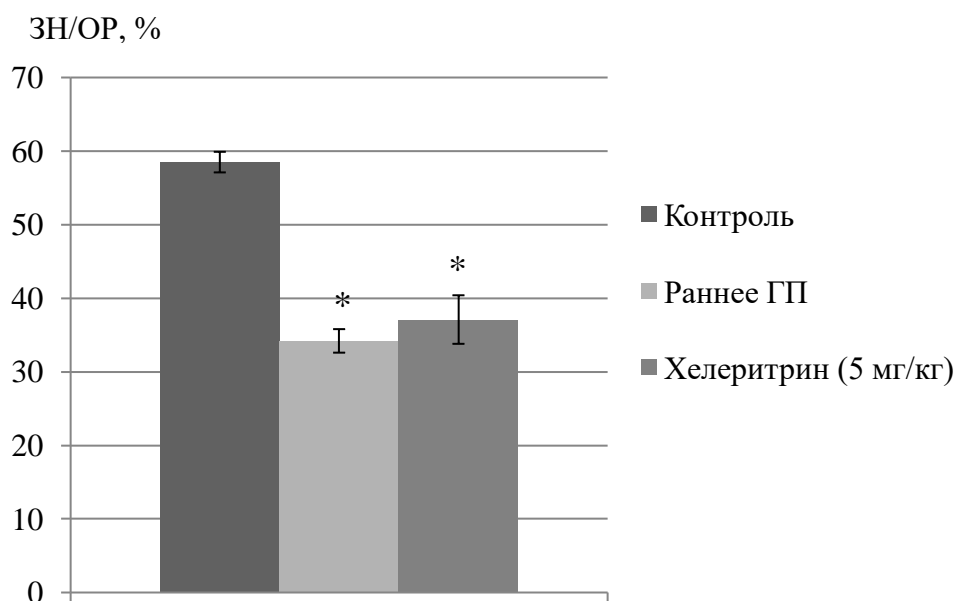


Рисунок 8 – Влияние ингибитора протеинкиназы С на формирование инфаркт-лимитирующего эффекта раннего ГП

Примечание - ГП – раннее гипоксическое preconditionирование; ЗН/ОР – отношение зоны некроза к области риска; * $p < 0,05$ – уровень значимости различий относительно контрольной группы.

Известно, что в ишемическом preconditionировании важную роль играют митоген-активируемые протеинкиназы (МАПК) [70]: ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase) – киназа, регулируемая внеклеточными сигналами, она же p42/44 МАПК; JNK (с-

Jun N-terminal kinase), киназа, фосфорилирующая транскрипционный фактор c-Jun; p38-киназа – МАПК с молекулярным весом в 38 кДа. Общеизвестно, что ERK1/2 фосфорилируется киназой MEK1/2 (mitogen-activated protein kinase kinase). Вполне очевидно, что сходство феномена ИП и феномена ГП побудило исследователей к изучению роли названных МАПК в ГП. В 2003 г Y.F. Huang и соавт. опубликовали результаты своих экспериментов по ГП изолированных неонатальных кардиомиоцитов крысы [117]. Ингибитор MEK1/2 PD98059 полностью устранял цитопротекторный эффект ГП при длительной гипоксии [117]. Эти данные были подтверждены в независимом исследовании, выполненном на изолированных неонатальных кардиомиоцитах крысы [118]. Гипоксическое preconditionирование индуцировали с помощью 20-минутной гипоксии, а через 24 ч воспроизводили гипоксию (3 ч) и реоксигенацию (3 ч) [118]. Preconditionирование предупреждало гибель клеток сердца и уменьшало уровень ЛДГ в среде инкубации. Ингибитор MEK1/2 PD98059 полностью устранял протекторный эффект ГП. Цитопротекторный эффект ГП не проявлялся, если в среде инкубации перед ГП был добавлен активатор протеинфосфатазы 2,3-бутадион монооксид [118]. Важная роль ERK1/2 в отсроченном ГП *in vitro* была подтверждена в более поздних независимых исследованиях и может считаться доказанным фактом. Кроме того, авторы одной из публикации обнаружили, что ГП вызывает фосфорилирование ERK1/2, что говорит об активации фермента [72, 115, 119, 120].

Литературные данные о роли p38-киназы противоречивы. Так, согласно данным Y.F. Huang и соавт., ингибитор p38-киназы SB203580 в экспериментах на изолированных кардиомиоцитах не блокировал ГП [117]. Более того, блокада p38-киназы во время длительной гипоксии оказывала цитопротекторный эффект [117]. В 2006 г в экспериментах на культуре неонатальных кардиомиоцитов крысы X.M. Zhu и соавт. показали, что цитопротекторный эффект отсроченного ГП не проявлялся, если в среду инкубации клеток перед ГП был добавлен ингибитор p38-киназы SB203580 [121]. Физиологи в течение 4 ч подвергали крыс воздействию гипоксии, через 24 ч у подопытных животных изолировали сердца и моделировали 30-минутную глобальную ишемию с последующей реперфузией [115]. Гипоксическое preconditionирование обеспечивало уменьшение размеров инфаркта в 1,5 раза. Введение SB203580 за 30 мин до ГП полностью устраняло инфаркт-лимитирующий эффект ГП [115]. Кроме того, авторы публикации обнаружили (Beguín P.C. et al.), что ГП вызывает фосфорилирование p38-киназы, что говорит об активации фермента. В 2007 г X. Wu и соавт. опубликовали результаты своих экспериментов с изолированными неонатальными кардиомиоцитами крысы [122]. Гипоксическое preconditionирование моделировали с помощью 20-

минутной гипоксии. После 24-часовой реоксигенации воспроизводили 3-часовую гипоксию и реоксигенацию (ГР). Длительная ГР вызывала увеличение в среде инкубации уровня ЛДГ в 3 раза. Если клетки были прекондиционированы, то этот подъём не превышал 90% [122]. Добавление в среду инкубации перед прекондиционированием ингибитора p38-киназы SB203580 полностью устраняло цитопротекторный эффект ГП.

Известно, что в кардиопротекторном эффекте ишемического прекондиционирования важную роль играет киназа Akt (anti-apoptotic kinase = Protein kinase B, PKB) и PI3-киназа (phosphatidylinositol-3-kinase) [123, 124, 125]. В 2004 г были опубликованы результаты экспериментов с изолированными кардиомиоцитами взрослых крыс [126]. Раннее ГП моделировали с помощью гипоксии (10 мин) и реоксигенации (30 мин). Затем прекондиционированные и обычные клетки подвергали воздействию 90-минутной гипоксии и реоксигенации. Прекондиционирование предупреждало апоптоз и некроз кардиомиоцитов. Предварительное добавление в среду инкубации селективного ингибитора PI3-киназы LY294002 полностью устраняло цитопротекторный эффект ГП [126]. Несколько иной результат получили Р.С. Veguin и соавт. [115]. У крыс *in vivo* моделировали ГП, через 24 ч у них изолировали сердца и воспроизводили глобальную ишемию (30 мин) и реперфузию (2 ч). Гипоксическое прекондиционирование оказывало инфаркт-лимитирующий эффект. Введение ингибитора PI3-киназы вортманнина за 30 мин до ГП не отражалось на инфаркт-лимитирующем эффекте ГП [115]. Исследователи из США в опытах на изолированных кардиомиоцитах взрослых крыс обнаружили, что раннее ГП вызывает фосфорилирование Akt [126]. Этот факт говорит об активации Akt, но не может рассматриваться, как бесспорное доказательство участия названной киназы в ГП.

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о том, что ERK1/2 и p38-киназа играют важную роль в отсроченном ГП *in vitro*. Участие ПКС и JNK в позднем ГП представляется сомнительным. В литературе нет данных о вовлечении Akt и PI3-киназы в протекторный эффект позднего прекондиционирования. Только одна публикация свидетельствует, что PI3-киназы и, возможно, Akt участвуют в раннем гипоксическом прекондиционировании [126]. Единственная работа по отсроченному ГП *in vivo* была выполнена Р.С. Veguin и соавт. [115]. Авторы этой работы показали, что в реализации кардиопротекторного эффекта позднего прекондиционирования вовлекаются p38-киназа и ERK1/2. Значение киназ в формировании толерантности сердца к ишемии-реперфузии при раннем прекондиционировании *in vivo* никем не исследовалось.

2.4 Роль NO – синтазы в механизме кардиопротекторного эффекта гипоксического preconditionирования

Установлено, что доноры оксида азота (NO[•]), который является свободным радикалом, имитируют феномен ишемического preconditionирования [127, 128]. Корейские физиологии на срезах сердца крысы индуцировали ГП с помощью трёх сеансов аноксии (5 мин) и реоксигенации (5 мин), а повреждение кардиомиоцитов моделировали с помощью 30-минутной аноксии и последующей реоксигенации [74]. Подобное preconditionирование в 3 раза снижало выброс ЛДГ в ответ на 30-минутную аноксию. Защитный эффект ГП не проявлялся в условиях блокады NO-синтазы с помощью NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) [74]. Донор NO[•] S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) в условиях моделирования длительной аноксии и реоксигенации оказывал цитопротекторный эффект [74]. В 2002 г L. Xi и соавт. опубликовали результаты своих экспериментов по моделированию отсроченного ГП у мышей [21]. Ингибитор индуцибельной NO-синтазы (iNOS, inducible NO-synthase) S-метилизотиомочевину вводили до моделирования ГП или перед изоляцией сердца. Исследователи установили, что блокада iNOS в обоих случаях устраняет инфаркт-лимитирующий эффект ГП. Этот факт позволил авторам утверждать Xi L. И соавт., что iNOS является триггером и медиатором preconditionирования. Данные А.Г. Портниченко и соавт свидетельствуют об индукции iNOS в миокарде preconditionированных крыс и об участии этого фермента в различных эффектах ГП [22, 129, 130]. Применение селективного блокатора iNOS phenylene-1,3-bis(ethane-2)-isothiourea полностью нивелировало антиаритмический эффект ГП. Эти факты говорят о том, что iNOS является триггером и медиатором гипоксического preconditionирования. Оставалось неизвестным, какова роль NO-синтазы и NO[•] в раннем ГП *in vivo*.

В нашем исследовании значение NO-синтазы и ее отдельных изоформ в инфаркт-лимитирующем эффекте ГП оценивали по проявлению инфаркт-лимитирующего действия ГП при ингибировании всего пула NO-синтазы, используя препарат L-NAME в дозе 10 мг/кг, либо при блокировании индуцибельной изоформы NO-синтазы препаратом S-метилтиомочевины сульфатом, либо эндотелиального пула препаратом 7-нитронидазол.

Установлено, что введение ингибитора NO-синтазы L-NAME за 15 мин до моделирования ГП предупреждало проявление инфаркт-лимитирующего действия гипоксического preconditionирования, размер некроза миокарда после перенесенной ишемии-реперфузии оказался большим на 42,8%, по сравнению с группой животных, подвергнутых ГП без блокирования NO-синтазы (рисунок 9). Ингибирование NO-синтазы с помощью введения L-NAME после ГП за 10 мин до ишемии не предупреждало

формирование защитного эффекта (Рис. 9). Эти результаты позволяют считать, что NO-синтаза является триггерным, но не медиаторным звеном механизма формирования инфаркт-лимитирующего действия ГП.

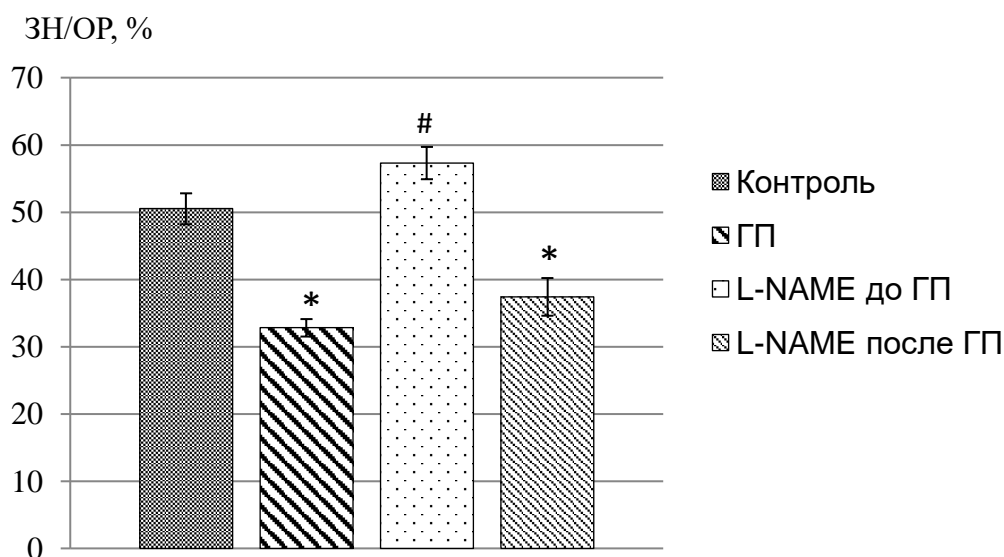


Рисунок 9 – Влияние ингибитора NO-синтазы L-NAME на размер инфаркта крыс, подвергнутых гипоксическому прекондиционированию (M±SEM)

Примечание - Контроль – острая коронароокклюзия (45 мин) и реперфузия (120 мин); ГП – раннее гипоксическое прекондиционирование; L-NAME в дозе 10 мг/кг вводили внутривенно либо за 15 мин до ГП, либо после адаптации за 10 мин до коронароокклюзии-реперфузии; *p < 0,05 – статистически значимые отличия по отношению к контролю; # p < 0,05 – статистически значимые отличия по отношению к группе ГП.

Известно, что NO-синтаза представлена в организме несколькими изоформами, исследование участия, которых в инфаркт-лимитирующем действии ГП явилось целью наших следующих экспериментов. Селективное ингибирование индуцибельной изоформы NO-синтазы препаратом S-метилизотиомочевинной в дозе 3 мг/кг за 15 мин до моделирования ГП привело к увеличению размера инфаркта до уровня контрольных значений (Рис. 10). В то же время блокада пула нейрональной NO-синтазы не отразилась на проявлении кардиопротекторного эффекта гипоксического прекондиционирования: соотношение ЗН/ОП осталось достоверно не отличным от особей с ГП (рисунок 10).

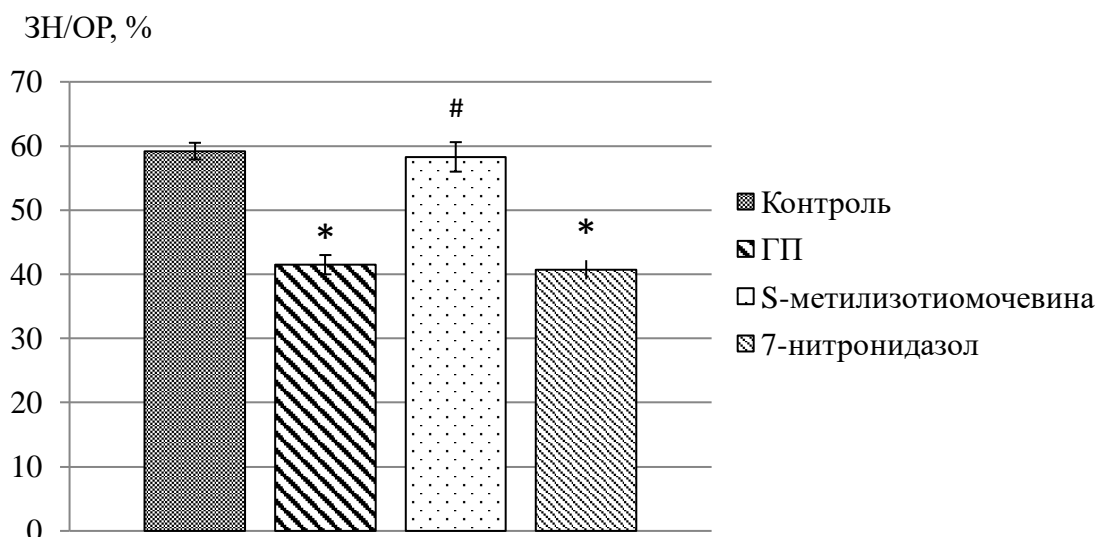


Рисунок 10 – Роль изоформ NO-синтазы в инфаркт-лимитирующем действии гипоксического preconditionирования ($M \pm SEM$)

Примечание - Контроль – острая коронароокклюзия (45 мин) и реперфузия (120 мин); ГП – раннее гипоксическое preconditionирование; S-метилизотиомочевину применяли в дозе 3 мг/кг внутривенно за 15 мин до ГП; 7-нитроиндазол вводили в дозе 50 мг/кг внутривенно за 15 мин до ГП; * $p < 0,05$ – статистически значимые отличия по отношению к контролю; # $p < 0,05$ – статистически значимые отличия по отношению к группе ГП.

На основании проведенного исследования мы можем говорить о триггерной роли индуцибельной NO-синтазы в развитии инфаркт-имитирующего действия ГП. По-видимому, конститутивная NO-синтаза не участвует в механизме инфаркт-лимитирующего эффекта ГП.

2.5 Роль K_{ATP} – каналов в механизме кардиопротекторного эффекта гипоксического preconditionирования

Важная роль K_{ATP} -каналов в ишемическом preconditionировании является общепризнанным фактом [70]. Первая работа об участии K_{ATP} -каналов в ГП была опубликована в 1999 г [98]. В экспериментах на изолированных кардиомиоцитах крысы было показано, что блокада K_{ATP} -каналов глибенкламидом перед ГП приводит к исчезновению цитопротекторного эффекта preconditionирования. Добавление в среду инкубации клеток сердца активатора K_{ATP} -каналов никорандила способствовало повышению толерантности клеток к действию длительной гипоксии/реоксигенации [98]. Год спустя Т. Vanden Hoek и соавт. в экспериментах на изолированных кардиомиоцитах цыпленка показали, что внесение в среду инкубации клеток сердца во время ГП ингибитора митохондриальных K_{ATP} -каналов (мит K_{ATP} -каналов) 5-гидроксидеканоата устраняет кардиопротекторный эффект ГП [75]. Активатор K_{ATP} -каналов пинацидил повышал устойчивость кардиомиоцитов к действию длительной гипоксии-реоксигенации

[75]. В 2001 г в экспериментах на изолированных кардиомиоцитах крысы китайские физиологи показали, что ГП приводит к значительному усилению $I_{\text{КАТФ}}$ [113]. Подобный эффект не наблюдался в случае блокады ПКС хелеритрином, поэтому авторы публикации связывают усиление $I_{\text{КАТФ}}$ с активацией КАТФ -каналов при посредстве ПКС [113]. В 2004 г К.З. Gong и соавт. показали, что ГП или добавление активатора мит КАТФ -каналов диазоксида в среду инкубации клеток сердца крысы за 24 ч до длительной гипоксии-реоксигенации значительно увеличивает выживаемость кардиомиоцитов в условиях тестирующей гипоксии-реоксигенации [72]. Цитопротекторный эффект ГП или диазоксида не проявлялся, если перед ГП или перед введением диазоксида ингибировали мит КАТФ -каналы 5-гидроксидеканоатом [72]. Защитный эффект диазоксида не отмечался, если в среду инкубации был добавлен антиоксидант 2-меркаптопропионил глицин или ингибитор MEK1/2 PD98059. Эти факты говорят о том, что мит КАТФ -канал, по всей видимости, является медиатором ГП. Кроме того, эти результаты свидетельствуют, что цитопротекторный эффект открытия мит КАТФ -каналов связан с усилением генерации АФК и активацией тандема MEK1/2-ERK1/2 .

В 2006 г корейские физиологи опубликовали результаты своих экспериментов на срезах сердца крыс [74]. Раннее гипоксическое preconditionирование моделировали с помощью трёх сеансов гипоксии (5 мин) и реоксигенации (5 мин), а через 15 мин воспроизводили тестирующую ГР. Добавление в среду инкубации блокатора сарколеммальных (сарк КАТФ -каналов) и мит КАТФ -каналов глибенкламида или ингибитора мит КАТФ -каналов 5-гидроксидеканоата во время ГП полностью устраняло цитопротекторный эффект preconditionирования. Так же действовали ингибитор NO -синтазы L-NAME и ингибитор цГМФ-зависимой протеинкиназы G (ПКГ) Rp-изомер β -phenyl-1,N2-etheno-8-bromoguanosine-3',5'-cyclic monophosphorothioate (Rp-8-Br-PET-cGMPS). Авторы показали, что повышения толерантности кардиомиоцитов к ГР можно добиться, внося в среду инкубации клеток сердца диазоксид или пинацидил, который активирует оба пула (сарколеммальный и митохондриальный) КАТФ -каналов [74]. Оказалось, что оба открывателя КАТФ -каналов снижают выброс ЛДГ из кардиомиоцитов в среду инкубации. Добавление в среду инкубации глибенкламида, 5-гидроксидеканоата, L-NAME или Rp-8-Br-PET-cGMPS полностью устраняло цитопротекторный эффект обоих открывателей КАТФ -каналов [74]. На наш взгляд, это даёт основания полагать, что цепочка событий в клетке складывается следующим образом: гипоксия \rightarrow АТФ \downarrow \rightarrow открытие мит КАТФ -каналов \rightarrow NO -синтаза \uparrow \rightarrow NO^\bullet \uparrow \rightarrow гуанилатциклаза \uparrow \rightarrow цГМФ \uparrow \rightarrow ПКГ \uparrow \rightarrow кардиопротекция. В данном случае мит КАТФ -каналы играют роль триггера ГП. Однако другие данные этих авторов не согласуются с такой рабочей гипотезой. Так, они показали,

что донор $\text{NO}\bullet$ SNAP также может имитировать кардиопротекторный эффект ГП, который исчезает в условиях блокады $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -каналов и после применения Rp-8-Br-PET-cGMPS. Цитопротекторный эффект сохранялся после применения L-NAME [74]. Протекторный эффект оказывал активатор ПКГ Sp-8-Br-PET-cGMPS (Sp-изомер β -phenyl-1,N2-etheno-8-bromoguanosine-3',5'-cyclic monophosphorothioate) [74]. Это защитное действие Sp-8-Br-PET-cGMPS не проявлялось в условиях блокады $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -каналов и исчезало после применения Rp-8-Br-PET-cGMPS. Кардиопротекторный эффект сохранялся после применения L-NAME [74]. Исходя из этих данных, авторы предположили, что события в клетке развиваются следующим образом: NO -синтаза $\uparrow \rightarrow \text{NO}\bullet \uparrow \rightarrow$ гуанилатциклаза $\uparrow \rightarrow$ цГМФ $\uparrow \rightarrow$ ПКГ $\uparrow \rightarrow$ открытие мит $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -каналов \rightarrow кардиопротекция [74]. Однако, на наш взгляд, эта гипотеза противоречит собственным данным авторов, поскольку протекторный эффект «открывателей» $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -каналов не проявлялся после применения L-NAME и Rp-8-Br-PET-cGMPS. Возможно, авторы допустили какую-то ошибку при проведении экспериментов, что не позволяет построить стройную гипотезу о механизме действия активаторов $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -каналов. В 2008 г J.D. Jiao и соавт. получили дополнительные данные об участии $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -каналов в ГП [76]. Ранее ГП моделировали на кардиомиоцитах взрослых крыс и клетках линии H9c2, которые морфологически идентичны кардиомиобластам. Протекторный эффект ГП не проявлялся, если в среду инкубации были добавлены siРНК (siRNA, short interfering RNA) комплементарные к мРНК Kт6.2 субъединицы сарк $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -канала. Подобные короткие молекулы РНК могут избирательно образовывать дуплекс с мРНК, кодирующей тот либо иной белок, и тем самым блокировать синтез белка на уровне трансляции [131]. Блокатор мит $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -каналов 5-гидроксидеканоат также устранял цитопротекторный эффект ГП [76]. Эти данные говорят о том, что в защитном эффекте ГП участвуют сарк $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -каналы и мит $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -каналы. В 2008 г показано, что кардиопротекторный эффект позднего ГП *in vivo* связан с активацией $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -каналов и VK_{Ca} -каналов, поскольку применение селективных блокаторов этих каналов через 24 ч после прекондиционирования полностью устраняет инфаркт-лимитирующий эффект ГП [22]. Эта работа говорит о том, что $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -каналы и VK_{Ca} -каналы могут быть не только медиаторами, но и конечными эффекторами позднего ГП.

Таким образом, представленные выше данные позволяют предположить, что мит $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -каналы и, возможно, сарк $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -каналы, являются медиаторами раннего и позднего ГП *in vitro*. Нельзя исключить возможность того, что $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -каналы могут быть триггерами гипоксического прекондиционирования. Неизвестно какова роль этих каналов в раннем гипоксическом прекондиционировании *in vivo*. Данные А.Г. Портниченко и др.,

(2008a) свидетельствуют о том, что K_{ATP} -каналы и $ВК_{Ca}$ -каналы могут быть конечными эффекторами позднего ГП *in vivo*.

Наши исследования были направлены на выявление участия K_{ATP} -каналов в реализации инфаркт-лимитирующего действия ГП в условиях *in vivo*. Участие K_{ATP} -каналов в защитном эффекте гипоксического preconditionирования устанавливали путем их фармакологического ингибирования за 15 мин до моделирования ГП, либо после ГП за 10 мин до ишемии.

Установлено, что гипоксическое preconditionирование оказывало кардиопротекторный эффект, уменьшая соотношение ЗН/ОР на 39,1% по сравнению с неадаптированными животными. Предварительное введение крысам неселективного блокатора K_{ATP} -каналов глибенкламида в дозе 0,3 мг/кг до моделирования ГП полностью нивелировало защитный эффект этого адаптирующего воздействия (рисунок 11). Однако применение глибенкламида после ГП не влияло на возникновение устойчивости к ишемическому-реперфузионному повреждению (рисунок 11). Селективное ингибирование K_{ATP} -каналов, расположенных на мембранах митохондрий (мито K_{ATP} -каналов) препаратом 5-гидроксидеканоат в дозе 5 мг/кг привело к увеличению размера инфаркта до значений контрольной группы (рисунок 12). Блокирование сарколеммальных K_{ATP} -каналов селективным ингибитором HMR 1098 (Clamikalant sodium) в дозе 10 мг/кг не устраняло инфаркт-лимитирующий эффект ГП (рисунок 12).

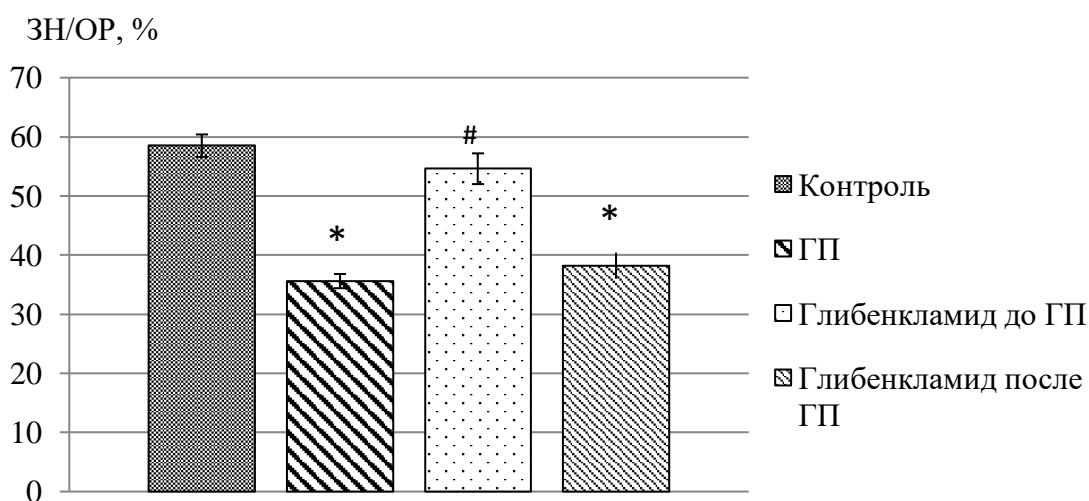


Рисунок 11 – Влияние глибенкламида на размер инфаркта у крыс, подвергнутых гипоксическому preconditionированию ($M \pm SEM$)

Примечание - Контроль – острая коронароокклюзия (45 мин) и реперфузия (120 мин); ГП – раннее гипоксическое preconditionирование: глибенкламид вводили в дозе 0,3 мг/кг внутривенно за 15 мин до ГП, либо после ГП за 10 мин до коронароокклюзии; * $p < 0,05$ – статистически значимые отличия по отношению к контролю; # $p < 0,05$ – статистически значимые отличия по отношению к группе ГП.

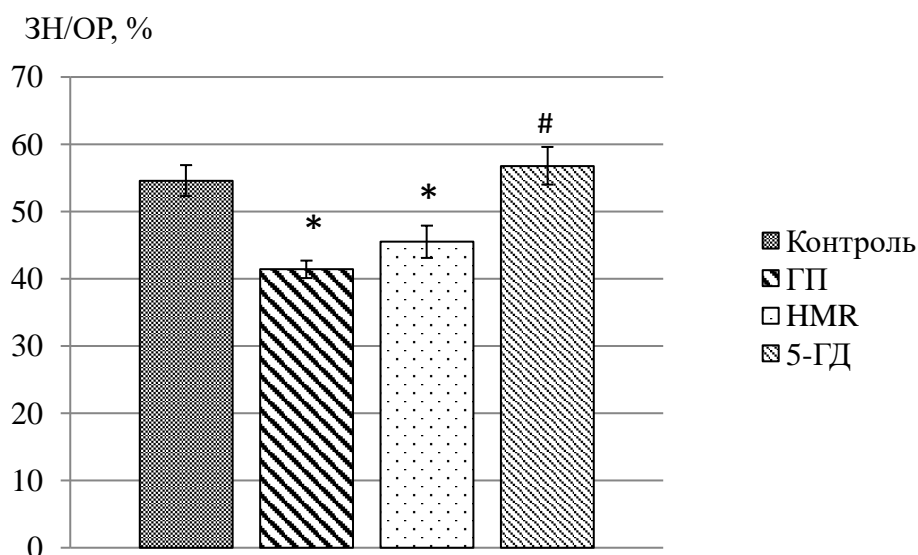


Рисунок 12 – Влияние 5-гидроксидеканоата на размер инфаркта у крыс, подвергнутых гипоксическому preconditionированию (M±SEM)

Примечание - Контроль – острая коронароокклюзия (45 мин) и реперфузия (120 мин); ГП – раннее гипоксическое preconditionирование; HMR – HMR 1098 (Clamikalant sodium) в дозе 10 мг/кг внутривенно; 5-ГД – 5-гидроксидеканоат в дозе 5 мг/кг внутривенно; * $p < 0,05$ – статистически значимые отличия по отношению к контролю; # $p < 0,05$ – статистически значимые отличия по отношению к группе ГП.

Полученные результаты указывают на значимую роль митоK_{ATP}-каналов в формировании защиты миокарда при ГП. В то же время, вопрос об участии сарколеммальных K_{ATP}-каналов в реализации адаптационного эффекта ГП в отношении ишемических-реперфузионных повреждений сердца не подтвержден.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящий момент широко известно, что ряд срочных адаптивных реакций в ответ на локальную органную ишемию - ишемическое пре-, пост- и дистантное кондиционирование - сопровождается выраженным кардиопротекторным и антиаритмическим действием [25], [132-135]. Исследования механизмов кондиционирования проводились и проводятся в настоящее время с целью выявления мишени для фармакотерапии острого инфаркта миокарда [136, 137]. Однако следует заметить, что эффективность применения ишемического прекондиционирования на практике до настоящего времени не подтверждена, поскольку при проведении клинических исследований получены результаты как подтверждающие кардиопротекцию и антиаритмический эффект ишемического и дистантного прекондиционирования так и отсутствие этих эффектов [138-140]. На наш взгляд, это обстоятельство является основной причиной того, что, несмотря на обширные сведения о механизме формирования протекции при ишемическом или дистантном прекондиционировании, до настоящего времени на основе этих знаний не создано новых фармакологических средств, показавших свою эффективность в клинике. Так, на основе предположения об участии протеинкиназы Сδ в механизме повреждающего действия ишемии-реперфузии был создан новый фармакологический препарат делкасертиб, блокатор указанной протеинкиназы [141]. Однако клиническую эффективность этого соединения при остром инфаркте миокарда доказать не удалось [142]. Экспериментальные исследования, показавшие эффективность эритропоэтина при ишемии-реперфузии миокарда не были подтверждены клиническими данными [143]. Применение ингибитора mРТР-пор циклоспорина у пациентов с острым инфарктом миокарда не повлияло на гемодинамические показатели и ремоделирование левого желудочка в течение 1 года [144]. Становится очевидным, что исследование протекторного действия локальных видов кондиционирования не выявляет мишеней для фармакологической защиты миокарда. Иная ситуация складывается в отношении гипоксического прекондиционирования. Его практическое применение не связано со столь серьезным риском осложнений, как при ишемическом прекондиционировании. Более того, применение гипоксического прекондиционирования у пациентов, оперируемых с применением искусственного кровообращения, было начато уже через 4 года после открытия этого феномена [145].

Наше исследование показало, что в реализации инфаркт-лимитирующего действия раннего гипоксического прекондиционирования принимают участие иные механизмы, чем при ишемическом прекондиционировании. Так, нами не обнаружено взаимосвязи между сокращением размера инфаркта при коронароокклюзии-реперфузии у

прекондиционированных сеансами гипоксии крыс с активацией опиоидных или аденозиновых рецепторов. Более того, оказалось, что популярный среди исследователей внутриклеточный фермент-регулятор адаптационных процессов протеинкиназа С не участвует в реализации инфаркт-лимитирующего действия ГП. Однако обнаружены и сходные механизмы проекторных воздействий, с большой долей вероятности в инфаркт-лимитирующем действии ГП участвует активация АТФ-чувствительных K^+ -каналов митохондрий. Кроме того, результаты настоящего исследования позволяют нам говорить об увеличении выработки оксида азота и активных форм кислорода в качестве пусковых механизмов кардиопротекции при гипоксическом preconditionировании.

ВЫВОДЫ

1. Опиоидные и аденозиновые рецепторы не участвуют в формировании кардиопротекторного эффекта гипоксического preconditionирования.
2. В механизме инфаркт-лимитирующего эффекта гипоксического preconditionирования участвуют активные формы кислорода.
3. Кардиопротекторный эффект гипоксического preconditionирования не связан с активацией протеинкиназы С.
4. Инфаркт-лимитирующий эффект гипоксического preconditionирования реализуется при участии индуцибельной NO-синтазы.
5. В механизме инфаркт-лимитирующего эффекта гипоксического preconditionирования участвуют митохондриальные K_{ATP} -каналы.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ за 2019 г со ссылкой на гос. задание

1. Прокудина Е.С., Горбунов А.С., Казаков В.А., Саушкин В.В., Ма Н., Маслов Л.Н. Мофофункциональные аспекты повреждения сердца при иммобилизационном стрессе у крыс // Росс. физиол. журнал. – 2019. – Т. 105, № 2. – С. 248–257.
2. Мухомедзянов А.В., Маслов Л.Н., Скрыбина А.А., Буцов Ю.В., Клим В.С. Взаимодействие $\delta 2$ -опиоидных рецепторов и КАТФ-каналов в регуляции толерантности сердца к действию реперфузии // Росс. физиол. журнал. – 2019. – Т. 105, № 3. – С. 303-310.
3. Прокудина Е.С., Маслов Л.Н., Цибульников С.Ю., Синг Н., Клим В.С., Скрыбина А.А. Роль гуморальных факторов в дистантном прекондиционировании сердца // Росс. физиол. журнал. – 2019. – Т. 105, № 4. – С. 416-436.
4. Maslov L.N., Tsibulnikov S.Y., Prokudina E.S., Popov S.V., Boshchenko A.A., Singh N., Zhang Y., Oeltgen P.R. Trigger, signaling mechanism and end effector of cardioprotective effect of remote postconditioning of heart // Curr. Cardiol. Rev. – 2019. – Vol. 15. – P. 177-187.
5. Семенцов А.С., Маслов Л.Н., Нарыжная Н.В., Бушов Ю.В., Лишманов Ю.Б. Роль активных форм кислорода в инфаркт-лимитирующем эффекте раннего гипоксического прекондиционирования // Росс. физиол. журнал. – 2019. – Т. 105, № 5. – С. 1-7.
6. Naryzhnaya N.V., Khaliulin I., Lishmanov Y.B., Suleiman M.S., Tsibulnikov S.Y., Kolar F., Maslov L.N. Participation of opioid receptors in the cytoprotective effect of chronic normobaric hypoxia // Physiol. Res. – 2019. – Vol. 68, No. 2. – P. 245-253.
7. Цибульников С.Ю., Прокудина Е.С., Синг Н., Клим В.С., Скрыбина А.А., Воронков Н.С., Нестеров Е.А., Маслов Л.Н. Ишемические и реперфузионные повреждения сердца: роль Ca^{2+} каналов L-типа и Na^+/H^+ -обменника. Анализ экспериментальных и клинических данных // Росс. физиол. журнал. – 2019. – Т. 105, № 7. – С. 801-811.
8. Маслов Л.Н., Нарыжная Н.В., Цибульников С.Ю., Воронков Н.С., Бушов Ю.В. Роль натрийуретических пептидов и эритропоэтина в регуляции толерантности сердца к действию ишемии и реперфузии. Анализ экспериментальных и клинических данных // Росс. физиол. журнал. – 2019. – Т. 105, № 1. – С. 24 -35.
8. Tsibulnikov S.Y., Maslov L.N., Naryzhnaya N.V., Ivanov V.V., Bushov Y.V., Voronkov N.S., Jaggi A.S., Zhang Y., Oeltgen P.R. Impact of cold adaptation on cardiac tolerance to ischemia/reperfusion and glucocorticoid, thyroid hormone levels // Gen. Physiol. Biophys. – 2019. – Vol. 38, No. 3. – P. 245-251.
9. Маслов Л.Н., Нарыжная Н.В., Цибульников С.Ю., Воронков Н.С., Бушов Ю.В. Ангиотензин II и его роль в регуляции толерантности сердца к действию ишемии/реперфузии. Ингибиторы АПФ и антагонисты AT1 рецептора ангиотензина II // Пат. физиол. экспер. терап. – 2019. – Т. 63, № 3. – С. 118-126.

10. Gorbunov A.S., Maslov L.N., Jaggi A.S., Singh N., De Petrocellis L., Boshchenko A.A., Roohbakhsh A., Bezuglov V.V., Oeltgen P.R. Physiological and pathological role of TRPV1, TRPV2 and TRPV4 channels in heart // *Curr. Cardiol. Rev.* – 2019. – Vol. 15, No. 4. – P. 244-251.
11. Tsibulnikov S.Y., Maslov L.N., Gorbunov A.S., Voronkov N.S., Boshchenko A.A., Popov S.V., Prokudina E.S., Singh N., Downey J.M. A review of humoral factors in remote preconditioning of the heart // *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* – 2019. – Vol. 24, No. 5. – С. 403-421.
12. Prokudina E.S., Maslov L.N., Naryzhnaya N.V., Tsibulnikov S.Y., Lishmanov Y.B., Madias J.E., Oeltgen P.R. Cardioprotective properties of opioid receptor agonists in rats with stress-induced cardiac injury // *Physiol. Res.* – 2019. – Vol. 68, No. 3. – P. 375-384.
13. Naryzhnaya N.V., Maslov L.N., Lishmanov Y.B., Nesterov E.A., Yaggi A.S., Suleiman M.S. The mitochondrial permeability transition pore – a regulator of the resistance of the heart to reperfusion // *Neurosci. Behav. Physiol.* – 2019. – Vol. 49, No. 8. – P. 943-953.
14. Нарыжная Н.В., Крылатов А.В., Цибульников С.Ю., Прокудина Е.С., Мухомедзянов А.В., Применение антагонистов P2Y₁₂ рецепторов для профилактики ишемических и реперфузионных повреждений сердца // *Клин. медицина.* – 2019. – Т. 97, № 3. – С.248-252.
15. Крылатов А.В., Ваизова О.Е., Белоусов М.В., Позднякова С.В., Нестеров Е.А., Мадонов П.Г. Использование агонистов δ-опиоидных рецепторов для предупреждения реперфузионных повреждений сердца *in vivo* // *Экспер. клин. фармакол.* – 2019. – Т. 82, № 11. – С. 8-10.

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., Naryzhnaya N.V., Prokudina E.S., Kolar F., Gorbunov A.S., Zhang Y., Wang H., Tsibulnikov S.Yu., Portnichenko A.G., Lasukova T.V., Lishmanov Yu.B. Preserved cardiac mitochondrial function and reduced ischaemia/reperfusion injury afforded by chronic continuous hypoxia: Role of opioid receptors // *Clin. Exper. Pharm. Physiol.* – 2015. – Vol.42. – P. 496–501.
6. Шляхто Е.В., Нифонтов Е.М., Галагудза М.М. Пре- и посткондиционирование как способы кардиопротекции: патофизиологические и клинические аспекты // *Журнал 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 прекодиционирования // *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. 404–410.
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 прекодиционирование - феномен, обеспечивающий повышение толерантности кардиомиоцитов к гипоксии-реоксигенации // *Российский 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 прекодиционирование, 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 прекодиционирования // *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. – 2008а. – Т. 5, № 3. – С. 61-62.
23. Koresky 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 T., Chuang C., Zuo L. Molecular Characterization of Reactive Oxygen Species in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury // *BioMed Research International.* – 2015. – P.1-9.
28. Бернар К. 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. Закощиков К.Ф., Катин С.О. Гипокситерапия – «Горный воздух» М.: «Бумажная галерея», 2005. – 66 с.
36. 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. 1078-1088.
37. 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.
38. West J.B. Recent advances in high altitude medicine and biology // *High altitude medicine & biology.* – 2015. – Vol. 16, No. 2. – P. 73-73.
39. Simonson T.S. Altitude adaptation: a glimpse through various lenses // *High altitude medicine & biology.* – 2015. – Vol. 16, No. 2. – P. 125-137.
40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. 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. 577-585.
44. 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.
45. 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.
46. 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. 507-513.
47. 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.
48. 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.
49. Murray A.J. Energy metabolism and the high-altitude environment // *Exp. Physiol.* – 2016. – Vol. 101, No. 1. – P. 23-27.
50. 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.
51. Лишманов Ю.Б. Использование энкефалинов для предупреждения стрессорных повреждений сердца в эксперименте // *Бюлл. exper. биол. и мед.* – 1986. – № 9. – С. 271-272.
52. Лишманов Ю.Б., Кондратьев Б.Ю. Взаимодействие опиоидной и симпатoadреналовой системы при ишемическом повреждении сердца // *Физиол. жур.* – 1995. – Т. 81, № 5. – С. 77-85.
53. Лишманов Ю.Б., Маслов Л.Н., Ускина Е.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.
54. 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.
55. 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.

56. 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 // Российский физиол. журнал им. И.М. Сеченова. – 2013. – Т. 99, № 4. – С. 433-452.
57. 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* // Российский физиол. журнал им. И.М. Сеченова. – 2009. – Т. 95, № 6. – С. 563-572.
58. Ласукова Т.В., Маслов Л.Н., Горбунов А.С. О роли опиоидной системы миокарда в реализации кардиопротекторного эффекта посткондиционирования // Российский физиол. журнал им. И.М. Сеченова. – 2014. – Т. 100, № 12. – С. 1391-1398.
59. Варфоломеев С.О. Опиатные рецепторы у крыс с различной адаптацией к эмоциональному стрессу // Клинические и орг. вопросы общей и судебной психиатрии. – М., 1986. – С. 76-80.
60. 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.
61. 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.
62. 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.
63. 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.
64. 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.
65. 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. 141-146.

66. 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.
67. 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.* – 1997a. – Vol. 29, No. 8. – P. 2187-2195.
68. 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.
69. Murry C.E., Richard V.J., Jennings R.B., Reimer K.A. Preconditioning with ischemia: Is the protective effect mediated by free radical induced myocardial stunning? // *Circulation.* – 1988. – Vol. 78(Suppl II). – P. 77.
70. 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.
71. 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.
72. 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.
73. 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. 299-308.
74. Cuong D.V., Kim N., Youm J.B., Joo H., Warda M., Lee J.W., Park W.S., Kim T., Kang S., Kim H., Han J. Nitric oxide-cGMP-protein kinase G signaling pathway induces anoxic preconditioning through activation of ATP-sensitive K⁺ channels in rat hearts // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2006. – Vol. 290, No. 5. – P. 1808-1817.
75. Vanden Hoek T., Becker L.B., Shao Z.H., Li C.Q., Schumacker P.T. Preconditioning in cardiomyocytes protects by attenuating oxidant stress at reperfusion // *Circ. Res.* – 2000. – Vol. 86, No. 5. – P. 541-548.
76. Jiao J.D., Garg V., Yang B., Hu K. Novel functional role of heat shock protein 90 in ATP-sensitive K⁺ channel-mediated hypoxic preconditioning // *Cardiovasc. Res.* – 2008. – Vol. 77, No. 1. – P. 126-133.

77. Schultz J.E.J., Qian Y.Z., Gross G.J., Kukreja R.C. The ischemia-selective KATP channel antagonist, 5-hydroxydecanoate, blocks ischemic preconditioning in the rat heart // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 1997b. – No. 29. – P. 1055-1060.
78. Kalyanaraman B., Darley-Usmar V., Davies K. J. A., Dennery P., Forman H. J., Grisham M., Mann G., Moor Roberts J. L., Ischiropoulos H. The use of fluorescence probes to measure reactive oxygen and nitrogen species in cell: challenges, potentials and caveats // *Free Radic. Biol. Med.* – 2012. – Vol. 52. – P. 1–6.
79. Koltai E., Hart N., Taylor A.W., Goto S., Ngo J. K., Davies K. J. A., Radak Z. Age-associated declines in mitochondrial biogenesis and protein quality control factors are minimized by exercise training // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2012. – Vol. 303, No. 2. – P. 127–134.
80. Radák Z., Chung H.Y., Naito H., Takahashi R., Jung K.J., Kim H.-J., Goto S. Age-associated increases in oxidative stress and nuclear transcription factor κ B activation are attenuated in rat liver by regular exercise // *The FASEB J.* – 2004. – Vol. 18, No. 6. – P. 749-750.
81. Dikalov S., Griendling K.K., Harrison D.G. Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies // *Hypertension.* – 2007. – Vol. 49, No. 4. – P. 717-727.
82. Aune S.E., Yeh S.T., Zelinski D.P., Angelos M.G. Measurement of hydrogen peroxide and oxidant stress in a recirculating whole blood-perfused rat heart model // *Resuscitation.* – 2011. – Vol. 82, No. 2. – P. 222-227.
83. Dikalov S.I., Harrison D.G. Methods for detection of mitochondrial and cellular reactive oxygen species // *Antioxid. Redox Signal.* – 2014. – Vol. 20, No. 2. – P. 372-382.
84. 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.
85. 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.
86. Paiva M., Riksen N.P., Davidson S.M., Hausenloy D.J., Monteiro P., Goncalves L., Providencia L., Rongen G.A., Smits P., Mocanu M.M., Yellon D.M. Metformin prevents myocardial reperfusion injury by activating the adenosine receptor // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* – 2009. – Vol. 53, No. 5. – P. 373-378.
87. Eldaif S.M., Deneve J.A., Wang N.P., Jiang R., Mosunjac M., Mutrie C.J., Guyton R.A., Zhao Z.Q., Vinten-Johansen J. Attenuation of renal ischemia-reperfusion injury by

- postconditioning involves adenosine receptor and protein kinase C activation // *Transpl. Int.* – 2010. – Vol. 23, No. 2. – P. 217-226.
88. Tanaka M., Fujiwara H., Yamasaki K., Sasayama S. Superoxide dismutase and N-2-mercaptopropionyl glycine attenuate infarct size limitation effect of ischaemic preconditioning in the rabbit // *Cardiovasc. Res.* – 1994. – Vol. 28, No. 7. – P. 980-986.
89. Eum H., Lee S. Effects of Trolox on the activity and gene expression of cytochrome P450 in hepatic ischemia/reperfusion // *Br. J. Pharmacol.* – 2004. – Vol. 142, No. 1. – P. 35–42.
90. Kimura S., Zhang G., Nishiyama A. et al. Role of NAD(P)H oxidase- and mitochondria-derived reactive oxygen species in cardioprotection of ischemic reperfusion injury by angiotensin II // *Hypertension.* – 2005. – Vol. 45, No. 5. – P. 860-866.
91. Puisieux F., Deplanque D., Bulckaen H. et al. Brain ischemic preconditioning is abolished by antioxidant drugs but does not up-regulate superoxide dismutase and glutathion peroxidase // *Brain Res.* – 2004. – Vol. 1027, No. 1-2. – P. 30-37.
92. Hartman J.C. The role of bradykinin and nitric oxide in the cardioprotective action of ACE inhibitors // *Ann. Thorac. Surg.* – 1995. – Vol. 60, No. 3. – P. 789-792.
93. Fryer R.M., Eells J.T., Hsu A.K. Ischemic preconditioning in rats: role of mitochondrial KATP-channel in preservation of mitochondrial function // *Am. J. Physiol.* – 2000a. – Vol. 278. – P. 305 – 312.
94. Chiari P.C., Bienengraeber M.W., Weihrauch D., Krolikowski J.G., Kersten J.R., Warltier D.C., Pagel P.S. Role of endothelial nitric oxide synthase as a trigger and mediator of isoflurane-induced delayed preconditioning in rabbit myocardium // *Anesthesiology.* – 2005. – Vol. 103, No. 1. – P. 74-83.
95. Jiang X., Shi E., Nakajima Y., Sato S. Inducible nitric oxide synthase mediates delayed cardioprotection induced by morphine in vivo: evidence from pharmacologic inhibition and gene-knockout mice // *Anesthesiology.* – 2004. – Vol. 101, No. 1. – P. 82-88.
96. Takashi E., Wang Y., Ashraf M. Activation of mitochondrial K(ATP) channel elicits late preconditioning against myocardial infarction via protein kinase C signaling pathway // *Circ. Res.* – 1999. – Vol. 85, No. 12. – P. 1146-1153.
97. Quindry J.C., Miller L., McGinnis G., Kliszczewicz B., Irwin J.M., Landram M., Urbiztondo Z., Nanayakkara G., Amin R. Ischemia reperfusion injury, KATP channels, and exercise-induced cardioprotection against apoptosis // *J. Appl. Physiol.* – 2012. – Vol. 113, No. 3. – P. 498-506.
98. Nojiri M., Tanonaka K., Yabe K., Kawana K., Iwai T., Yamane M., Yoshida H., Hayashi J., Takeo S. Involvement of adenosine receptor, potassium channel and protein kinase C in hypoxic

preconditioning of isolated cardiomyocytes of adult rat // *Jpn. J. Pharmacol.* – 1999. – Vol. 80, No. 1. – P. 15-23.

99. Chien G.L., Van Winkle D.M. Naloxone blockade of myocardial ischemic preconditioning is stereoselective // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 1996. – Vol. 28, No. 9. – P. 1895-900.

100. Huh J., Gross G.J., Nagase H., Liang B.T. Protection of cardiac myocytes via δ 1-opioid receptors, protein kinase C, and mitochondrial KATP channels // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2001. – Vol. 280, No. 1. – P. 377-383.

101. Yang X.M., Liu Y., Liu Y., Tandon N., Kambayashi J., Downey J.M., Cohen M.V. Attenuation of infarction in cynomolgus monkeys: preconditioning and postconditioning // *Basic Res. Cardiol.* – 2010. – Vol. 105, No. 1. – P. 119-128.

102. Gonzales G.F., Chung F.A., Miranda S., Valdez L.B., Zaobornyj T., Bustamante J., Boveris A. Heart mitochondrial nitric oxide synthase is upregulated in male rats exposed to high altitude (4,340 m) // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2005. – Vol. 288. – P. 2568-2573.

103. Misra M., Sarwat M., Bhakuni P., Tuteja R., Tuteja N. Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes // *Med. Sci. Monit.* – 2009. – Vol. 15, No. 10. – P. 209-219.

104. 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.

105. Kolar F., Jezková J., Balková P., Breh J., Neckár J., Novák F., Nováková O., Tomášová H., Srbová M., Ost'ádal B., Wilhelm J., Herget J. Role of oxidative stress in PKC- δ upregulation and cardioprotection induced by chronic intermittent hypoxia // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2007. – Vol. 292, No. 1. – P. 224-230.

106. Baines C.P., Goto M., Downey J.M. Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 1997. – Vol. 29, No. 1. – P. 207-216.

107. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. М.: Фирма «Слово». – 2006. – С. 556.

108. Fox R.B. Prevention of granulocyte-mediated oxidant lung injury in rat by a hydroxyl radical scavenger dimethylthiourea // *J. Clin. Invest.* – 1984. – Vol. 74, No. 4. – P. 1356-1364.

109. Just A., Whitten C.L., Arendshorst W.J. Reactive oxygen species participate in acute renal vasoconstrictor responses induced by ETA and ETB receptors // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* – 2008. – Vol. 294, No. 4. – P. 719-728.

110. Cadenas S. ROS and redox signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury and cardioprotection // *Free Radic. Biol. Med.* – 2018. – Vol. 117. – P. 76-89.

111. Li Q., Fu G.B., Zheng J. T., He J., Niu X.B., Chen Q.D. et al. NADPH oxidase subunit p22(phox)-mediated reactive oxygen species contribute to angiogenesis and tumor growth through AKT and ERK1/2 signaling pathways in prostate cancer // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2013. – Vol. 1833, No. 12. – P. 3375-3385.
112. Honma Y., Tani M., Takayama M., Yamamura K., Hasegawa H. Aging abolishes the cardioprotective effect of combination heat shock and hypoxic preconditioning in reperfused rat hearts // *Basic Res. Cardiol.* – 2002. – Vol. 97, No. 6. – P. 489-495.
113. Zhuang J.G., Zhang Y., Zhou Z.N. Hypoxic preconditioning upregulates KATP channels through activation of protein kinase C in rat ventricular myocytes // *Acta Pharmacol. Sin.* – 2000. – Vol. 21, No. 9. – P. 845-849.
114. Ogbi M., Johnson J.A. Protein kinase C ϵ interacts with cytochrome c oxidase subunit IV and enhances cytochrome c oxidase activity in neonatal cardiac myocyte preconditioning // *Biochem. J.* – 2006. – Vol. 393(Pt 1). – P. 191-199.
115. Beguin P.C., Belaidi E., Godin-Ribuot D., Lévy P., Ribouot C. Intermittent hypoxia-induced delayed cardioprotection is mediated by PKC and triggered by p38 MAP kinase and Erk1/2 // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2007. – Vol. 42, No. 2. – P. 343-351.
116. Yu H., Yang Z., Pan S., Yang Y., Tian J., Wang L., Sun W. Hypoxic preconditioning promotes the translocation of protein kinase C ϵ binding with caveolin-3 at cell membrane not mitochondrial in rat heart // *Cell Cycle.* – 2015. – Vol. 14, No. 22. – P. 3557-3565.
117. Huang Y.F., Gong K.Z., Zhang Z.G. Different roles of ERK1/2 and p38 MAPK α/β in cellular signaling during cardiomyocyte anoxia preconditioning // *Acta Physiol. Sin.* – 2003. – Vol. 55, No. 4. – P. 454-458.
118. Liu X., Wu X., Cai L., Tang C., Su J. Hypoxic preconditioning of cardiomyocytes and cardioprotection: phosphorylation of HIF-1 α induced by p42/p44 mitogen-activated protein kinases is involved // *Pathophysiology.* – 2003. – Vol. 9, No. 4. – P. 201-205.
119. Chen H.P., He M., Xu Y.L., Huang Q.R., Zeng G.H., Liu D., Liao Z.P. Anoxic preconditioning up-regulates 14-3-3 protein expression in neonatal rat cardiomyocytes through extracellular signal-regulated protein kinase $\frac{1}{2}$ // *Life Sci.* – 2007. – Vol. 81, No. 5. – P. 372-379.
120. Xu F.F., Liu X.H., Cai L.R. Role of hypoxia-inducible factor-1 α in the prevention of cardiomyocyte injury induced by hypoxic preconditioning // *Acta Physiol. Sin.* – 2004. – Vol. 56, No. 5. – P. 609-614.
121. Zhu X.M., Liu X.H., Cai L.R., Xu F.F. Hypoxic preconditioning induces endoplasmic reticulum stress-related cardioprotection mediated by p38 mitogen-activated protein kinase // *Acta Physiol. Sin.* – 2006. – Vol. 58, No. 5. – P. 463-470.

122. Wu X., Liu X., Zhu X., Tang C. Hypoxic preconditioning induces delayed cardioprotection through p38 MAPK-mediated calreticulin upregulation // *Shock*. – 2007. – Vol. 27, No. 5. – P. 572-577.
123. Ban K., Cooper A.J., Samuel S., Bhatti A., Patel M., Izumo S., Penninger J.M., Backx P.H., Oudit G.Y., Tsushima R.G. Phosphatidylinositol 3-kinase gamma is a critical mediator of myocardial ischemic and adenosine-mediated preconditioning // *Circ. Res.* – 2008. – Vol. 103, No. 6. – P. 643-653.
124. Skyschally A., van Caster P., Boengler K., Gres P., Musiolik J., Schilawa D., Schulz R., Heusch G. Ischemic postconditioning in pigs: no causal role for RISK activation // *Circ. Res.* – 2009. – Vol. 104, No. 1. – P. 15-18.
125. Yang C., Talukder M.A., Varadharaj S., Velayutham M., Zweier J.L. Early ischaemic preconditioning requires Akt- and PKA-mediated activation of eNOS via serine1176 phosphorylation // *Cardiovasc. Res.* – 2013. – Vol. 97, No. 1. – P. 33-43.
126. Uchiyama T., Engelman R.M., Maulik N., Das D.K. Role of Akt signaling in mitochondrial survival pathway triggered by hypoxic preconditioning // *Circulation*. – 2004. – Vol. 109, No. 24. – P. 3042-3049.
127. Banerjee S., Tang X.L., Qiu Y., Takano H., Manchikalapudi S., Dawn B., Shirk G., Bolli R. Nitroglycerin induces late preconditioning against myocardial stunning via a PKC-dependent pathway // *Am. J. Physiol.* – 1999. – Vol. 277 (6 Pt 2). – P. 2488-2494.
128. Dawn B., Bolli R. Role of nitric oxide in myocardial preconditioning // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2002. – Vol. 962. – P. 18-41.
129. Портниченко А.Г., Василенко М.И., Портниченко В.И., Мойбенко А.А. Острая гипоксическая гипоксия как индуктор отсроченной кардиопротекции у крыс. В кн.: Гипоксия, автоматизированный анализ гипоксических состояний. Сб. трудов под ред. А.З. Колчинской. – Москва-Нальчик. – 2005. – Т.1. – С. 185-190.
130. Портниченко А.Г., Василенко М.И., Мойбенко А.А. Влияние острой гипоксической гипоксии на индукцию синтазы оксида азота у крыс // *Физиол. журнал*. – 2003. – Т.49, № 3. – С. 47-49.
131. Kalota A., Shetzline S.E., Gewirtz A.M. Progress in the development of nucleic acid therapeutics for cancer // *Cancer. Biol. Ther.* – 2004. – Vol. 3, No. 1. – P. 4-12.
132. Cohen M.V., Downey J.M. Is it time to translate ischemic preconditioning's mechanism of cardioprotection into clinical practice? // *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* – 2011. – Vol. 16, No. 3-4. – P. 273-280.

133. Gao L., Guan Y., Cui F., Liu Y.X., Zhou Z.N., Zhang Y. Facilitation of chronic intermittent hypobaric hypoxia on carotid sinus baroreflex in anesthetized rats // *Chin. J. Physiol.* – 2012. – Vol. 55, No. 1. – P. 62-70.
134. Cai Z., Luo W., Zhan H., Semenza G.L. Hypoxia-inducible factor 1 is required for remote ischemic preconditioning of the heart // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2013. – Vol. 110, No. 43. – P. 17462-17467.
135. Bulluck H., Hausenloy D.J. Ischaemic conditioning: are we there yet? // *Heart.* – 2015. – Vol. 101, No. 13. – P. 1067-1077.
136. Oerlemans M.I., Koudstaal S., Chamuleau S.A., de Kleijn D.P., Doevendans P.A., Sluijter J.P. Targeting cell death in the reperfused heart: pharmacological approaches for cardioprotection // *Int. J. Cardiol.* – 2013. – Vol. 165, No. 3. – P. 410-422.
137. Чазов Е.И. Фундаментальная медицина как основа инноваций в медицинской практике // *Тер. архив.* – 2013. – Т. 85, № 8. – С. 6-7.
138. Hausenloy D.J., Yellon D.M. “Conditional Conditioning” in cardiac bypass surgery // *Basic Res. Cardiol.* – 2012. – Vol. 107, No. 3. – P. 258.
139. White S.K., Frohlich G.M., Sado D.M., Maestrini V., Fontana M., Treibel T.A., Tehrani S., Flett A.S., Meier P., Ariti C., Davies J.R., Moon J.C., Yellon D.M., Hausenloy D.J. Remote ischemic conditioning reduces myocardial infarct size and edema in patients with ST-segment elevation myocardial infarction // *JACC Cardiovasc. Interv.* – 2015. – Vol. 8(1-Pt B). – P. 178-88.
140. McCrindle B.W., Clarizia N.A., Khaikin S., Holtby H.M., Manlhiot C., Schwartz S.M., Caldarone C.A., Coles J.G., Van Arsdell G.S., Scherer S.W., Redington A.N. Remote ischemic preconditioning in children undergoing cardiac surgery with cardiopulmonary bypass: a single-center double-blinded randomized trial // *J. Am. Heart. Assoc.* – 2014. – Vol. 3, No. 4. – P. e000964.
141. Miyaji Y., Walter S., Chen L., Kurihara A., Ishizuka T., Saito M., Kawai K., Okazaki O. Distribution of KAI-9803, a novel δ -protein kinase C inhibitor, after intravenous administration to rats // *Drug Metab. Dispos.* – 2011. – Vol. 39, No. 10. – P. 1946-1953.
142. Lincoff A.M., Roe M., Aylward P., Galla J., Rynkiewicz A., Guetta V. et al. Inhibition of delta-protein kinase C by delcasertib as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention for acute anterior ST-segment elevation myocardial infarction: results of the PROTECTION AMI Randomized Controlled Trial // *Eur. Heart J.* – 2014. – Vol. 35, No. 37. – P. 2516-2523.
143. Pearl R.G. Erythropoietin and organ protection: lessons from negative clinical trials // *Crit. Care.* – 2014. – Vol. 18, No. 5. – P. 526.

144. Cung T.T., Morel O., Cayla G., Rioufol G., Garcia-Dorado., Angoulvant D. et al. Cyclosporine before PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction // Engl. J. Med. – 2015. – Vol. 373, No. 11. – P. 1021-1031.

145. Подоксенов Ю.К., Сидлецкая И.В., Соколов А.А., Волкова Т.Г., Мерунко А.А., Свинцова Л.И., Шишнева Е.В., Филиппов Г.П. Использование интервальной гипоксической тренировки в предоперационной подготовке детей с врожденными пороками сердца. Тез. докл. «50 лет детской хирургии Томской области». Томск. – 1996. – С. 26-28.