

АННОТАЦИЯ ПЛАНИРУЕМОЙ ТЕМЫ
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Томский национальный исследовательский медицинский центр
Российской академии наук»
Научно-исследовательский институт кардиологии

Наименование темы: Рецепторные и сигнальные механизмы кардиопротекторного эффекта срочной и долговременной адаптации к гипоксии

Сроки выполнения: 2016-2018 гг.

Номер и дата гос. регистрации АААА-А15-115120910024-0 от 09.12.2015

Номер в автоматизированной информационной системе ФАНО России: 0550-2014-0116

Шифр темы: 029

Рубрикатор научно-технической информации (ГРНТИ): 34.15.65; 34.39.00; 34.45.00

Приоритетное направление развития науки, технологий и техники в РФ: «Биомедицина и качество жизни»

Критическая технология РФ: Геномные и постгеномные технологии

Технологическая платформа: Медицина будущего

Руководитель темы,

Руководитель лаборатории экспериментальной кардиологии,
доктор медицинских наук, профессор

Л.Н. Маслов

Ответственный исполнитель:

Старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной
кардиологии, кандидат медицинских наук

Н.В. Нарыжная

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

Актуальность исследования. В России внутригоспитальная летальность при остром инфаркте миокарда (ОИМ) составляет 13,8% [Марков В.А. и др., 2011]. Среди пациентов, перенесших ОИМ, 22% вынуждены уменьшить объём или квалификацию труда, а 23% полностью утратили трудоспособность [Николаева Н.В. и др., 1997]. Эти данные свидетельствуют о большой социальной значимости разработки методов профилактики ишемических и реперфузионных повреждений сердца, вызванных ОИМ. Вполне очевидно, что назрела настоятельная необходимость в разработке принципиально новых подходов к профилактике ишемических и реперфузионных повреждений сердца. Особый интерес в этом отношении представляет способность организма включать мощные врожденные защитные механизмы с помощью адаптивных воздействий [Mastitskaya S, 2012], таких как гипоксическое прекондиционирование и долговременной адаптации к гипоксии.

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

Долговременная адаптация к гипоксии. Показано, что адаптация крыс к хронической непрерывной нормобарической гипоксии (ХННГ) ограничивает размер инфаркта при коронароокклюзии и реперфузии *in vivo* [Neckar J. et al., 2003; Maslov L.N. et al., 2013] и повышает устойчивость изолированного сердца к действию глобальной ишемии-реперфузии [Tajima M. et al., 1994]. При этом выраженность проявления инфаркт-лимитирующего эффекта у крыс, адаптированных к ХННГ, значительно больше, чем при адаптации к прерывистой гипоксии [Neckar J. et al., 2003]. Продолжительность указанного эффекта достигает 4–5 недель [Neckar J. et al., 2004]. Однако количество публикаций по кардиопротекторному эффекту ХННГ ограничено всего четырьмя статьями [Tajima M. et al., 1994; Neckar J. et al., 2003; Maslov L.N. et al., 2013; Lishmanov Y.B. et al. 2014]. Две из них – это наши публикации, [Maslov L.N. et al., 2013; Lishmanov Y.B. et al. 2014]. В отличие от адаптации к прерывистой гипоксии, рецепторный и сигнальный механизм кардиопротекторного действия адаптации к ХННГ остается малоизученным. Приоритет в этой области принадлежит нашему коллективу. Так, например, нами было установлено, что

инфаркт-лимитирующий эффект ХННГ зависит от активации μ - и δ_2 -опиоидных рецепторов [Maslov L.N. et al., 2013]. Однако сигнальный механизм ХННГ остаётся не изученным, неизвестен конечный эффектор ХННГ. Неясно, участвуют ли аденозиновые и другие рецепторы в реализации ХННГ-индуцированного повышения толерантности сердца к ишемии-реперфузии или же в протекторном эффекте ХННГ задействованы исключительно опиоидные рецепторы (ОР). Вполне вероятно, что ХННГ ввиду сложности моделирования и продолжительности воздействия не найдет применения в клинической практике. Однако изучение рецепторных и сигнальных механизмов инфаркт-лимитирующего эффекта ХННГ может послужить основой для разработки новых патофизиологически обоснованных подходов для создания лекарственных препаратов.

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

Имеющийся задел по планируемой теме. Вопросами адаптации, коллектив исследователей, возглавляемый Л.Н. Масловым, успешно, занимается с 1996 г. За это время сформировалась группа высококвалифицированных специалистов, хорошо ориентирующихся в проблеме адаптации организма к стрессу и владеющих широким спектром методик, необходимых для реализации проекта. Все методики, представленные в проекте, уже успешно используются сотрудниками группы. Исследования ведутся в тесном контакте с украинскими физиологами (Портниченко А.Г.), белорусскими кардиологами (Мрочек А.Г.), китайскими физиологами (Pei J.M.), американскими исследователями (Oeltgen P.), британскими физиологами (Khaliulin I.G.) и израильскими фармакологами (R. Mechoulam, L. Hanus), о чем свидетельствуют совместные статьи, представленные на сайте www.scopus.com Проводятся совместные семинары и стажировки. Эти факты косвенно свидетельствуют об актуальности и новизне наших исследований, в противном случае трудно было бы заинтересовать наших зарубежных коллег в сотрудничестве. Л.Н. Маслов является руководителем исследований по срочной адаптации к гипоксии (гипоксическое прекондиционирование) и долговременной адаптации к гипоксии.

Имеющийся у группы задел по проекту подтверждается наличием монографии и журнальных статей проблеме срочной и долговременной адаптации к гипоксии:

1. 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.
2. Лишманов Ю.Б., Маслов Л.Н., Нарыжная Н.В. Участвуют ли эндогенные опиоидные пептиды в реализации кардиопротекторного эффекта адаптации. Пат. физиол. и экспер. терап. 1997; № 3: 3-5.
3. Нарыжная Н.В., Крылатов А.В., Маслов Л.Н., Лишманов Ю.Б., Гросс Г.Дж., Стефано Дж.Б. Об участии δ -опиатных рецепторов и их лигандов в формировании адаптационной защиты сердца при аритмогенных воздействиях. Росс. физиол. журн. 2001; 87(12): 1617-1625.
4. Лишманов Ю.Б., Нарыжная Н.В., Маслов Л.Н., Гросс Г.Дж. Опиатергическое звено антиаритмического эффекта адаптации к гипоксии на модели ишемии и реперфузии *in vivo*. Пат. физиол. экспер. терапия 2003; № 1: 19-21.
5. Лишманов Ю.Б., Нарыжная Н.В., Крылатов А.В., Маслов Л.Н., Богомаз С.А., Угдыжекова Д.С., Гросс Г.Дж., Стефано Дж.Б. Роль опиатных рецепторов и АТФ-зависимых калиевых каналов митохондрий в формировании адаптационной

- устойчивости миокарда к аритмогенному действию ишемии и реперфузии. Известия РАН. Серия биологическая. 2003; № 6: 720-727.
6. Маслов Л.Н., Нарыжная Н.В., Крылатов А.В., Гросс Г. Дж. Эндогенные опиоидные пептиды и антиаритмический эффект адаптации к стрессу. Пат. физиол. exper. тер. 2004; № 4: 11-14.
 7. Маслов Л.Н., Лишманов Ю.Б., Нарыжная Н.В., Буданкова Е.В., Стахеев Д.Л., Соленкова Н.В., Барзах Е.И., Олтджен П.Р., Гросс Г.Дж. Роль эндогенных агонистов опиоидных рецепторов в регуляции устойчивости сердца к аритмогенному действию кратковременной ишемии и реперфузии. Бюлл. exper. биол. и мед. 2005; 139(2): 138-142.
 8. Нарыжная Н.В., Маслов Л.Н., Лишманов Ю.Б., Колар Ф. Влияние адаптации к стрессу на содержание циклических нуклеотидов в ткани миокарда при острой ишемии и реперфузии. Бюлл. exper. биол. мед. 2008; 145(5): 525-528.
 9. Колар Ф., Некар Я., Остадал Б., Маслов Л.Н., Стахеев Д.Л., Нарыжная Н.В., Таюрская А.С., Лишманов Ю.Б. Значение АТФ-чувствительных K^+ -каналов в механизме антиаритмического и кардиопротекторного действия адаптации к периодической гипобарической гипоксии. Росс. физиол. жур. 2008; 94(4): 448-455.
 10. Нарыжная Н.В., Некар Я., Маслов Л.Н., Лишманов Ю.Б., Колар Ф., Ласукова Т.В. Роль сарколеммальных и митохондриальных K_{ATP} -каналов в реализации кардиопротекторного и антиаритмического эффектов разных режимов гипобарической адаптации. Росс. физиол. жур. 2009; Т. 95, № 8: 837-849.
 11. Нарыжная Н.В., Лишманов Ю.Б., Колар Ф., Маслов Л.Н., Жанг И., Портниченко А.Г. Внутриклеточные механизмы кардиопротекции при адаптации к гипоксии. Триггеры и киназные каскады. Росс. физиол. жур. 2011; 97 (9): 35-50.
 12. Нарыжная Н.В., Маслов Л.Н., Таюрская А.С., Лишманов Ю.Б. К вопросу о рецепторной специфичности опиоидергического повышения электрической стабильности сердца при адаптации к стрессу и гипобарической гипоксии. Сиб. мед. жур. (Томск). 2011; 26(4), выпуск 1: 143-147.
 13. Лишманов Ю.Б., Маслов Л.Н., Нарыжная Н.В., Пей Ж.М., Колар Ф., Жанг И., Портниченко А.Г., Ванг Х. Эндогенная опиоидная система как звено срочной и долговременной адаптации организма к экстремальным воздействиям. Перспективы клинического применения опиоидных пептидов. Вестник РАМН 2012; № 6: 73-82.
 14. Лишманов Ю.Б., Нарыжная Н.В., Маслов Л.Н., Прокудина Е.С., Горбунов А.С., Цибульников С.Ю. Функциональное состояние миокардиальных митохондрий при ишемии-реперфузии сердца у крыс, адаптированных к гипоксии. Бюлл. exper. биол. мед. 2013;156(11): 589-592.
 15. Maslov L.N., Naryzhnaya N.V., Tsibulnikov S.Yu., Kolar F., Zhang Y., Wang H., Gusakova A.M., Lishmanov Yu.B. Role of endogenous opioid peptides in the infarct size-limiting effect of adaptation to chronic continuous hypoxia. Life Sci. 2013; 93(9-11): 373-379.
 16. Maslov L.N., Naryzhnaya N.V., Tsibulnikov S.Yu., Kolar F., Zhang Y., Wang H., Gusakova A.M., Lishmanov Yu.B. Role of endogenous opioid peptides in the infarct size-limiting effect of adaptation to chronic continuous hypoxia. Life Sci. 2013; 93(9-11): 373-379.
 17. Маслов Л.Н., Лишманов Ю.Б., Крылатов А.В., Семенцов А.С., Портниченко А.Г.,
 18. Подоксёнов Ю.К., Халиулин И.Г. Сравнительный анализ кардиопротекторной и антиаритмической эффективности раннего и позднего гипоксического preconditionирования. Бюлл. exper. биол. мед. 2013; 156(12): 705-708.
 19. Нарыжная Н.В., Маслов Л.Н., Прокудина Е.С., Лишманов Ю.Б. Участие опиоидных рецепторов в цитопротекторном эффекте адаптации к хронической гипоксии при

гипоксии-реоксигенации изолированных кардиомиоцитов. Бюлл. exper. биол. мед. 2015; 159(2): 166-169.

Наши предварительные данные по тематике проекта получены в 2014 г. Нами установлено, что ХННГ обеспечивает повышение устойчивости изолированного перфузируемого сердца к действию тотальной ишемии-реперфузии. Одновременно повышается устойчивость митохондрий к действию ишемии и реперфузии на изолированное сердце [Maslov L.N. et al., в печати]. Оба эффекта зависят от активации опиоидных рецепторов. Кроме того, мы установили, что ХННГ повышает выживаемость изолированных кардиомиоцитов в условиях моделирования гипоксии-реоксигенации. Этот эффект также оказался зависимым от активации опиоидных рецепторов.

В исследованиях по гипоксическому прекондиционированию мы получили, предварительные данные, свидетельствующие о том, что триггерами ГП являются активные формы кислорода, оксид азота и, возможно, K_{ATP} -каналы.

Все перечисленные факты вселяют уверенность в успешном выполнении проекта сотрудниками лаборатории экспериментальной кардиологии НИИ кардиологии.

Цель работы: Изучить рецепторные и сигнальные механизмы кардиопротекторного эффекта срочной и долговременной адаптации к гипоксии

Задачи:

- (1) Исследовать роль NO-синтазы, протеинкиназы С, тирозинкиназ, ERK1/2-киназы, PI3-киназы, K_{ATP} -каналов в механизме инфаркт-лимитирующего эффекта адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии (ХННГ) *in vivo*.
- (2) Оценить значение вегетативной нервной системы, опиоидных рецепторов, аденозиновых рецепторов, активных форм кислорода, протеинкиназы С, тирозинкиназ, ERK1/2-киназы, PI3-киназы, K_{ATP} -каналов, NO-синтазы в триггерном механизме инфаркт-лимитирующего эффекта раннего гипоксического прекондиционирования (ГП).
- (3) В экспериментах на изолированных кардиомиоцитах, подвергнутых действию гипоксии-реоксигенации, исследовать роль опиоидных рецепторов, протеинкиназы С, тирозинкиназ, ERK1/2-киназы, PI3-киназы, NO-синтазы в механизме цитопротекторного действия ХННГ.
- (4) Оценить значение вегетативной нервной системы, опиоидных рецепторов, аденозиновых рецепторов, активных форм кислорода, протеинкиназы С, тирозинкиназ, ERK1/2-киназы, PI3-киназы, K_{ATP} -каналов, NO-синтазы в медиаторном механизме инфаркт-лимитирующего действия раннего ГП.
- (5) В экспериментах на изолированном перфузируемом сердце, подвергнутом действию ишемии-реперфузии, исследовать роль опиоидных рецепторов в механизме цитопротекторного действия ХННГ.
- (6) Выяснить роль опиоидных рецепторов в изменении биоэнергетики миокарда после ишемии и реперфузии сердца у контрольных и адаптированных к ХННГ крыс.

Методы исследования

Адаптация к хронической нормобарической гипоксии

Животных будут подвергать адаптации, помещая их в гипоксическую камеру при 12% O₂ и нормальном атмосферном давлении на протяжении 21 дня [Neckar J. et al. 2003]. Объем гипоксической камеры составит 1,5 м³, концентрацию O₂ будут поддерживать на уровне 11,75—12,25%, концентрацию CO₂ - на уровне 0,03% системой «Био-нова-204G4R1» (НТО Био-нова, Россия, г. Москва). Давление O₂ и CO₂ внутри камеры будут постоянно контролировать датчиками TCO₂-IR и OLC 20 (Oldham, Франция) через блок управления MX32 (Oldham, Франция).

Экспериментальный инфаркт миокарда. Исследования будут выполняться на крысах-самцах линии Вистар массой 250 – 300 г. Крысы будут наркотизированы пентобарбиталом натрия (60 мг/кг, внутривенно, Sanofi) и подключены к аппарату искусственной вентиляции легких SAR-830 Series Small Animal Ventilator компании CWE, Inc, (Ардмор, США), осуществляющему дыхание комнатным воздухом с частотой 68 вдохов/минуту. Будет выполняться левосторонняя торакотомия и перикард будет удален, чтобы видеть местоположение левой нисходящей коронарной артерии. Лигатуру на левую нисходящую коронарную артерию будут накладывать на 1-2 мм ниже ушка левого предсердия по методу группы проф. G.J. Gross [Fryer R.M. et al., 1999a; Schultz J.E. et al., 1997a]. Коронароокклюзия будет верифицирована по появлению эпикардального цианоза и подъему сегмента ST. Правая сонная артерия будет канюлирована для измерения артериального давления (АД), которое регистрируют с помощью датчика давления SS13L (Biorac System Inc., Goleta, Калифорния, США), сопряженного с аппаратом для электрофизиологических исследований MP35 (Biorac System Inc., Goleta, США). Этот же аппарат будет использован для записи ЭКГ. Количественную обработку полученных данных осуществляют с помощью программного обеспечения INSTBSL-W компании Biorac System Inc., (Goleta, США). После 20 минут ишемии лигатура будет ослаблена и восстановление кровотока будет подтверждено появлением эпикардальной гиперемии. Продолжительность реперфузии будет составлять 3 часа. Выявление зоны некроза и зоны риска будут проводить по методу, предложенному J. Neckar и соавт. [Neckar J. et al., 2003]. После реперфузии сердца будут удалять и промывать с помощью шприца через канюлированную аорту физиологическим раствором, содержащим 125 МЕ/мл гепарина. Для определения области риска (ЗР) лигатура будет вновь затянута и миокард будет окрашен струйно через аорту 5% перманганатом калия, после промывки будут сделаны срезы сердца толщиной в 1 мм перпендикулярно к продольной оси. Зона некроза будет выделена из зоны риска путем окрашивания 1%-ым раствором 2,3,5-трифенил тетразолия хлорида в течение 30 минут при 37°C. После окончания окраски срезы будут помещены в 10% раствор формальдегида на 1 сутки. На следующий день после окрашивания правый желудочек будет удален и срезы отсканированы с обеих сторон сканером HP Scanjet G2710. Область риска и зона инфаркта (ЗИ) будут определяться компьютеризированным планиметрическим методом. Размер зоны инфаркта будет выражен в процентах от размера зоны гипоперфузии. Следует отметить, что у адаптированных к гипоксии крыс будет использован протокол моделирования инфаркта миокарда, такой же, какой применяют наши чешские коллеги, с которым мы поддерживаем тесное сотрудничество (проф. F. Kolar).

Протокол исследований in vivo. Фармакологические агенты будут вводить внутривенно за 15 мин до коронароокклюзии. Каждая экспериментальная группа будет включать до 15 животных. Для оценки значения NO-синтазы в сигнальном механизме защитного действия

ХННГ будет использовано введение L-NAME (10 мг/кг) [Ebrahim Z. et al., 2001]. Если инфаркт-лимитирующий эффект окажется зависимым от NO-синтазы, то будут использовать селективный ингибитор индуцибельной NO-синтазы S-метилизотиомочевина (3 мг/кг) [Zhao T.C. et al., 2001] и селективный ингибитор эндотелиальной NO-синтазы 7-нитроиндазол (50 мг/кг) [Chiari P.C. et al., 2005]. Ингибитор протеинкиназы C (ПКC) хелеритрин будут применять в дозе 5 мг/кг [Maslov L.N. et al., 2009; Fryer R.M., et al., 1999b]. Ингибитор тирозинкиназ генистеин будут вводить в дозе 5 мг/кг [Maslov L.N. et al., 2009; Fryer R.M. et al., 1999]. Вортманнин ингибитор PI3-киназы будут вводить в дозе 0,015 мг/кг [Peart et J.N. al., 2008]. Блокатор MEK/ERK1/2-киназ PD-098059 будут применять в дозе 0,5 мг/кг [Lasley R.D. et al., 2005]. Для блокады K_{ATP} -каналов будут использовать глибенкламид (0,3 мг/кг) [Maslov L.N. et al., 2009; Schultz J.E. et al., 1997a]. В случае, если глибенкламид устранил защитный эффект ХННГ, будут применять ингибитор мит K_{ATP} -каналов 5-гидроксидеканоат (5 мг/кг) [Fryer R.M. et al., 2000a; Schultz J.E. et al., 1997c] и ингибитор сарк K_{ATP} -каналов HMR 1098 (3 мг/кг) [Fryer R.M. et al., 2000a, 2000b].

Большинство фармакологических агентов растворят в 0,9% NaCl. Глибенкламид, хелеритрин, вортманнин, 7-нитроиндазол, SB-203580, PD-098059, первоначально растворят 0,1 мл DMSO, а затем - в 1 мл 20% гидроксипропил- β -циклодекстрине. Все растворы будут готовить непосредственно перед использованием.

Исследование in vitro. Это исследование будет выполняться на изолированных перфузируемых сердцах крыс. Крыс наркотизируют диэтиловым эфиром и умертвят с помощью цервикальной дислокации.

После стернотомии сердца быстро иссекут и поместят в бикарбонатный буфер Кребса-Хензелята (+40°C) до остановки. Аорту канюлируют для ретроградной перфузии буфером Кребса-Хензелята. Этот буфер будет иметь температуру +37°C и содержать (в мМ): 120 NaCl, 4,8 KCl, 2,0 CaCl₂, 1,2 MgSO₄, 1,2 KH₂PO₄, 20,0 NaHCO₃, 10,0 глюкозы. После насыщения буфера смесью газов 95% O₂ – 5% CO₂ его pH будет доведена до 7,4. Наполненный водой латексный баллончик будет прикреплён к металлической канюле и введён в полость левого желудочка через митральный клапан. Через посредство канюли баллончик будет связан с датчиком давления для непрерывного измерения давления в левом желудочке. Объем баллончика будет доведен до создания конечного диастолического давления в левом желудочке (КДД ЛЖ) до 5 мм рт. ст. Каждое сердце будут перфузировать при постоянном давлении в 52 мм рт. ст. Систолическое и диастолическое давление в левом желудочке будут регистрировать с помощью датчика давления SS13L (Biopac System Inc., Goleta, Калифорния, США), сопряженного с указанным баллончиком. Динамику давления в левом желудочке будут регистрировать с помощью аппарата для электрофизиологических исследований MP35 (Biopac System Inc., Goleta, США). Количественную обработку полученных данных осуществят с помощью программного обеспечения INSTBSL-W компании Biopac System Inc., (Goleta, США). В ходе опыта будут регистрировать частоту сердечных сокращений (ЧСС, уд/мин), давление, развиваемое левым желудочком (ДРЛЖ, мм рт. ст.). Последнее вычислят как разницу между систолическим и диастолическим давлением. В динамике эксперимента измерят также конечное диастолическое давление (КДД, мм рт.ст.). Кроме того, будут определять максимальную скорость увеличения давления ЛЖ (+dP/dt) и максимальную скорость снижения давления ЛЖ (-dP/dt). Показатели будут регистрировать во время воздействия препаратов и во время реперфузии, сопоставляя с исходными показателями (до ишемии) в конце стабилизационного периода. Электрокардиограмму (ЭКГ) будут записывать с помощью электродов, закрепленных на верхушке сердца и на аорте. ЭКГ будут непрерывно регистрировать с помощью аппарата для электрофизиологических исследований MP35 (Biopac

System Inc., Goleta, США). Стабилизационный период составит 20 - 30 мин. Затем будут моделировать тотальную ишемию продолжительностью 45 мин. Реперфузию будут проводить раствором Кребса-Хензеляйта в течение 30 мин. Во время реперфузии будут регистрировать сократимость сердца и коронарный проток.

Некроз кардиомиоцитов будут оценивать по уровню креатинкиназы в перфузате. Для этого раствор, оттекающий от сердца, будут собирать для определения выброса креатинкиназы в течение последних 10 мин стабилизационного периода и в течение 10 мин реперфузии. Креатинкиназу будут определять энзиматическими наборами СК-NAc kits компании Analyticon Biotechnologies AG, (Lichtenfels, Германия). Выброс креатинкиназы будут выражать в условных единицах на грамм массы сердца за 10 мин перфузии.

Протокол исследований in vitro. Перфузию изолированного сердца антагонистами опиоидных рецепторов будут вести в течение 15 мин непосредственно перед 45 минутной глобальной ишемией и реперфузией. Неселективный антагонист всех типов опиоидных рецепторов налоксон будут использовать в конечной концентрации 300 нМ/л [Маслов Л.Н. и др., 2006; Munday M.K. et al., 2000]; антагонист κ-опиоидных рецепторов нор-биналторфимин будут применять в конечных концентрации 3 нМ/л [Heijna M.H., et al., 1990]; Селективный δ₁-антагонист BNTX (7-Benzylidenenaltrexone) будут использовать в конечной концентрации 1 нМ/л [Sanchez-Blazquez P. et al., 1999; Portoghese P.S. et al., 1992]; Смешанный антагонист δ₁- и δ₂-рецепторов налтриндола гидрохлорид будут применять в конечной концентрации 30 нМ/л [Roques B.P. et al., 1990]; Селективный антагонист δ₂-рецепторов налтрибен будут использовать в конечной концентрации 1 нМ/л [Buzas B. et al., 1994; Sanchez-Blazquez P. et al., 1999; Sofuoglu M. et al., 1992; Tang T. et al., 1994]. Селективный антагонист μ-рецепторов СТАР (NH₂-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Arg-Thr-L-Pen-Thr-NH₂) [Garcia-Barrado M.J. et al., 2002; Ortiz-Miranda S.I. et al., 2003; Scherrer G. et al., 2004] будут использовать в конечной концентрации 100 нМ/л; Селективный антагонист δ-рецепторов TIPP[ψ] (H-Tyr-Ticψ[CH₂-NH]Phe-Phe-OH) будут применять в конечной концентрации 30 нМ/л [Schiller P.W. et al., 1993]; Селективный антагонист ORL1-рецепторов (±)J-113397 ((±)-1-[(3R*,4R*)-1-(Cyclooctylmethyl)-3-(hydroxymethyl)-4-piperidinyl]-3-ethyl-1,3-dihydro-2H-benzimidazol-2-one) будут использовать в конечной концентрации 56 нМ/л [Kawamoto H. et al., 1999]. Препарат будут растворять в DMSO. Для изучения роли K_{ATФ}-каналов в реализации кардиотропных эффектов ХННГ применят блокатор сарколеммальных и митохондриальных K_{АТР}-каналов глибенкламид, который будут предварительно растворять DMSO и использовать в конечной концентрации 10 μМ/л [Burley D.S. и Baxter G.F., 2007; Nishida H., et al. 2009]. Будет применен блокатор митохондриальных K_{АТР}-каналов 5-гидроксидеканоат (5-ГД) в конечной концентрации 100 μМ/л [Burley D.S. и Baxter G.F., 2007]. Препарат растворят в растворе Кребса-Хензеляйта. Селективный блокатор сарколеммальных K_{ATФ}-каналов HMR1098 будут использовать в конечной концентрации 10 μМ/л [Burley D.S. и Baxter G.F., 2007]. Препарат будут растворять в растворе Кребса-Хензеляйта. Для оценки роли протеинкиназы С (ПКС) будет применен блокатор ПКС хелеритрина хлорид в конечной концентрации 5 μМ/л [Hedayati N. et al., 2003; Zhu Z., et al. 2000]. Ингибитор ПКС предварительно растворят в DMSO. Для ингибирования PI3-киназы вортманнин будут использовать в конечной концентрации 100 нМ/л [Yang X.M. et al., 2005]. Вортманнин предварительно растворят в DMSO. Ингибитор ERK1/2 киназы PD-98059 будут растворять в DMSO и использовать в конечной концентрации 10 μМ/л [Milano G. et al., 2010; Tamareille S. et al., 2009]

Перфузия с антагонистами и ингибиторами будет вестись в течение 10 мин непосредственно перед началом глобальной ишемии. DMSO используют в конечной

концентрации 0.01%, в которой он не влияет на параметры сократимости изолированного сердца и его устойчивость к действию ишемии-реперфузии [Маслов Л.Н. и др., 2012].

Эксперименты с митохондриями кардиомиоцитов. После окончания реперфузии из ткани желудочков будут выделять митохондрии методом дифференциального центрифугирования [Argaud L. et al., 2005, Chen X. et al., 2002]. Для этого левый и правый желудочек сердца измельчат ножницами при +2°C, а затем гомогенизируют, используя диспергатор T10 basic ULTRA-TURRAX с диспергирующей насадкой S10N-5G (IKA-Werke, Staufen, Германия), в растворе, содержащем 70 мМ сахарозы, 210 мМ маннитола, 1 мМ ЭГТА, 10 мМ HEPES, pH 7.4. Гомогенат центрифугируют при 900 g в течение 10 мин в рефрижераторной центрифуге Eppendorf 5810 R (Eppendorf AG, Гамбург, Германия). Супернатант соберут, а митохондрии, содержащиеся в нем, осадят центрифугированием при 9000 g в течение 10 мин. Осадок, содержащий митохондрии, промоют буфером (70 мМ сахарозы, 210 мМ маннитола, 0,1 мМ EGTA в 10 мМ HEPES, pH 7.4) и осадят повторным центрифугированием при 9000g в течение 10 мин. Все процедуры проведут в холодильной камере при +2 – +4°C. Осадок митохондрий суспендируют в 200 мкл буфера, содержащего 70 мМ сахарозы, 210 мМ маннитола, 10 мМ HEPES, pH 7.4. Содержание белка в суспензии митохондрий определяют методом Бредфорда [Bradford M.M. et al., 1976]. Для приготовления растворов будут использованы реагенты компании Sigma-Aldrich (St. Louis, США). Дистиллированную воду для приготовления растворов подвергнут дополнительной очистке на аппарате Simplicity (Millipore Corporation, Molheim, Франция).

Измерение трансмембранного потенциала митохондрий ($\Delta\psi$), проведут с использованием катионного флуоресцентного зонда – этиловый эфир тетраметилродамина (TMRE, tetramethylrhodamine ethyl ester) компании Invitrogen, Molecular Probes Inc., (Eugene, США) на спектрофлуориметре Shimadzu RF-5301-PC (Shimadzu Corporation, Киото, Япония) при длинах волн возбуждения/излучения $\lambda_{Ex}=550$ нм; $\lambda_{Em}=575$ нм [Scaduto R.C. et al., 1999] в буфере, содержащем 200 мМ сахарозы, 10 мМ Tris-HCl, 1 мМ KH_2PO_4 , 10 мкМ EGTA, 0,3 мМ пирувата, 0,3 мМ малата, pH 7.4, 25°C. Конечная концентрация TMRE составит 150 нмоль/л, содержание митохондриального белка будет 1 мг/мл [Singh I.N. et al., 2006]. Сброс $\Delta\psi$ осуществляют, добавляя разобщитель FCCP (Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone) в конечной концентрации 0,1 μ М. За величину трансмембранного потенциала примут удельное падение флуоресценции при добавлении FCCP.

Состояние МРТ-поры (mitochondrial permeability transition pore) будут оценивать по Ca^{2+} -связывающей способности митохондрий, которую определяют с помощью флуоресцентного Ca^{2+} -чувствительного зонда Calcium Green-5N (Invitrogen, Molecular Probes Inc., Eugene, США) при длинах волн возбуждения/излучения $\lambda_{Ex}=506$ нм; $\lambda_{Em}=535$ нм [Gomez L. et al., 2008, Singh I.N. et al., 2006] на спектрофлуориметре Shimadzu RF-5301-PC. Среда инкубации будет содержать 200 мМ сахарозы, 10 мМ Tris-HCl, 1 мМ KH_2PO_4 , 10 мкМ EGTA, 0,3 мМ пирувата, 0,3 мМ малата, pH 7.4, 25°C, объем 3 мл, при концентрации Calcium Green -5N – 100 нМ и митохондриального белка – 1 мг/мл. К суспензии митохондрий будут дробно добавлять по 100 нМ $CaCl_2$, регистрируя возрастание свечения Calcium Green-5N, которое затем будет угасать в результате аккумуляции митохондриями Ca^{2+} . Хлорид кальция будут добавлять до тех пор, пока не произойдет открытие МРТ-поры и массиванный выход Ca^{2+} , детектируемый по резкому возрастанию флуоресценции Calcium Green-5N. Кальций-связывающую способность митохондрий вычислят по максимальному количеству удерживаемого митохондриями Ca^{2+} в пересчете на мг митохондриального белка [Gomez L. et al., 2008].

Оценку параметров дыхания митохондрий проведут по поглощению ими кислорода в закрытой термостатируемой камере (1,6 мл) при +25°C с помощью кислород-чувствительного Кларковского электрода («Эконикс-эксперт», Москва, Россия) и оксиграфа «Эксперт-001» («Эконикс-эксперт», Москва, Россия) в среде, содержащей 180 мМ сахарозы, 70 мМ маннитола, 5 мМ KH_2PO_4 , 5 мМ MgCl_2 , 10 мМ HEPES, pH 7,37 [Singh I.N. et al., 2006]. Скорость поглощения кислорода будут измерять в присутствии НАДН-зависимых субстратов 3 мМ малата и 3 мМ пирувата (состояние 2, V_2), после добавления 200 нМ АДФ (состояние 3, V_3) и когда синтез АТФ будет завершен (состояние 4, V_4) [Chance B. и Williams G.R. 1955]. Разобщения окислительного фосфорилирования вызовут с помощью FCCP (10 мкМ). Скорость дыхания митохондрий будут выражать в нМ кислорода на мг белка в минуту. Эффективность дыхания вычислят по соотношению количества добавленного АДФ к поглощенному в течение состояния 3 кислороду (коэффициент АДФ/О).

Аноксии-реоксигенации изолированных кардиомиоцитов. Выделение изолированных кардиомиоцитов из сердца крысы проведут энзиматическим методом с применением коллагеназы тип II компании Worthington Biochemical Corp. (Lakewood, США). Анестезированных этиловым эфиром и гепаринизированных (внутрибрюшинно 5000 МЕ гепарина на 1 кг массы крысы) крыс умертвят шейной дислокацией. После стернотомии сердца быстро извлекут и поместят в буфер Тирода (+4°) до остановки. Аорту канюлируют и закрепят для ретроградной перфузии в аппарате Лангендорфа, подключённому к перистальтическому насосу Minipuls Evolution (Gilson inc., Middleton, США). Скорость перфузии на протяжении всего выделения кардиомиоцитов составит 10 мл/мин, температура 37°C, все растворы будут предварительно насыщены смесью газов 95% O_2 – 5% CO_2 , после чего их pH доведут до 7,4. Перфузию осуществят буфером Тирода (в мМ: 140 NaCl, 5.4 KCl, 1 Na_2HPO_4 , 1 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 glucose, 5 HEPES, 1 CaCl_2), в течение 3 минут. Следом осуществят перфузию бескальциевым буфером Тирода (в мМ: 140 NaCl, 5.4 KCl, 1 Na_2HPO_4 , 1 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 глюкоза, 5 HEPES) в течение 3 минут. Последующую перфузию будут осуществлять раствором коллагеназы, содержащим (в мМ): 140 NaCl, 5.4 KCl, 1 Na_2HPO_4 , 1 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 glucose, 5 HEPES, 1,6 г/л БСА, коллагеназу тип II, 335 U/мл и протеазу XIV (230 мг/л) в течение 12-20 минут. После чего миокард будут перфузировать бескальциевым раствором Тирода, не содержащем ферментов, в течение 4 минут. Миокард отсекут от аорты и диспергируют в 10 мл бескальциевого буфера Тирода, содержащего 10 мг/мл БСА. Полученную суспензию клеток будут фильтровать через марлю, клетки будут осаждают при комнатной температуре в течение 5 минут. Супернатант удалят, осевшие кардиомиоциты суспендируют в буфером Тирода до 7 мл. Количество клеток будут контролировать микроскопически, в 0,001 мм³ суспензии будет содержаться 30 клеток. В работе будут использовать протеазу XIV и компании Sigma-Aldrich (St. Louis, США). Дистиллированную воду для приготовления растворов подвергнут дополнительной очистке на аппарате Simplicity (Millipore Corporation, Molheim, Франция). Для стабилизации выделенные клетки будут инкубировать в течение 1 ч при температуре +28°C под протоком CO_2 в CO_2 -инкубаторе MCO-5AC (SANYO Electric Ltd, Osaka, Япония).

После окончания инкубации проведут контроль выживаемости клеток. Для этого 100 мкл суспензии клеток осадят, осадок окрасят 10 мкл красителя трипанового синего (0,04%) и подсчитают процент погибших клеток (окрасятся синим), клеток в состоянии апоптоза (неокрашенные клетки округлой формы) и жизнеспособных палочковидных кардиомиоцитов (соотношение длина : ширина не менее 3:1). Исследование проведут на микроскопе Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss Surgical GmbH, Германия). В случае, если выживаемость клеток составит более 50%, кардиомиоциты будут считать пригодными для

дальнейшего изучения. Надосадочную среду, полученную при осаждении клеток, используют для контроля выхода ЛДГ (лактатдегидрогеназы). Определение ЛДГ проводят энзиматическим методом с применением наборов Fluitest LDH-L (Analyticon biotechnologies AG, Lichtenfels, Германия) на планшетном спектрофотометре Infinete M200 Pro (Tecan, Salzburg, Австрия). Выход ЛДГ вычисляют в процентах относительно общего содержания этого фермента в клетках, которое измеряют в предварительно лизированных кардиомиоцитах (500 мкл суспензии клеток инкубируют 45 мин с 75 мкл 8% Тритона X100 при 37°C, центрифугируют 30 сек при 10000 g, в супернатанте измеряют количество ЛДГ).

Перед моделированием аноксии в суспензию клеток добавляют антагонисты и ингибиторы, в тех же концентрациях, в которых их будут использовать в опытах на изолированном перфузируемом сердце. Время инкубации составит 25 минут. Для моделирования аноксии будут использовать 1 мл суспензии клеток, которым позволят самопроизвольно выпасть в осадок, супернатант тщательно удалят. К осадку добавляют 1 мл аноксического буфера, содержащего (в mM): 118 NaCl, 25 NaHCO₃, 4,7 KCl, 1,2 MgSO₄, 1,2 KH₂PO₄, 5 2-дезоксиглюкозы, pH 7,4. Для предотвращения доступа кислорода на поверхность суспензии накладывают 5-6 капель минерального масла. Клетки подвергнут аноксии в течение 20 минут при комнатной температуре, как рекомендовано R.S. Vander Heide и соавт. [Vander Heide R.S. et al., 1990]. Контролем будут служить клетки, ресуспендированные вместо аноксического буфера в бескальциевом растворе Кребса, содержащем (в mM): 118 NaCl, 25 NaHCO₃, 11 Glucose, 4,7 KCl, 1,2 MgSO₄, 1,2 KH₂PO₄, pH 7,4. После окончания аноксии минеральное масло удалят автоматической микропипеткой, суспензию клеток центрифугируют 1 мин при 0,8 g, на центрифуге Eppendorf 5810 R (Eppendorf AG, Гамбург, Германия). Супернатант над осадком контрольных и опытных клеток тщательно соберут и используют для определения ЛДГ, после чего ко всем клеткам добавляют 1 мл буфера Тирода и оставляют на 30 минут при 25°C (реоксигенация). По окончании реперфузии во всех пробах проводят контроль выживаемости клеток и измеряют выход ЛДГ как это описано выше. Выживаемость клеток и выход ЛДГ при аноксии и реперфузии вычисляют в процентах от контроля (инкубация с буфером Кребса).

Гипоксическое прекондиционирование

Это исследование будет выполняться на крысах самцах линии Вистар массой 250 - 300 г. Все инвазивные процедуры (введение препаратов и торакотомия) будут выполняться под наркозом.

Гипоксическое прекондиционирование. Для моделирования гипоксического прекондиционирования крысу на 10 мин будут помещать в герметичную банку объемом 3,3 литра, где в течение 1 мин создадут воздушную среду, содержащую 8% O₂, 0,9% CO₂ и 91,1% N₂. Через 10 мин концентрация кислорода снизится до 7,3%, а уровень CO₂ повысится до 1,3%. Уровень кислорода и углекислого газа определяют с помощью газоанализатора Stat Profile M (Nova Biomedical Corporation, Waltham, США). За гипоксией последует 10-минутная реоксигенация (21% O₂). Как показали наши эксперименты, шесть циклов гипоксии-реоксигенации по 20 мин обеспечивают снижение соотношения ЗИ/ОР на 24%, не оказывая влияния на гемодинамику при коронароокклюзии и не изменяют частоту возникновения ишемических и реперфузионных аритмий [Маслов Л.Н. и др. 2013]. Интервал времени между последним сеансом гипоксии и коронароокклюзией в случае раннего ГП составит 40 мин.

Моделирование экспериментального инфаркта миокарда. Исследования будут выполняться на крысах-самцах линии Вистар массой 250 – 300 г. Крысы будут наркотизированы α -хлоралозой (50 мг/кг, внутривенно, Sigma) и подключены к аппарату искусственной вентиляции легких SAR-830 Series Small Animal Ventilator компании CWE, Inc, (Ардмор, США), осуществляющему вентиляцию лёгких комнатным воздухом с частотой 68 вдохов/минуту. Будет выполняться левосторонняя торакотомия и перикард будет удален, чтобы видеть местоположение левой нисходящей коронарной артерии. Лигатура на левую нисходящую коронарную артерию будет накладываться на 1-2 мм ниже ушка левого предсердия по методу группы проф. G.J. Gross [Fryer R.M. et al., 1999; Schultz J.E. et al., 1997b]. Коронароокклюзия будет верифицирована по появлению эпикардального цианоза и подъему сегмента ST. Правая сонная артерия будет канюлирована для измерения артериального давления (АД), которое регистрируют с помощью датчика давления SS13L (Biopac System Inc., Goleta, Калифорния, США), сопряженного с аппаратом для электрофизиологических исследований MP35 (Biopac System Inc., Goleta, США). Этот же аппарат будет использован для записи ЭКГ. Количественную обработку полученных данных осуществят с помощью программного обеспечения INSTBSL-W компании Biopac System Inc., (Goleta, США).

У крыс, наркотизированных α -хлоралозой и находящихся на искусственной вентиляции, будут воспроизводить ишемию (45 мин) и реперфузию (2 ч), используя технику, описанную ранее J.E.J Schultz и соавт. [Schultz J.E. et al., 1997]. Измерение очага инфаркта будут осуществлять, как предложено J.E.J Schultz и соавторами [Schultz J.E. et al., 1997]. После каждого эксперимента будут производить реокклюзию левой коронарной артерии и вводить внутривенно краситель Patent blue violet для окрашивания области левого желудочка с нормальным кровотоком. Крыс умертвят с помощью инъекции 15% KCl. Сердце иссекут, выделяют левый желудочек и сделают пять поперечных срезов толщиной в 1 мм, используя слайсер HSRA001-1 (Zivic Instruments, Pittsburgh, США). Эта процедура позволяет визуализировать неишемизированную область и область риска (ОР, зона ишемии). Зону риска отделят от интактного миокарда. Обе области (неишемизированная и ЗР) будут инкубировать 15 мин с 0,1% нитротетразолием синим (НТС) в 100 мМ фосфатном буфере (pH = 7,4, +37°C). Краситель НТС является индикатором жизнеспособной и нежизнеспособной ткани. НТС быстро восстанавливается дегидрогеназами, которые присутствуют в живом миокарде, поэтому ткань окрашивается в серебристый цвет. Поскольку нежизнеспособный, инфарктированный миокард не содержит дегидрогеназ, ткань сохраняет бледно розовую окраску. Зону инфаркта (ЗИ) и ОР будут определять гравиметрически. Затем ЗИ будут рассчитывать в процентах от ОР (ЗИ/ОР) и в процентах от массы левого желудочка (ЗИ/ЛЖ). ЭКГ будут записывать в течение 45 мин ишемии и первых 10 мин реперфузии.

Протокол исследований. Фармакологические агенты будут вводить внутривенно за 15 мин до гипоксического прекондиционирования. Каждая экспериментальная группа будет включать 15 животных. Для оценки вклада вегетативной нервной системы в защитный эффект ГП будет использовано предварительное введение блокатора вегетативных нервных ганглиев гексаметония (10 мг/кг) [Sander G.E. et al., 1989]. Выбор доз антагонистов ОР и схема введения были основаны на опубликованных данных [Maslov L.N. et al., 2009]. Антагонист всех типов ОР налтрексон будут применять в дозе 5 мг/кг [Maslov L.N. et al., 2009]. Если инфаркт-лимитирующий эффект окажется опиоид-зависимым, то будут использовать другие антагонисты ОР: неселективный антагонист налоксона метиодид (5 мг/кг), непроникающий через ГЭБ [Schultz J.E.J. et al., 1997d; Maslov L.N. et al., 2009]; антагонист μ -ОР СТАР (0,1 мг/кг) [Maslov L.N. et al., 2013]; антагонист δ -ОР TIPP[ψ] (0,5 мг/кг) [Maslov L.N. et al., 2013]; селективный δ_1 -ОР антагонист BNTX 0,7 мг/кг [Sofuoglu M. et al., 1993; Maslov L.N. et al.,

2009]; селективный δ_2 -ОР ингибитор налтрибен месилат (0,3 мг/кг) [Kamei J. et al., 1995; Maslov L.N. et al., 2009]; селективный антагонист к-ОР норбинаторфимин (2 мг/кг) [Guo H.T. et al., 2011]. Для блокады всех типов аденозиновых рецепторов будут использовать 8-р-(sulphophenyl)theophylline (7,5 мкг/кг) [Philipp S. et al., 2006]. Если инфаркт-лимитирующий эффект адаптации удастся устранить, то будут использовать селективные антагонисты аденозиновых рецепторов. Для блокады аденозиновых A_1 и A_2 рецепторов будут использовать препарат CGS-15943 [Ghai G. et al., et al. 1987] в дозе 0,5 мг/кг [Bivalacqua T.J. et al., 2002]. Если кардиопротекторный эффект будет зависеть от аденозина, то будут использовать селективный ингибитор A_1 -рецепторов DPCPX (1 мг/кг), антагонист A_{2a} -рецепторов CSC (0,66 мг/кг), антагонист A_{2b} -рецепторов MRS 1754 (0,01 мг/кг) [Philipp S. et al., 2006]. Для оценки значения NO-синтазы в сигнальном механизме защитного действия ГП будет использовано введение L-NAME (10 мг/кг) [Ebrahim Z. et al., 2001]. Если инфаркт-лимитирующий эффект окажется зависимым от NO-синтазы, то будут использовать селективный ингибитор индуцибельной NO-синтазы S-метилизотиомочевину (3 мг/кг) [Zhao T.C. et al., 2001] и селективный ингибитор нейрональной NO-синтазы 7-нитроиндазол (50 мг/кг) [Chiari P.C. et al., 2005]. Для ингибирования ПКС будут применять хелеритрин (5 мг/кг) [Maslov L.N. et al., 2009; Fryer R.M., et al., 1999]. Ингибитор тирозинкиназ генистеин будут вводить в дозе 5 мг/кг [Maslov L.N. et al., 2009; Fryer R.M. et al., 1999]. Вортманнин ингибитор PI3-киназы будут вводить в дозе 0,015 мг/кг [Peart et al., 2008]. Блокатор MEK/ERK1/2-киназ PD-098059 будут применять в дозе 0,5 мг/кг [Lasley R.D. et al., 2005]. Для блокады K_{ATP} -каналов будут использовать глибенкламид (0,3 мг/кг) [Maslov L.N. et al., 2009; Schultz J.E. et al., 1997]. В случае, если глибенкламид устранил инфаркт-лимитирующий эффект ГП, будут применять ингибитор мито K_{ATP} -каналов 5-гидроксидеканоат (5 мг/кг) [Fryer R.M. et al., 2000a; Schultz J.E. et al., 1997c] и ингибитор сарк K_{ATP} -каналов HMR 1098 (3 мг/кг) [Fryer R.M. et al., 2000a, 2000b]. Для выяснения роли активных форм кислорода (АФК) в прекондиционировании животным будут вводить внутривенно антиоксидант 2-меркаптопропионилглицин (20 мг/кг) [Tanaka M. et al., 1994]. С этой же целью будут применять водорастворимый антиоксидант тролокс, который будут вводить внутривенно в дозе 2,5 мг/кг [Eum H.A., Lee S.M., 2004]. Кроме того, будут применять водонерастворимый антиоксидант темпол, который введут внутривенно в дозе 30 мг/кг [Kimura S. et al., 2005].

Большинство фармакологических агентов растворят в 0,9% NaCl. Глибенкламид, хелеритрин, темпол, CGS-15943, BNTX, налтрибен, генистеин, вортманнин, 7-нитроиндазол, 1400W, SB-203580, PD-098059, DPCPX, MRS 1754, CSC первоначально растворят 0.1 мл DMSO, а затем в 1 мл 20% гидроксипропил- β -циклодекстрине. Все растворы будут готовить немедленно перед использованием.

Аппаратура и оборудование

Лаборатория экспериментальной кардиологии имеет необходимое оборудование для проведения исследований на современном методологическом уровне. Мы располагаем двумя аппаратами Лангендорфа. Один подключен к аппарату для электрофизиологических исследований MP35, а другой (для изоляции кардиомиоцитов) - к перистальтическому насосу Minipuls Evolution (Gilson inc., Middleton, США). Коллектив исследователей для работы с изолированными кардиомиоцитами располагает спектрофотометром Microplate Reader Infinite 200 PRO (Tecan GmbH, Salzburg, Австрия); для выполнения экспериментального инфаркта аппаратом искусственной вентиляции легких SAR-830 Series Small Animal Ventilator компании CWE, Inc, (Ардмор, США); для оценки дыхания митохондрий оксиграфом «Эксперт-001» («Эконикс-эксперт», Москва, Россия); для оценки

состояния МРТ-поры и определения $\Delta\psi$ спектрофлуориметром Shimadzu RF-5301-PC (Shimadzu Corporation, Киото, Япония); для работы с изолированными кардиомиоцитами CO₂-инкубатором MCO-5AC (SANYO Electric Ltd, Osaka, Япония) и микроскопом Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss Surgical GmbH, Германия). для выделения митохондрий будет использована центрифуга K-24 (ГДР). Кроме того, лаборатория оснащена гипоксической камерой, подключённой к системе «Био-нова-204G4R1» (НТО Био-нова, Россия) с датчиками TCO₂-IR и OLC 20 (Oldham, France) и блоком управления MX32 (Oldham, France), холодильной камерой, pH-метром PP-25 компании Sartorius AG (Gottingen, Германия), газоанализатором Stat Profile M (Nova Biomedical Corporation, Waltham, США) и другими необходимыми приборами. Кроме того, коллектив исследователей располагает антагонистами опиоидных рецепторов, ингибиторами ферментов, что позволит начать исследования, ещё до начала финансирования проекта.

Научная новизна

Новизна исследования будет заключаться в изучении взаимодействия опиоидных и аденозиновых рецепторов и сопряженных с ними сигнальных путей в регуляции адаптационной резистентности сердца к патогенному действию ишемии и реперфузии после срочной и долговременной адаптации к гипоксии.

Практическая значимость

Настоящая работа внесет вклад в развитие фундаментальных представлений о механизмах кардиопротекторного действия долговременной (адаптация к гипоксии) и кратковременной (гипоксическое прекодиционирование) адаптации к гипоксии. Результаты работы расширят представления о роли опиоидных, аденозиновых рецепторов и сопряженных с ними сигнальных путей в реализации адаптационного повышения устойчивости сердца к действию ишемии и реперфузии.

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

Ожидаемые результаты работы

В результате исследований будут получены данные о рецепторных механизмах формирования повышенной устойчивости миокарда крыс к повреждающему действию ишемии и реперфузии после хронической нормобарической гипоксии и гипоксическом прекодиционировании. Предполагается получение данных о роли сигнальных систем: активные формы кислорода, протеинкиназы C, тирозинкиназ, PI3-киназы, АТФ-зависимых K⁺-каналов, ERK1/2-киназы, NO-синтаз в кардиопротекторном эффекте хронической нормобарической гипоксии и гипоксического прекодиционирования.

Область применения, уровень внедрения: кардиология, молекулярная и клеточная биология, фармакология. **Формы внедрения:** научные публикации, патенты.

Годовые этапы исследования

В 2016 г будут решены следующие задачи:

(1) Исследовать роль NO-синтазы, протеинкиназы C, тирозинкиназ, ERK1/2-киназы, PI3-киназы, K_{АТФ}-каналов, в механизме инфаркт-лимитирующего эффекта адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии (ХННГ) *in vivo*.

(2) Оценить значение вегетативной нервной системы, опиоидных рецепторов, аденозиновых рецепторов, активных форм кислорода, протеинкиназы С, тирозинкиназ, ERK1/2-киназы, PI3-киназы, K_{ATP}-каналов, NO-синтазы в триггерном механизме инфаркт-лимитирующего эффекта раннего гипоксического preconditionирования (ГП).

В 2017 г будут решены следующие задачи:

(3) В экспериментах на изолированных кардиомиоцитах, подвергнутых действию гипоксии-реоксигенации, исследовать роль опиоидных рецепторов, протеинкиназы С, тирозинкиназ, ERK1/2-киназы, PI3-киназы, NO-синтазы в механизме цитопротекторного действия ХННГ.

(4) Оценить значение вегетативной нервной системы, опиоидных рецепторов, аденозиновых рецепторов, активных форм кислорода, протеинкиназы С, тирозинкиназ, ERK1/2-киназы, PI3-киназы, K_{ATP}-каналов, NO-синтазы в медиаторном механизме инфаркт-лимитирующего действия раннего ГП.

В 2018 г будут решены следующие задачи:

(5) В экспериментах на изолированном перфузируемом сердце, подвергнутых действию ишемии-реперфузии, исследовать роль опиоидных рецепторов в механизме цитопротекторного действия ХННГ.

(6) Выяснить роль опиоидных рецепторов в изменении биоэнергетики миокарда после ишемии и реперфузии сердца у контрольных и адаптированных к ХННГ крыс.

Смета расходов (2016-2018 гг.)

Код	Предметные статьи расходов	тыс. рублей
211	Оплата труда	6200,0
213	Начисления на оплату труда (страховые взносы на государственное страхование граждан) 30,2 %	1872,4
340	Приобретение предметов снабжения и расходных материалов	4400,0
212,222,226	Командировки и служебные разъезды	1610,0
310	Приобретение оборудования	6391,2
	Накладные расходы	7212,8
	<i>Итого расходов</i>	27686,4

Руководитель темы,
д.м.н., проф.



Л.Н.Маслов