

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

УДК: 61:577.1

№ госрегистрации: АААА-А15-115120910024-0

Уникальный номер научной темы: 0550-2014-0116




УТВЕРЖДАЮ
Директор Томского НИМЦ,
академик РАН
Е.Л. Чойнзонов

«29» января 2018 г.


ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

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


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


_____ С.В. Попов
«1» февраля 2017 г.

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


_____ Л.Н. Маслов
«1» февраля 2017 г.

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


_____ И.Ю. Ефимова
«1» февраля 2017 г.

Томск – 2018

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель темы,
Заведующий лабораторией экспериментальной
кардиологии, доктор медицинских наук,
профессор


30.11.2017
подпись, дата

Л.Н. Маслов

Ответственный исполнитель:
Старший научный сотрудник лаборатории
экспериментальной кардиологии, доктор
медицинских наук


30.11.2017
подпись, дата

Н.В. Нарыжная

Исполнители темы:		
Старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной кардиологии, доктор биологических наук	 30.11.2017 подпись, дата	Т.В. Ласукова
Руководитель лаборатории молекулярно-Клеточной патологии и генодиагностик	 30.11.2017 подпись, дата	С.А. Афанасьев
Старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной кардиологии, доктор медицинских наук	 30.11.2017 подпись, дата	В.А. Казаков
Старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной кардиологии, кандидат медицинских наук	 30.11.2017 подпись, дата	А.С. Горбунов
Старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной кардиологии, кандидат медицинских наук	 30.11.2017 подпись, дата	С.Ю. Цибульников
Младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной кардиологии, кандидат медицинских наук	 30.11.2017 подпись, дата	Е.С. Прокудина
Лаборант - исследователь лаборатории экспериментальной кардиологии, кандидат медицинских наук	 30.11.2017 подпись, дата	А.В. Крылатов
Лаборант	 30.11.2017 подпись, дата	А.С. Семенцов
Лаборант	 30.11.2017 подпись, дата	А.В. Мухомедзянов

РЕФЕРАТ

Отчёт 75 с, 16 рис., 11 табл., 216 источников

СЕРДЦЕ, ИШЕМИЯ, РЕПЕРFUЗИЯ, АДАПТАЦИЯ, ГИПОКСИЯ

Объектом исследования являются крысы линии Вистар.

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

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

Установлено, что гипоксическое прекондиционирование оказывает умеренный инфаркт-лимитирующий эффект при острой коронароокклюзии-реперфузии, а хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия вызывает выраженное цитопротекторное действие при аноксии-реоксигенации изолированных кардиомиоцитов.

В результате исследования было впервые установлено, что формирование цитопротекторного действия хронической нормобарической гипоксии происходит через активацию $\delta 2$ опиоидных рецепторов, протеинкиназы С, тирозинкиназ. В механизме цитопротекторного действия ХННГ не принимают участия $\delta 1$, PI3-киназа.

Обнаружено, что в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта гипоксического прекондиционирования не участвует вегетативная нервная система, опиоидные и аденозиновые рецепторы. Активные формы кислорода, митохондриальные K^+ _{АТФ}-каналы и индуцибельная NO-синтаза являются триггерами, но не медиаторами инфаркт-лимитирующего действия раннего гипоксического прекондиционирования. Сарколеммальные K^+ АТФ-каналы и нейрональная NO-синтаза не являются триггерами или медиаторами инфаркт-лимитирующего действия гипоксического прекондиционирования.

Степень внедрения: публикации 9 статей в центральных российских журналах.

СОДЕРЖАНИЕ

Список исполнителей	2
Реферат	3
Содержание	4
Использованная терминология	5
Обозначения и сокращения	6
Введение	8
1. Обзор литературы	10
2. Методы исследования	15
3. Результаты исследования и их обсуждение	22
3.1. Роль опиоидных рецепторов, протеинкиназы С, тирозинкиназ, PI3-зы в механизме цитопротекторного действия хронической непрерывной юбарической гипоксии	22
3.2. Значение вегетативной нервной системы, опиоидных рецепторов, азиновых рецепторов, активных форм кислорода, K^+ _{АТФ} -каналов и NO-азы в триггерном и медиаторном механизме инфаркт-лимитирующего твия раннего гипоксического preconditionирования.	35
Заключение	47
Выводы	55
Список публикаций за 2017 год	56
Список использованных источников	57

ИСПОЛЬЗОВАННАЯ ТЕРМИНОЛОГИЯ

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.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

- 2-МПП – 2-меркаптопропионил глицин;
- 5-ГД – 5-гидроксидеканоат;
- 8-SPT – 8-(p-сульфофенил)теофиллин;
- Akt-киназа – киназа, выделенная из AKR thymoma cells;
- DMSO – диметилсульфоксид;
- EGFR-рецептор – рецептор к эндотелиальному фактору роста;
- GPCR – $G_{i/o}$ -белок–сопряженные рецепторы;
- GSK3 β – киназа гликогенсинтазы 3 β ;
- HIF1 α – гипоксия-индуцируемый фактор транскрипции 1 α ;
- HMR – HMR 1098 (Clamikalant sodium);
- iNOS – индуцибельная NO-синтаза;
- L-NAME – N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride;
- mPTP – поры, изменяющие проницаемость митохондрий;
- NO – оксид азота;
- NOS – синтаза оксида азота;
- PI3-киназа – фосфатидилинозитол-3 киназа, phosphatidylinositol-3-kinase;
- АФК – активные формы кислорода;
- БСА – бычий сывороточный альбумин, V фракция;
- ВНС – вегетативная нервная система;
- ГП – гипоксическое preconditionирование;
- ГЦ – гуанилатциклаза;
- ЗИ/ОР – соотношение зоны инфаркта к области риска;
- ИП – ишемическое preconditionирование;
- K⁺_{АТФ}-канал – АТФ-чувствительный калиевый канал;
- ЛДГ – лактатдегидрогеназа;
- митокK⁺_{АТФ} – митохондриальный АТФ-зависимый K⁺ канал;
- MPT-пора – пора, изменяющая проницаемость митохондрий, mitochondrial permeability transition pore;
- ОИМ – острый инфаркт миокарда;
- ОР – опиоидные рецепторы;
- ПОЛ – перекисное окисление липидов;
- ПКГ – протеинкиназа G;
- ПКС – протеинкиназа C;
- САС – симпатoadреналовая система;

СОД – супероксиддисмутаза;

ТК – тирозинкиназа;

ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия;

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. В России внутригоспитальная летальность при остром инфаркте миокарда (ОИМ) составляет 13,8% [Сыркина А.Г. и др., 2013]. Среди пациентов, перенесших ОИМ, 22% вынуждены уменьшить объём или квалификацию труда, а 23% полностью утратили трудоспособность [Николаева Н.В. и др., 1997]. Эти данные свидетельствуют о большой социальной значимости разработки методов профилактики ишемических и реперфузионных повреждений сердца, вызванных ОИМ. Вполне очевидно, что назрела настоятельная необходимость в разработке принципиально новых подходов к профилактике ишемических и реперфузионных повреждений сердца. Особый интерес в этом отношении представляет способность организма включать мощные врожденные защитные механизмы с помощью адаптивных воздействий, таких как гипоксическое preconditionирование 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 [Neckar J., et al., 2003; Maslov L.N., et al., 2013; 2015]. Ранее нами было показано, что инотропный, инфаркт-лимитирующий и антинекротический эффекты ХННГ зависят от активации опиоидных рецепторов (ОР) [Maslov L.N., et al., 2013; 2015]. Между тем, локализация опиоидных рецепторов и внутриклеточные механизмы, обеспечивающие реализацию кардиопротекторного эффекта хронической гипоксии, остаются малоизученными. Есть основание считать, что одним из таких механизмов может служить активация опиоидных рецепторов кардиомиоцитов и связанного с ними каскада протеинкиназ, участвующих в передаче сигнала от Gi/o-белок-связанных рецепторов (опиоидных, брадикининовых, аденозиновых) на внутриклеточные эффекторы: mPTP-пора (mitochondrial permeability transition pore), K⁺_{АТФ}-канал (АТФ-чувствительный K-канал) [Шляхто Е.В., и др. 2008; Heusch G. 2015; Williams-Pritchard G., 2011]. Такая гипотеза базируется на результатах анализа литературы [Маслов Л.Н. и др., 2012; Шляхто Е.В., и др. 2008; Heusch G. 2015; Liu H., et al., 2001; Oudit G.Y., Penninger J.M. 2009; Tong H. et al., 2000], посвященной механизмам ишемического preconditionирования, кардиопротекторный эффект которого реализуется через активацию P13-протеинкиназы (phosphatidylinositol-3-kinase), тирозинкиназы и протеинкиназы С (ПКС). Основываясь на сходстве основных проявлений (антинекротический, антиаритмический, инотропный эффекты) кардиопротекторного действия хронической гипоксии и preconditionирования, мы предположили, что в реализации защитного влияния ХННГ при аноксии-реоксигенации кардиомиоцитов могут быть также задействованы опиоидные рецепторы кардиомиоцитов, тирозинкиназы, P13-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 [Маслов Л.Н. и др. 2010; 2011; 2013; Shizukuda Y. et al., 1992; 1993], и задержанное ГП, при котором повышение толерантности сердца к ишемии и реперфузии выявляется через 24 ч после прекондиционирования [Beguín P.C. et al., 2005; Cai Z. et al., 2003; Sasaki H. et al., 2002; Xi L. et al., 2002]. Большинство публикаций по ГП – это работы по позднему ГП [Портниченко А.Г. и др., 2008; Beguín P.C. et al., 2005; Cai Z. et al., 2003; Sasaki H. et al., 2002; Xi L. et al., 2002] и только единичные работы посвящены раннему ГП [Маслов Л.Н. и др. 2010; 2011; 2013; Shizukuda Y. et al., 1992]. Некоторые исследователи отрицают сам факт существования раннего ГП [Cai Z. et al., 2003]. Однако нам удалось показать, что раннее ГП существует и оказывает более выраженный инфаркт-лимитирующий эффект, чем позднее ГП [Маслов Л.Н. и др., 2013]. Раннее ГП имеет важное преимущество перед хронической гипоксией: повышение толерантности сердца к ишемии-реперфузии формируется очень быстро (в течение 1 – 3 ч), поэтому такое воздействие может найти свое применение в качестве предоперационной подготовки у пациентов, которым предстоит произвести кардиоплегическую остановку сердца (тотальная ишемия) с применением искусственного кровообращения. Рецепторный, сигнальный механизмы 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 2017 году:

1. В экспериментах на изолированных кардиомиоцитах, подвергнутых действию гипоксии-реоксигенации, исследовать роль опиоидных рецепторов, протеинкиназы С, тирозинкиназ, PI3-киназы в механизме цитопротекторного действия хронической непрерывной нормобарической гипоксии.

2. Оценить значение вегетативной нервной системы, опиоидных рецепторов, аденозиновых рецепторов, активных форм кислорода, K^+ _{АТФ}-каналов и NO-синтазы в триггерном и медиаторном механизме инфаркт-лимитирующего действия раннего ГП.

1. 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 [Koresky M., Daum S., 1958]. Эти данные были подтверждены и дополнены работами отечественного физиолога Ф.З. Меерсона [Меерсон Ф.З., 1986] и ряда других исследователей [Wang Z., Si L.Y. 2013; Ma H.J. et al., 2014; Zhou J.J. et al., 2015].

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

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

В 1994 г в Японии на модели тотальной ишемии изолированного миокарда было впервые показано кардиопротекторное действие хронической нормобарической гипоксии [Tajima M. et al., 1994]. Дальнейшие работы показали, что такой способ адаптации сопровождается развитием выраженного инфаркт-лимитирующего эффекта [Neckar J. et al., 2003; Maslov L.N. et al., 2013]. Однако механизмы, реализующие формирование адаптационной толерантности сердца к ишемии и реперфузии остаются во многом неясными.

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

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

В качестве важнейшего звена регуляторных функций организма современная физиология рассматривает каскад передачи сигнала с рецепторов на эффекторные структуры через систему внутриклеточных мессенджеров. В соответствие с этими представлениями, стимуляция опиоидных рецепторов может приводить к активации внутриклеточного сигнального каскада, включающего в себя тирозинкиназы, PI3-киназу (инозитолтрифосфат-активируемая протеинкиназа), NO-синтазу (синтазу оксида азота), протеинкиназу С, митохондриальные АТФ-чувствительные K^+ -каналы (мито K^+ _{АТФ}-каналы) и mPTP-поры (mitochondrial permeability transition pore) [Маслов Л.Н. и др., 2013]. 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 С [Holzerova K. et al., 2015], а также гексокиназы и

фосфорилированной (активированной) Akt-киназы (киназа, выделенная из AKR thymoma cells) [Waskova-Arnostova P. et al., 2013; 2014], в миокарде экспериментальных животных. Одновременно с этим в кардиомиоцитах происходит активация синтеза противоапоптотических белков, ферментов антиоксидантной системы и энергетического метаболизма [Bohuslavova R. et al., 2010; Waskova-Arnostova P. et al., 2014; Chytilova A. et al., 2015]. Инфаркт-лимитирующий эффект хронической гипоксии не усиливается введением донора оксида азота [Alanova P. et al., 2015], что может косвенно свидетельствовать об участии этого вещества в указанном эффекте. Однако вовлечение этих процессов в реализацию кардиопротекторного эффекта хронической непрерывной нормобарической гипоксии (ХННГ) остаётся недоказанной, поскольку эксперименты с ингибиторами указанных ферментов до настоящего времени не проводились.

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

Гипоксическое прекондиционирование. Литературные данные о рецепторном механизме кардиопротекторного действия гипоксического прекондиционирования немногочисленны и противоречивы. Так, обнаружено, A1-аденозиновые рецепторы не участвуют в механизмах сохранения сократительной функции миокарда под действием гипоксического прекондиционирования при ишемии-реперфузии изолированного сердца крысы [Yabe K. et al., 1995]. Вместе с тем обнаружена важная роль аденозиновых рецепторов в развитии инфаркт-лимитирующего эффекта ГП на модели изолированного сердца кролика [Walsh R. S. et al., 1995] и кардиопротекторного действия ГП на изолированном сердце крысы [Tani M. et al., 1998; Nojiri M. et al., 1999]. Можно предположить, что ключевую роль в формировании кардиопротекторного эффекта ГП играют аденозиновые A2-рецепторы, однако экспериментов, подтверждающих это предположение в условиях *in vivo* не проводилось.

Роль опиоидных рецепторов, которые, к примеру, участвуют в формировании адаптивной реакции ишемического прекондиционирования [Schultz J. et al., 1997; Miki T. et al., 1998; Wall T. M. et al., 1994], не исследована.

Об участии активные формы кислорода (АФК) в механизмах формирования адаптивных реакция миокарда впервые сообщили в 1988 г. [Murry C.E. et al., 1988]. Позднее было

установлено, что АФК являются триггерами кардиопротекторного действия ишемического preconditionирования [Yellon D.M. и Downey J.M., 2003]. Однако участие АФК в кардиопротекторном эффекте ГП обнаружено лишь *in vitro*, в опытах на изолированных кардиомиоцитах цыпленка [Vanden Hoek T.L. et al., 1998]. 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 [Vanden Hoek T.L. et al., 1998]. Сходные результаты получены на модели гипоксии-реоксигенации изолированных неонатальных кардиомиоцитов крысы [Gong K.Z. et al., 2004]. Интересные данные были опубликованы G. Lebuffe и соавт. в 2003 г. [Lebuffe G. et al., 2003]. 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 [Lebuffe G. et al., 2003]. Важной находкой этого исследования явилось то, что антиоксидант (2-меркаптопропионил) глицина (2-МППГ) 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 [Lebuffe G. et al., 2003]. 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 [Cuong D.V. et al., 2006], модели изолированного сердца мыши [Xi L. et al., 2002], изолированных кардиомиоцитах [Hu L. et al., 2014]. Однако остается неподтвержденным участие NO-синтазы в инфаркт-лимитирующем действии ГП и неясным, какие субтипы NO-синтазы участвуют в реализации этого эффекта.

О роли АТФ-зависимых калиевых каналов (K⁺_{АТФ}-каналов) в механизме ГП свидетельствует ряд исследований [Vanden Hoek T. et al., 2000; Lebuffe G. et al., 2003; Gong K.Z. et al., 2004; Chen R. et al., 2004; Cuong D.V. et al., 2006; Jiao J., 2008]. В экспериментах на изолированных кардиомиоцитах крысы показано, что блокада K⁺_{АТФ}-каналов перед ГП приводит к предупреждению формирования цитопротекторного эффекта [Vanden Hoek T. et al., 2000; Jiao J., 2008], и наоборот, добавление в среду инкубации активатора данных каналов увеличивает устойчивость клеток к действию длительной аноксии и реоксигенации [Vanden Hoek T. et al., 2000; Lebuffe G. et al., 2003]. Подтверждение этим данным приводят Gong K.Z. и соавт. (2004) [Gong K.Z. et al., 2004]. G. Lebuffe и соавт. в 2003 г. [Lebuffe G. et al., 2003] обнаружили, что защитный эффект, аналогичный влиянию ГП, возникал при 10-минутной инкубации культуры клеток в присутствии активатора K⁺_{АТФ}-каналов пинацидила [Lebuffe G. et al., 2003]. 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.

2. 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.

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

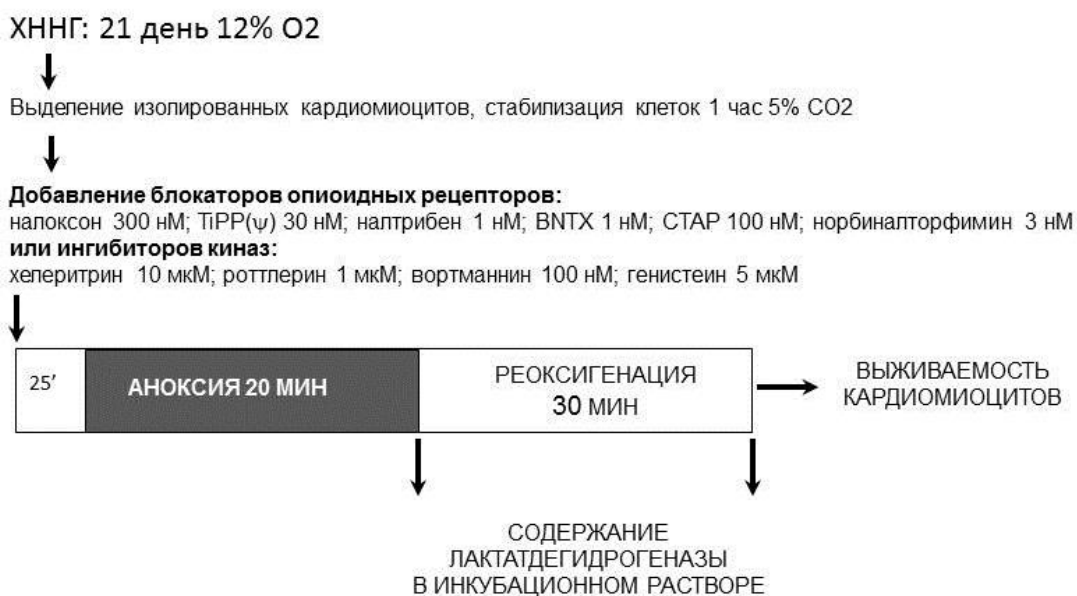


Рисунок 1 – Дизайн исследования механизма цитопротекторного действия хронической нормобарической гипоксии.

Примечание - В качестве контроля использовали клетки адаптированных к хронической гипоксии животных без добавления блокаторов опиоидных рецепторов или ингибиторов киназ. Поскольку ингибиторы киназ (хелеритрин, роттлерин, вортманнин и генистеин) растворяли в DMSO, к контрольным клеткам добавляли DMSO в той же концентрации

По аналогичному протоколу исследовали кардиомиоциты неадаптированных крыс.

Каждая экспериментальная группа включала 12 животных.

Метод моделирования аноксии-реоксигенации изолированных кардиомиоцитов

Выделение изолированных кардиомиоцитов из сердца крысы проводили энзиматическим методом с применением коллагеназы [Xu X., Colecraft H. 2009]. Животных гепаринизировали (1500 МЕ, внутривенно) и умерщвляли шейной дислокацией под эфирным наркозом. После стернотомии сердца быстро иссекали и помещали в буфер Тироде (+4 о) до остановки. Аорту канюлировали и закрепляли для ретроградной перфузии. Скорость перфузии на протяжении всего выделения составляла 10 мл/мин, температура 37°C, все растворы были предварительно насыщены смесью газов 95% O₂– 5% CO₂, после чего их рН доведена до 7,4. Осуществляли ретроградную перфузию миокарда в течение 3 минут буфером Тироде (в mM): 140 NaCl, 5.4 KCl, 1 Na₂HPO₄, 1 MgCl₂·6H₂O, 10 глюкоза, 5 HEPES, 1 CaCl₂, затем в течение 3 минут перфузировали бескальциевым буфером Тироде. Последующую перфузию осуществляли раствором коллагеназы, содержащим (в mM): 140 NaCl, 5.4 KCl, 1 Na₂HPO₄, 1 MgCl₂·6H₂O, 10 глюкоза, 5 HEPES, 1,6 г/л БСА, коллагеназу тип II 335 U/мл (Worthington) и протеазу XIV 0,230 г/л (Sigma) в течение 15-25 минут до размягчения миокарда. Для удаления коллагеназы, миокард перфузировали бескальциевым раствором Тироде в течение 4 минут. Миокард отсекали от аорты и диспергировали путём перемешивания в 10 мл бескальциевого буфера Тироде, содержащего 10 мг/мл БСА. Полученную суспензию клеток фильтровали через марлю и осаждали при комнатной температуре в течение 5 минут. Надосадок удаляли, осевшие кардиомиоциты разбавляли бескальциевым буфером Тироде до 350-400 тысяч клеток в 1 мл. Количество клеток контролировали микроскопически. Для стабилизации выделенные клетки инкубировали в течение 1 часа при температуре + 28°C под протоком 5% CO₂ в CO₂-инкубаторе MCO-5AC (SANYO, Япония). После окончания инкубации проводили контроль выживаемости клеток по включению трипанового синего, который окрашивает только в погибшие клетки. Подсчитывали процент погибших (окрашенных) клеток и жизнеспособных палочковидных кардиомиоцитов (соотношение длина: ширина не менее 3:1). Кардиомиоциты, не окрасившиеся трипановым синим, но потерявшие палочковидную форму были условно обозначены как гибнущие. Исследование проводили на микроскопе Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss Surgical GmbH, Германия). Исходную выживаемость 50% и более палочковидных кардиомиоцитов считали пригодной для дальнейшего изучения. В инкубационной среде проводили определение лактатдегидрогеназы (ЛДГ) с применением наборов Fluitest LDH-L (Analytical biotechnologies AG, Германия) на спектрофотометре INFINITE 200M (Текан, Австрия).

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

подвергали аноксии в течение 20 минут при комнатной температуре. После окончания аноксии суспензию клеток аккуратно отбирали через масло и центрифугировали 1 мин при 800g, надосадок клеток полностью удаляли и использовали для определения ЛДГ. Реоксигенацию кардиомиоцитов осуществляли в бескальциевом буфере Тироде в течение 30 минут. По окончании реоксигенации проводили контроль выживаемости клеток и измеряли выход ЛДГ как описано выше. Контролем служили клетки, ресуспендированные на время, равное аноксии (20 минут), в бескальциевом растворе Кребса, содержащем (в мМ): 118 NaCl, 25 NaHCO₃, 11 глюкоза, 4,7 KCl, 1,2 MgSO₄, 1,2 KH₂PO₄, pH 7,4, далее в течение 30 минут в бескальциевом буфере Тироде (нормоксия). Гибель клеток и выход ЛДГ при аноксии-реоксигенации вычисляли в процентах от нормоксии (инкубация с буфером Кребса).

Фармакологические инструменты. В экспериментах с моделированием аноксии-реоксигенации изолированных кардиомиоцитов фармакологические агенты добавляли в инкубационный буфер за 25 минут до начала аноксии. Антагонист всех типов опиоидных рецепторов налоксон использовали в концентрации 300 нМ/л [Ласукова Т.В. и соавт. 2014]. Антагонист δ -опиоидных рецепторов TIPP(ψ) использовали в концентрации 30 нМ/л [Schiller P. W. et al., 1993; Martin N.A. et al., 2001]. Селективный антагонист $\delta 1$ -опиоидных рецепторов BNTX, использовали в концентрации 1 нМ/л [Zeng X. et al., 2011]. Селективный антагонист $\delta 2$ -опиоидных рецепторов налтрибен, использовали в концентрации 1 нМ/л [Huh J. et al., 2001; Zhu M. et al., 2009]. Антагонист μ -опиоидных рецепторов СТАР, использовали в концентрации 00 нМ/л [Devidze N. et al., 2008]. Антагонист κ -опиоидных рецепторов норбиналторфимин, использовали в концентрации 3 нМ/л [Stevens W. C. et al., 2000]. Ингибитор протеинкиназы С (ПКС) хелеритрина хлорид использовали в концентрации 5 μ М/л [Fryer R. M. et al., 1999; Khaliulin I., et al., 2010]; ингибитор ПКС- δ ротлерин применяли в концентрации 1 мкМ/л [Маслов Л. Н. и др., 2013]; ингибитор PI3-киназы вортманнин использовали в концентрации 100 нМ/л [Powis G. et al., 1994]; ингибитор тирозинкиназы генистеин применяли в концентрации 50 мкМ/л [Fryer R.M. et al., 1999]. Ингибиторы киназ хелеритрина хлорид, ротлерин, вортманнин и генистеин предварительно растворяли в DMSO в конечной концентрации 0,02%

Моделирование гипоксического preconditionирования. Дизайн исследования представлен на рисунке 2. Для моделирования гипоксического preconditionирования крысу на 10 мин помещали в герметичную банку объёмом 3,3 литра, где в течение 1 мин создавали воздушную среду, содержащую 8% O₂, 0,9% CO₂ и 91,1% N₂. Через 10 мин концентрация кислорода снижалась до 7,3%, а уровень CO₂ повышался до 1,3%. Уровень кислорода и углекислого газа определяли с помощью газоанализатора Stat Profile M (Nova Biomedical Corporation, Waltham, США). За гипоксией следовала 10-минутная реоксигенация. Как показали наши предварительные

эксперименты [Маслов Л.Н. и др. 2013] шесть циклов гипоксии-реоксигенации по 20 мин обеспечивают снижение соотношения ЗИ/ОР на 24%, не оказывают влияния на гемодинамику при коронароокклюзии и не изменяют частоту возникновения ишемических и реперфузионных аритмий. Интервал времени между последним сеансом гипоксии и последующим моделированием коронароокклюзии составлял 15 мин.

Исследование рецепторных и сигнальных механизмов инфаркт-лимитирующего действия гипоксического прекондиционирования проведено на модели острой коронароокклюзии и реперфузии *in vivo*. Дизайн исследования представлен на рисунке 2.

Моделирование 45-минутной коронароокклюзии и 120-минутной реперфузии. Исследования выполнены на крысах-самцах линии Вистар массой 250 – 300 г. Крысы были наркотизированы α -хлоралозой (50 мг/кг, внутривенно, Sigma) и подключены к аппарату искусственной вентиляции легких (ИВЛ) “SAR-830 Series” (CWE Inc. США), осуществляющему ИВЛ комнатным воздухом с частотой 68 вдохов/минуту. Выполнялась левосторонняя торакотомия, перикард был удален, чтобы видеть местоположение левой нисходящей коронарной артерии. Лигатуру на левую нисходящую коронарную артерию накладывали 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 верифицировалась по появлению эпикардального цианоза и подъему сегмента ST. Правая сонная артерия канюлировалась для измерения артериального давления (АД), которое регистрировали 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 использован для записи ЭКГ. Количественную обработку полученных данных осуществляли с помощью программного обеспечения INSTBSL-W компании Biopac System Inc., (Goleta, США). После 45 минут ишемии лигатуру ослабляли, восстановление кровотока подтверждали появлением эпикардальной гиперемии. Продолжительность реперфузии составляла 2 часа. Выявление зоны некроза и зоны риска проводили по методу, предложенному J. Neckar и соавт. [Neckar J. et al., 2003]. После реперфузии сердце удаляли из грудной клетки и промывали с помощью шприца через канюлированную аорту физиологическим раствором, содержащим 125 МЕ/мл гепарина. Для определения области риска (ОР) лигатуру вновь затягивали и миокард окрашивали струйно через аорту 5% перманганатом калия, затем промывали физиологическим раствором. С помощью слайсера HSRA001-1 (Zivic Instruments, Pittsburgh, США) делали срезы сердца толщиной в 1 мм перпендикулярно к продольной оси. Зону некроза выделяли из зоны риска окрашиванием срезов 1% раствором 2,3,5-трифенил тетразолия хлорида в течение 30 минут при 37°C. После окончания окраски срезы помещали в 10% раствор формальдегида на 1 сутки. На следующий день после окрашивания правый желудочек удаляли, и срезы сканировали с обеих сторон сканером HP Scanjet G2710.

Область риска (ОР) и зону инфаркта (ЗИ) определяли компьютеризированным планиметрическим методом с применением оригинальной программы. Размер зоны инфаркта выражали в процентах от размера зоны гипоперфузии (области риска), как соотношение ЗИ/ОР.

Фармакологические инструменты. В экспериментах с моделированием гипоксического preconditionирования фармакологические агенты вводили внутривенно (за исключением S-метилтиомочевины) за 15 мин до гипоксического preconditionирования, либо после завершения процедуры ГП, за 10 мин до ишемии. Каждая экспериментальная группа включала 13 - 25 животных. Блокатор вегетативных ганглиев гексаметоний хлорид вводили в дозе 10 мг/кг; ингибитор опиоидных рецепторов налтрексон в дозе 2 мг/кг [Sander G.E. et al., 1989]; блокатор аденозиновых рецепторов - 8-(p-сульфофенил)теофиллин в дозе 7,5 мг/кг [Walsh R.S. et al., 1995]; гидрофильный тиоловый антиоксидант n-(2-меркаптопропионил)глицин (2-МПП; n-(2-mercaptopropionyl)glycine; tiopronin) вводили в дозе 20 мг/кг внутривенно [Tanaka M. et al., 1994]; ингибитор всего пула NO-синтазы L-NAME применяли в дозе 10 мг/кг [Laude K. et al., 2003; Maslov L.N. et al., 2009]; ингибитор индуцибельной NO-синтазы S-метилтиомочевину вводили в дозе 3 мг/кг внутрибрюшинно [Jiang X. et al., 2004]; за 15 мин до ГП; ингибитор нейрональной NO-синтазы 7-нитроиндазол вводили внутривенно в дозе 50 мг/кг [Fradorf J. et al., 2010].; блокатор АТФ-зависимых K^+ -каналов глибенкламид вводили в дозе 0,3 мг/кг [Schultz J.J. et al., 1997]; блокатор митохондриальных АТФ-зависимых K^+ -каналов 5-гидроксидеканоат в дозе 5 мг/кг внутривенно [Schultz J.J. et al., 1997]; блокатор сарколеммальных K^+ _{АТФ}-каналов HMR 1098 (Clamikalant sodium) в дозе 10 мг/кг внутривенно [Zhu B.M. et al., 2003].

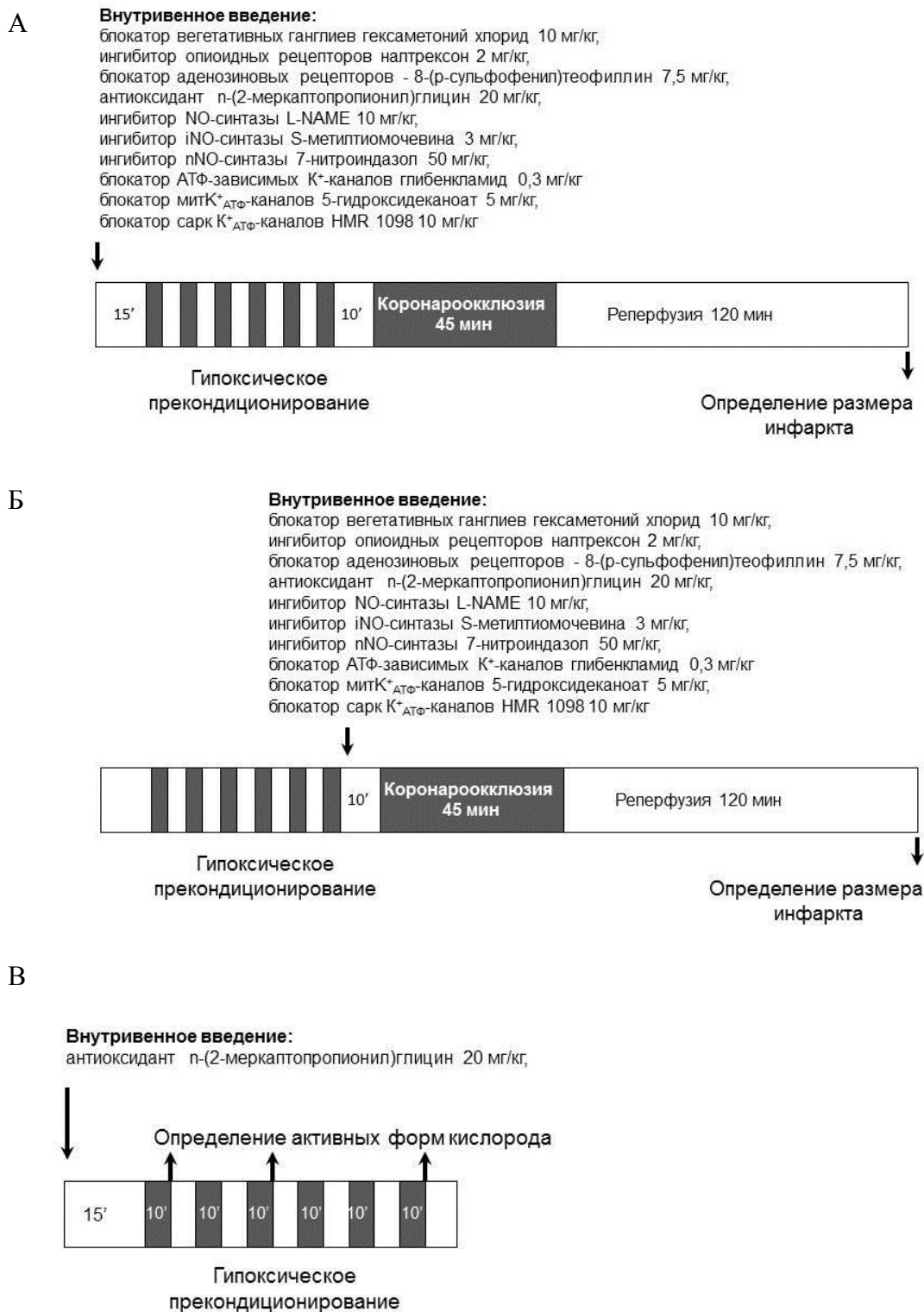


Рисунок 2 – Дизайн исследования гипоксического прекондиционирования.

А – исследование триггерного механизма ГП;

Б – исследование медиаторного механизма ГП;

В – исследование участия активных форм кислорода в триггерном механизме ГП.

Примечание - В качестве контроля использовали животных, которых не подвергали гипоксическому прекондиционированию. Каждая экспериментальная группа включала 15 животных

Определение содержания активных форм кислорода в ткани миокарда. Миокард крыс иссекали непосредственно после окончания preconditionирования, промывали через аорту холодным буфером, содержащим 137 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7,4, отсекали 100-150 мг ткани из области левого желудочка и немедленно гомогенизировали в 1,5 мл того же буфера. Образцы центрифугировали 5' при 1000g, +4°C. Надосадок собирали, быстро замораживали и хранили в жидком азоте до 30 дней. Для определения содержания активных форм кислорода к пробе добавляли 25 мкМ 2',3'-дигидродихлорфлуоресцеина диацетата (Sigma), инкубировали 30 мин при 37°C и измеряли флуоресценцию при длинах волн возбуждения/поглощения λ_{ex} 485 nm, λ_{em} 538 nm соответственно [Koltai E. et al., 2012]. Свечение 2',3'-дигидродихлорфлуоресцеина рассчитывали на содержание в пробе белка, которое определяли методом Бредфорда [Bradford M. M. 1976].

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

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Роль опиоидных рецепторов, протеинкиназы C, тирозинкиназ, PI3-киназы в механизме цитопротекторного действия хронической непрерывной нормобарической гипоксии

Исследование цитопротекторного действия хронической непрерывной нормобарической гипоксии проводили в условиях моделирования аноксии – реоксигенации свежесыводенной культуры изолированных кардиомиоцитов. Исходное количество жизнеспособных палочковидных кардиомиоцитов в культуре клеток контрольной и опытной экспериментальных групп составило 65% и 66% соответственно для контрольных крыс и группы ХННГ (Таблица 1). Этот показатель характеризует качество культуры кардиомиоцитов и свидетельствует о сопоставимости изначальных параметров клеток в экспериментальных группах. Исходный выброс лактатдегидрогеназы (ЛДГ) кардиомиоцитами в группе интактных и ХННГ так же не различался (Таблица 2).

При моделировании 20-минутной аноксии и последующей 30-минутной реоксигенации кардиомиоцитов контрольных крыс количество погибших кардиомиоцитов составило $50,63 \pm 3,63\%$ от всего числа клеток (Таблица 1). Относительно исходной выживаемости этот показатель оказался равным 23%, эта величина характеризует количество клеток, погибших под влиянием аноксии (Рисунок 3). Процент выживших (палочковидных) кардиомиоцитов в контрольной группе составил $38,84 \pm 3,92\%$. При аноксии-реоксигенации кардиомиоцитов крыс, подвергнутых ХННГ, погибшими оказались $38,27 \pm 2,08\%$ (Таблица 1), что составило 2,5% от исходно жизнеспособных клеток (Рисунок 3). При этом число выживших (палочковидных) кардиомиоцитов в группе ХННГ оказалось равным $49,78 \pm 2,34\%$, и было достоверно выше, чем в контрольной группе ($p < 0,05$; Таблица 1). Кардиомиоциты, не окрасившиеся трипановым синим, но потерявшие палочковидную форму были условно обозначены как гибнущие. Количество таких клеток и их процентное содержание в культуре кардиомиоцитов контрольной и опытной групп при аноксии-реоксигенации не различалось (Таблица 1).

Таблица 1 – Показатели гибели кардиомиоцитов при аноксии–реоксигенации (M±SEM)

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

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

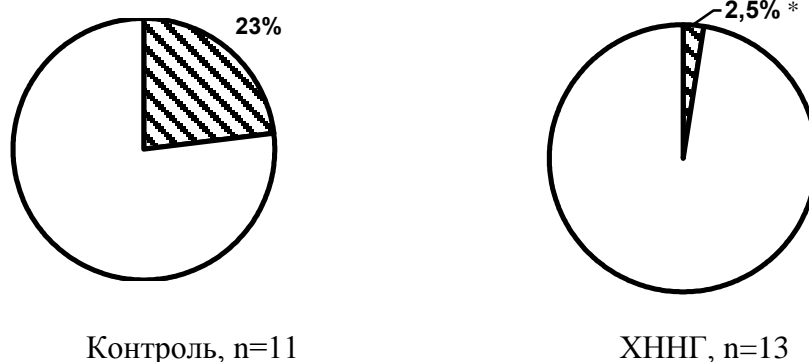


Рисунок 3 – Гибель кардиомиоцитов при аноксии–реоксигенации (M±SEM).

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

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

Выброс лактатдегидрогеназы кардиомиоцитами интактных крыс при аноксии составил 175% относительно «нормоксии» (Таблица 2). В группе ХННГ этот показатель составил 142%, что оказалось на 33% ниже, чем в кардиомиоцитах интактных крыс при аноксии ($p < 0,05$). После окончания реоксигенации выброс ЛДГ кардиомиоцитами интактных крыс оказался равным 182% от нормоксии, в то же время в кардиомиоцитах крыс, подвергнутых ХННГ, выброс ЛДГ составил 138% ($p < 0,05$) (Таблица 2). Следовательно, выброс маркера повреждения лактатдегидрогеназы клетками миокарда крыс, подвергнутых ХННГ, ниже, чем в группе неадаптированных крыс.

Таблица 2 – Выброс лактатдегидрогеназы изолированными кардиомиоцитами крыс при аноксии–реоксигенации ($M \pm SEM$)

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

Примечания - n – количество животных в группе; $p < 0,05$ – достоверность относительно контроля (t–тест Стьюдента); ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия

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

Выявление участия опиоидных рецепторов в формировании этой устойчивости проводили путем добавления одного из селективных антагонистов опиоидных рецепторов в инкубационную среду изолированных кардиомиоцитов перед моделированием аноксии. Как следует из таблицы 3 и рисунка 4, добавление антагонистов опиоидных рецепторов в среду инкубации кардиомиоцитов интактных (неадаптированных) крыс не вызывало достоверного изменения числа погибших кардиомиоцитов и выброса ЛДГ при аноксии-реоксигенации по сравнению с контролем.

При инкубации кардиомиоцитов крыс группы ХННГ с антагонистом ОР налоксоном, число погибших клеток при аноксии-реоксигенации составило 12%, что оказалось в 5 раз выше аналогичного показателя в группе ХННГ без налоксона и не отличалось от группы крыс «интактные + налоксон» (Рисунок 4). Как показано в таблице 18, при аноксии статистически значимого влияния налоксона на выброс ЛДГ из кардиомиоцитов не наблюдалось. Однако при реоксигенации выброс ЛДГ из клеток был достоверно выше, чем в группе клеток «ХННГ» с

незаблокированными опиоидными рецепторами ($p=0,012268$) и оказался сопоставимым с этим показателем у интактных крыс (Таблица 3). Эти данные могут быть интерпретированы как отсутствие цитопротекторного эффекта ХННГ при блокаде опиоидных рецепторов. При добавлении в инкубационный раствор изолированных кардиомиоцитов крыс, прошедших курс ХННГ, селективного антагониста μ -опиоидных рецепторов СТАР, мы наблюдали увеличение количества погибших клеток после аноксии–реоксигенации по отношению к ХННГ (Рис. 10). При этом блокада μ -опиоидных рецепторов, так же как в случае с налоксоном, не приводило к изменению выброса ЛДГ во время аноксии (Таблица 3). Реперфузионный выброс ЛДГ в группе крыс, адаптированных к хронической гипоксии, под влиянием СТАР возрастал на 40% и оказался сопоставимым со значениями неадаптированных животных (Таблица 3). Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии цитопротекторного действия ХННГ при блокаде μ -ОР, что говорит об их важной роли в изучаемом защитном эффекте. Исследование роли дельта-ОР в формировании цитопротекторного действия ХННГ показало, что при добавлении в инкубационный буфер кардиомиоцитов крыс группы ХННГ селективного ингибитора δ -ОР $TiPP(\psi)$ или селективного ингибитора δ_2 -ОР налтрибена приводит к увеличению процента погибших клеток и выброса лактатдегидрогеназы после окончания реоксигенации по сравнению с клетками группы ХННГ, подвергнутыми аноксии–реоксигенации без антагонистов ОР (Рисунок 4, Таблица 3). На содержание ЛДГ в инкубационном буфере, взятом после аноксии, эти антагонисты ОР не повлияли (Таблица 3). Вместе с тем, можно видеть, что селективная блокада δ_1 -ОР препаратом VNTX не изменяло выживаемость кардиомиоцитов и содержание ЛДГ при аноксии и реоксигенации у адаптированных к гипоксии крыс (Рисунок 4, Таблица 3). Полученные данные свидетельствуют о том, что δ_2 -ОР принимают опосредующее участие в цитопротекторном действии ХННГ.

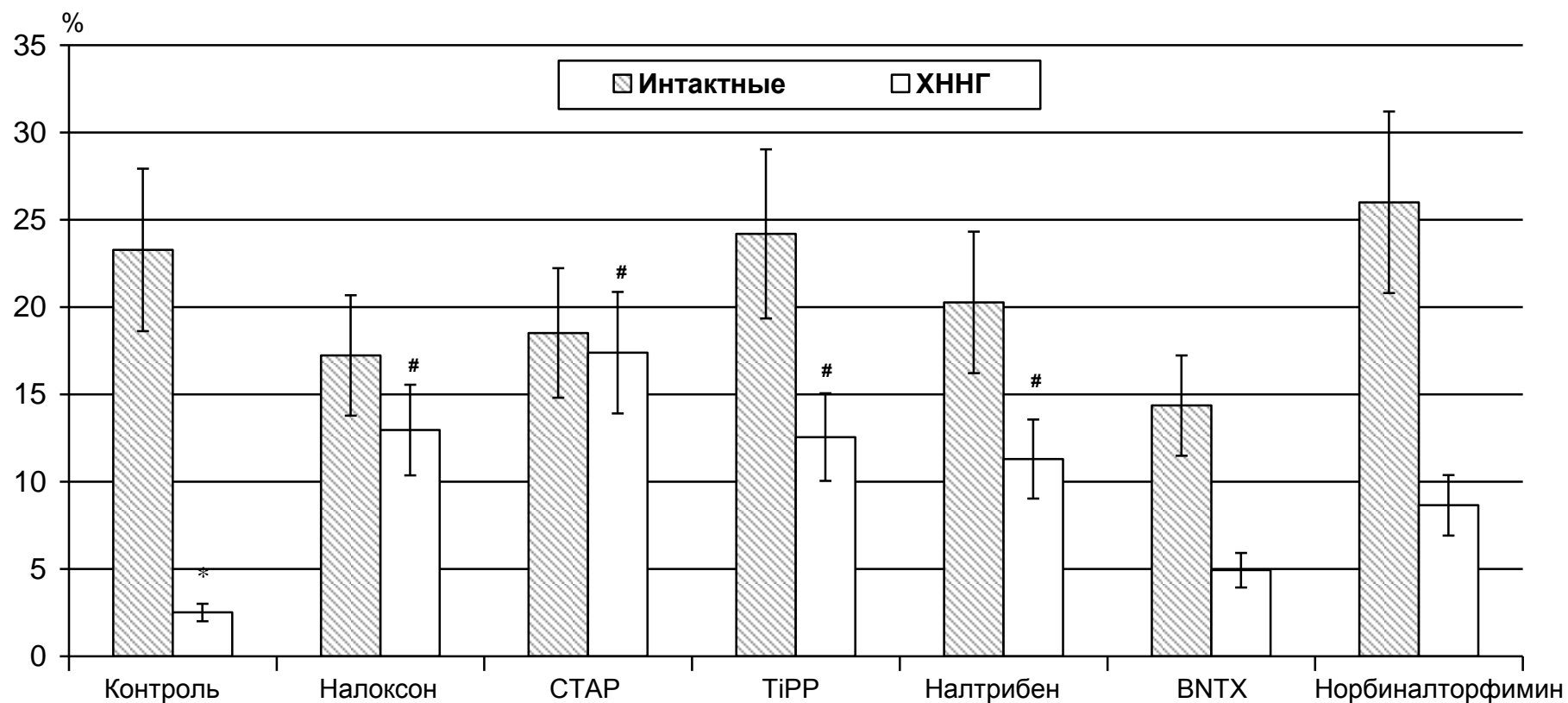


Рисунок 4 – Гибель кардиомиоцитов при аноксии–реоксигенации ($M \pm SEM$).

Примечание - гибель клеток представлена в % к исходной выживаемости. ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия; * $p < 0,05$ – относительно контрольных клеток интактных крыс; # – $p < 0,05$ – относительно контрольных клеток крыс после ХННГ (тест Манна–Уитни). Все препараты добавляли за 25 минут до начала аноксии

Таблица 3 – Выброс лактатдегидрогеназы изолированными кардиомиоцитами крыс при аноксии и реоксигенации (M±SEM)

Группа	Аноксия		Реоксигенация	
	Интактные n=11	ХННГ n=13	Интактные n=11	ХННГ n=13
Контроль	174,65 ± 19,57	141,93 ± 8,27 p1=0,025317	181,66 ± 15,15	137,76 ± 7,94 p1=0,019413
Налоксон 300 нМ	188,18 ± 15,23 p1=0,721116	158,11 ± 11,60 p2=0,166790 p3=0,125742	181,75 ± 13,5 p1=0,771269	172,96 ± 9,84 p2=0,012268 p3=0,65245
СТАР 100 нМ	153,62 ± 7,29 p1=0,193964	152,87 ± 10,55 p2=0,210490 p3=0,953172	164,05 ± 9,4 p1=0,425615	176,63 ± 13,75 p2=0,027730 p3=0,48109
TiPP(ψ) 30 нМ	162,19 ± 14,03 p1=0,398820	170,42 ± 9,70 p2=0,194250 p3=0,887626	181,73 ± 15,99 p1=0,925902	171,28 ± 13,69 p2=0,041043 p3=0,636649
Налтрибен 1 нМ	175,49 ± 16,39 p1=0,509630	165,58 ± 10,67 p2=0,401624 p3=0,601339	170,76 ± 10,49 p1=0,601884	177,92 ± 13,08 p2=0,019159 p3=0,678389
BNTX 1 нМ	186,88 ± 16,72 p1=0,663013	160,46 ± 10,91 p2=0,292148 p3=0,183813	180,9 ± 11,67 p1=0,875369	160,07 ± 10,54 p2=0,112626 p3=0,206925
Норбинал- торфимин 3 нМ	176,85 ± 8,37 p1=0,566122	156,92 ± 7,57 p2=0,106276 p3=0,110343	174,86 ± 19,76 p1=0,942571	158,75 ± 8,34 p2=0,085661 p3=0,402944

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

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

Следующим этапом исследования стало выявление внутриклеточного сигнального механизма, активация которого способствует повышению устойчивости кардиомиоцитов к ишемическому–реперфузионному повреждению при ХННГ. Было выдвинуто предположение, что этот внутриклеточный механизм может быть сходным с сигнальным механизмом, опосредующим кардиопротекторное действие агонистов опиоидных рецепторов.

В настоящее время принято считать, что стимуляция опиоидных рецепторов через $G_{i/o}$ -белки приводит к активации каскада протеинкиназ, которые обеспечивают внутриклеточный сигналинг [Williams-Pritchard G. et al., 2011]. В работах последних лет приводятся убедительные данные о том, что важным опосредующим звеном между опиоидными рецепторами, сопряженными с ними $G_{i/o}$ -белками и протеинкиназами является трансактивация (гетеродимеризация) ОР с EGFR-рецептором (рецептор к эндотелиальному фактору роста) [Förster K. et al., 2007]. Внутриклеточным сигнальным ферментом EGFR-рецептора, опосредующим защитный эффект опиоидов, являются рецепторные тирозинкиназы (Src–киназы) [Beltowski J., Jazmroz-Wisniewska A. 2014]. Существуют доказательства участия протеинкиназы PI3 (phosphatidylinositol 3) в формировании кардиопротекторного эффекта опиоидов [Маслов Л. Н. и др., 2013а]. В ряде исследований было показано, что в реализации инфаркт-лимитирующего и антиапоптотического эффектов агонистов опиоидных рецепторов принимают участие протеинкиназа С (ПКС) [Маслов Л. Н. и др., 2013а]. Эти данные позволяют нам предполагать, что кардиопротекторный эффект ХННГ может быть реализован через внутриклеточный сигнальный механизм, включающий тирозинкиназы, PI3–киназу и протеинкиназу С. Важно отметить, что сходные сигнальные механизмы могут реализовывать кардиопротекторный эффект ишемического пре- и посткондиционирования [Маслов Л.Н. и др. 2013а,b]. В связи с вышеизложенным, дальнейшие эксперименты были направлены на подтверждение предположения о том, что цитопротекторный эффект ХННГ может быть реализован через активацию тирозинкиназ, PI3-киназы и протеинкиназы С.

Ранее обнаружено, что кардиопротекторный эффект ишемического и фармакологического прекодиционирования реализуется через активацию Src/EGFR-тирозинкиназ [Ping P, et al., 1999; Williams-Pritchard G. et al., 2011]. В связи с этим наше внимание было направлено на исследование роли тирозинкиназ в формировании цитопротекторного действия хронической непрерывной нормобарической гипоксии. Изучение роли этих ферментов

было проведено путем оценки проявления указанных защитных эффектов при блокаде всего пула тирозинкиназ генистеином [Fryer R.M. et al., 1999].

Ранее указывалось, что гибель клеток при аноксии–реоксигенации изолированных кардиомиоцитов крыс значительно снижена, если клетки миокарда были выделены у крыс, подвергнутых адаптации к гипоксии (Рисунок 3, таблица 1). Так, гибель кардиомиоцитов интактных крыс при аноксии–реоксигенации составила $17,23 \pm 2,50\%$, в то время как в группе ХННГ этот показатель оказался равным $6,76 \pm 0,92\%$ (Табл. 4). Инкубация кардиомиоцитов крыс группы ХННГ с ингибитором тирозинкиназ генистеином приводила к достоверному возрастанию гибели клеток при аноксии–реоксигенации до $19,0 \pm 2,55\%$ (Таблица 4). При этом выживаемость кардиомиоцитов интактных крыс под влиянием генистеина достоверно не изменялась (Таблица 4).

Таблица 4 – Гибель кардиомиоцитов при аноксии– реоксигенации ($M \pm SEM$)

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

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

Выброс лактатдегидрогеназы из изолированных кардиомиоцитов крыс, подвергнутых адаптации к хронической гипоксии, при моделировании аноксии и последующей реоксигенации был ниже, чем в группе неадаптированных животных на 17% (Таблица 5) В том случае, если клетки миокарда крыс группы «ХННГ» инкубировали с ингибитором тирозинкиназ генистеином, выброс ЛДГ при последующей аноксии и реоксигенации оказался ниже, чем у животных группы «ХННГ» без блокады тирозинкиназ на 25% и был сопоставим с этим показателем неадаптированных крыс (Таблица 5).

Таким образом, наши исследования показали, что цитопротекторный эффект ХННГ в отношении аноксии–реоксигенации изолированных кардиомиоцитов так же не был обнаружен при блокаде тирозинкиназ (Таблица 4). Эти данные однозначно свидетельствует о важной роли тирозинкиназ в защитном эффекте ХННГ.

Таблица 5 – Выброс лактатдегидрогеназы изолированными кардиомиоцитами крыс при аноксии и реоксигенации (M±SEM)

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

Примечание - Выброс ЛДГ выражен в процентах к параллельному нормоксическому контролю. ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия. p1 – достоверность относительно неадаптированных крыс; P2 – относительно группы ХННГ (t–тест Стьюдента). Генистеин добавляли в инкубационный буфер за 25 минут до начала аноксии. n – количество животных в группе

Инкубация клеток в растворе ингибитора Р13–киназы вортманнина не приводила к статистически значимому изменению количества погибших кардиомиоцитов при моделировании аноксии–реоксигенации, то есть не повлияла на выживаемость кардиомиоцитов как в группе интактных крыс, так и у крыс после курса ХННГ (Таблица 6)

Таблица 6 – Гибель кардиомиоцитов при аноксии– реоксигенации (M ± SEM)

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

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

Добавление в инкубационную среду клеток ингибитора Р13–киназы вортманнина не изменило содержания ЛДГ в среде инкубации у крыс, адаптированных к ХННГ, ни при аноксии, ни при реоксигенации (Таблица 7).

Таблица 7 – Выброс лактатдегидрогеназы из изолированных кардиомиоцитов крыс при аноксии и реоксигенации (M±SEM)

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

Примечание - Выброс ЛДГ выражен в процентах к параллельному нормоксическому контролю. ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия. p1 – достоверность относительно неадаптированных крыс; P2 – относительно группы ХННГ (t–тест Стьюдента). Вортманнин добавляли в инкубационный буфер за 25 минут до начала аноксии. n – количество животных в группе

На основании полученных данных мы можем сделать вывод о том, что PI3–киназа не участвует в реализации цитопротекторного эффекта ХННГ. Эти данные противоречат имеющимся в литературе сведениям о том, что этот фермент реализует кардиопротекторный эффект ишемического прекондиционирования и опиоидов [Qin Q, et al., 2003; Cao Z. et al., 2005b]. На основании проведенного исследования мы можем предполагать, что в механизмах реализации кардиопротекторного эффекта ХННГ и ишемического прекондиционирования существуют значительные различия.

Добавление в инкубационный раствор кардиомиоцитов перед моделированием аноксии ингибитора протеинкиназы С хелеритрина, гибель кардиомиоцитов оказалась равной $13,97 \pm 0,95$, что оказалось выше, чем в группе адаптированного контроля в 2 раза и было сопоставимо с показателем группы неадаптированных крыс (Табл. 8). Эти результаты подтверждаются данными о содержании лактатдегидрогеназы в инкубационном буфере. Оказалось, что выброс ЛДГ клетками крыс, прошедших курс ХННГ, при реоксигенации оказался на 15% ниже, чем в контрольной группе (Таблица 9). Инкубация кардиомиоцитов крыс группы «ХННГ» с хелеритрином приводило к повышению выброса ЛДГ до уровня интактных животных (Таблица 9).

Вместе с тем, как можно видеть в таблице 8, количество жизнеспособных кардиомиоцитов в группе «ХННГ+хелеритрин» статистически значимо не отличалось от количества жизнеспособных клеток в группе «ХННГ». Следовательно, хелеритрин не повлиял на выживаемость клеток при аноксии–реоксигенации в этой группе. Этот факт на первый взгляд кажется парадоксальным, однако следует обратить внимание на то, что в данной группе крыс процент гибнущих клеток составил лишь 5,15% против 12,47% в группе «ХННГ» (p=0,025. Таблица 8). Следовательно, высокая выживаемость в данном случае была обусловлена снижением

процента гибнущих клеток. Таким образом, блокада протеинкиназы С приводила к ускорению гибели чувствительных к аноксии клеток.

Известно, что протеинкиназа С представлена в кардиомиоцитах несколькими субтипами. Наибольшее внимание исследователей привлекает δ -субтип протеинкиназы С, доказано его участие в реализации кардиопротекторного действия ишемического посткондиционирования [Маслов Л.Н. и др., 2013b] и хронической гипобарической гипоксии [Hlavackova M. et al., 2010]. Проведение исследований *in vitro* позволило нам изучить роль C_{δ} в цитопротекторном действии хронической непрерывной нормобарической гипоксии. Обнаружено, что инкубация кардиомиоцитов адаптированных крыс с ингибитором протеинкиназы C_{δ} роттлерином приводит к увеличению гибели клеток при последующей аноксии–реоксигенации с $6,76 \pm 0,92\%$ до $17,82 \pm 2,22\%$ (Таблица 8). При этом показатели выживаемости кардиомиоцитов оказываются сопоставимыми с выживаемостью клеток крыс неадаптированного контроля (Таблица 8). Этот факт свидетельствует о полном отсутствии цитопротекторного действия ХННГ при блокаде протеинкиназы C_{δ} . Как можно видеть в таблице 8, добавление ингибитора протеинкиназы С в инкубационную среду клеток неадаптированных крыс не повлияло на выживаемость кардиомиоцитов при аноксии–реоксигенации.

Данные цитологического исследования были подтверждены биохимическими показателями. Выброс лактатдегидрогеназы изолированными кардиомиоцитами крыс при реоксигенации в группе «ХННГ+роттлерин» был на 18% выше, чем в группе «ХННГ» и оказался сопоставимым с уровнем неадаптированного контроля (Таблица 9). Следовательно, мы можем заключить, что блокада протеинкиназы C_{δ} устраняет цитопротекторное действие адаптации к хронической нормобарической гипоксии.

Таблица 8 – Выживаемость изолированных кардиомиоцитов при аноксии– реоксигенации (M±SEM)

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

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

Таблица 9 – Выброс лактатдегидрогеназы изолированными кардиомиоцитами крыс при аноксии–реоксигенации (M±SEM)

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

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

Проведенные исследования показали важную роль протеинкиназы С в реализации цитопротекторного действия хронической непрерывной нормобарической гипоксии. В научной литературе имеются сведения о противоположной функции различных изоформ ПКС при формировании защитных эффектов ИП [Ping P. et al., 1997; Churchill E.N., Mochly-Rosen D. 2007]. Одними авторами показано, что ИП приводит к активации ПКС ϵ [Ping P. et al., 1997; Liu H. et al., 2001], которая играет важную роль при формировании кардиопротекторного эффекта этого адаптирующего воздействия [Churchill E.N. et al., 2010, Gray M.O. et al., 1997; Ping P. et al., 2002]. В то же время эксперименты с «нокаутированными» по гену ПКС δ мышами показали, инфаркт-лимитирующий эффект ИП у таких животных не формируется [Mayr M. et al., 2004]. При исследовании участия изоформ ПКС в реализации инфаркт–лимитирующего действия хронической прерывистой гипобарической гипоксии было обнаружено, что при блокаде ПКС δ протекторное действие такой адаптации не проявляется [Neckar J. et al., 2005; Hlavackova M et al., 2010]. Наше исследование показало важную роль протеинкиназы С δ в цитопротекторном действии ХННГ.

3.2. Значение вегетативной нервной системы, опиоидных рецепторов, аденозиновых рецепторов, активных форм кислорода, K^+ _{АТФ}-каналов и NO-синтазы в триггерном и медиаторном механизме инфаркт-лимитирующего действия раннего ГП.

3.2.1 Инфаркт-лимитирующий эффект раннего гипоксического preconditionирования

Экспериментальная коронароокклюзия во всех исследованиях приводила к образованию области гипоперфузии (область риска), составляющей 48-55% от массы левого желудочка (Рисунок 5). Часть ткани миокарда этой зоны оказывалась некротизированной (зона некроза). Соотношение «зона некроза/область риска» (ЗН/ОР) принимали за размер инфаркта миокарда при ишемии-реперфузии. В наших исследованиях острая коронароокклюзия и последующая реперфузия у контрольных крыс вызывали развитие некроза миокарда, составляющего $58,7 \pm 1,5\%$ от размера области риска (Таблица 10). В группе крыс, которым коронароокклюзию-реперфузию моделировали после гипоксического preconditionирования (ГП), это соотношение составляло $41,8 \pm 1,8\%$, * $p < 0,001$ (Таблица 10). Следовательно, ГП обладает значительным инфаркт-лимитирующим эффектом *in vivo*, что выражается в уменьшении соотношения ЗН/ОР (Таблица 10).

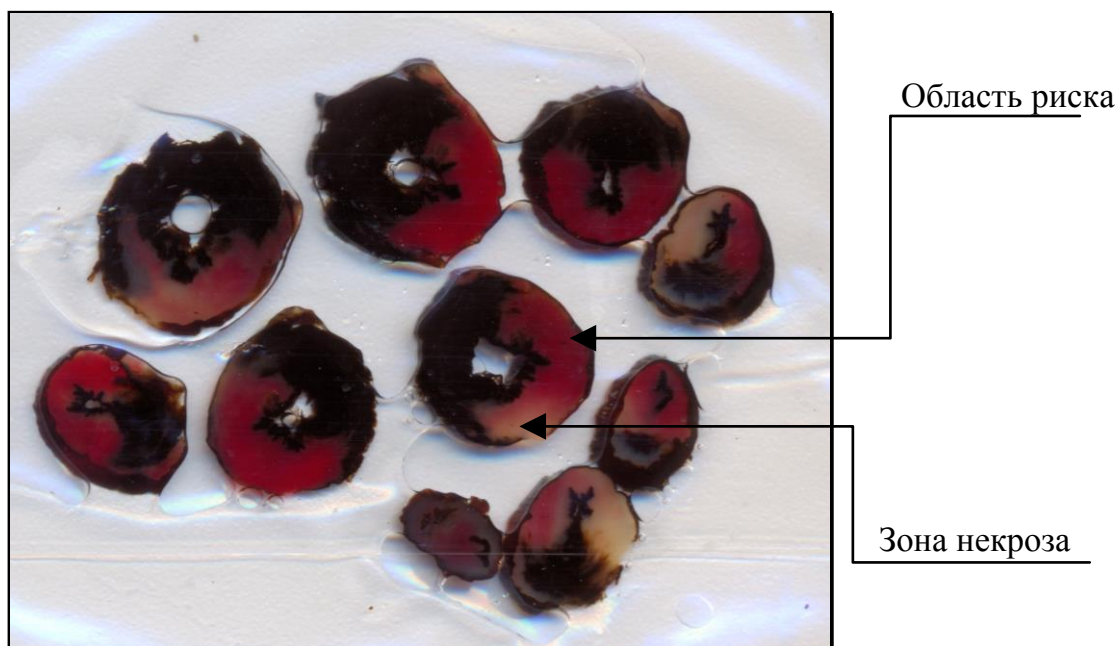


Рисунок 5 – Некроз миокарда при экспериментальной коронароокклюзии-реперфузии.

Таблица 10 – Влияние гипоксического preconditionирования на размер инфаркта у крыс при коронароокклюзии-реперфузии (M±SEM)

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

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

3.2.2 Значение вегетативной нервной системы в формировании инфаркт-лимитирующего эффекта раннего гипоксического preconditionирования.

Повышение тонуса симпатoadренальной системы (САС) является неотъемлемой составляющей патогенеза острого инфаркта миокарда и вносит значимый вклад в усугубление этой патологии. Активация САС сопровождается повышением содержания катехоламинов в крови, активация клеточной аденилатциклазы, увеличения уровня цАМФ в кардиомиоцитах, повышение внутриклеточного Ca^{2+} , что приводит к активации липаз, фосфолипаз, усилению перекисного окисления липидов (ПОЛ) и увеличению энергетических потребностей клетки [Меерсон Ф. З., 1984]. Доказано, что выделение катехоламинов, наблюдаемое во время ишемии, усиливает ишемическое повреждение миокарда [Lubbe W.F. et al., 1992]. Вместе с тем, на основе предварительных данных, можно предполагать участие симпатoadренальной системы в процессе запуска или формирования адаптации организма к неблагоприятным воздействиям [Меерсон Ф.З., Пшенникова М.Г., 1988]. Эти предпосылки позволили нам предположить, что ВНС может являться триггером или медиатором ГП.

Участие ВНС в реализации инфаркт-лимитирующего действия ГП оценивали по проявлению данного эффекта в присутствии блокатора периферических ганглиев гексаметония хлорида. Гексаметоний хлорид вводили животным за 15 минут до моделирования ГП либо после окончания ГП за 10 мин до коронароокклюзии.

Как следует из Рис. 6, предварительное введение гексаметония хлорида не увеличивало размер некроза миокарда при коронароокклюзии-реперфузии, то есть не влияло на развитие инфаркт-лимитирующего эффекта ГП. Аналогичные результаты получены и в случае, когда ганглиоблокатор применяли после прекращения адаптационного воздействия (Рисунок 6).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что вегетативная нервная система не участвует в формировании защитного эффекта раннего ГП при коронароокклюзии-реперфузии.

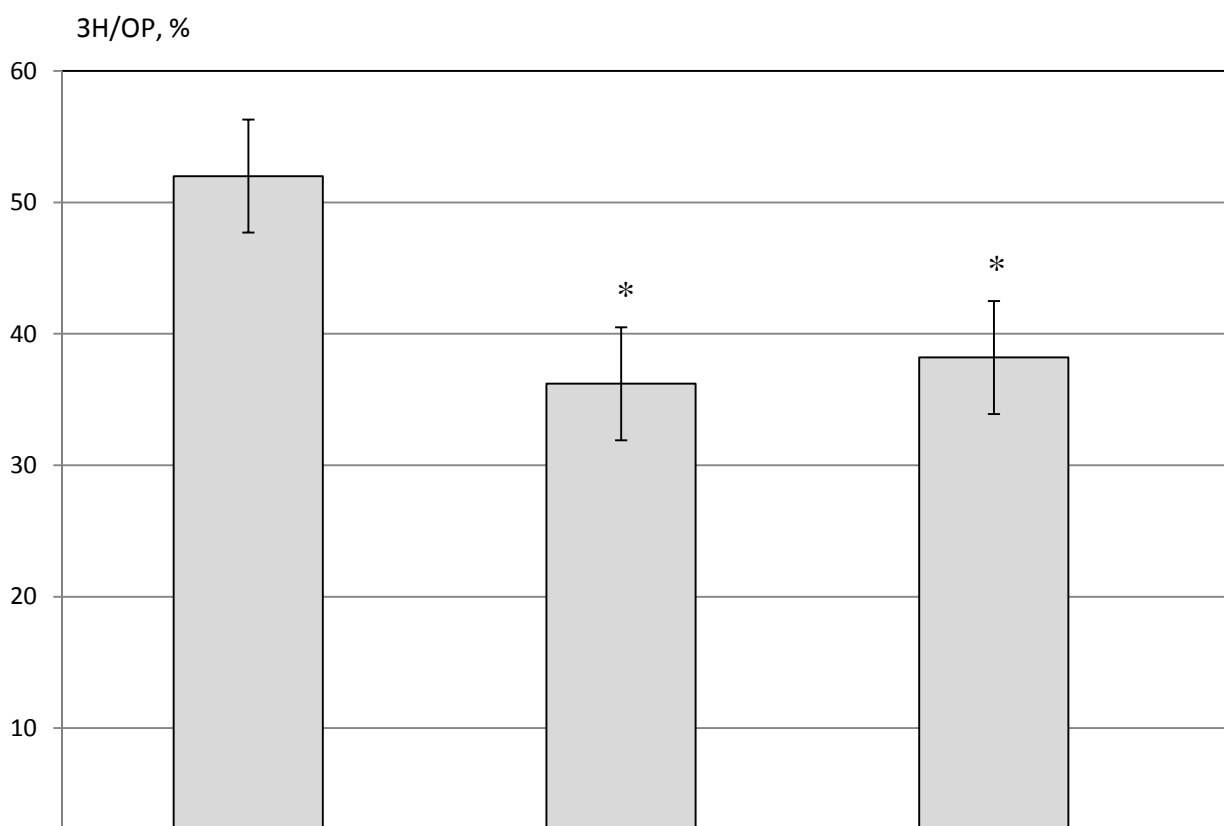


Рисунок 6 – Влияние гексаметония хлорида на размер инфаркта у крыс, подвергнутых гипоксическому preconditionированию ($M \pm SEM$).

Примечание - ЗН/ОР – отношение зоны некроза к области риска; ГП – раннее гипоксическое preconditionирование; гексаметоний вводили в дозе 10 мг/кг за 15 мин до ГП, либо после ГП за 10 мин до ишемии; * $p < 0,05$ – уровень значимости различий по отношению к контролю

3.2.2 Исследование участия опиоидных и аденозиновых рецепторов в триггерном и медиаторном механизме формирования инфаркт-лимитирующего эффекта раннего гипоксического preconditionирования.

Ранее установлено, что кардиальные рецепторы к опиоидам и аденозину играют важную роль в развитии кардиопротекторного эффекта ишемического preconditionирования, сходного по механизмам реализации и гипоксическим preconditionированием [Tsuchida A. et al., 1992; Schultz J. et al., 1997; Miki T. et al., 1998; Cohen M. V. et al., 2000; Lankford A. R. et al., 2006]. Рядом работ показано участие опиоидных и аденозиновых A₂-рецепторов в сигналинге кардиопротекции при гипоксическом preconditionировании, однако эти исследования были проведены *in vitro*, на модели изолированного сердца крысы или кролика [Yabe K. et al., 1995; Walsh R. S. et al., 1995; Tani M. et al., 1998; Nojiri M. et al., 1999]. Таким образом, остается не выясненным, участвуют ли опиоидные и аденозиновые рецепторы в защитном действии ГП при коронароокклюзии-реперфузии миокарда в исследовании *in vivo*.

Триггерную или медиаторную роль опиоидных и аденозиновых рецепторов в формировании инфаркт-лимитирующего действия раннего ГП *in vivo* оценивали по проявлению этого эффекта после введения животным неселективного антагониста опиоидных рецепторов налтрексона в дозе 2 мг/кг или неселективного блокатора аденозиновых рецепторов 8-(p-сульфофенил)теофиллина (8-SPT) в дозе 7,5 мг/кг за 15 мин до ГП, либо после ГП – за 10 мин до коронароокклюзии соответственно.

Инфаркт-лимитирующий эффект ГП 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 ГП, то есть на 40%. 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 7). Блокатор аденозиновых рецепторов 8-SPT не устранял инфаркт-лимитирующий эффект ГП, как при введении за 15 мин до начала моделирования ГП (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 8).

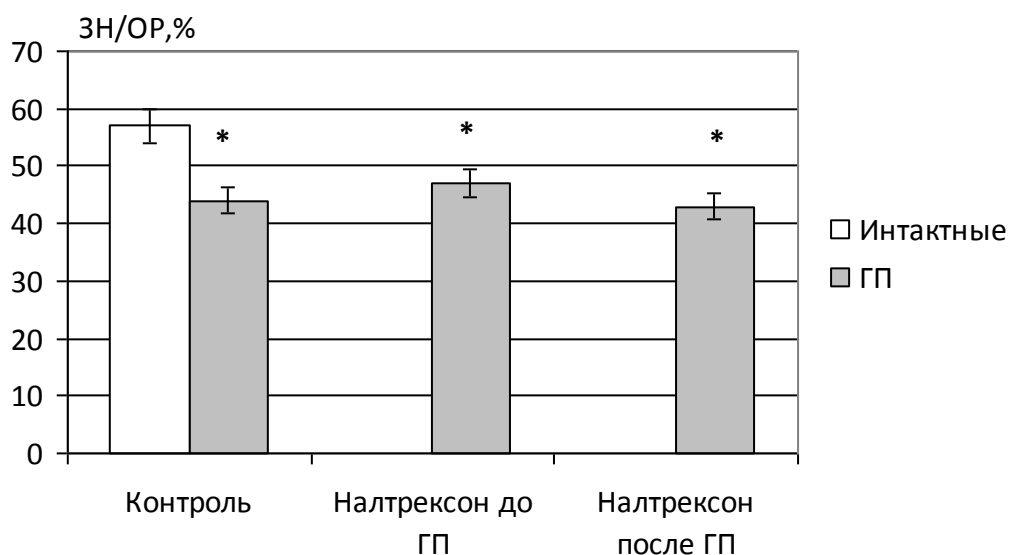


Рисунок 7 – Влияние блокатора опиоидных рецепторов налтрексона на размер инфаркта у крыс, подвергнутых гипоксическому прекондиционированию (M±SEM).

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

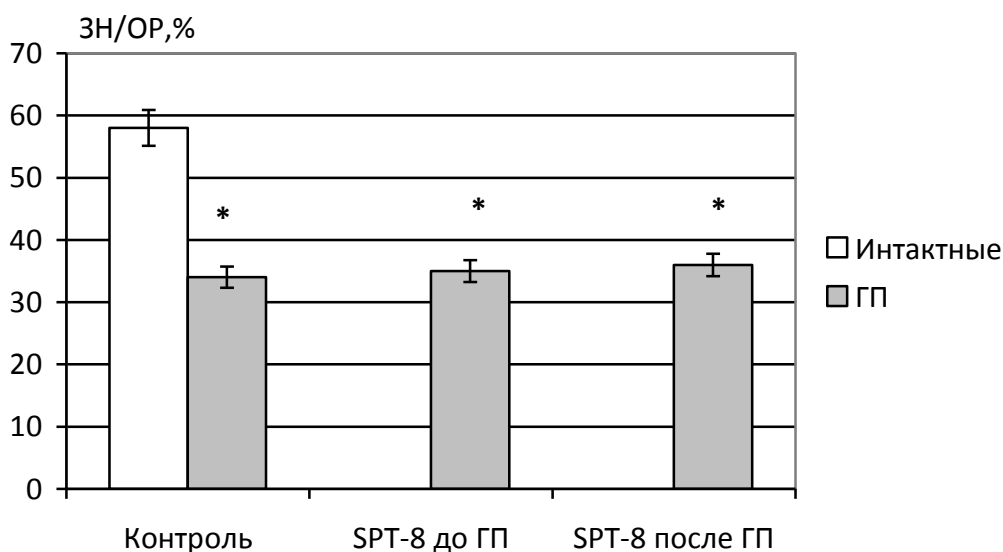


Рисунок 8 – Влияние блокатора аденозиновых рецепторов 8-(p-сульфофенил) теofilлина на размер инфаркта у крыс, подвергнутых гипоксическому прекондиционированию (M±SEM).

Примечание - ГП – раннее гипоксическое прекондиционирование; ЗН/ОР – отношение зоны некроза к области риска; 8-SPT – 8-(p-сульфофенил)теofilлин 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

При этом ингибирование опиоидных или аденозиновых рецепторов у непрекондиционированных крыс не повлияло размер некроза миокарда, налтрексон или 8-(p-

сульфопенил)теофиллин в использованных дозировках не обладали выраженным инфаркт-лимитирующим эффектом (Рисунок 7, 8). 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.

3.2.4 Участие активных форм кислорода в триггерном и медиаторном механизмах формирования инфаркт-лимитирующего эффекта гипоксического preconditionирования.

Несмотря на устоявшееся мнение о том, что активные формы кислорода, образующиеся в миокарде при ишемии-реперфузии, усугубляют повреждение кардиомиоцитов [Misra M. et al., 2009; Raedschelders K. et al., 2012; Zhou T. et al., 2015], в последние годы появился ряд работ, в которых обнаружена важная триггерная роль АФК в запуске адаптационных реакций. Так, установлено, что АФК выполняют триггерную функцию в сигнальном механизме ишемического preconditionирования [Yellon D.M. и Downey J.M., 2003]. Важная роль АФК в реализации кардиопротекторного эффекта ГП показана в экспериментах Vanden Hoek и соавт. на изолированных кардиомиоцитах цыпленка [Vanden Hoek T.L. et al., 1998] и Gong и соавт. [Gong K.Z. et al., 2004], выполнявших эксперименты на изолированных неонатальных кардиомиоцитах крысы. В этих исследованиях выявлено увеличение продукции АФК в кардиомиоцитах при моделировании ГП [Vanden Hoek T.L. et al., 1998], а так же предупреждение цитопротекторного действия ГП в присутствии антиоксиданта 2-меркаптопропионил глицина [Vanden Hoek T.L. et al., 1998; Gong K.Z. et al., 2004]. Однако участие АФК в механизме запуска или реализации инфаркт-лимитирующего действия ГП оставалась неисследованной.

Для оценки роли АФК в протекторном действии ГП исследовали содержание активных форм кислорода в ткани миокарда по флуоресценции 2,3-дигидродихлорфлуоресцеина, 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.

Результаты исследования показали двукратное возрастание АФК в ткани миокарда после 1 сеанса гипоксии-реоксигенации животного (Рис. 9). Высокий уровень АФК сохранялся после 3 сеанса ГП, однако оказался снижен практически до интактных значений по окончании 6 сеанса preconditionирования (Рисунок 9).

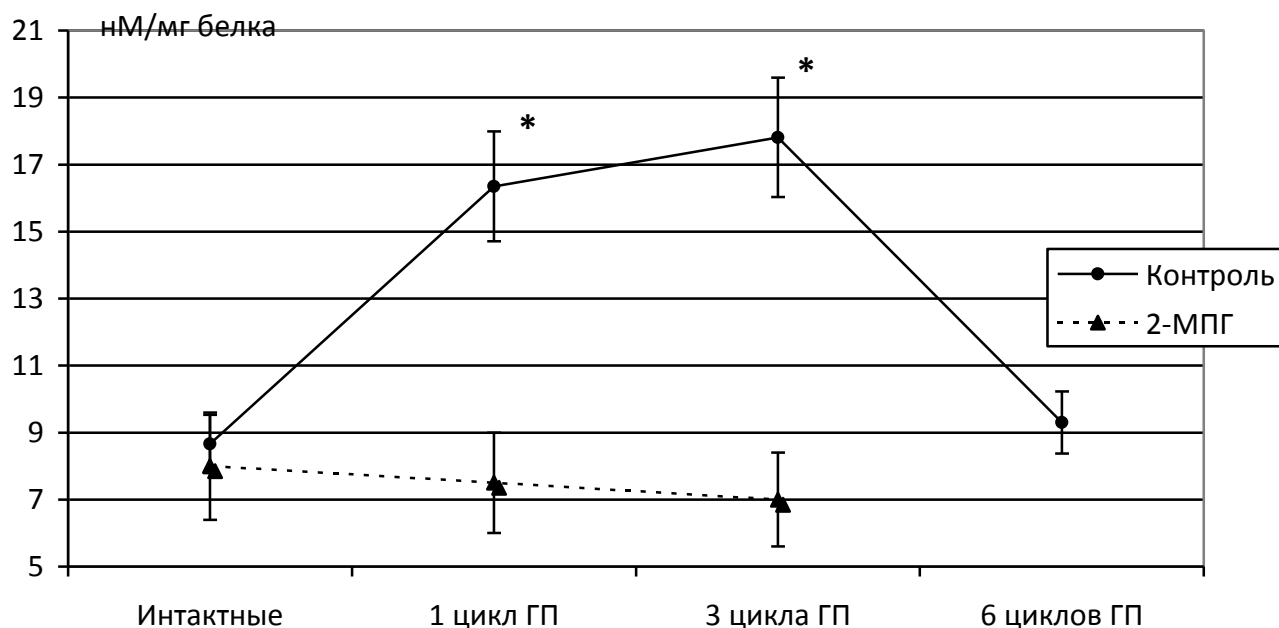


Рисунок 9 – Содержание активных форм кислорода в ткани миокарда крыс в динамике проведения гипоксического preconditionирования ($M \pm SEM$).

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

Поскольку данные литературы свидетельствуют о кардиопротекторных свойствах антиоксидантов [Чернявский А.М. и др., 1996], перед применением 2-МПП нами был исследован его возможный инфаркт-лимитирующий эффект у интактных крыс. Как показано в Таблице 11, в используемой нами дозе 2-МПП не влиял на размер инфаркта. В то же время мы выявили выраженное антиоксидантное действие 2-МПП, введение этого препарата до моделирования ГП предупреждало образование АФК в ткани миокарда (Рисунок 9).

Таблица 11 – Влияние n-(2-меркаптопропионил)-глицина на размер инфаркта интактных крыс ($M \pm SEM$)

Серия	n	Масса сердца, мг	Зона риска, мг	Зона некроза, мг	ЗН/ОР (%)
Контроль	15	1273 ± 5,6	600 ± 4	306 ± 2,4	50,5 ± 2,3
2-МПП (20 мг/кг)	14	1289 ± 4,5	706 ± 5,6	360 ± 3	51,5 ± 2,6

Примечание - 2-МПП – n-(2-меркаптопропионил)-глицин – вводили в дозе 20 мг/кг внутривенно за 10 мин до коронароокклюзии. Достоверные отличия между группами отсутствуют ($u=95,00$; $p=0,66$)

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 10). 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.

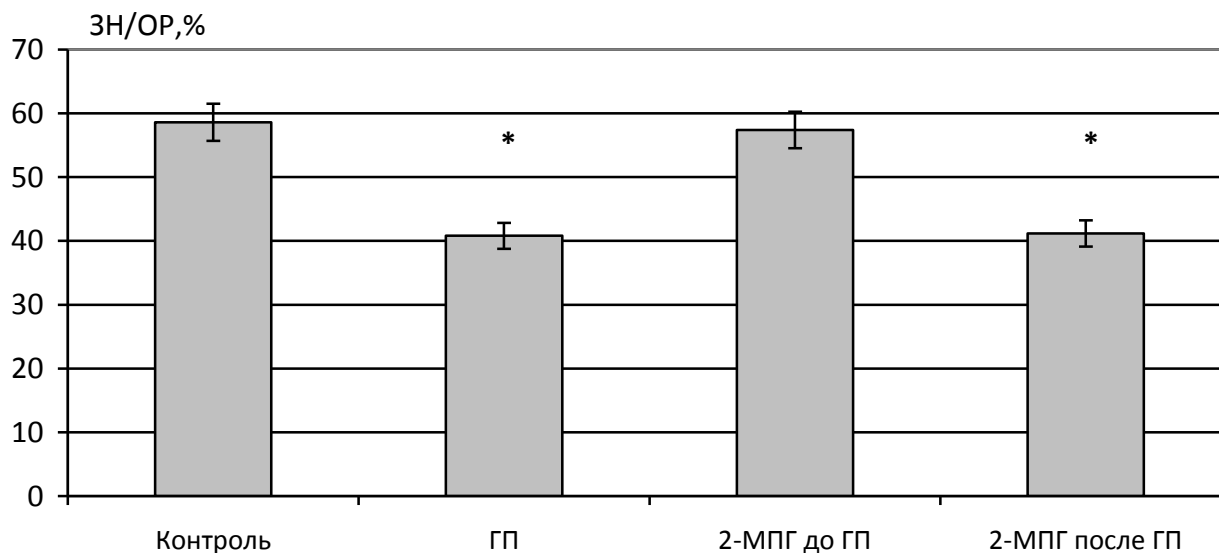


Рисунок 10 – Влияние n-(2-меркаптопропионил)-глицина на размер инфаркта у крыс, повергнутых гипоксическому preconditionированию ($M \pm SEM$).

Примечание - 2-МПП – n-(2-меркаптопропионил)-глицин, вводили в дозе 20 мг/кг внутривенно за 15 минут до ГП или за 10 минут до коронароокклюзии

3.3.5 Участие различных изоформ NO-синтазы в формировании феномена раннего гипоксического preconditionирования.

Значение NO-синтазы и ее отдельных субтипов 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 (Рисунок 11), либо при блокировании индуцибельной изоформы NO-синтазы препаратом S-метилтиомочевины сульфатом, либо эндотелиального пула препаратом 7-нитронидазол (Рисунок 12).

Установлено, что при введении ингибитора NO-синтазы L-NAME за 15 мин до моделирования ГП, размер некроза миокарда после перенесенной ишемии-реперфузии оказался большим на 42,8%, по сравнению с группой животных, подвергнутых ГП без блокирования NO-синтазы (Рисунок 11). Ингибирование NO-синтазы с помощью введения L-NAME после ГП за 10 мин до ишемии не предупреждало формирование защитного эффекта (Рисунок 11). Эти результаты позволяют считать, что NO-синтаза является триггерным, но не медиаторным звеном механизма формирования инфаркт-лимитирующего действия ГП.

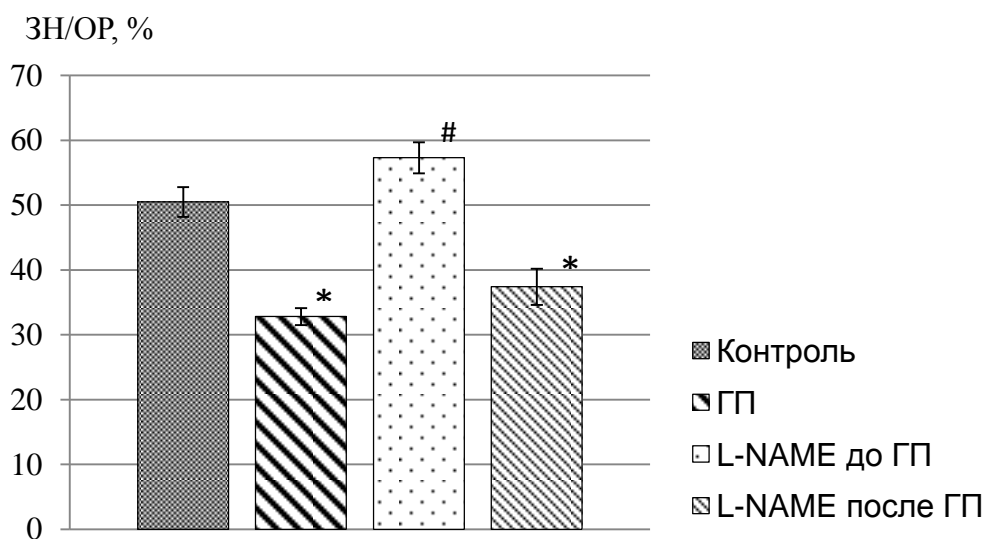


Рисунок 11 – Влияние ингибитора NO-синтазы L-NAME на размер инфаркта крыс, подвергнутых гипоксическому preconditionированию (M±SEM).

Примечание - Контроль – острая коронароокклюзия (45 мин) и реперфузия (120 мин); ГП – раннее гипоксическое preconditionирование; 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 субтипами, исследование участия которых в инфаркт-лимитирующем действии ГП явилось целью наших следующих экспериментов. Селективное ингибирование индуцибельной изоформы NO-синтазы препаратом S-метилтиомочевины в дозе 3 мг/кг за 15 мин до моделирования ГП привело к

увеличению размера инфаркта до уровня контрольных значений (Рисунок 12). В то же время блокада пула нейрональной NO-синтазы не отразилась на проявлении кардиопротекторного эффекта гипоксического preconditionирования: соотношение ЗН/ОР осталось достоверно не отличным от особей с ГП (Таблица 4).

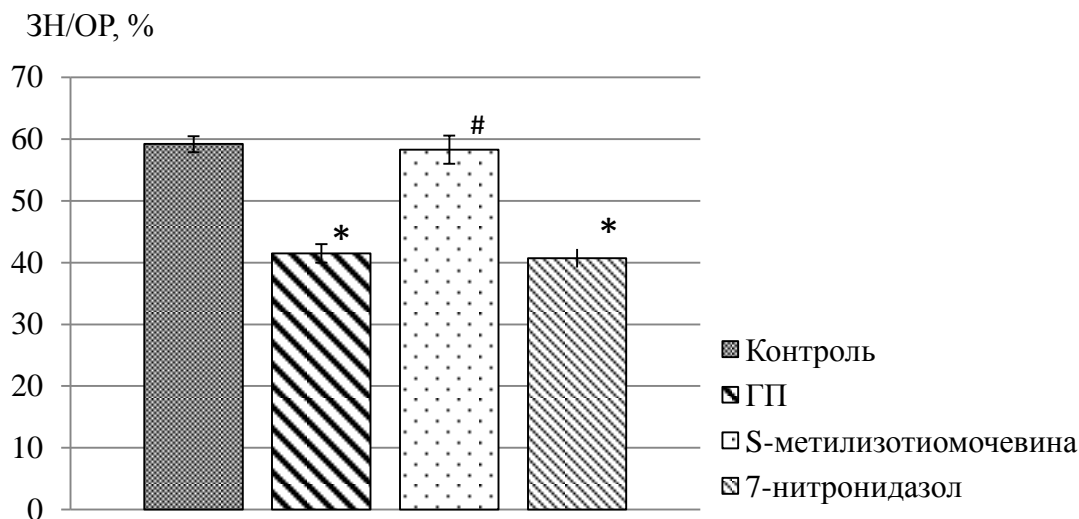


Рисунок 12 – Роль субтипов NO-синтазы в инфаркт-лимитирующем действии гипоксического preconditionирования (M±SEM).

Примечание - Контроль – острая коронароокклюзия (45 мин) и реперфузия (120 мин); ГП – раннее гипоксическое preconditionирование; S-метилтиотомочевину применяли в дозе 3 мг/кг внутрибрюшинно 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 индуцибельная NO-синтаза в развитии инфаркт-имитирующего действия ГП. По-видимому, конститутивная NO-синтаза не участвует в механизме инфаркт-лимитирующего эффекта ГП.

3.3.6 Роль K^+ _{АТФ}-каналов в реализации кардиопротекторного эффекта раннего гипоксического preconditionирования.

Анализ литературных источников показал, что АТФ-чувствительные калиевые каналы могут претендовать на роль медиатора раннего и позднего ГП *in vitro*. Однако роль этих каналов в раннем гипоксическом preconditionировании *in vivo* остается не выясненной.

В нашем исследовании участие K^+ _{АТФ}-каналов в защитном эффекте гипоксического preconditionирования устанавливали путем их фармакологического ингибирования за 15 мин до моделирования ГП, либо после адаптации 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^+ _{АТФ}-каналов глибенкламида в дозе 0,3 мг/кг до моделирования ГП полностью нивелировало защитный эффект этого адаптирующего воздействия (Рисунок 12). Однако применение глибенкламида после ГП не влияло на возникновение устойчивости к ишемическому-реперфузионному повреждению (Рисунок 13)

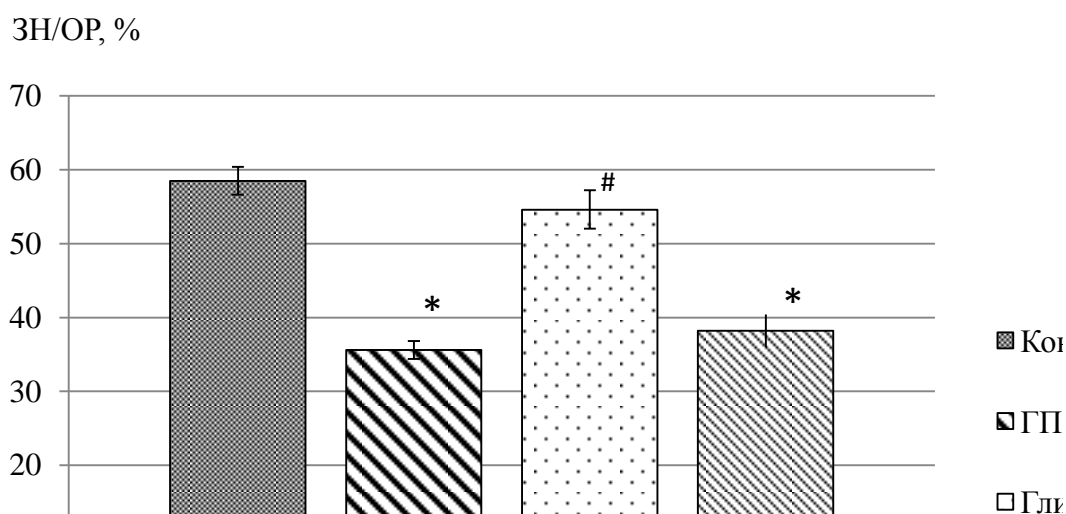


Рисунок 13 – Влияние глибенкламида на размер инфаркта у крыс, подвергнутых гипоксическому preconditionированию (M±SEM).

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

Селективное ингибирование K^+ _{АТФ}-каналов, расположенных на мембранах митохондрий (мито K^+ _{АТФ}-каналов) препаратом 5-гидроксидеканоат в дозе 5 мг/кг привело к увеличению размера инфаркта до значений контрольной группы (Рисунок 14). Блокирование сарколеммальных

K^+ _{АТФ}-каналов селективным ингибитором HMR 1098 (Clamikalant sodium) в дозе 10 мг/кг не устраняло инфаркт-лимитирующий эффект ГП (Рис. 14).

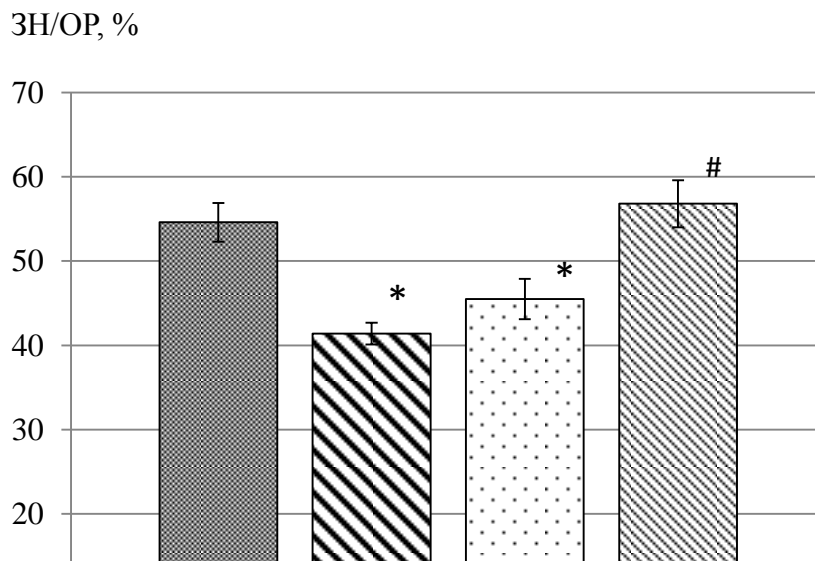


Рисунок 14 – Влияние 5-гидроксидеканоата на размер инфаркта у крыс, подвергнутых гипоксическому прекодиционированию ($M \pm SEM$).

Примечание - Контроль – острая коронароокклюзия (45 мин) и реперфузия (120 мин); ГП – раннее гипоксическое прекодиционирование; 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 значительное влияние мито K^+ _{АТФ}-каналов на формирование защиты миокарда при ГП. В то же время, вопрос об участии сарколеммальных K^+ _{АТФ}-каналов в реализации адаптационного эффекта ГП в отношении ишемических-реперфузионных повреждений сердца не подтвержден.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Механизм цитопротекторного действия хронической нормобарической гипоксии. Ранее нами было показано, что миокард крыс, подвергнутых хронической непрерывной нормобарической гипоксии, устойчив к повреждению, вызванному коронароокклюзией и реперфузией *in vivo* [Maslov L.N. et al., 2013] и тотальной ишемией–реперфузией изолированного сердца *in vitro* [Maslov L.N. et al., 2015]. У крыс, адаптированных к ХННГ, оказалась выше и сократительная активность миокарда [Maslov L.N. et al., 2015; Tajima M. et al., 1994]. В ходе настоящего исследования нами был обнаружен цитопротекторный эффект ХННГ при моделировании аноксии–реоксигенации изолированных кардиомиоцитов (Таблица 1, рисунок 3). Цитопротекторное действие хронической нормобарической гипоксии ранее было показано только на модели метаболического ингибирования клеточного дыхания [Borchert G.H. et al., 2011; 2013], а на модели аноксии–реоксигенации изолированных кардиомиоцитов этот эффект ХННГ выявлен нами впервые.

Несмотря на выраженный и длительный инфаркт–лимитирующий эффект адаптации к нормобарической гипоксии (уменьшение размера инфаркта миокарда при этом адаптирующем воздействии достигает 63%, а продолжительность эффекта – до 5 недель после прекращения гипоксии) [Neskar J. et al., 2004], его механизмы до настоящего времени были недостаточно исследованы. Тот факт, что протекторное действие ХННГ обнаруживается на модели изолированных кардиомиоцитов, свидетельствует о том, что реализация этого эффекта происходит, в том числе, через внутриклеточные сигнальные механизмы и/или связанные с ними рецепторы. Однако в научной литературе полностью отсутствовала информация о рецепторах, опосредующих протекторный эффект ХННГ. Вместе с тем, известно, что рецепторы, находящиеся на мембране кардиомиоцитов, в частности: аденозиновые, брадикининовые, опиоидные и каннабиноидные рецепторы, объединенные в группу GPCR ($G_{i/o}$ -белок–сопряженных рецепторов) являются необходимым звеном для передачи внутрь клетки протекторного сигнала при таких воздействиях как ишемическое пре– и посткондиционирование, дистантное и фармакологическое преко́ндиционирование [Schultz J.E.J., 1998; Xu Y.C., et al., 2015]. Опиоидные рецепторы, на наш взгляд, являются наиболее перспективными структурами для фармакологического воздействия на кардиомиоциты с целью повышения устойчивости миокарда к ишемическому–реперфузионному повреждению, поскольку их селективные агонисты показывают выраженное протекторное действие, не обладая негативными побочными эффектами, как агонисты аденозиновых, брадикининовых и каннабиноидных рецепторов [Маслов Л.Н. и др., 2013а]. В связи с этим, первоочередной задачей настоящего исследования оказалось выявление участия опиоидных

рецепторов различных субтипов и опиоидной системы в целом в реализации кардиопротекторного действия ХННГ.

Важно отметить, что в результате ХННГ наблюдается возрастание уровня эндогенных опиоидов – мет–энкефалина и эндоморфинов – в плазме крови и миокарде крыс [Maslov L.N. et al., 2013]. Повышение содержания опиоидных пептидов было обнаружено ранее в плазме крови и мозге крыс при адаптации к хроническому стрессу [Маслова Л.В., Лишманов Ю.Б., 1989; Лишманов Ю.Б. и др. 1996]. При длительном воздействии хронической гипобарической гипоксии этими же авторами было обнаружено возрастание содержания мет–энкефалина в гипоталамусе [Маслов Л.Н. и др. 1998а]. В 1996 г. группа ученых из исследовательского центра Аризоны выявила повышение экспрессии гена, кодирующего дельта–опиоидные рецепторы, в мозге мышей после 7–дневной нормобарической гипоксии [Mayfield K.P. et al., 1996]. Все эти данные однозначно свидетельствуют о значительных изменениях, которым подвергается опиоидная система в процессе адаптационных воздействий. Важно отметить, что обнаруженное нами повышение содержания эндогенных опиоидов в крови и миокарде адаптированных к ХННГ крыс сохраняется при коронароокклюзии–реперфузии, в то время как у неадаптированных крыс уровень опиоидов снижается [Maslov L.N. et al., 2013]. Физиологическое значение этих изменений становится понятным после исследования с применением антагонистов ОР: для выявления роли опиоидной системы в развитии адаптационной устойчивости миокарда к ишемическим–реперфузионным повреждениям мы исследовали инфаркт–лимитирующий, кардиопротекторный и цитопротекторный эффекты ХННГ в условиях блокады опиоидных рецепторов их селективными агонистами. В нашей работе обнаружено, что инфаркт–лимитирующий эффект ХННГ *in vivo* не проявляется в условиях блокады δ_2 - и μ -опиоидных рецепторов [Maslov L.N. et al., 2013]. Это свидетельствует об опосредовании этими субтипами ОР защитного действия ХННГ в отношении ишемического–реперфузионного повреждения миокарда и позволяет нам с уверенностью говорить о том, что инфаркт–лимитирующий эффект ХННГ реализуется через активацию эндогенной опиоидной системы – выработку опиоидов и стимулирование опиоидных рецепторов. Помимо этого, исследование роли опиоидной системы в процессе адаптации к гипоксии проводили физиологи из США [Mayfield K.P., D'Alecy L.G. 1994]. Ими была установлена важная роль опиоидных рецепторов в повышении толерантности к гипоксии у адаптированных к этому экстремальному воздействию крыс [Mayfield K.P., D'Alecy L.G. 1994].

Важным вопросом является выяснение локализации опиоидных рецепторов, ответственных за реализацию обнаруженных защитных эффектов хронической гипоксии. Проведенные опыты показали, что в случае, если моделирование ишемии–реперфузии было

проведено на изолированных кардиомиоцитах (Таблица 1, 2, рисунок 3), защитный эффект ХННГ сохранялся. Более того, при блокаде δ_2 - или μ -опиоидных рецепторов на этой экспериментальной модели мы не наблюдали цитопротекторного действия ХННГ (Таблица 3, рисунок 4). Эти данные позволяют нам говорить о том, что кардиопротекторное действие ХННГ реализуется через δ_2 -и μ -опиоидные рецепторы, расположенные в миокарде, на мембранах кардиомиоцитов.

Внутриклеточные механизмы реализации инфаркт-лимитирующего действия ХННГ до настоящего времени были исследованы недостаточно. Анализируя данные литературы о механизмах реализации инфаркт-лимитирующего эффекта гипобарической гипоксии, ишемического прекондиционирования и механизма кардиопротекторного действия опиоидов мы предположили, что механизм защитных эффектов хронической нормобарической гипоксии включает в себя тирозинкиназы, PI3-протеинкиназу [Williams-Pritchard G., et al, 2011], протеинкиназу C [Rouet-Benzineb P. et al, 1999; Neckar J. et al., 2005]. Важно отметить, что эти киназные каскады связаны с опиоидными рецепторами [Williams-Pritchard G., et al, 2011]. В связи с этим второй задачей исследования было выявление участия этих киназ и молекулярных структур в кардиопротекторном эффекте ХННГ.

Наши исследования показали, что при моделировании аноксии-реоксигенации на изолированных кардиомиоцитах адаптированных к хронической нормобарической гипоксии крыс на фоне ингибирования всех типов тирозинкиназ генистеином, цитопротекторный эффект адаптации не проявлялся (Таблица 4, 5). Эти данные однозначно свидетельствуют о важной роли тирозинкиназ кардиомиоцитов в защитном эффекте ХННГ. Полученные результаты согласуются с данными литературы об участии тирозинкиназ в формировании инфаркт-лимитирующего действия раннего и отсроченного ишемического прекондиционирования [Ge H., et al., 2015; Ping P, et al., 1999], или этого же эффекта опиоидов [Fryer R.M. et al., 2001].

При исследовании участия PI3-киназы в механизмах реализации цитопротекторного действия ХННГ нами были получены неожиданные данные, свидетельствующие о том, что PI3-киназа не участвует в реализации этого эффекта ХННГ (Таблица 6, 7). Ранее было обнаружено, что этот фермент участвует в кардиопротекторном эффекте ишемического прекондиционирования и опиоидов [Qin Q, et al., 2003; Cao Z. et al., 2005b]. Известно, что активация PI3-киназы при ишемическом прекондиционировании способствует образованию фосфатидил инозитол-(3,4,5)-трифосфата, который активирует фосфоинозитол-зависимые киназы (PDK), функциональное состояние которых влияет на активность протеинкиназы C [Oudit G.Y., Penninger J.M., 2009; Tong H. et al., 2000]. Роль этого внутриклеточного механизма в реализации кардиопротекторного действия ишемического пре-, посткондиционирования и дистантного прекондиционирования показана в недавних исследованиях [Heusch G., 2015]. Сигнальный каскад,

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

В противоположность приведенным данным литературы S.E. He и соавт. показали, что кардиопротекторный эффект морфина при ишемии-реперфузии изолированного сердца может реализоваться без участия PI3K/Akt-киназ [He S.F. et al., 2015]. Наши данные свидетельствуют о том, что PI3-киназа не вовлечена в регуляторный каскад ХННГ.

Проведенные исследования показали важную роль протеинкиназы С и ее δ -типа в реализации инфаркт-лимитирующего и цитопротекторного действия хронической непрерывной нормобарической гипоксии (Таблица 8, 9). Протеинкиназа С была первым обнаруженным цитоплазматическим медиатором кардиопротекторного действия ишемического preconditionирования, проф. Дж.М. Дауни и его коллеги в 1994 г. показали отсутствие кардиопротекции при ИП на модели коронароокклюзии-реперфузии у кроликов при введении ингибиторов протеинкиназы С [Liu Y. et al., 1994]. Эти исследователи предположили, что активация $G_{i/o}$ -белок-сопряженных рецепторов (GPCR, в число которых входят и опиоидные рецепторы) вызывает активацию фосфолипазы С, которая продуцирует инозитолтрифосфат и диацилглицерол в качестве вторичных мессенджеров. Диацилглицерол вызывает активацию и транслокацию протеинкиназы С [Liu Y. et al., 1994]. Позднее было обнаружено, что активация протеинкиназы С может происходить фосфатидил-зависимыми киназами, которые в свою очередь активируются PI3-киназой [Tong H. et al., 2000; Oudit G.Y., Penninger J.M., 2009; Tong H. et al., 2000]. Несмотря на наличие единичных публикаций, опровергающих роль протеинкиназы С в кардиопротекторном эффекте ИП [Simkhovich B.Z. et al., 1996], концепция о ключевом значении протеинкиназы С в формировании кардиопротекторного эффекта неспецифических адаптивных реакций остается в числе одной из самых обсуждаемых до настоящего времени [Heusch G., 2015].

Известно, что функции различных изоформ ПКС в формировании защитных эффектов неоднозначны [Ping P. et al., 1997; Liu H. et al., 2001; Churchill E.N., Mochly-Rosen D. 2007]. Было обнаружено, что ИП у кроликов приводит к активации ПКС ϵ [Ping P. et al., 1997; Liu H. et al., 2001]. В 2010 г были опубликованы результаты исследования, проведенного в Стендфордском университете США [Churchill E.N. et al., 2010]. На модели ИП изолированного перфузируемого

сердца крысы обнаружено, что митохондриальная (партикулярная) фракция гомогената кардиомиоцитов крыс, подвергшихся ИП перед длительной ишемией, содержит в 3,8 раз меньше активной (фосфорилированной) ПКСδ, но в 16 раз больше активной ПКСε, чем у непрекondиционированных крыс. При этом общее содержание ПКСδ в клетках сердца прекондиционированных сердец снижено. Эти данные позволили предполагать, что опосредование кардиопротекторного действия ИП реализуется через ε-субтип ПКС. Недавними исследованиями показано, что ингибирование экспрессии ПКСβ2 способно снижать ишемическое–реперфузионное повреждение кардиомиоцитов [Liu Y. et al., 2015]. Мнения исследователей об участии ПКСδ в защитном действии ИП противоречивы. Существуют данные как о протективной [Maug M. et al., 2004], так и о негативной [Inagaki K. et al., 2003; Kong L. et al., 2008] роли ПКСδ в регуляции толерантности сердца к действию ишемии-реперфузии. Наше исследование показало важную роль протеинкиназы Сδ в цитопротекторном действии ХННГ (Табл. 8, 9). Эти данные подтверждаются результатами исследования наших коллег из института физиологии г. Прага об увеличении экспрессии ПКСδ в миокарде крыс при адаптации к гипобарической гипоксии [Neckar J. et al., 2005; Hlavackova M. et al., 2010]. Однако недавние исследования этой же группы ученых показали увеличение содержания фосфорилированной ε-изоформы ПКС в миокарде крыс после хронической непрерывной гипоксии [Holzerová K. et al., 2015].

Резюмируя сказанное, мы можем предположить, что сигнальный механизм реализации кардиопротекторного действия ХННГ последовательно включает δ₂-ОР и μ-ОР → GPCR → тирозинкиназы → ПКСδ → повышение толерантности миокарда к повреждающему действию ишемии–реперфузии (Рисунок 15).

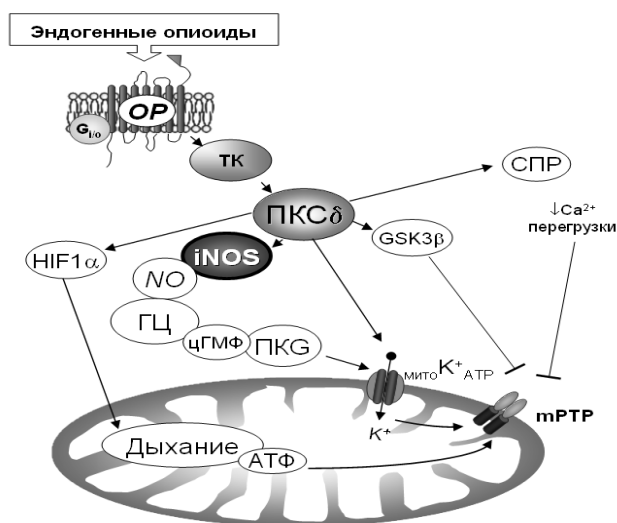


Рисунок 15 – Предполагаемый механизм кардиопротекторного действия хронической непрерывной нормобарической гипоксии.

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

Механизм инфаркт-лимитирующего эффекта гипоксического preconditionирования.

Проведенные исследования показали выраженный инфаркт-лимитирующий эффект раннего ГП (Таблица 10). В отличие от ишемического preconditionирования, ГП может быть применено в клинической практике, поскольку является малоинвазивным методом профилактики ИР-повреждения [Мандель И.А., и др. 2017].

Исследование механизмов формирования кардиопротекторного действия гипоксического preconditionирования ведется с момента открытия этого феномена в 1992 г [Shizukuda Y. et al., 1992]. Однако в настоящий момент нельзя утверждать, что они раскрыты в достаточной степени. Так, до настоящего времени оставалось неясным, участвует ли активация вегетативной нервной системы в реализации инфаркт-лимитирующего действия ГП. Предпосылками к этому предположению явились ранее известные факты об активации ВНС при ишемии-реперфузии [Lubbe W.F. et al., 1992; Hara A., Abiko Y. 1996] и ее важная роль в опосредовании кардиопротекции при ишемическом и фармакологическом preconditionировании миокарда [Takasaki Y. et al., 1998; Pasqualin R.C. et al., 2016; Kawada T. et al., 2002; 2009]. Однако результаты, полученные в нашем исследовании, показали, что при блокировании вегетативных нервных ганглиев гексаметония хлоридом инфаркт-лимитирующий эффект ГП сохраняется (Рисунок 16), что свидетельствует о том, что вегетативная нервная система не участвует в формировании защитного эффекта раннего ГП при коронароокклюзии-реперфузии.

Считают, что важным звеном формирования адаптационных реакций миокарда при краткосрочных и долговременных гипоксических воздействиях является активация G-белок сопряженных рецепторов (GPCR), в том числе аденозиновых и опиоидных [Yang X. et al., 2010; Headrick J.P. et al., 2012]. Однако проведенные нами исследования показали, что ингибирование аденозиновых рецепторов их селективным антагонистом 8-(p-сульфофенил) теofilлином как до начала процедуры ГП, так и после окончания ГП (то есть перед моделированием коронароокклюзии) не предупреждает развития инфаркт-лимитирующего действия ГП. Сходная картина наблюдается и в отношении опиоидных рецепторов – селективное ингибирование всех типов опиоидных рецепторов налтрексоном до или после ГП не изменяет размер инфаркта у крыс, подвергнутых ГП. Эти факты свидетельствуют о том, что опиоидные и аденозиновые рецепторы не принимают участие в триггерном или медиаторном механизмах формирования инфаркт-

лимитирующего эффекта раннего ГП. Полученные данные ставят под вопрос участие рецепторных механизмов запуска ГП. В связи с этим можно предположить, что триггером ГП являются внутриклеточные регуляторные системы, чувствительные к изменению содержания кислорода. В последние десятилетия в литературе сформировалось мнение о том, что в качестве одного из таких механизмов может выступать образование активных форм кислорода, происходящее в ответ на краткосрочную гипоксию [Semenza G.L. 2009]. В нашем исследовании мы выявили увеличение продукции активных форм кислорода при моделировании гипоксического preconditionирования (Рисунок 9). Важно отметить, что повышение АФК мы наблюдали лишь после 1 и 3 цикла ГП, в то время как после окончания ГП содержание активных форм кислорода снижалось до исходного уровня (Рисунок 9). Полученные данные свидетельствуют о том, что АФК могут быть триггерами ГП. Результаты экспериментов с применением антиоксиданта подтвердили это предположение. Введение крысам водорастворимого антиоксиданта 2-меркаптопропионил глицина до начала моделирования ГП полностью предупреждало формирование его инфаркт-лимитирующего действия. В случае если 2-МППГ вводили после моделирования ГП, перед началом коронароокклюзии, инфаркт-лимитирующий эффект ГП сохранялся (Рисунок 10). Важно отметить, что в использованной дозе 2-МППГ не влиял на размер инфаркта у интактных крыс, однако предупреждал образование АФК в миокарде при ГП (Рисунок 9). Полученные данные свидетельствуют о том, что выработка кардиомиоцитами АФК является триггерным, но не медиаторным звеном механизма инфаркт-лимитирующего действия раннего ГП.

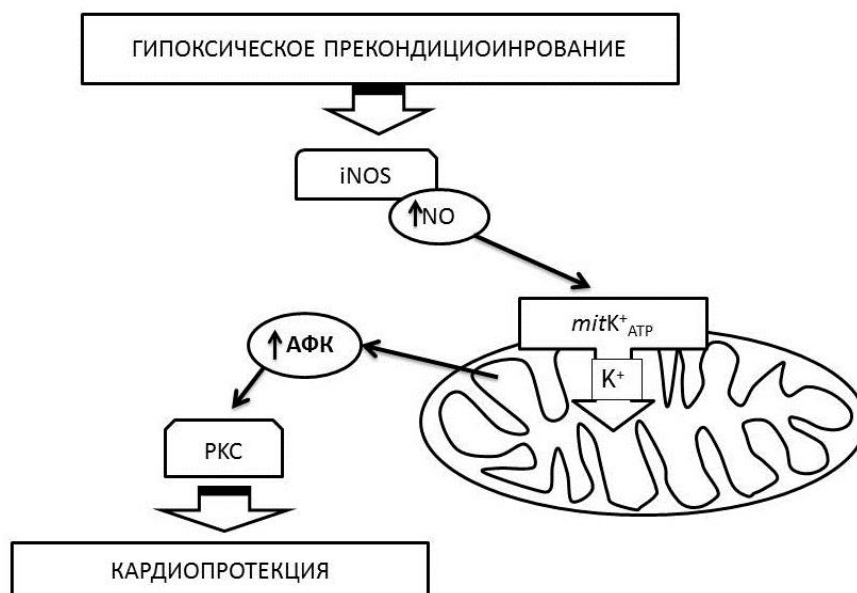


Рисунок 16 – Предполагаемый механизм кардиопротекторного действия гипоксического preconditionирования.

Примечания - PKC – протеинкиназа C, iNOS – индуцибельная синтаза оксида азота, mitK⁺_{ATP} – митохондриальный АТФ-зависимый K⁺ канал

Не менее значимым кислородным сенсором клетки является регуляторная система оксид азота–NO-синтаза [Cuong D.V. et al., 2007]. Наши исследования показали, что ингибирование индуцибельной формы NO-синтазы до моделирования ГП предупреждает развитие его инфаркт-лимитирующего действия, что не происходит при введении блокатора iNOS после ГП (Рисунок 11). На основании проведенного исследования мы можем говорить о триггерной роли индуцибельной NO-синтазы в развитии инфаркт-лимитирующего действия ГП. По-видимому, конститутивная NO-синтаза не участвует в механизме инфаркт-лимитирующего эффекта ГП.

Эффектором внутриклеточным звеном активации NO-синтазы является открытие АТФ-чувствительных K^+ каналов. В нашем исследовании обнаружено, что блокирование K^+ АТФ-каналов предупреждает развитие инфаркт-лимитирующего действия ГП, но только в том случае, если оно проведено перед моделированием ГП (Рисунок 13). О важной роли митохондриальных K^+ АТФ-каналов в защитном действии ГП свидетельствует отсутствие его инфаркт-лимитирующего действия при селективном блокировании мито K^+ АТФ-каналов, но не сарколеммальных K^+ АТФ-каналов (Рисунок 14). Полученные результаты указывают на участие мито K^+ АТФ-каналов в триггерном механизме защиты миокарда при ГП. В то же время, вопрос об участии сарколеммальных K^+ АТФ-каналов в реализации адаптационного эффекта ГП в отношении ишемических-реперфузионных повреждений сердца остается открытым.

Резюмируя данные настоящего исследования можно предполагать, что триггерный механизм гипоксического прекондиционирования включает умеренное повышение выработки активных форм кислорода в ответ на краткосрочную гипоксию, повышение активности синтазы оксида азота и открытие АТФ-чувствительных калиевых каналов. Ни один из исследованных регуляторных механизмов не является медиатором гипоксического прекондиционирования (Рисунок 16).

ВЫВОДЫ

1. Цитопротекторное действие хронической нормобарической гипоксии при гипоксии-реоксигенации изолированных кардиомиоцитов реализуется через $\delta 2$ и μ -опиоидные рецепторы кардиомиоцитов, активацию протеинкиназы $C\delta$, и тирозинкиназ.
2. В механизме цитопротекторного действия хронической непрерывной нормобарической гипоксии не принимают участие $\delta 1$, κ -опиоидные рецепторы и PI3-киназа.
3. Инфаркт-лимитирующее действие раннего гипоксического preconditionирования при коронароокклюзии-реперфузии *in vivo* формируется без участия вегетативной нервной системы, опиоидных и аденозиновых рецепторов.
4. Активные формы кислорода, митохондриальные K^+ _{АТФ}-каналы и индуцибельная NO-синтаза являются триггерами, но не медиаторами инфаркт-лимитирующего действия раннего гипоксического preconditionирования.
5. Сарколеммальные K^+ _{АТФ}-каналы и нейрональная NO-синтаза не являются триггерами или медиаторами инфаркт-лимитирующего действия гипоксического preconditionирования.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ

1. Горбунов А.С., Ваизова О.Е., Белоусов М.В., Позднякова С.В., Нестеров Е.А., Мадонов П.Г. Роль эндогенных агонистов опиоидных рецепторов в регуляции устойчивости сердца к действию реперфузии // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. - 2017. – Том 164, №7. – С.25-28.
2. Мандель И.А., Подоксенов А.Ю., Суходоло И.В., Подоксенов Ю.К., Свирко Ю.С., Каменщиков Н.О., Михеев С.Л., Семенцов А.С., Роговская Ю.В., Ан Д.А., Шипулин В.М., Маслов Л.Н. Защита миокарда от ишемических и реперфузионных повреждений (экспериментальное исследование) // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. -2017. – Том 164, №7. - С. 29-33.
3. Кондратьева Д.С., Афанасьев С.А., Усов В.Ю., Попов С.В. Ритмоинотропная реакция папиллярных мышц крыс при разной выраженности постинфарктного кардиосклероза // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. – 2017. – Том 163, №5. – С.564-569.
4. Муслимова Э.Ф., Реброва Т.Ю., Сергиенко Т.Н., Афанасьев С.А., Репин А.Н. Связь полиморфизма T-786C гена эндотелиальной NO-синтазы 3-го типа с функциональным состоянием миокарда у больных ИБС на фоне сахарного диабета 2-го типа // Генетика. – 2017. – Том 53, №6. – С.7 56-760.
5. Муслимова Э.Ф., Афанасьев С.А., Реброва Т.Ю., Сергиенко Т.Н., Репин А.Н. Ассоциация полиморфизмов генов ITGB3, P2RY12, CYP2C19 с функциональной активностью тромбоцитов у пациентов с ишемической болезнью сердца на фоне двухкомпонентной антиагрегантной терапии // Тер. архив. – 2017. – Том 89, №5. – С.74-78.
6. Маслов Л.Н., Лишманов Ю.Б. Проницаемость гематоэнцефалического барьера для опиоидных пептидов // Экспериментальная и клиническая фармакология. -2017. – Том 80, №6. - С. 39-44.
7. Прокудина Е.С., Бушов Ю.В. Участие μ -опиоидных рецепторов в реализации антинекротического и инотропного эффектов на изолированное сердце у крыс после адаптации к хронической гипоксии // Вестник новых медицинских технологий. -2 017. – Том 24, №3. - С.7-11.
8. Прокудина Е.С., Бушов Ю.В. Вклад μ -опиоидных рецепторов в повышение толерантности митохондрий миокарда к ишемии и реперфузии после хронической гипоксии // Вестник новых медицинских технологий. - 2017. - Том 4, №3. - С. 53-59.
9. Халиулин И.Г., Маслов Л.Н. Problem of heart salvation during reperfusion. Opioid receptor agonists as a possible solution // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. - 2017. - Том VI, № 3. – С. 150-154.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Бернар К. (Bernard C.) Курс общей физиологии. Жизненные явления, общие животным и растениям Пер. с франц. — Спб., 1878. — 316 с.
2. Варфоломеев С. О. Опиатные рецепторы у крыс с различной адаптацией к эмоциональному стрессу // Клинические и орг. вопр. общей и судебной психиатрии. – М., 1986. – С. 76-80.
3. Гаркави Л. Х., Квакина Е.Б., Уколова М.А. Адаптационные реакции и резистентность организма. – Ростов н/Д: Изд. РГУ, 1990. — 224 с.
4. Дудко В.А., Соколов А.А. Моделирование гипоксии в клинической практике – Томск: STT, 2000. – 352с
5. Закошиков К. Ф., Катин С.О. Гипокситерапия – «Горный воздух» М.: «Бумажная галерея», 2005. – 66 с.
6. 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. журн. – 2008. – Т. 94, №4. – С. 448-455.
7. Ласукова Т. В., Маслов Л.Н., Горбунов А.С. О роли опиоидной системы миокарда в реализации кардиопротекторного эффекта посткондиционирования // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2014. – Т. 100, № 12. – С. 1391-1398.
8. Лишманов Ю. Б., Горбунов А.С., Маслов Л.Н. Участие протеинкиназы С- δ в реализации кардиопротективного эффекта ишемического посткондиционирования // Бюлл. exper. биол. и медицины. – 2016. – Т. 161, №3. – С. 318-320.
9. Лишманов Ю. Б., Маслов Л.Н., Мухомедзянов А.В. Роль β -адренорецепторов и Ca^{2+} -каналов L-типа в механизме реперфузионного повреждения сердца // Бюлл. exper. биол. и медицины. – 2016. – Т. 161, №1.- С. 28-30.
10. Лишманов Ю. Б., Кондратьев Б.Ю. Взаимодействие опиоидной и симпатoadреналовой системы при ишемическом повреждении сердца // Физиол. журн. – 1995. – Т. 81, № 5. – С. 77-85.
11. Лишманов Ю. Б., Маслов Л.Н. Использование лигандов мю- и дельта-опиатных рецепторов для предупреждения нарушений ритма и сократимости изолированного сердца в постишемическом периоде // Кардиология. – 1998(6). – № 12. – С. 25-30.
12. Лишманов Ю. Б. Использование энкефалинов для предупреждения стрессорных повреждений сердца в эксперименте // Бюлл. exper. биол. и мед. – 1986. – № 9. – С. 271-272.
13. 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.

14. Лишманов Ю. Б., Маслов Л.Н., Ускина Е.В., А. В. Крылатов А.В. О роли центральных мю- и дельта-опиатных рецепторов в реализации антиаритмического эффекта адаптации // Бюлл. экспер. биол. и мед. – 1996. – Т. 122, № 10. – С. 378-381.
15. Лишманов Ю. Б., Ускина Е.В., Маслов Л.Н., Крылатов А.В. Опиатергические механизмы антиаритмического эффекта адаптации // Бюлл. экспер. биол. и мед. – 1996. – Т. 122, № 9. – С. 276-278.
16. 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.
17. Лишманов Ю. Б., Маслов Л.Н., Угдыжекова Д.С. Экспериментальное изучение фармакологической активности лигандов опиатных рецепторов на модели адреналовых аритмий // Экспер. и клин. фармакология. – 1995. – Т. 56, № 4. – С. 26-28.
18. 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. – С. 73-82.
19. Мандель И.А., Подоксенов А.Ю., Суходоло И.В., Подоксенов Ю.К., Свирко Ю.С., Каменщиков Н.О., Михеев С.Л., Семенцов А.С., Роговская, Ю.В. Ан Д.А., Шипулин В.М., Маслов Л.Н. Защита миокарда от ишемических и реперфузионных повреждений (экспериментальное исследование) // Бюлл. экспер. биол. мед.- 2017.- Т. 164, № 7.- С. 29-33.
20. Маслов Л.Н. Основные проявления феномена дистантного посткондиционирования сердца. Клиническое применение посткондиционирования // Ангиол. сосуд. хир. – 2016. – Т. 22, №3. – С. 16-24.
21. Маслов Л. Н., Крылатов А.В., Горбунов А.С., Цибульников С.Ю., Семенцов А.С. Вазопротекторный эффект классического ишемического преко́ндиционирования // Сиб. мед. жур. (Томск). – 2012. – Т. 27, № 1.С. 9-17.
22. Маслов Л. Н., Лишманов Ю.Б. Кардиопротекторный эффект посткондиционирования сердца (экспериментальные и клинические аспекты) – Изд-во Томского гос. университета систем управления и радиоэлектроники, Томск, 2016. – 271 с.
23. 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 преко́ндиционирование, как новый подход к профилактике ишемических и реперфузионных повреждений головного мозга и сердца // Ангиол. сосуд. Хирургия. – 2011. – Т.17, № 3. – С. 27-36.
24. Маслов Л. Н., Лишманов Ю.Б., Колар Ф., Портниченко А.Г., Подоксёнов Ю.К., Халиулин И.Г., Ванг Х, Пей Ж.-М. Гипоксическое преко́ндиционирование - феномен,

обеспечивающий повышение толерантности кардиомиоцитов к гипоксии-реоксигенации // Росс. физиол. жур. – 2010. – Т.96, № 12.- С. 1170-1189.

25. 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 preconditionирования // Бюлл. exper. биол. и мед. – 2013. – Т.156, №12.- С. 705-708.

26. Маслов Л. Н., Мухомедзянов А.В., Лишманов Ю.Б. Роль эндогенной опиоидной системы в регуляции функционального состояния сердца // Росс. физиол. жур. – 2016. – Т.102, №9. – С. 1017-1029.

27. Маслов Л. Н., Нарыжная Н.В., Семенцов А.С., Мухомедзянов А.В., Горбунов А.С. Влияние посткондиционирования сердца на некроз, апоптоз, онкоз и аутофагию кардиомиоцитов // Пат. физиол. exper. терап. – 2016. – Т.60, №2. – С. 94-100.

28. Маслов Л. Н., Подоксёнов Ю.К., Цибульников С.Ю., Горбунов А.С., Цепокина А.В., Хуторная А.В., Кутихин А.Г., Жанг И., Пей Ж.-М. Феномен дистантного preconditionирования сердца и его основные проявления // Росс. физиол. жур. – 2016. – Т.102, №4.- С. 398-410.

29. Маслов Л.Н., Цибульников С.Ю., Мухомедзянов А.В., Семенцов А.С., Цепокина А.В., Хуторная М.В., Кутихин А.Г., Нам И.Ф. Посткондиционирование сердца. Анализ экспериментальных и клинических данных // Вестник РАМН. – 2016. – Т.71, №1. – С. 40-45.

30. Маслов Л. Н., Цибульников С.Ю., Мухомедзянов А.В., Нарыжная Н.В., Халиулин И.Г. Перспективы применения агонистов аденозиновых, опиоидных и брадикининовых рецепторов для фармакологической имитации феномена посткондиционирования сердца // Exper. клин. фармакол. – 2016. – Т.79, №6. – С. 36-44.

31. Маслов Л. Н., Цибульников С.Ю., Нарыжная Н.В., Иванов В.В., Цибульникова М.Р. Хроническое воздействие холода – адаптация без стресса // Пат. физиол. exper. терап. – 2016. -- № 1. – С. 28-31.

32. Маслов Л. Н., Цибульников С.Ю., Цепокина А.В., Хуторная М. В., А. Г. Кутихин, М. Р. Цибульникова, М. В. Басалай, А. Г. Мрочек Феномен дистантного preconditionирования. Перспективы применения при патологии легких и желудочно-кишечного тракта / Л. Н. Маслов, // Клин. мед. – 2016 – Т.94, №5. – С. 395-400.

33. Маслов Л.Н., Барзах Е.И., Крылатов А.В., Браун С.А., Олтджен П.Р., Говиндашвами М, Чернышева Г.А., Соленкова Н.В., Лишманов А.Ю., Цибульников С.Ю., Криг Т., Жанг Е. Значение опиоидных рецепторов в регуляции толерантности сердца к патогенному действию длительной ишемии-реперфузии in vivo // Росс. физиол. журн.им. И.М. Сеченова. – 2009. – Т. 95, № 6. – С. 563-572.

34. 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.
35. Маслов Л. Н., Мрочек И. А. Щепёткин И.А., Хедрик Дж.П., Хануш Л., Барзах Е.И., Лишманов А.Ю., Горбунов А.С., Цибульников С.Ю., Байков А.Н. Роль протеинкиназ в формировании адаптивного феномена ишемического посткондиционирования сердца // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова – 2013. – Т. 99, № 4. – С. 433-452.
36. Маслов Л. Н., Хануш Л., Пей Ж.-П., Крылатов А.В., Ванг Х., Нарыжная Н.В., Барзах Е.И., Лишманов А.Ю. Сигнальный механизм кардиопротекторных эффектов опиоидов // Экспер. клин. фармакол. – 2013. – Т. 76, № 3. – С. 41-48.
37. Маслов Л. Н., Нарыжная Н.В., Крылатов А.В., Гросс Г.Дж. Эндогенные опиоидные пептиды и антиаритмический эффект адаптации к стрессу // Пат. физиол. и exper. тер. – 2004. – № 4. – С. 11-14.
38. 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.
39. Меерсон Ф. З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. М.: Медицина, 1984. – С.272.
40. Меерсон Ф.З., Пожаров В.П., Миняленко Т.Д., Голубева Л.Ю. Адаптация к стрессу может повышать резистентность животных к сублетальной гипоксии в большей мере, чем адаптация к гипоксии // Бюлл. exper. биол. и мед. – 1993. - № 12. – С. 574-576.
41. Меерсон Ф. З., Пшенникова М. Г. Адаптация к стрессорным ситуациям и физическим нагрузкам. М.: Медицина, 1988. – С.252.
42. Меерсон Ф.З. Адаптация к стрессорным ситуациям и стресс-лимитирующие системы организма // Физиология адаптационных процессов: руководство по физиологии. – М.: Наука, 1986. – С. 521-631.
43. Мухомедзянов А.В., Маслов Л.Н., Овчинников М.В., Сидорова М.В., Pei J. M., Цибульников С.Ю., Целокина А.В., Хуторная М.В., Кутихин А.Г. Влияние дельторфина и его ретро-энантиоаналога на устойчивость сердца к действию ишемии и реперфузии // Бюлл. exper. биол. и медицины. 2016 – Т.162, №9. – С. 284-288.
44. Мухомедзянов А.В., Маслов Л.Н., Цибульников С.Ю., Pei J. M. Эндоморфины и β -эндорфин не влияют на устойчивость сердца к патогенному действию реперфузии // Бюлл. exper. биол. и медицины. – 2016. – Т.162, №7. – С. 29-32.

45. Нарыжная Н.В., Маслов Л.Н. Роль синтеза оксида азота в реализации ранней (первой) фазы ишемического прекодиционирования миокарда // Росс. физиол. жур. – 2016. – Т.102, №7. – С. 92-806.
46. Нарыжная Н.В., Маслов Л.Н., Цепочкина А.В., Хуторная М.В., Кутихин А.Г., Нам И.Ф., Жанг И., Пей Ж.-М. Значение опиоидных рецепторов в цитопротекторном действии адаптации к хронической гипоксии при аноксии-реоксигенации кардиомиоцитов // Росс. физиол. жур. – 2016. – Т.102, №6. – С. 688-697.
47. 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. – С. 837-849.
48. Нарыжная Н.В., Цибульников С.Ю., Маслов Л.Н. Адаптация миокарда к хронической гипоксии: участие опиоидных рецепторов и сопряженных с ними сигнальных механизмов // Тезисы докладов VI Всероссийской школы-конференции с международным участием «Физиология кровообращения», Москва, 2-5 февраля 2016 г, С. 114.
49. Николаева Н.В., Федоров В.В., Привалова В.Ю., Гальянов А.А. Трудовой прогноз больных инфарктом миокарда // Кардиология. – 1997. – Т.37, №3. С. 73.
50. Портниченко А. Г., Василенко М. І., Мойбенко О. О. Роль калієвих каналів в ефекторних механізмах кардіопротекції при пизньому прекодиціюванні серця щурів // Патологія. – 2008. – Т.5, №3. – С. 61-62.
51. Прокудина Е.С., Маслов Л.Н., Бушова Ю.В., Коробов М.В., Подольский А.А., Ванг Ш, Лишманов Ю.Б. Участие опиоидных рецепторов в повышении устойчивости сердца и митохондрий к действию ишемии-реперфузии после адаптации к хронической непрерывной гипоксии // Росс. физиол. жур. – 2016. – Т.102, №10. – С. 1195-1205.
52. 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 // Сиб. мед. жур (Томск). – 2013. - Т. 28, № 3. – С. 19-23.
53. Цибульников С.Ю., Маслов Л.Н., Нарыжная Н.В., Иванов В.В. Лишманов Ю.Б. Особенности адаптации крыс к хроническому воздействию холода // Доклады АН. Биологические науки. – 2016. – Т.470, №1. – С. 1-3.
54. Чернявский А.М., Маслов Л.Н., Пономаренко И.В., Вечерский Ю.Ю., Лишманов Ю.Б., Карпов Р.С. Кардиопротекторный эффект эноксипина при хирургической реконструкции коронарных артерий // Кардиология. – 1996. –Т.36, №8. – С.35-38.

55. Шляхто Е В., Нифонтов Е.М., Галагудза М.М. Пре- и посткондиционирование как способы кардиопротекции: патофизиологические и клинические аспекты // Жур. сердечной недостаточности. - 2008. - Т.9, №1.- С. 4-10.
56. Abbruscato T. J., Thomas S. A., Hruby V. J., Davis T. P. Blood-brain barrier permeability and bioavailability of a highly potent and mu-selective opioid receptor antagonist, CTAP: comparison with morphine // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 1997. – Vol. 280, No1.- P. 402-409.
57. 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.
58. Arstall M.A. Y., Zhao Z., Hornberger L Human ventricular myocytes in vitro exhibit both early and delayed preconditioning responses to simulated ischemia. // J. Mol. Cell. Cardiol. – 1998. – Vol. 30, No5. - P. 1019-1025.
59. 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, No6. – P. 643-653.
60. Barnholt K. E., Hoffman A. R., Rock P. B., Muza S. R., Fulco C. S., Braun B., Holloway L., S. Mazzeo R., Cymerman A., Friedlander A. L. Endocrine responses to acute and chronic high-altitude exposure , № 4,300 meters: modulating effects of caloric restriction // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. – 2006. – Vol. 290, No 6. – P. E1078-E1088.
61. 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, No3. – P. 1064-1069.
62. Beltowski J., Jazmroz-Wisniewska A. Transactivation of ErbB receptors by leptin in the cardiovascular system: mechanisms, consequences and target for therapy // Curr. Pharm. Des. – 2014. – Vol. 20, No 4. – P. 616-624.
63. Birch P.J., Hayes A. G., Sheehan M. J., Tyers M. B. Norbinaltorphimine: antagonist profile at κ opioid receptors // Eur. J. Pharmacol. – 1987. – Vol.144, No3. – P. 405-408.
64. 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, No4. – P. 1195-1202.
65. Borchert G.H., Yang C., Kolar F. Mitochondrial BKCa channels contribute to protection of cardiomyocytes isolated from chronically hypoxic rats. // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – 2011. – Vol. 300, No 2. – P. H507-H513.
66. Borchert G.H., Hlaváčková M., Kolar F. Pharmacological activation of mitochondrial BK(Ca) channels protects isolated cardiomyocytes against simulated reperfusion-induced injury // Exp. Biol. Med. – 2013. – Vol. 238, No 2. – P. 233-241.

67. Borutaite V., Toleikis A., Brown G. C. In the eye of the storm: mitochondrial damage during heart and brain ischaemia // FEBS J. – 2013. – Vol. 280, No 20. – P. 4999-5014.
68. 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.
69. 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, No1. – P. 79-85.
70. Chen Y., Long H., Wu Z., Jiang X., Ma L EGF transregulates opioid receptors through EGFR-mediated GRK2 phosphorylation and activation //Mol. Biol. Cell. – 2008. – Vol. 19, No7. – P.2973-2983.
71. Churchill E. N., Ferreira J. C., Brum P. C., Szweda L. I., Mochly-Rosen D. Ischaemic preconditioning improves proteasomal activity and increases the degradation of dPKC during reperfusion // Cardiovascular Research. – 2010. – Vol. 85. – P. 385–394.
72. Churchill E. N., Mochly-Rosen D. The roles of PKCdelta and epsilon isoenzymes in the regulation of myocardial ischaemia/reperfusion injury // Biochem Soc Trans. – 2007. – Vol. 35. – P. 1040–1042.
73. Chytilova A., Borchert G. H., Mandíková-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.
74. Cox B.M., Christie M. J., Devi L., Toll L., Traynor J. R. Challenges for opioid receptor nomenclature: IUPHAR Review 9 // Br. J. Pharmacol. – 2015. – Vol. 172, No 2. – P. 317-323.
75. Cuong D.V., Warda M., Kim N., Park W. S., Ko J. H., Kim E., Han J. Dynamic changes in nitric oxide and mitochondrial oxidative stress with site-dependent differential tissue response during anoxic preconditioning in rat heart // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.- 2007.- Vol.293, No3.- P. H1457-465.
76. Dengjel J., Kratchmarova I., Blagoev B. Receptor tyrosine kinase signaling: a view from quantitative proteomics // Mol. Biosyst.– 2009.– Vol.5, No10.– P. 1112–1121.
77. Devidze N., Zhang Q., Zhou J., Lee A. W., Pataky S., Kow L. M., Pfaff D. W. Presynaptic actions of opioid receptor agonists in ventromedial hypothalamic neurons in estrogen- and oil-treated female mice // Neuroscience. – 2008. – Vol. 152, No 4. – P. 942-949.
78. Ding H.L., Zhu H. F., W. Dong J., Zhu W.Z., Zhou Z.N. Intermittent hypoxia protects the rat heart against ischemia/reperfusion injury by activating protein kinase C // Life Sci. – 2004. – Vol.75, No21. – P. 2587-2603.
79. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function // Physiol. Rev. -2002.- Vol.82, No1.- P.47-95.

80. Eisinger D.A., Ammer H. Delta-opioid receptors activate ERK/MAP kinase via integrin-stimulated receptor tyrosine kinases // *Cell. Signal.* – 2008. – Vol. 20, No 12. – P. 2324-2331.
81. Eisinger D.A., Ammer H. Epidermal growth factor treatment switches δ -opioid receptor-stimulated extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 signaling from an epidermal growth factor to an insulin-like growth factor-1 receptor-dependent mechanism // *Mol. Pharmacol.* – 2011. – Vol. 79, No 2. – P. 326-335.
82. Espinosa-Diez C., Miguel V., Mennerich D. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress // *Redox Biol.* – 2015. – Vol.6. – P.183-197.
83. Feng Y., He X., Yang Y., Chao D., Lazarus L. H., Xia Y. Current Research on Opioid Receptor Function / Y. Feng // *Curr Drug Targets.* – 2012. – Vol. 13, No2. – P. 230–246.
84. Fitzpatrick C.M., Shi Y., Hutchins W. C., Su J., Gross G. J., Ostadal B., Tweddell J. S., Baker J. E. Cardioprotection in chronically hypoxic rabbits persists on exposure to normoxia: role of NOS and K_{ATP} channels // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2005. – Vol.288, No1. – P. H62-H68.
85. Forster K., Kuno A., Solenkova N., Felix S. B., Krieg T. The δ -opioid receptor agonist DADLE at reperfusion protects the heart through activation of pro-survival kinases via EGF receptor transactivation // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2007. – Vol. 293, No3. – P. H1604-H1608.
86. 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. – V. 10, No7. – P. e0134283.
87. Frassdorf J., Weber N. C., Obal D., Toma O., Müllenheim J., Kojda G., Preckel B., Schlack W. Morphine induces late cardioprotection in rat hearts in vivo: the involvement of opioid receptors and nuclear transcription factor kappaB // *Anesth Analg.* – 2005. – Vol. 101, No 4. – P. 934-941
88. Fryer R.M., Hsu A. K., Eells J. T., Nagase H., Gross G. J. Opioid-induced second window of cardioprotection: potential role of mitochondrial K_{ATP} channels // *Circ. Res.* – 1999. – Vol.84, No7. – P. 846-851
89. Fryer R.M., Wang Y., Hsu A. K., Nagase H., Gross G. J. Dependence of δ 1-opioid receptor-induced cardioprotection on a tyrosine kinase-dependent but not a Src-dependent pathway // *JPET.* – 2001. – Vol. 299, No 2. – P. 477-482.
90. Fryer R.M., Schultz J. E. J., Hsu A. K., Gross G. J. Importance of PKC and tyrosine kinase in single or multiple cycles of preconditioning in rat hearts // *Am. J. Physiol.* – 1999. – Vol. 276. – P. H1229-H1235.
91. Fryer R.M., Patel H.H., Hsu A.K., Gross G.J. Stress-activated protein kinase phosphorylation during cardioprotection in the ischemic myocardium // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2001b. – Vol. 281, No 3. – P. H1184-H1192.

92. Fradorf J., Huhn R., Weber N.C., Ebel D., Wingert N., Preckel B., Toma O., Schlack W., Hollmann M. W. Sevoflurane-induced preconditioning: impact of protocol and aprotinin administration on infarct size and endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation in the rat heart in vivo // *Anesthesiology*. – 2010. – Vol. 113, No 6. – P. 1289-1298.
93. Ge H., Zhao M., Lee S., Xu Z. Mitochondrial Src tyrosine kinase plays a role in the cardioprotective effect of ischemic preconditioning by modulating complex I activity and mitochondrial ROS generation // *Free Radic. Res.* – 2015. – Vol. 49, No 10. – P. 1210-1217.
94. 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, No3. – P. 395-400.
95. Gray M.O., Karliner J.S., Mochly-Rosen D. A selective epsilon-protein kinase C antagonist inhibits protection of cardiac myocytes from hypoxia-induced cell death // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272. – P. 30945–30951.
96. Gross G. J. Role of opioids in acute and delayed preconditioning // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2003. – Vol.35, No 7. – P. 709-718.
97. Guan Y., Li N., Tian Y.M., Zhang L., Ma H. J., Maslov L.N., Wang S., Zhang Y. Chronic intermittent hypobaric hypoxia antagonizes renal vascular hypertension by enhancement of vasorelaxation via activating BK_{Ca} // *Life Sci.* – 2016. – Vol. 157.- P.74-81.
98. Hara A. Role of the sympathetic nervous system in the ischemic and reperfused heart // *EXS.* – 1996. – Vol.76. – P.285-97.
99. Hausenloy D.J., Yellon D.M Preconditioning and postconditioning: united at reperfusion // *Pharmacol. Ther.* – 2007. – Vol. 116, No 2. – P. 173–191.
100. He S.F., Jin S.Y., Wu H., Wang B., Wu Y.X., Zhang S.J., Irwin M.G., Wong T.M., Zhang Y. Morphine preconditioning confers cardioprotection in doxorubicin-induced failing rat hearts via ERK/GSK-3 β pathway independent of PI3K/Akt // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2015. – Vol. 88, No 3. – P. 349-358.
101. Headrick J.P., Pepe S., Peart J. N. Non-analgesic effects of opioids: cardiovascular effects of opioids and their receptor systems // *Curr. Pharm. Des.* – 2012. – Vol. 18, No 37. – P. 6090-6100.
102. 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.
103. Hlavackova M., Kozichova K., Neckar J., Kolar F., Musters R. J., Novak F., Novakova O. Up-regulation and redistribution of protein kinase C- δ in chronically hypoxic heart // *Mol. Cell. Biochem.* – 2010. – Vol. 345, No 1-2. – P. 271-282.

104. 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.
105. 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. H377-H383.
106. Inagaki K., Chen L., Ikeno F., Lee F.H., Imahashi K., Bouley D.M., Rezaee M., Yock P. G., Murphy E., Mochly-Rosen D. Inhibition of δ -protein kinase C protects against reperfusion injury of the ischemic heart in vivo // *Circulation.* – 2003. – Vol. 108, No 19. – P. 2304-2307.
107. Jain K., Suryakumar G., Prasad R., Ganju L. Differential activation of myocardial ER stress response: a possible role in hypoxic tolerance // *Int. J. Cardiol.* – 2013. – Vol. 168, No 5. – P. 4667-4677.
108. 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.
109. 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.
110. 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.
111. Kawada T., Akiyama T., Shimizu S., Kamiya A., Uemura K., Li M., Shirai M., Sugimachi M. Detection of endogenous acetylcholine release during brief ischemia in the rabbit ventricle: a possible trigger for ischemic preconditioning // *Life Sci.* – 2009. – Vol. 85, No15-16. – P.597-601.
112. Kawada T., Yamazaki T., Akiyama T., Mori H., Inagaki M., Shishido T., Takaki H., Sugimachi M., Sunagawa K. Effects of brief ischaemia on myocardial acetylcholine and noradrenaline levels in anaesthetized cats // *Auton Neurosci.* – 2002. – Vol.95, No1-2. – P. 37-42.
113. Khaliulin I., Parker J.E., Halestrap A. P. Consecutive pharmacological activation of PKA and PKC mimics the potent cardioprotection of temperature preconditioning // *Cardiovasc. Res.* – 2010. – Vol. 88, No 2. – P. 324-333.
114. Kolar F., Neckar J., Ostadal B. MCC-134, a blocker of mitochondrial and opener of sarcolemmal ATP-sensitive K^+ channels, abrogates cardioprotective effects of chronic hypoxia // *Physiol. Res.* – 2005. – Vol. 54, No4. – P. 467-471.
115. 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, No2. – P. R127-R134.

116. Kong L., Andrassy M., Chang J. S., Huang C., Asai T., Szabolcs M. J., Homma S., Liu R., Zou Y.S., Leitges M., Yan S.D., Ramasamy R., Schmidt A.M., Yan S.F. PKC β modulates ischemia-reperfusion injury in the heart // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2008. – Vol. 294. – P. H1862-1870.
117. Kopecky M., Daum S. Tissue adaptation to anoxia in rat myocardium // *Cs. Fysiol.* – 1958. – Vol. 7. – P. 518-521.
118. Lasukova T.V., Maslov L.N., Gorbunov A.S. The role of the opioid system of the myocardium in mediating the cardioprotective effect of postconditioning // *Neurosci. Behav. Physiol.* – 2016. – Vol.46, No5. – P. 548-551.
119. Laude K., Favre J., Thuillez C., Richard V. NO produced by endothelial NO synthase is a mediator of delayed preconditioning-induced endothelial protection // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2003. – Vol. 284, No 6. – P. H2053-H2060.
120. Liu Y., Cohen M.V., Downey J.M. Chelerythrine, a highly selective protein kinase C inhibitor, blocks the anti-infarct effect of ischemic preconditioning in rabbit hearts // *Cardiovasc. Drugs Ther.* – 1994. – Vol. 8. – P. 881–882.
121. Liu H., McPherson B. C., Yao Z. Preconditioning attenuates apoptosis and necrosis: role of protein kinase C epsilon and -delta isoforms // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2001. – Vol. 281. – P. H404–H410.
122. Liu H., Zhang H.Y., McPherson B.C., Baman T., Roth S., Shao Z, Zhu X., Yao Z. Role of opioid δ 1 receptors, mitochondrial KATP channels, and protein kinase C during cardiocyte apoptosis // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2001. – Vol. 33, No 11. – P. 2007-2014.
123. Liu Y., Ytrehus K., Downey J. M. Evidence that translocation of protein kinase C is a key event during ischemic preconditioning of rabbit myocardium // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 1994. – Vol. 26. – P. 661–668.
124. Lubbe W.F., Podzuweit T., Opie L.H. Potential arrhythmogenic role of cyclic adenosine monophosphate (AMP) and cytosolic calcium overload: implications for prophylactic effects of beta-blockers in myocardial infarction and proarrhythmic effects of phosphodiesterase inhibitors // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 1992. – Vol.19, No7. – P. 1622-1633.
125. 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/Ca $^{2+}$ exchanger in developing rats // *Cell. Physiol. Biochem.* – 2014. – Vol. 34, No 2. – P. 313-324.
126. Manukhina E.B., Downey H.F., Mallet R. T. Role of nitric oxide in cardiovascular adaptation to intermittent hypoxia // *Exp. Biol. Med (Maywood).* – 2006. – Vol. 231, No4. – P. 343-365.

127. Martin N.A., Terruso M.T., Prather P. L. Agonist activity of the μ -antagonists TIPP and TIPP-c in cellular models expressing endogenous or transfected μ -opioid receptors // *JPET*. – 2001. – Vol. 298. – P. 240-248.
128. Maslov L.N., Khaliulin I., Oeltgen P.R., Naryzhnaya N.V., Pei J.-M., Brown S.A., Lishmanov Y.B., Downey J. M. Prospects of creation of cardioprotective and antiarrhythmic drugs based on opioid receptor agonists // *Med. Res. Rev.* – 2016. – Vol.36, No5. – P. 871-923.
129. Maslov L.N., Khaliulin I., Zhang Y., Krylatov A.V., Naryzhnaya N.V., Mechoulam R., De Petrocellis L., Downey J.M. Prospects for creation of cardioprotective drugs based on cannabinoid receptor agonists // *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* – 2016. – Vol.21, No3. – P. 262-272.
- 130.** Maslov L.N., Naryzhnaya N.V., Podoksenov Yu.K., Mrochek A.G., Gorbunov A.S., Tsibulnikov S.Yu. Opioids as triggers of the adaptive phenomenon of ischemic preconditioning of the heart // *Neurosci. Behav. Physiol.* – 2016. – Vol.46, No3. – P. 319-327.
131. 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.
132. Maslov L.N., Vychuzhanova E.A. The role of the sympathoadrenal system in adaptation to cold // *Neurosci. Behav. Physiol.* – 2016. – Vol.46, No5. – P. 589-600.
133. Maslov L.N., Lishmanov Yu.B., Oeltgen P.R. Activation of peripheral $\delta 2$ 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.
134. Maslov L.N., Lishmanov Y.B., Oeltgen P.R., Barzakh E.I., Krylatov A.V., Naryzhnaya N.V., Pei J. M., Brown S.A. Comparative analysis of the cardioprotective properties of opioid receptor agonists in a rat model of myocardial infarction // *Acad. Emer. Med.* – 2010. – Vol. 17, No 11. – P. 1239-1246.
135. 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.
136. Mayfield K.P., D'Alecy L.G. Delta-1 opioid receptor dependence of acute hypoxic adaptation // *J. Pharm. Exper. Ther.* – 1994. – Vol. 268, No 1. – P. 74-77.
137. Mayfield K.P., Kozak W., Malvin G.M., Porreca F. Hypoxia decreases opioid delta receptor expression in mouse brain // *Neuroscience.* – 1996. – Vol. 72, No 3. – P. 785-9.
138. Mayr M., Metzler B., Chung Y.L., McGregor E., Mayr U., Troy H., Hu Y., Leitges M., Pachinger O., Griffiths J.R., Dunn M.J., Xu Q. Ischemic preconditioning exaggerates cardiac damage in PKC-delta null mice // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2004. – Vol. 287. – P. H946-H956.

139. 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, No1. – P. 30-34.
140. Meerson F.Z., Malyshev I.Yu. Adaptation to stress increases the heart resistance to ischemic and reperfusion arrhythmias // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 1989. – Vol.21. – P. 299-303.
141. Meerson F.Z., Ustinova E.E., Manukhina E.B. Prevention of cardiac arrhythmias by adaptation to hypoxia: regulatory mechanisms and cardiotropic effect // *Biomed. Biochim. Acta.* – 1989. – Vol.48, No2-3. – P. S83-S88.
142. 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.
143. Meerson F.Z., Kopylov Y.N., Golubeva L.Yu. The role of ITP-DAG regulatory cascade in the mechanism of cardioprotective effect of adaptation to stress // *Can. J. Cardiol.* – 1994. – Vol. 10, No 1. – P. 137-147.
144. 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.
145. Merry T.L., Steinberg G.R., Lynch G.S., McConell G. K. Skeletal muscle glucose uptake during contraction is regulated by nitric oxide and ROS independently of AMPK // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2010. – Vol. 298, No 3. – P. E577-85.
146. 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.
147. 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.
148. Milano G., L. K. von Segesser, 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. – 2010b. – Vol. 235, No 3. – P. 401-410.
149. Misra M., Sarwat M., Bhakuni P., Tuteja R., Tuteja N. Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes // *Med. Sci. Monit.* – 2009. – Vol.15, No10. – P.RA209-219.
150. Murray A.J. Energy metabolism and the high-altitude environment // *Exp. Physiol.* – 2016. – Vol. 101, No 1. – P. 23-27.

151. Musil J., Prochazka J., Krofta K., Rakusan K., Poupa O. Effect of chronic systemic hypoxia of the methaemoglobin type on the rat myocardium and its resistance to anoxia // *Physiol. Bohemoslov.* – 1966. – Vol.15, No4. – P. 357-361.
152. 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, No2. – P. 171-175.
153. Neckar J., Szarszoi O., Kotten L., Papousek F., Ost'adal B., Grover G.J., Kolar F. Effects of mitochondrial K_{ATP} modulators on cardioprotection induced by chronic high altitude hypoxia in rats // *Cardiovasc. Res.* - 2002b. – Vol.55, No3. – P. 567-575.
154. Neckar J., Ost'adal B., Kolar F. Acute but not chronic tempol treatment increases ischemic and reperfusion ventricular arrhythmias in open-chest rats / J. Neckar, // *Physiol. Res.* – 2008. – Vol. 57. – P. 653-656.
155. Neckar J., Borchert G.H., Hlousková P., Mícová P., Novakova O., Novak F., Hroch M., Papousek F., Ost'adal B., Kolár F. Brief daily episode of normoxia inhibits cardioprotection conferred by chronic continuous hypoxia. Role of oxidative stress and BKCa channels // *Curr. Pharm. Des.* – 2013. – Vol. 19, No 39. – P. 6880-6889.
156. Neckar J., Papousek F., Novakova O., Ost'adal B., Kolar F. Cardioprotective effects of chronic hypoxia and ischaemic preconditioning are not additive // *Basic Res. Cardiol.* – 2002. – V. 97, No 2. – P. 161-167.
157. Neckar J., Markova I., Novak F., Novakova O., Szarszoi O., Ostadal B., Kolar F. Increased expression and altered subcellular distribution of PKC-delta in chronically hypoxic rat myocardium: involvement in cardioprotection // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2005. – Vol. 288, No 4. – P. H1566- H1572.
158. Neckar J., Ostadal B., Kolar F. Myocardial infarct size-limiting effect of chronic hypoxia persists for five weeks of normoxic recovery // *Physiol Res.* – 2004. – Vol. 53, No 6. – P. 621-628.
159. Neckar J., Boudikova A., Mandíkova P., Sterba M., Popelova O., Miksík I., Dabrowska L., Mraz J., Gersl V., Kolar F. Protective effects of dexrazoxane against acute ischaemia/reperfusion injury of rat hearts // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 2012. – Vol. 90, No 9. – P. 1303-1310.
160. Ostadal B., Kolar F., Pelouch V., Widimsky J. Ontogenetic differences in cardiopulmonary adaptation to chronic hypoxia // *Physiol. Res.* – 1995. – Vol.44, No1. – P. 45-51.
161. Oudit G.Y., Penninger J.M. Cardiac regulation by phosphoinositide 3-kinases and PTEN // *Cardiovasc. Res.* – 2009. – Vol. 82. – P. 250–260.
162. Pagliaro P., Penna C. Redox signalling and cardioprotection: translatability and mechanism // *Br. J. Pharmacol.*-2015.- Vol.172, No8.- P.1974-1995.
163. 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.

164. Pasqualin R.C., Mostarda C.T., Souza L.E., Vane M.F., Sirvente R., Otsuki D.A., Torres M. L., Irigoyen M.C, Auler Jr. J. O. Sevoflurane preconditioning during myocardial ischemia-reperfusion reduces infarct size and preserves autonomic control of circulation in rats // Acta Cir Bras. – 2016. – Vol.31, No5. – P.338-45.

165. 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.

166. Ping P., Zhang J., Zheng Y.T., Li R.C., Dawn B., Tang X.L., Takano H., Balafanova Z., Bolli R. Demonstration of selective protein kinase C-dependent activation of Src and Lck tyrosine kinases during ischemic preconditioning in conscious rabbits // Circ. Res. – 1999. – Vol. 85. – P. 542–550.

167. Ping P., Song C., Zhang J., Guo Y., Cao X., Li R.C., Wu W., Vondriska T.M., Pass J.M., Tang X.L., Pierce W.M., Bolli R. Formation of protein kinase C(epsilon)-Lck signaling modules confers cardioprotection // J. Clin. Invest. – 2002. – Vol. 109. – P. 499–507.

168. Ping P., Zhang J., Qiu Y., Tang X.L., Manchikalapudi S., Cao X., Bolli R. Ischemic preconditioning induces selective translocation of protein kinase C isoforms epsilon and delta in the heart of conscious rabbits without subcellular redistribution of total protein kinase C activity // Circ. Res. – 1997. – Vol. 81. – P. 404–414.

169. Poupá O., Krofta K., Procházka J., Chvapil M. The resistance of the myocardium to anoxia in animals acclimated to simulated altitude // Physiol. Bohemoslov. – 1965. – Vol. 14. – P. 233-237.

170. Poupá O., Krofta K., Procházka J., Turek Z. Acclimation to simulated high altitude and acute cardiac necrosis // Fed. Proc. – 1966b. – Vol.25, No4. – P. 1243-1246.

171. Poupá O., Krofta K., Rakusan K., Procházka J., Barbashova Z.I. Myoglobin content of the heart and resistance of the isolated myocardium to anoxia in vitro during adaptation to high altitude hypoxia // Physiol. Bohemoslov. – 1966a. – Vol.15, No5. – P. 450-453.

172. Powis G., Bonjouklian R., Berggren M.M., Gallegos A., Abraham R., Ashendel C., Zalkow L., Matter W.F., Dodge J., Grindey G., et al. Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase / G. Powis, // Cancer Res. – 1994. – Vol. 54, No 9. – P. 2419-2423.

173. Qin Q., Downey J.M., Cohen M.V. Acetylcholine but not adenosine triggers preconditioning through PI3-kinase and a tyrosine kinase // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2003. – Vol. 284, No 2. – P. H727-H734.

174. Raedschelders K., Ansley D., Chen D. The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion // Pharmacol. Ther. – 2012. – Vol.133, No2. – P.230-255.

175. Rouet-Benzineb P., Eddahibi S., Raffestin B., Laplace M., Depond S., Adnot S., Crozatier B. Induction of cardiac nitric oxide synthase 2 in rats exposed to chronic hypoxia // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 1999. – Vol. 31. – P. 1697-1708.
176. Sander G.E., Lowe R.F., Given T.D. Giles Interactions between circulating peptides and the central nervous system in hemodynamic regulation // *Am. J. Cardiol.* – 1989. – Vol. 64, No 6. – P. 44C-50C.
177. 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, No3. – P. 335-348.
178. Schiller P.W., Weltrowska G., Nguyen T.M. TIPP[ψ]: a highly potent and stable pseudopeptide δ opioid receptor agonist with extraordinary δ selectivity // *J. Med. Chem.* – 1993. – Vol. 36, No 21. – P. 3182-3187.
179. Schultz J.J., Hsu A.K., Gross G.J. Ischemic preconditioning and morphine-induced cardioprotection involve the delta (δ)-opioid receptor in the intact rat heart // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 1997. – Vol.29, No8. – P. 2187-2195.
180. Schultz J.E., Yao Z., Cavero I., Gross G.J. Glibenclamide-induced blockade of ischemic preconditioning is time dependent in intact rat heart // *Am. J. Physiol.* – 1997. – Vol. 272, No 6, Pt 2. – P. H2607-2615.
181. Schultz J.E.J., Hsu A.K., Gross G.J. Ischemic preconditioning in the intact rat heart is mediated by delta1- but not mu- or kappa-opioid receptors // *Circulation.* – 1998. – Vol. 97, No13 – P. 1282-1289.
182. Schultz J.E.J., Hsu A.K., Gross G.J. Morphine mimics the cardioprotective effect of ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in the rat heart // *Circ. Res.* – 1996. – Vol. 78. – P. 1100-1104.
183. Schultz J.E.J., Hsu A.K., Nagase H., Gross G.J. TAN-67, a δ 1-opioid receptor agonist, reduces infarct size via activation of Gi/o proteins and KATP channels // *Am. J. Physiol.* – 1998. – Vol. 274, No 3 Pt 2. – P. H909-H914.
184. Semenza, G. L. Regulation of Oxygen Homeostasis by Hypoxia-Inducible Factor 1 // *Physiology.* – 2009. – Vol.24. – P. 97-106.
185. 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.
186. 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, No4. – P. 559-564.

187. Simkhovich B.Z., Przyklenk K., Hale S.L., Patterson M., Kloner R.A. Direct evidence that ischemic preconditioning does not cause protein kinase C translocation in rabbit heart // *Cardiovasc. Res.* – 1996. – Vol. 32. – P. 1064–1070.
188. Simonson, T. S. Altitude adaptation: a glimpse through various lenses // *High altitude medicine & biology.* – 2015. – Vol. 16, No 2. – 125-137.
189. Stevens W.C.Jr., Jones R.M., Subramanian G., Metzger T.G., Ferguson D.M., Portoghese P. S. Potent and selective indolomorphinan antagonists of the kappa-opioid receptor // *J. Med. Chem.* – 2000. – Vol. 43, No 4. – P. 2759-2769.
190. Surendra H., Diaz R.J., Harvey K., Tropak M., Callahan J., Hinek A., Hossain T., Redington A., Wilson G.J. Interaction of δ and κ opioid receptors with adenosine A1 receptors mediates cardioprotection by remote ischemic preconditioning // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2013. – Vol. 60. – P. 142-150.
191. Tajima M., Katajose D., Bessho M., Isoyama S. Acute ischemic preconditioning and chronic hypoxia independently increase myocardial tolerance to ischemia // *Cardiovasc. Res.* – 1994. – Vol. 28. – P. 312–319.
192. Takasaki Y., Adachi N., Dote K., Tsubota S., Yorozuya T., Arai T. Ischemic preconditioning suppresses the noradrenaline turnover in the rat heart // *Cardiovasc Res.* – 1998. – Vol.39, No2. – P.373-80.
193. 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, No7. – P. 980-986.
194. 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, No3. – P. 594-602.
195. 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.
196. Trost S.U., Omens J.H., Karlon W.J., Meyer M., Mestril R., Covell J.W., Dillmann W. H. Protection against myocardial dysfunction after a brief ischemic period in transgenic mice expressing inducible heat shock protein 70 // *J. Clin. Invest.* – 1998. – Vol.101, No4. – P. 855-862.
197. 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, No29. – P. 18092-18098.
198. Walsh R.S., Borges M., Thornton J.D. Hypoxia preconditions rabbit myocardium by an adenosine receptor-mediated mechanism // *Can J Cardiol.* – 1995. – Vol. 11, No2.- P. 141-6.

199. Wang G.Y., Wu S., Pei J.M., Yu X.C., Wong T.M. Kappa- but not delta-opioid receptors mediate effects of ischemic preconditioning on both infarct and arrhythmia in rats // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2001. – Vol. 280, No 1. – P. H384-H391.
200. 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.
201. 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.
202. 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.
203. West, J. B. Recent advances in high altitude medicine and biology // *High altitude medicine & biology.* – 2015. – Vol. 16, No 2. – P. 73-73.
204. Williams-Pritchard G., Headrick J.P., Peart J.N. Myocardial opioid receptors in conditioning and cytoprotection // *Pharmaceuticals.* – 2011. – Vol. 4. – P. 470-484.
205. 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, No1. – P. H5-H12.
206. Xu X., Colecraft H. Primary culture of adult rat heart myocytes [electronic resource] // *J. Vis. Exp.* – 2009. – Vol. 28. – P. 1308.
207. Xu Y. C., Li R.P., Xue F.S., Cui X.L., Wang S.Y., Liu, G.P. Yang G Z., Sun C., Liao X. κ -Opioid receptors are involved in enhanced cardioprotection by combined fentanyl and limb remote ischemic postconditioning / *J. Anesth.* – 2015. – Vol. 29, No 4. – P. 535-543.
208. Yang X., Cohen M.V., Downey J.M. Mechanism of cardioprotection by early ischemic preconditioning // *Cardiovasc. Drugs. Ther.* – 2010. – Vol. 24, No3. – P. 225-234.
209. Yellon D.M., Downey J.M. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology // *Physiol. Rev.* – 2003. – Vol.83, No4. - P. 1113-1151.
210. Yellon D.M., Baxter G.F. A "second window of protection" or delayed preconditioning phenomenon: future horizons for myocardial protection? // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 1995. – Vol.27, No4. – P. 1023-1034.
211. Yuan G., Nanduri J., Khan S., Semenza G.L., Prabhakar N.R. Induction of HIF-1 α expression by intermittent hypoxia: involvement of NAD(P)H oxidase, Ca²⁺ signaling, prolyl hydroxylases and mTOR // *J. Cell. Physiol.* – 2008. – Vol. 217. – P. 674-685.

212. Zeng X., Zhao X., Yang Y., Kuai J., Gao C., Yu D., Zhao H., Chai W., Yao L. Opioid $\delta(1)$ and $\delta(2)$ receptor agonist attenuate myocardial injury via mPTP in rats with acute hemorrhagic shock // *J. Surg. Res.* – 2011. – Vol. 169, No 2. – P. 267-276.
213. Zhou T., Chuang C., Zuo L. Molecular Characterization of Reactive Oxygen Species in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury // *BioMed Research International.* - 2015.- P.1-9.
214. 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.
215. Zh B.M., Miyamoto S., Nagasawa Y., Wajima T., Hashimoto K. Effect of the sarcolemmal K(ATP) channel blocker HMR1098 on arrhythmias induced by programmed electrical stimulation in canine old myocardial infarction model: comparison with glibenclamide // *J. Pharmacol. Sci.* – 2003. – Vol. 93, No 1. – P. 106–113.
216. Zhu M., Cho Y.K., Li C.S. Activation of delta-opioid receptors reduces excitatory input to putative gustatory cells within the nucleus of the solitary tract // *J. Neurophysiol.* – 2009. – Vol. 101, No 1. – P. 258-268.