

Нарыжная

Наталья Владимировна

**ОПИОИДНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ И ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ СИГНАЛЬНЫЕ
МЕХАНИЗМЫ, ОПОСРЕДУЮЩИЕ КАРДИОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ
АДАПТАЦИИ К ХРОНИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ**

14.03.03 – патологическая физиология
03.03.01 – физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени доктора медицинских наук

Томск 2016 г.

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт кардиологии»

Научные консультанты:

доктор медицинских наук, профессор Маслов Леонид Николаевич

доктор медицинских наук, профессор, член-корр. РАН Лишманов Юрий Борисович

Официальные оппоненты:

Шилов Сергей Николаевич – доктор медицинских наук, доцент кафедры патологической физиологии и клинической патофизиологии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации;

Меньщикова Елена Брониславовна – доктор медицинских наук, руководитель лаборатории молекулярных механизмов свободнорадикальных процессов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины», г. Новосибирск;

Дьякова Елена Юрьевна – доктор медицинских наук, профессор кафедры спортивно-оздоровительного туризма, спортивной физиологии и медицины факультета физической культуры Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет».

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово.

Защита состоится «___»_____ 2016 года в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Томск, Московский тр. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России и на сайте <http://ssmu.ru>.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Петрова Ирина Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Сердечно-сосудистые заболевания остаются основной причиной смертности трудоспособного населения развитых стран [Чазов Е.И., 2008; Марков В.А. и др., 2011; Braunwald E. et al., 2011; Шальнова, С. А. и др., 2012]. В России гибель населения от болезней системы кровообращения составляет в структуре общей смертности 34% у мужчин и 39% у женщин [Бойцов С.А., Самородская И.В. 2014; Оганов Р.Г., 2002, 2015]. Основной причиной смертности и стойкой утраты трудоспособности у больных кардиологического профиля является ишемическая болезнь сердца, чреватая такими осложнениями как инфаркт миокарда, фатальные аритмии, сердечная недостаточность и гибель пациента [Сыркин А. С. 2003; Winkler C. et al., 2013; Chung H. et al., 2014; Braunwald E. 2015]. Как известно, основными патогенетическими факторами вышеназванных осложнений ишемической болезни сердца (ИБС) служат некроз и апоптоз кардиомиоцитов [Vaines С.Р. 2011], поэтому профилактика ишемических и реперфузионных повреждений миокарда остается одной из наиболее актуальных проблем современной патофизиологии и кардиологии.

Предупреждение последствий острой и хронической ишемии миокарда включает в себя тромболитическую терапию, хирургическую и/или эндоваскулярную реваскуляризацию, а также медикаментозное лечение [Марков В.А. и др., 2011; Но Y.C. et al., 2014]. Результаты использования указанных методов в последние десятилетия впечатляют [Braunwald E. 2011; Газарян Г.А. и др., Поляков Р.С. и др., 2014; Чернявский А.М. и др., 2015; Mauri L. et al., 2015; Mega J. L. et al., 2015], однако эффективность традиционных способов лечения остаётся недостаточной [Braunwald E. 2015].

Исходя из вышесказанного, разработку способов повышения естественной устойчивости сердца к ишемии следует признать актуальной.

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 [Korecky 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., 2010а,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 [Karck 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 C, митохондриальные АТФ-чувствительные K⁺-каналы (миток_{АТФ}-каналы) и mPTP-поры (mitochondrial permeability transition pore) [Маслов Л.Н. и др., 2013]. Можно предполагать, что этот регуляторный механизм опиоидергической регуляции функционального состояния сердца реализуется и при хронической гипоксии. Обоснованность такой гипотезы подтверждается работами, проведенными в 2010-2015 гг. Так, рядом авторов было показано, что хроническая нормобарическая гипоксия вызывает увеличение количества активной формы протеинкиназы C [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.

Учитывая непреложную роль дисфункции митохондрий в патогенезе повреждений миокарда при ишемии-реперфузии [Borutaite V. et al., 2013], а также участие опиоидов в обеспечении резистентности сердца к этим патогенным воздействиям [Маслов Л. Н. и др., 2009; 2013], целесообразным представляется изучение опосредующей роли опиоидных рецепторов в регуляции функционального состояния митохондрий миокарда при адаптации к гипоксии.

Наряду с некрозом миокарда, известным следствием его повреждения при ишемии и реперфузии является нарушение электрической стабильности сердца. В этой связи следует отметить, что профессором Ф.З. Меерсоном [Meerson F.Z. et al., 1987] было продемонстрировано и антиаритмическое действие адаптации к гипоксии. Однако рецепторные и внутриклеточные механизмы реализации такого эффекта остаются практически не изученными.

В качестве подобного механизма можно рассматривать снижение активности симпатoadреналовой системы, на что указывает снижение чувствительности β-адренорецепторов миокарда к катехоламинам после адаптации крыс к хронической гипобарической гипоксии [Меерсон Ф.З. и др., 1991; Voelkel N.F. et al., 1981; Guan Y. et al., 2010]. При этом установлено, что опиоиды способны ингибировать выброс норадреналина из симпатических терминалей [Caffrey J.L., 1984; Bali A. et al., 2015;

Mercadante S. et al., 2014; Leal A.K. et al., 2013] и экскрецию катехоламинов с мочой при острой ишемии миокарда [Алекминская Л.А. и др., 1986; Лишманов Ю.Б., Кондратьев Б.Ю., 1995]. В связи с этим можно предполагать, что снижение «адренореактивности» миокарда при адаптации к гипоксии связано с активацией опиоидных рецепторов. Однако эта гипотеза остается не подтвержденной.

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.

Цель исследования:

Изучить роль опиоидных рецепторов и связанных с ними сигнальных путей в реализации адаптационного повышения толерантности сердца к воздействию ишемии и реперфузии.

Задачи исследования:

1. Выявить закономерности изменений уровня эндогенных опиоидов в крови и тканях при адаптации крыс к действию хронической гипоксии.
2. Исследовать вклад различных субтипов опиоидных рецепторов в реализацию кардиопротективного и антиаритмического действия хронической гипоксии.
3. Оценить роль сопряженных с опиоидными рецепторами внутриклеточных сигнальных систем в обеспечении кардиопротекции при адаптации к хронической гипоксии.
4. Определить влияние хронической непрерывной нормобарической гипоксии на функциональное состояние митохондрий миокарда в зависимости от активности опиоидных рецепторов.
5. Оценить вклад антиадренергического действия опиоидов в реализацию антиаритмического эффекта хронической прерывистой гипобарической гипоксии.
6. Доказать возможность увеличения устойчивости миокарда к аритмогенным воздействиям при повышении уровня опиоидных пептидов в организме.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Опиоидная система является одним из ключевых звеньев реализации кардиопротекторного действия хронической непрерывной нормобарической гипоксии и антиаритмического эффекта хронической прерывистой гипобарической гипоксии.
2. Кардиопротекторный эффект хронической непрерывной нормобарической гипоксии реализуется через активацию δ_2 - и μ -опиоидных рецепторов мембран кардиомиоцитов и связанных с ними тирозинкиназ, протеинкиназы $C\delta$, iNO-синтазы и митоK_{ATФ}-каналов, а также улучшение энергетического метаболизма митохондрий и увеличение устойчивости mPTP-пор к действию ишемии-реперфузии.
3. Антиаритмический эффект адаптации к прерывистой гипобарической гипоксии опосредуется через активацию экстракардиальных δ -опиоидных рецепторов и обусловленное этим снижение выброса катехоламинов из надпочечников и симпатических терминалей миокарда.
4. Ингибирование энкефалиназ является перспективным патогенетически обоснованным подходом к разработке новых способов защиты миокарда при ишемии-реперфузии.

Научная новизна исследования. В представленной работе впервые обнаружено участие опиоидной системы в реализации кардиопротекторного действия хронической непрерывной нормобарической гипоксии и антиаритмического эффекта хронической прерывистой гипобарической гипоксии. Абсолютную новизну представляют результаты, показывающие повышение содержания опиоидных пептидов в крови и ткани миокарда у крыс, адаптированных к хронической непрерывной нормобарической гипоксии. Впервые определена рецепторная природа участия опиоидов в реализации кардиопротекторного действия ХННГ и антиаритмического эффекта ХППГ.

При выполнении диссертационной работы впервые выявлено, что в реализации инфаркт-лимитирующего, кардиопротекторного и цитопротекторного эффектов хронической непрерывной нормобарической гипоксии важную роль играет активация тирозинкиназ, протеинкиназы $C\delta$, iNO-синтазы (индуцибельной изоформы синтазы оксида азота), митоK_{ATФ}-каналов, увеличение устойчивости mPTP-пор к действию ишемии-реперфузии и улучшение энергетического метаболизма митохондрий.

Факт того, что антиаритмический эффект адаптации к прерывистой гипоксии при ишемии-реперфузии может быть осуществлен через активацию опиоидных рецепторов и последующее ограничение выхода катехоламинов из надпочечников и симпатических терминалей миокарда, обнаружен впервые.

Принципиально новым явилось обнаружение антиаритмического действия ингибиторов энкефалиназ.

Теоретическая и практическая значимость работы. Проведенное исследование раскрывает новые закономерности формирования защитных эффектов адаптации к гипоксии. В результате исследования разработана и обоснована концепция о взаимосвязи опиоидных рецепторов и внутриклеточных механизмов в реализации кардиопротекторного действия хронической непрерывной нормобарической гипоксии. Обосновано предположение о зависимости «адреносберегающего» действия при формировании антиаритмического эффекта хронической прерывистой гипобарической

гипоксии от активации опиоидных рецепторов. Предложен новый методологический и патогенетически обоснованный подход к разработке эффективных способов защиты миокарда при ишемии-реперфузии - инактивация ферментов катаболизма эндогенных опиоидных пептидов.

По результатам исследования получен патент РФ № 2488404 от 27 июля 2013 г «Средство, увеличивающее устойчивость сердца к ишемическим и последующим реперфузионным повреждениям».

Результаты исследования внедрены в курсы лекций для ординаторов НИИ кардиологии по специальностям кардиология, сердечно-сосудистая хирургия, анестезиология-реаниматология, функциональная диагностика, радиология, детская кардиология; аспирантов по специальностям сердечно-сосудистая хирургия, анестезиология-реаниматология, лучевая диагностика, лучевая терапия, патологическая физиология (Акт внедрения от 20 октября 2015 г).

Методология и методы исследования. Согласно поставленным задачам применены современные высокоинформативные методологические подходы, разработанные в НИИ кардиологии на основании анализа литературных источников. Объектами исследования явились белые конвенциональные аутбредные крысы Вистар, виварий НИИ кардиологии. Основной методический подход - экспериментальные исследования.

Степень достоверности и апробация результатов. Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом материала исследования, использованием современных методов и методологических подходов, высокотехнологического оборудования, адекватных критериев статистической обработки данных. Основные положения диссертации доложены на IV съезде физиологов Сибири (Новосибирск, 2002); VI Сибирском физиологическом съезде (Барнаул, 2008); V всероссийской конференции «Гипоксия, механизмы, адаптация, коррекция» (Москва, 2008), VI Российской конференции с международным участием «Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция» (Москва, 2011); Российском национальном конгрессе кардиологов (Москва, 2011); V Всероссийской с международным участием школе-конференции Физиология кровообращения (Москва, 2012); конференции «Высокие технологии, исследования, образование в физиологии, медицине и фармакологии» (Санкт-Петербург, 2012); V съезде кардиологов Сибирского Федерального округа «Сибирская наука – Российской практике» (Барнаул, 2013); Российском национальном конгрессе кардиологов «Кардиология: от науки к практике», (Санкт-Петербург, 2013 г); VII съезде кардиологов Узбекистана, «Стратегические задачи снижения сердечно-сосудистой заболеваемости и смертности» (Ташкент, 2015 г.); Юбилейной научной сессии «От трансляционных исследований – к инновационной медицине» посвященной 35-летию ФГБУ «Северо-западный Федеральный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России (Санкт-Петербург, 2015); VI Всероссийской с международным участием школе-конференции «Физиология кровообращения» (Москва, 2016 г).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 26 печатных работ, из которых 21 статья в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ для публикации материалов диссертационных исследований на соискание ученой степени доктора

медицинских наук, 3 статьи в международных высокорейтинговых журналах, один патент РФ на изобретение, материал диссертации использован при написании монографии [Лишманов Ю.Б. и соавт. 2003].

Работа проводилась при поддержке следующих грантов: Грант РФФИ №11-04-98001 «Рецепторные и сигнальные механизмы протекторных эффектов хронической нормобарической гипоксии» (2011 – 2012, руководитель проекта); Грант РФФИ №12-04-91152-ГФЕН «Молекулярные механизмы адаптационного феномена, вызванного хронической гипоксией» (2012 – 2013, участник проекта); Грант РФФИ №13-04-98049 «Адаптивный феномен, вызванный хронической нормобарической гипоксией. Рецепторный механизм и сигнальные пути его реализации» (2013-2015, руководитель проекта); Грант РФФИ №15-54-53003 ГФЕН «Роль опиоидных рецепторов и ассоциированных с ними сигнальных механизмов в позитивных и негативных эффектах адаптации к гипоксии» (2015-2016, участник проекта); Грант ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2013 годы» государственный контракт от «28» октября 2011 г. № 11.519.11.2028 «Разработка на основе опиоидных пептидов нового лекарственного средства, повышающего адаптивные возможности организма» (2011-2013, участник проекта); Грант ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009-2013 годы», соглашение на предоставление гранта от «14» ноября 2012 г. г. № 8827, «Разработка нового метода кардиопротекции с помощью гипоксического прекодиционирования» (2012-2013, участник проекта).

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 297 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы. Работа иллюстрирована 45 таблицами, 28 рисунками. Список литературы включает 595 источников (из них 75 отечественных и 520 зарубежных источников).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы. **В первой главе** проведен анализ отечественной и зарубежной научной литературы по теме исследования. В первом разделе представлены сведения о механизмах повреждения миокарда при ишемии и реперфузии, второй раздел посвящен кардиопротекторному действию опиоидов, в третьем разделе изложены современные данные о путях формирования адаптационных реакций миокарда. **Вторая глава** диссертации посвящена описанию материала и методов исследования. Работа выполнена на белых конвенциональных аутбредных крысах-самцах линии Вистар массой 250 – 320 г. Хроническую непрерывную нормобарическую гипоксию проводили путем непрерывного содержания крыс в специальной герметичной камере при 12% содержании O₂ в течение 21 дня. Парциальное давление O₂ и CO₂ внутри гипоксической камеры постоянно поддерживали системой «Био-нова-204G4R1» (НТО Био-Нова, Россия, г. Москва) и контролировали датчиками TCOD-IR и OLC 20 (Oldham, Франция) через блок управления MX32 (Oldham, Франция). Хроническую

прерывистую гипобарическую гипоксию (ХПГГ) проводили в медицинской барокамере «ОКА-МТ». Животных 5 раз в неделю помещали в барокамеру на 6 ч в течение 6 недель (всего 30 сеансов гипоксии). В течение первой недели давление в барокамере ступенчато снижали до 405 мм рт. ст. (54 кПа), что соответствовало высоте 5000 м над уровнем моря (далее «высота 5000 м»). В течение последующих 5 недель крыс тренировали при этом давлении [Meerson F.Z. et al., 1987].

По окончании хронической гипоксии оценивали стресс-реакцию по изменению массы тимуса, надпочечников, селезенки, числу язв слизистой оболочки желудка и уровню кортикостерона в сыворотке крови животных (иммуноферментным методом набором «Corticosterone (Human, Rat, Mouse) ELISA» RE52211 (IBL International GmbH, Германия) на микропланшетном ридере «Infinite 200 PRO» (Tecan GmbH, Австрия), а так же содержание гемоглобина и эритроцитов периферической крови.

Кардиопротекторный эффект хронической гипоксии исследовали на моделях: 1) острой коронароокклюзии-реперфузии *in vivo*, оценку повреждения миокарда проводили по размеру инфаркта, в сыворотке крови и ткани миокарда животных после коронароокклюзии-реперфузии исследовали содержание опиоидных пептидов и стабильных метаболитов NO; 2) тотальной ишемии и реперфузии изолированного-перфузируемого сердца крысы, оценку повреждения миокарда проводили по изменению сократительной активности миокарда, выходу в перфузионный раствор маркера повреждения креатинфосфокиназы; определяли содержание АТФ; выделяли митохондрии для измерения скорости их дыхания, трансмембранного потенциала и устойчивости mPTP к открытию; 3) аноксии-реоксигенации изолированных кардиомиоцитов, оценку их повреждения проводили по выживаемости клеток и выходу в инкубационный раствор маркера повреждения лактатдегидрогеназы. Антиаритмический эффект при адаптирующих воздействиях оценивали на модели острой коронароокклюзии-реперфузии *in vivo*, при тотальной ишемии-реперфузии изолированного сердца *in vitro* или при введении адреналина.

Об участии исследуемых субтипов опиоидных рецепторов в реализации кардиопротекторного или антиаритмического действия адаптирующих воздействий судили по выраженности этих эффектов в условиях блокады ОР, а так же по содержанию опиоидов в плазме крови и миокарде крыс. О роли киназ и K_{ATP} -каналов в кардиопротекторном эффекте ХННГ судили по выраженности этого эффекта в условиях ингибирования соответствующих киназ и K_{ATP} -каналов. О роли симпатической нервной системы в реализации антиаритмического действия хронической прерывистой гипобарической гипоксии судили по проявлению антиаритмического эффекта ХПГГ при моделировании адреналиновых аритмий и содержанию катехоламинов в адренергических волокнах миокарда и надпочечников.

Коронароокклюзию *in vivo* моделировали накладыванием лигатуры на левую коронарную артерию в ее верхней трети у наркотизированных пентабарбиталом крыс в условиях искусственной вентиляции легких. Ишемию проводили по двум схемам: кратковременная (10 мин) ишемия с последующей 10 минутной реперфузией и длительная (20 мин ишемия) с последующей 3 часовой реперфузией. ЭКГ регистрировали во II стандартном отведении усилителем биопотенциалов MP35 компании Biopac System Inc., (Goleta, США). При анализе ЭКГ подсчитывали частоту

встречаемости в экспериментальных группах желудочковых экстрасистол, желудочковой тахикардии и фибрилляции желудочков. Зону риска выявляли окрашиванием насыщенным раствором перманганата калия через канюлированную аорту, зону некроза окрашивали на поперечных срезах миокарда 1% 2,3,5-трифенилтетразолием (37°C, 30 минут). Срезы сканировали, размер зоны некроза и зоны риска определяли планиметрически с помощью пакета специальных программ. Размер инфаркта определяли как соотношение зона некроза/ зона риска в процентах.

Моделирование тотальной ишемии и реперфузии изолированного сердца крысы проводили путем прекращения подачи перфузионного раствора (раствор Кребса-Хензелейта, в ммоль/л: NaCl – 120; KCl – 4,8; CaCl₂ – 2,0; MgSO₄ – 1,2; KН₂PO₄ – 1,2; NaHCO₃ – 20; глюкоза – 10, рН 7,5, при температуре 37±0,5°C, насыщенный 95% O₂ и 5% CO₂) на 45 минут с последующей 30-минутной реперфузией. Силу сокращения и конечное диастолическое давление регистрировали в изоволюмическом режиме с помощью датчика давления SS13L (Biopac System Inc., Goleta, Калифорния, США), сопряженного с латексным баллончиком, помещенным в полость левого желудочка. Запись сократимости сердца производили с помощью аппарата для электрофизиологических исследований MP35 (Biopac System Inc., Goleta, США) с пакетом программ для обработки данных. Для регистрации ЭКГ электроды располагали на правом предсердии и левом желудочке сердца. Степень повреждения кардиомиоцитов оценивали по активности креатинфосфокиназы (КФК) в оттекающем от сердца перфузате. Активность КФК определяли с помощью коммерческих энзиматических наборов фирмы "Bioson СК-Nac" «Analiticon Biotechnologies» (Lichtenfels, Германия). Значение активности КФК выражали в ед/г миокарда.

Выделение изолированных кардиомиоцитов из сердца крысы проводили перфузией миокарда раствором коллагеназы в буфере Тироде (в ммоль): 140 NaCl, 5.4 KCl, 1 Na₂HPO₄, 1 MgCl₂·6H₂O, 10 глюкоза, 5 HEPES, 1,6 г/л БСА, коллагеназа тип II 335 U/мл (Worthington) и протеаза XIV 0,230 г/л (Sigma). Для моделирования аноксии кардиомиоциты инкубировали в течение 20 минут в модифицированном буфере Кребса (аноксическом буфере), содержащем (в ммоль): 118 NaCl, 25 NaHCO₃, 4.7 KCl, 1.2 MgSO₄, 1.2 KН₂PO₄, 5 2-дезоксиглюкозы, рН 7,4. Для предотвращения доступа кислорода на поверхность суспензии наслаивали 5-6 капель минерального масла. Реоксигенацию кардиомиоцитов осуществляли в бескальциевом буфере Тироде в течение 30 минут. Выживаемость клеток определяли микроскопически по включению трипанового синего. В инкубационной среде проводили определение активности лактатдегидрогеназы на спектрофотометре INFINITE 200M (Текан, Австрия) с применением наборов Fluitest LDH-L (Analytical biotechnologies AG, Германия). Оценку образования активных форм кислорода изолированными кардиомиоцитами проводили флуоресцентным методом по свечению селективного АФК-чувствительного внутриклеточного зонда 2',7'-дихлорфлуоресцеина диацетата (30 нМ) при длинах волн λ_{ex}=500 нм; λ_{em}=530 нм на планшетном спектрофлуориметре INFINITE 200M (Текан, Австрия). Валидацию метода проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss Surgical GmbH, Германия)

Моделирование адреналиновых аритмий выполняли внутривенным введением раствора адреналина в дозе 80 мкг/кг. На протяжении 5 минут после инъекции у

животных, находящихся под легким эфирным наркозом, регистрировали ЭКГ во II стандартном отведении (как описано ранее).

Исследование содержания опиоидных пептидов: мет-энкефалина, бета-эндорфина, эндоморфина-1 и эндоморфина-2 проводили спектрофотометрическим методом иммуноферментными наборами фирмы Бахем (Bachem, Peninsula Laboratories, LLC, San Carlos, CA, USA) на иммуноферментном автоматическом анализаторе АИФ-Ц-01С (Санкт-Петербург, Россия) при длине волны 450 нм. Экстракцию опиоидных пептидов из крови и ткани миокарда проводили на селективных колонках SEP-COLUMN, содержащих сорбент С18, фирмы Бахем (Bachem, Peninsula Laboratories, LLC, San Carlos, CA, USA).

Исследование содержания нитритов и нитратов в крови и ткани миокарда крыс проводили после окончания периода острой коронароокклюзии *in vivo*, через 5 минут после снятия лигатуры с коронарной артерии. Сыворотку крови и гомогенаты миокарда депротенизировали центрифугированием в пробирках Amicon Ultra-10 (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) в течение 30 мин при 14000g, +4°C. Суммарное содержание нитратов и нитритов проводили набором фирмы Sigma (St. Louis, USA) 23479-1КТ-F на спектрофотометре INFINITE-200М (Текан, Австрия) при 540 нм.

Исследование содержания АТФ в ткани миокарда проводили с помощью биолюминесцентного анализа наборами фирмы Sigma, США (FL-AA) на биолюминометре Lucy-2 (Anthos labtec instruments, Salzburg, Austria). Экстракцию АТФ проводили охлажденной 3% трихлоруксусной кислотой.

Выделение митохондрий из ткани миокарда проводили методом дифференциального центрифугирования при +2°C - +4°C. Фрагменты миокарда массой 0,5–1 г гомогенизировали в растворе, содержащем 70 мМ сахарозы, 210 мМ манитола, 1 мМ ЭГТА, 5 мг/мл БСА V фракции, 10 мМ HEPES, pH 7,4, центрифугировали при 200g 3 минуты, затем при 700g 4 минуты. Митохондрии осаждали центрифугированием при 12000g в течение 10 мин. Осадок, содержащий митохондрии, промывали буфером, содержащим 70 мМ сахарозы, 210 мМ манитола, 0,1 мМ ЭГТА, 10 мМ HEPES, pH 7,4 и осаждали центрифугированием при 12000g 10 мин. Концентрацию белка определяли методом Бредфорда. Оценку параметров дыхания митохондрий проводили по поглощению ими кислорода в герметичной термостатируемой камере при помощи Кларковского кислород-чувствительного электрода ДКТП-02.4 прибором pH-метр-иономер «Эксперт-001» (Москва, Россия) в насыщенном кислородом растворе, содержащим 200 мМ сахарозы, 10 мМ Trizma base, 5 мМ K_2HPO_4 , 10 мкМ ЭГТА, 2,5 мг/мл БСА V фракции, 0,5 мг/мл суспензии митохондрий, pH 7,4, 25°C, в присутствии/отсутствии 200 нМ АДФ. Измеряли скорость поглощения кислорода в присутствии НАД⁺-зависимых субстратов 3 мМ малата и 3 мМ пирувата или FAD-зависимое дыхание в присутствии 5 мМ сукцината, после добавления 200 нМ АДФ (состояние 3), а также после завершения синтеза АТФ (состояние 3). Эффективность дыхания вычислялась по соотношению количества добавленного АДФ (200 нМ) к поглощенному в течение состояния 3 кислороду (коэффициент АДФ/О). Измерение трансмембранного потенциала ($\Delta\psi$) митохондрий проводили с использованием флуоресцентного зонда этиловый эфир тетраметилродамина (TMRE, Molecular Probes) на спектрофлуориметре Shimadzu RF-5301-PC (Шимадзу, Япония) при длинах волн

$\lambda_{Ex}=550$ нм; $\lambda_{Em}=575$ нм соответственно в буфере, содержащем 200 мМ сахарозы, 10 мМ Tris-HCl, 5 мМ KH_2PO_4 , 10 мкМ ЭГТА, 3 мМ пируват, 3 мМ малат, pH 7,4, 25°C, 150 нМ/л TMRE. О величине трансмембранного потенциала митохондрий судили по падению интенсивности флуоресценции TMRE при добавлении 0,1 мкМ разобщающего агента FCCP. Состояние mPTP-поры оценивали по способности изолированных митохондрий накапливать и удерживать ионы Ca^{2+} при помощи флуоресцентного Ca^{2+} -чувствительного зонда Calcium Green-5N (Molecular Probes) при длинах волн $\lambda_{Ex}=506$ нм и $\lambda_{Em}=535$ нм на спектрофлуориметре Shimadzu RF-5301-PC (Шимадзу, Япония) в среде инкубации: 200 мМ сахарозы, 10 мМ Tris-HCl, 5 мМ KH_2PO_4 , 10 мкМ ЭГТА, 3 мМ пирувата, 3 мМ малата, Calcium Green-5N 100 мМ, 1 мг/мл митохондрий, pH 7,4, 25°C. Кальций-связывающую способность митохондрий вычисляли по максимальному количеству аккумулированного митохондриями Ca^{2+} в пересчете на миллиграмм митохондриального белка.

Для гистохимического определения опиоидных пептидов на криостатные срезы переднего и заднего гипоталамуса наносили иммунную кроличью антисыворотку к мет-энкефалину-Arg⁶-Phe⁷ или к динорфину В, срезы инкубировали во влажной камере в течение 1 суток при 4°C. Для второго этапа инкубации использовали козы антигена к иммуноглобулинам кролика, меченные изотиоцианатом флуоресцеина. Полуколичественную оценку уровня флуоресценции иммунореактивных мет-энкефалина-Arg⁶-Phe⁷ и динорфина в нервных волокнах и телах нейронов проводили цитофотометрически на микроскопе ЛЮМАМ-ИЗ ("ЛОМО", Санкт-Петербург, Россия).

При гистохимическом определении катехоламинов криостатные срезы левого желудочка сердца и надпочечников толщиной 15 или 25 мкм 10-минут инкубировали в 2% растворе глиоксиловой кислоты (pH 7,2-7,4). Для окончания гистохимической реакции срезы подсушивали и выдерживали 10 минут при температуре 85°C. После термической обработки готовые препараты заключали в нефлуоресцирующее вазелиновое масло и исследовали в люминесцентном микроскопе.

Для провокации выброса катехоламинов использовали однократное введение изадрина в дозе 40 мг/кг внутривенно за 24 часа до взятия материала.

Антагонисты опиоидных рецепторов в экспериментах *in vivo* вводили внутривенно за 25 минут до коронароокклюзии или введения адреналина в следующих дозах: антагонист всех типов опиоидных рецепторов налоксон в дозе 2 мг/кг; антагонист всех типов опиоидных рецепторов налтрексон в дозе 5 мг/кг; антагонист δ -опиоидных рецепторов TIPP(ψ) в дозе 0,5 мг/кг; антагонист δ -рецепторов ICI-174864 в дозе 2,5 мг/кг; селективный антагонист δ_1 -опиоидных рецепторов 7-бензилиденалнтретксон малеат (BNTX) в дозе 0,7 мг/кг; селективный антагонист δ_2 -опиоидных рецепторов налтрибен в дозе 0,3 мг/кг; антагонист μ -опиоидных рецепторов СТАР в дозе 0,5 мг/кг; антагонист к-ОР норбиналторфимина гидрохлорид в дозе 9 мг/кг за 90 минут до ишемического воздействия. Антагонисты опиоидных рецепторов в экспериментах *in vitro* добавляли в перфузионный раствор изолированного сердца или инкубационную среду изолированных кардиомиоцитов в следующих концентрациях: антагонист всех типов опиоидных рецепторов налоксон в концентрации 300 нМ/л; антагонист δ -опиоидных рецепторов TIPP(ψ) в концентрации

30 нМ/л; селективный антагонист δ_1 -опиоидных рецепторов BNTX в концентрации 1 нМ/л; селективный антагонист δ_2 -опиоидных рецепторов налтрибен в концентрации 1 нМ/л; антагонист μ -опиоидных рецепторов СТАР в концентрации 100 нМ/л, антагонист κ -опиоидных рецепторов норбинаторфимин в концентрации 3 нМ/л.

Ингибиторы киназ в экспериментах *in vivo* вводили внутривенно за 25 минут до коронароокклюзии (кроме указанных отдельно) в следующих дозах: ингибитор протеинкиназы С хелеритрина хлорид в дозе 5 мг/кг; селективный ингибитор NO-синтазы L-NAME в дозе 10 мг/кг; ингибитор индуцибельной NO-синтазы S-метилтиомочевин сульфат в дозе 3 мг/кг за 30 мин до ишемии; ингибитор нейрональной NO-синтазы 7-нитронидазол в дозе 50 мг/кг за 5 мин до начала ишемии; ингибитор тирозинкиназы генистеин в дозе 5 мг/кг 45 мин до моделирования ишемии; ингибитор PI3 киназы вортманнин в дозе 0,015 мг/кг; ингибиторы нейтральной эндопептидазы (энкефалиназы) ацеторфан или RB 101 в дозе 10 мг/кг; блокатор АТФ-чувствительных K^+ -каналов глибенкламид в дозе 0,3 мг/кг за 10 минут до коронароокклюзии; блокатор митохондриальных K^+ АТФ-каналов 5-гидроксидеканоат в дозе 5 мг/кг за 10 минут до коронароокклюзии. Ингибиторы киназ в экспериментах *in vitro* добавляли в инкубационную среду изолированных кардиомиоцитов за 25 минут до начала аноксии в следующих концентрациях: ингибитор протеинкиназы С хелеритрина хлорид в концентрации 5 μ М/л; ингибитор ПКС- δ роттлерин в концентрации 1 мкМ/л, ингибитор PI3-киназы вортманнин в концентрации 100 нМ/л; ингибитор тирозинкиназы генистеин в концентрации 50 мкМ/л.

Статистический анализ данных проводили с помощью программы STATISTICA 6.0. Результаты всех экспериментов приведены в таблицах в виде $M \pm SEM$, где M – среднее, SEM – ошибка среднего, n – объем анализируемой подгруппы, p – достигнутый уровень значимости. Гипотезу о равенстве средних для величин, соответствующих нормальному распределению, проверяли при помощи t-критерия Стьюдента. При сравнении полученных цифровых данных, распределение которых не соответствует нормальному, для выявления межгрупповых различий использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Проверку распределения величин проводили с помощью критерия Пирсона. Статистическую обработку качественных признаков (частота возникновения аритмий) проводили с помощью χ -критерия Пирсона (χ^2). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Третья глава диссертации содержит результаты исследования и их обсуждение.

Исследование роли опиоидных рецепторов в механизме кардиопротекторного действия хронической нормобарической гипоксии

Обнаружено, что содержание мет-энкефалина в плазме крови интактных крыс составляет 528,08 пг/мл, содержание бета-эндорфина было равным 995,33 пг/мл, концентрация эндоморфина-1 и эндоморфина-2 была соответственно 4,87 и 11,43 пг/мл (на рис.1 эти данные приняты за 100%). В ткани миокарда опиоидные пептиды были выявлены в следующих концентрациях: мет-энкефалин 10,52 пг/мг ткани, бета-эндорфин 0,59 пг/мг, эндоморфин-1 - 0,0049 пг/мг, эндоморфин-2 – 0,022 пг/мг (на рис.1 эти данные приняты за 100%).

Экспериментальная коронароокклюзия и последующая реперфузия привели к снижению содержания опиоидных пептидов в плазме крови и ткани миокарда.

В плазме крови у крыс после коронароокклюзии-реперфузии концентрация мет-энкефалина уменьшилась на 18%, уровень бета-эндорфина снизился на 23%, а содержание эндоморфина-2 - на 40% по сравнению с интактными животными; концентрация эндоморфина-1 значимо не изменилась (Рис.1). В ткани миокарда при ишемии-реперфузии содержание мет-энкефалина снизилось в 6,5 раз, бета-эндорфина в 3,2 раза по отношению к интактным крысам; в содержании эндоморфинов достоверных изменений не произошло (Рис.1).

Было установлено, что хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия способствует повышению содержания мет-энкефалина в плазме крови и ткани миокарда в 1,3 и 2 раза соответственно. Количество эндоморфина-1 в плазме крови крыс после ХННГ оказалось выше, чем у интактных особей в 1,5 раза, в ткани миокарда – в 11 раз (Рис. 1). Повышение содержания эндоморфина-2 в плазме крови крыс под действием ХННГ составило 34%, а в ткани миокарда количество этого пептида превысило уровень интактных крыс в 12 раз. ХННГ на содержание бета-эндорфина не повлияла.

Коронароокклюзия и реперфузия, проводимые у крыс после курса ХННГ, привели к возрастанию концентрации мет-энкефалина в плазме крови по отношению к этому показателю у интактных крыс на 70%, а по сравнению с группой животных, которым моделировали коронароокклюзию без предварительного курса ХННГ – в 2 раза (Рис.1). По отношению к крысам, подвергнутым курсу ХННГ без последующей коронароокклюзии увеличение уровня мет-энкефалина в плазме крови составило 28%. В ткани сердца крыс, подвергнутых коронароокклюзии-реперфузии после воздействия ХННГ, содержание мет-энкефалина оказалось равным 18,55 пг/мг, что было в 1,8 раза выше, чем у интактных крыс и в 12 раз выше, чем в группе животных, которым коронароокклюзию моделировали без предварительного курса адаптации к гипоксии (Рис.1). При исследовании концентрации бета-эндорфина обнаружено, что в плазме крови у крыс, подвергнутых ХННГ и затем коронароокклюзии-реперфузии, этот показатель возрос на 40% по отношению к группе «коронароокклюзия-реперфузия», но статистически значимо не отличается от аналогичного показателя в группе «ХННГ» и интактных крыс. Содержание этого опиоидного пептида в миокарде крыс при моделировании коронароокклюзии-реперфузии оказалось в 5 раз выше у адаптированных крыс, чем у интактных особей (Рис. 1). Содержание эндоморфина-1 в плазме крови адаптированных к гипоксии крыс после коронароокклюзии-реперфузии было в 2 раза выше, чем в группе «ХННГ» и в 3 раза, чем в группе животных с моделированием коронароокклюзии-реперфузии без предварительной адаптации (Рис.1). Коронароокклюзия-реперфузия не вызвала дополнительного увеличения содержания этого пептида в ткани миокарда крыс, подвергнутых ХННГ, этот показатель оставался выше, чем у интактных крыс в 7,7 раз.

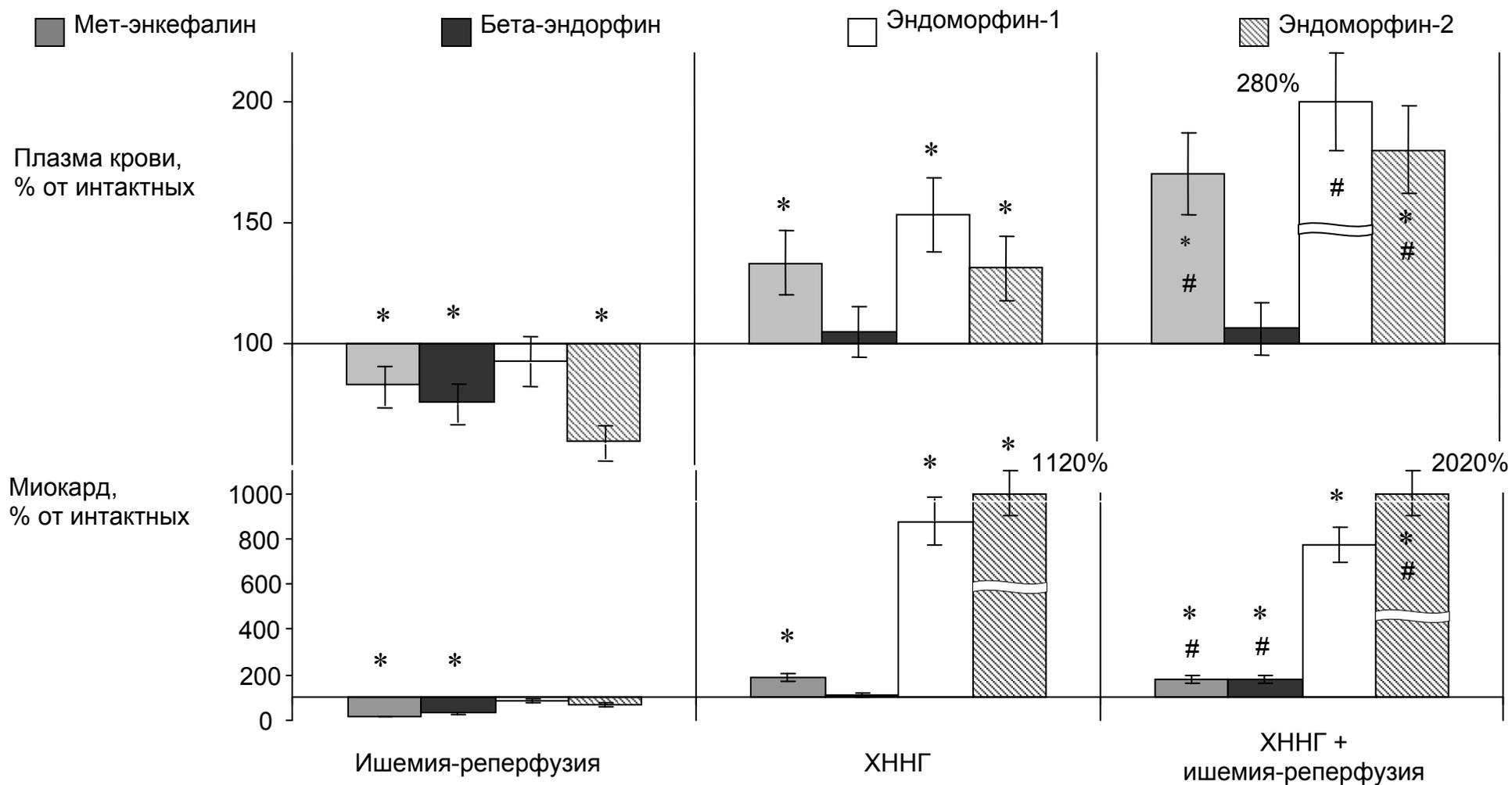


Рисунок 1 - Влияние адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии на содержание опиоидных пептидов в плазме крови и ткани миокарда крыс ($M \pm SEM$)

* - $p < 0,01$ по отношению к интактным, # – $p < 0,01$ к группе «ХННГ», t-критерий Стьюдента.

Исследование уровня эндоморфина-2 в плазме крови крыс после курса ХННГ и коронароокклюзии показало возрастание концентрации этого опиоидного пептида на 37% относительно группы «ХННГ», при этом его содержание оказалось на 80% выше по сравнению с интактными крысами и в 3 раза по отношению к группе крыс, перенесших коронароокклюзию-реперфузию (Рис. 1). В ткани миокарда у крыс коронароокклюзия после курса ХННГ привела к еще более выраженным изменениям содержания эндоморфина-2 (Рис. 1).

Полученные данные свидетельствуют об увеличении содержания эндогенных опиоидных пептидов в крови и ткани миокарда крыс после ХННГ, при этом коронароокклюзия-реперфузия вызывает еще большее возрастание содержания опиоидов в крови и тканях адаптированных к гипоксии крыс.

Исследования показали, что зона ишемического некроза миокарда у крыс, подвергнутых хронической непрерывной гипоксии, составила 20% от зоны риска, что достоверно ($p < 0,01$) отличалось от соответствующего показателя контрольной группы (57%) (Табл. 1). Эти результаты свидетельствуют о том, что хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия оказывает выраженный инфаркт-лимитирующий эффект.

Введение антагонистов опиоидных рецепторов интактным животным не оказывало влияния на размер инфаркта при последующей коронароокклюзии и реперфузии. Блокада ОР неселективным антагонистом налтрексоном у крыс, подвергнутых ХННГ, приводила к увеличению индекса зона некроза/зона риска (ЗН/ЗР) с 20% до 53%, что оказалось идентично показателю контрольной группы (Табл. 1). Следовательно, при блокаде ОР всех типов инфаркт-лимитирующий эффект хронической непрерывной нормобарической гипоксии не проявляется. Как видно из таблицы 1, блокада δ -ОР селективным антагонистом TIPP(ψ) приводила к увеличению соотношения ЗН/ЗР более чем на 30% по отношению к таковым показателям группы «ХННГ» (Табл. 1). В результате соотношение ЗН/ЗР оказалась равной этому показателю в контрольной группе. На фоне блокады δ_1 -ОР селективным антагонистом BNTX размер зоны некроза относительно показаний животных, подвергнутых ХННГ, не изменялся, то есть защитный эффект хронической непрерывной нормобарической гипоксии сохранялся (Табл. 1). В то же время «выключение» δ_2 -ОР селективным антагонистом налтрибеном приводило к увеличению соотношения ЗН/ЗР с 20% у животных с ХННГ до 54% в группе «ХННГ» + налтрибен (Табл. 1). Полученные данные свидетельствуют о том, что в реализации кардиопротекторного эффекта хронической нормобарической гипоксии важную роль играют δ_2 -, но не δ_1 -ОР. Ингибирование μ -ОР селективным антагонистом СТАР приводило к увеличению соотношения ЗН/ЗР на 28%, что указывает на устранение кардиопротекторного эффекта ХННГ (Табл. 1).

Предварительное введение антагониста к-ОР норбиналторфимина не изменяло соотношение ЗН/ЗР у «гипоксических» особей (Табл. 1). Следовательно, к-ОР не принимают участия в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта хронической непрерывной нормобарической гипоксии. Проведенные исследования показали, что при внутривенном введении антагонистов δ_2 - и μ -опиоидных рецепторов животным, подвергнутым ХННГ, инфаркт лимитирующий эффект этого адаптирующего воздействия не проявляется.

Таблица 1 – Влияние блокады опиоидных рецепторов на размер зоны некроза при 20-минутной коронароокклюзии и 180-минутной реперфузии у крыс после курса ХННГ (M±SEM)

Группа	n	ЗН/ЗР, %
Контроль	15	57 ± 3
ХННГ	18	20 ± 1,8 p<0,01
ХННГ + налтрексон 5 мг/кг	12	53 ± 6 p1<0,01
ХННГ + Т1РР (ψ) 0,5мг/кг	13	56 ± 4 p1<0,01
ХННГ + налтрибен 0,3 мг/кг	11	54 ± 4,2 p1<0,01
ХННГ + ВNTX 0,7 мг/кг	11	14 ± 3,1 p<0,01
ХННГ + СТАР 0,1 мг/кг	12	49 ± 9,4 p1<0,01
ХННГ + норбинаторфимин 9 мг/кг	12	19 ± 3,7 p<0,01

p – уровень достоверности относительно группы контроля; p1– уровень достоверности относительно группы адаптированных крыс, U-критерий Манна-Уитни.

При моделировании тотальной ишемии-реперфузии изолированного сердца крыс, предварительно подвергнутых ХННГ, выброс КФК составил 19,77 ед/г, что было в 2,2 раза меньше, чем в аналогичной ситуации у неадаптированных крыс (Табл. 2). Эти данные свидетельствуют об уменьшении повреждения миокарда при ишемии-реперфузии у крыс после ХННГ. Для выявления участия опиоидных рецепторов миокарда в кардиопротекторном действии ХННГ перед моделированием тотальной ишемии–реперфузии изолированного сердца крысы миокард перфузировали раствором одного из селективных антагонистов опиоидных рецепторов. В том случае, если миокард, выделенный у животных, предварительно подвергнутых ХННГ, перед моделированием ишемии-реперфузии перфузировали раствором налоксона (антагонист всех типов ОР), активность КФК в оттекающем от миокарда перфузионном растворе оказалось равным 39,78±5,29 ед/г (Табл. 2). Эта величина была вдвое выше, чем в группе «ХННГ» и не отличалась от неадаптированного контроля (Табл. 2). Результаты этих экспериментов свидетельствуют о том, что кардиопротекторный эффект адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии не проявляется при блокаде опиоидных рецепторов, что может говорить об их важной роли в реализации кардиопротекторного эффекта ХННГ. Перфузия миокарда крыс, подвергнутых ХННГ, селективным антагонистом δ–опиоидных рецепторов Т1РР(ψ) перед ишемией приводила к увеличению выхода КФК в перфузионный раствор по отношению к группе «ХННГ», что говорит об увеличении ишемического повреждения миокарда. Следовательно, в присутствии антагониста δ–ОР кардиопротекторный эффект ХННГ на данной модели ишемического–реперфузионного повреждения миокарда не проявляется. Предварительная перфузия сердец крыс, подвергнутых ХННГ, раствором, содержащим антагонист δ₂–ОР налтрибен, приводила к возрастанию выброса КФК из кардиомиоцитов в перфузионный раствор изолированного сердца по отношению к контрольным сердцам группы «ХННГ». Блокада δ₁–ОР препаратом ВNTX не оказала влияния на этот показатель (Табл. 2). Эти данные позволяют говорить о том, что при блокаде δ₂–ОР кардиопротекторный эффект ХННГ при ишемии–реперфузии изолированного сердца не проявляется.

Таблица 2 – Активность креатинфосфокиназы в перфузионном растворе, оттекающем от изолированного миокарда крыс, при моделировании тотальной ишемии-реперфузии, ед/г (M±SEM) ¹

Группа животных	Интактные крысы	ХННГ
Исходные значения	10,90±0,93	8,95±1,24
Ишемия – реперфузия	45,38±5,35, p=0,00002	19,77±1,45, p<0,001 p1<0,001
Налоксон +ишемия-реперфузия	43,78±3,17, p=0,0004	39,78 ± 5,29 p2<0,001
TiPP (ψ) + ишемия-реперфузия	49,7 ± 3,67, p=0,0001	51,43 ± 3,06, p2<0,01
BNTX + ишемия-реперфузия	47,19 ± 5,58, p = 0,002	18,81 ± 1,99, p2>0,05
Налтрибен + ишемия-реперфузия	43,12 ± 4,84 p = 0,00037	46,53 ± 3,7 p2<0,001

p – достоверность различий по отношению к исходным значениям, p1 – по отношению к ишемии-реперфузии у неадаптированных крыс, p2 – к группе «ХННГ+ишемия-реперфузия», U-критерий Манна-Уитни.

Тотальная ишемия изолированного сердца во всех экспериментах приводила к полной остановке сокращений миокарда. Во время реперфузии наблюдалось частичное восстановление силы сокращения миокарда (Рис. 2). Постишемическое восстановление сократимости миокарда крыс, подвергнутых ХННГ, оказалось в 2,5 раза выше, чем у неадаптированных крыс (Рис. 2).

Предварительная перфузия миокарда адаптированных крыс налоксоном приводила к двукратному снижению сократительной активности миокарда по отношению к группе «ХННГ» без препарата (Рис. 2). Таким образом, восстановление силы сокращения в этой экспериментальной группе оказалось статистически не различимым с группой интактного контроля (Рис. 2). Перфузия изолированного сердца крыс группы «ХННГ» раствором антагониста δ–опиоидных рецепторов TiPP(ψ) приводила к снижению силы сокращений изолированного сердца при реперфузии до показателей контрольной группы, не подвергнутой ХННГ (Рис. 2). Блокада δ₁–ОР путем перфузии миокарда крыс после ХННГ селективным антагонистом этого субтипа ОР BNTX не повлияла на силу сокращения миокарда во время реперфузии. Однако блокада δ₂–ОР налтрибеном привела к снижению силы сокращения изолированного сердца в два раза по отношению к этому показателю группы «ХННГ» (p<0,05) (Рис. 2). Приведенные данные свидетельствуют о том, что наблюдаемый при реперфузии миокарда положительный инотропный эффект ХННГ не обнаруживается в условиях блокады δ₂–ОР.

Исследование диастолической функции миокарда при реперфузии, следовавшей после тотальной ишемии, показало, что расслабление миокарда неадаптированных крыс в этом случае нарушено, конечное диастолическое давление (КДД) превышало исходный уровень в 4,5 раза (Рис. 2).

¹ Исследование выполнено совместно с Е.С.Прокудиной

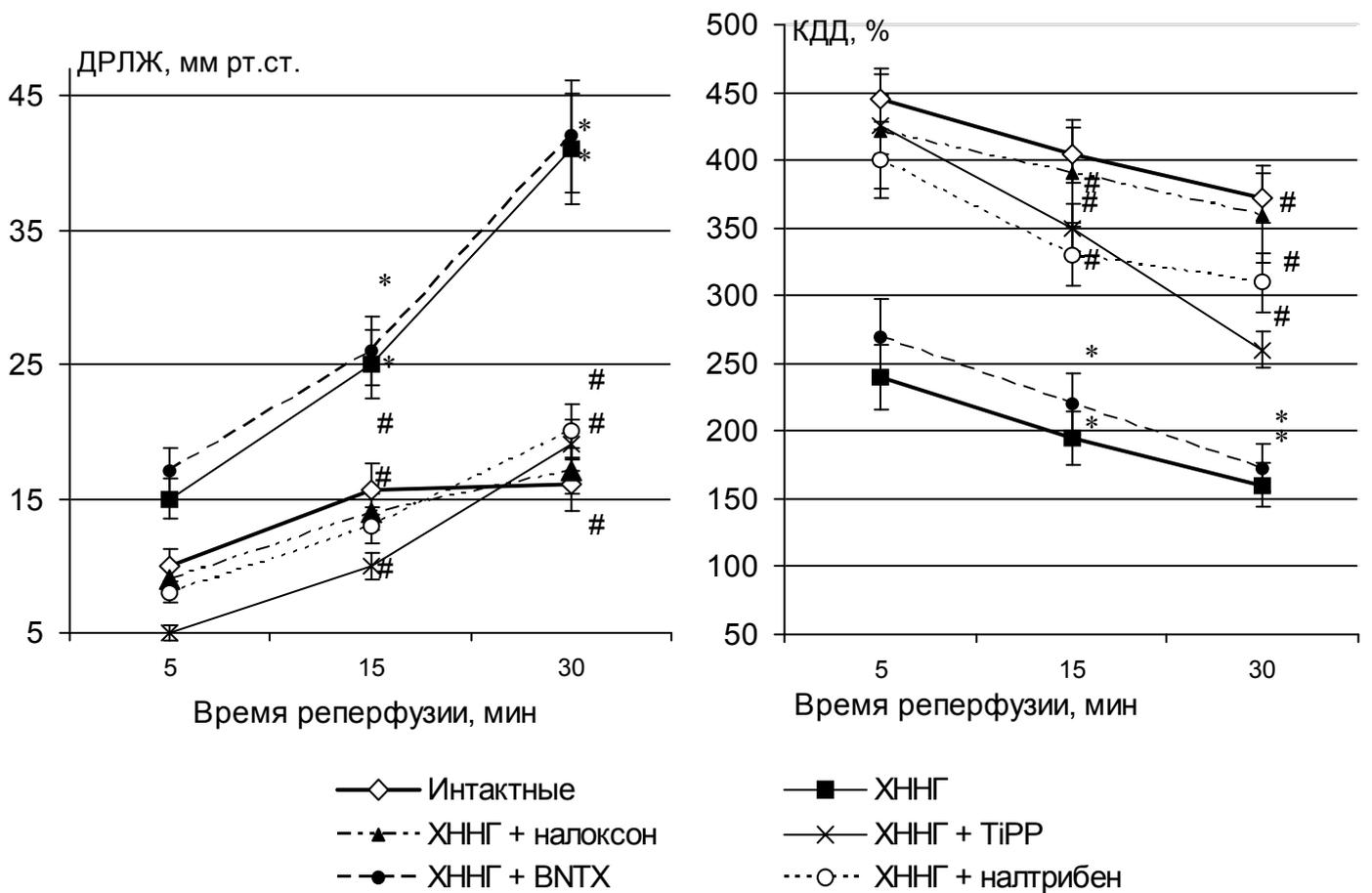


Рисунок 2 – Сила сокращения (ДРЛЖ) и конечное диастолическое давление (КДД) левого желудочка изолированного сердца крысы при реперфузии после 45-минутной ишемии (M±SEM)

* - $p < 0,01$ по отношению к интактным, # – $p < 0,01$ к группе «ХННГ», U-критерий Манна-Уитни.

Хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия способствовала снижению КДД при постишемической реперфузии сердца (Рис. 2). Следовательно, мы можем говорить о значительном улучшении расслабления миокарда при реперфузии изолированного сердца крыс, адаптированных к ХННГ. Предварительная перфузия сердца раствором, содержащим налоксон, полностью предупреждала улучшение расслабления миокарда, обусловленное ХННГ (Рис. 2). Перфузия миокарда раствором, содержащим селективный антагонист δ -ОР TiPP(ψ) или селективный антагонист δ_2 -ОР налтрибен приводила к тому же результату. Блокада δ_1 -ОР препаратом BNTX не изменяла конечное диастолическое давление при реперфузии миокарда крыс, адаптированных к ХННГ (Рис. 2). Следовательно, мы можем сделать вывод о том, что улучшение диастолической функции миокарда во время реперфузии, наблюдаемое при ХННГ, связано с δ_2 -ОР. Следует отметить, что предварительная перфузия сердец раствором, содержащим антагонисты ОР, не оказала значимого влияния на исходные параметры сократимости миокарда и постишемическое восстановление силы сокращения миокарда в группе интактных животных. Приведенные данные показывают значительное снижение повреждения и многократное улучшение

сократительной функции миокарда при тотальной ишемии и реперфузии у крыс, подвергнутых адаптации к ХННГ. Дельта-2 опиоидные рецепторы миокарда опосредуют влияние ХННГ на сократительную функцию и сердца и ее кардиопротекторный эффект при ишемии-реперфузии и кардиопротекцию.

В исследовании, проведенном на изолированных кардиомиоцитах, 20-минутная аноксия и последующая 30-минутная реоксигенация приводила к гибели 23% исходно жизнеспособных клеток. При аноксии-реоксигенации кардиомиоцитов крыс, подвергнутых ХННГ, погибшими оказались 2,5% клеток (Рис. 3). Выброс лактатдегидрогеназы кардиомиоцитами интактных крыс при аноксии составил 175% относительно нормоксии. 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% ($p < 0,05$). 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. Добавление антагонистов опиоидных рецепторов в среду инкубации кардиомиоцитов интактных 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» (Рис. 3). При аноксии статистически значимого влияния налоксона на выброс ЛДГ из кардиомиоцитов не наблюдалось. Однако при реоксигенации выброс ЛДГ из клеток этой экспериментальной группы был достоверно выше, чем в группе клеток «ХННГ» с незаблокированными опиоидными рецепторами ($p = 0,012268$). 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. 3). Блокада μ -опиоидных рецепторов, так же как в случае с налоксоном, не приводила к изменению выброса ЛДГ во время аноксии. Реперфузионный выброс ЛДГ в группе крыс, адаптированных к хронической гипоксии, под влиянием СТАР возрастал на 40% и оказался сопоставимым со значениями неадаптированных животных. Добавление в инкубационный буфер кардиомиоцитов крыс группы «ХННГ» селективного δ -антагониста $\text{TiPP}(\psi)$ или селективного δ_2 -антагониста налтрибена приводило к увеличению процента погибших клеток и выбросу лактатдегидрогеназы после окончания реоксигенации по сравнению с клетками группы «ХННГ», подвергнутыми аноксии-реоксигенации без антагонистов ОР (Рис. 3). выживаемость кардиомиоцитов и содержание ЛДГ при аноксии и реоксигенации у адаптированных к гипоксии крыс (Рис. 3).

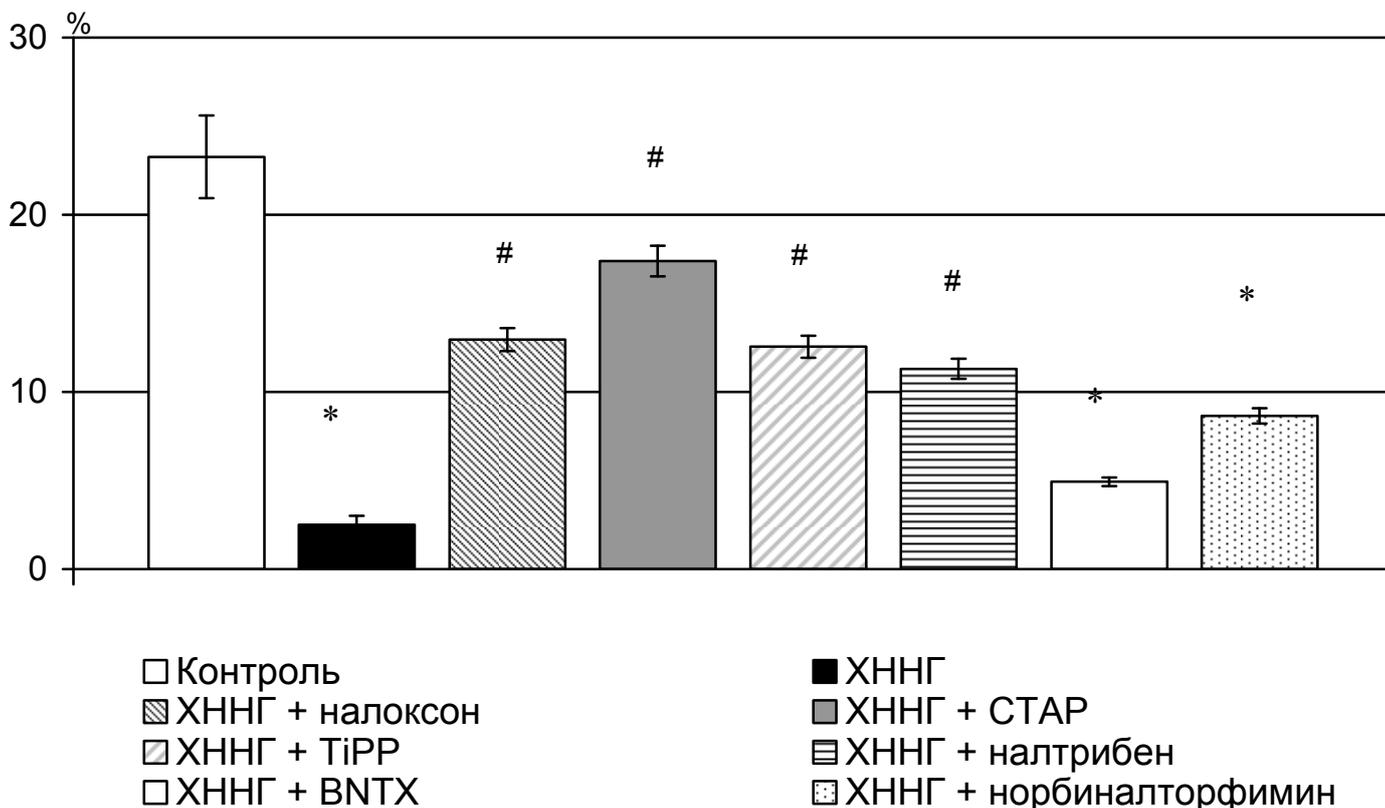


Рисунок 3 – Гибель кардиомиоцитов при аноксии– реоксигенации ($M \pm SEM$)

* $p < 0,05$ – относительно контрольных клеток интактных крыс; # – $p < 0,05$ – относительно контрольных клеток крыс после ХННГ, U-критерий Манна-Уитни.

На содержание ЛДГ в инкубационном буфере, взятом после аноксии, эти антагонисты ОР не повлияли. Вместе с тем селективная блокада δ_1 -ОР препаратом BNTX не изменяла выживаемость кардиомиоцитов и содержание ЛДГ при аноксии и реоксигенации у адаптированных к гипоксии крыс (Рис. 3).

Исследование образования активных форм кислорода выявило, что аноксия и следующая за ней реоксигенация приводит к двукратному возрастанию свечения 2',7'-дихлорфлуоресцеина (ДХФ) в изолированных кардиомиоцитах по отношению к клеткам, не подвергнутым аноксии (данные не представлены в таблице). В клетках, выделенных из миокарда крыс после ХННГ, свечение ДХФ в ответ на аноксию-реоксигенацию возрастало лишь в 1,5 раза, что было ниже, чем в группе неадаптированных крыс ($p < 0,05$). Эти данные свидетельствуют о том, что ХННГ способствует снижению степени окислительного стресса в кардиомиоцитах. Блокада ОР не повлияла на образование активных форм кислорода в кардиомиоцитах крыс, подвергнутых ХННГ.

Проведенные исследования показали, что инфаркт-лимитирующий, кардиопротекторный, цитопротекторный эффекты, наблюдаемые после курса хронической непрерывной нормобарической гипоксии, а так же влияние этого адаптирующего воздействия на сократительную активность миокарда зависят от активации опиоидных рецепторов. В этот процесс оказываются вовлеченными опиоидные рецепторы μ - и δ_2 -субтипов. Антиоксидантный эффект ХННГ не зависит от активации опиоидных рецепторов.

Изучение роли сопряженных с опиоидными рецепторами сигнальных систем в реализации кардиопротекторного эффекта хронической нормобарической гипоксии

Как было сказано ранее, ХННГ способствует сокращению размера инфаркта при коронароокклюзии-реперфузии. Введение ингибиторов тирозинкиназ генистеина и лавендустина неадаптированным животным не повлияло на размер инфаркта при моделировании коронароокклюзии и реперфузии. Предварительное введение ингибитора всего пула тирозинкиназ крысам, прошедшим курс ХННГ, привело к тому, что размер зоны некроза оказался на 70% больше, чем в группе «ХННГ» с незаблокированными тирозинкиназами (Рис. 4). При введении ингибитора Src/EGFR-тирозинкиназ лавендустина изменения размера зоны некроза у крыс, подвергнутых хронической непрерывной нормобарической гипоксии, обнаружено не было (Рис. 4). Эти результаты свидетельствуют об участии нерцепторных тирозинкиназ в реализации инфаркт-лимитирующего действия ХННГ.

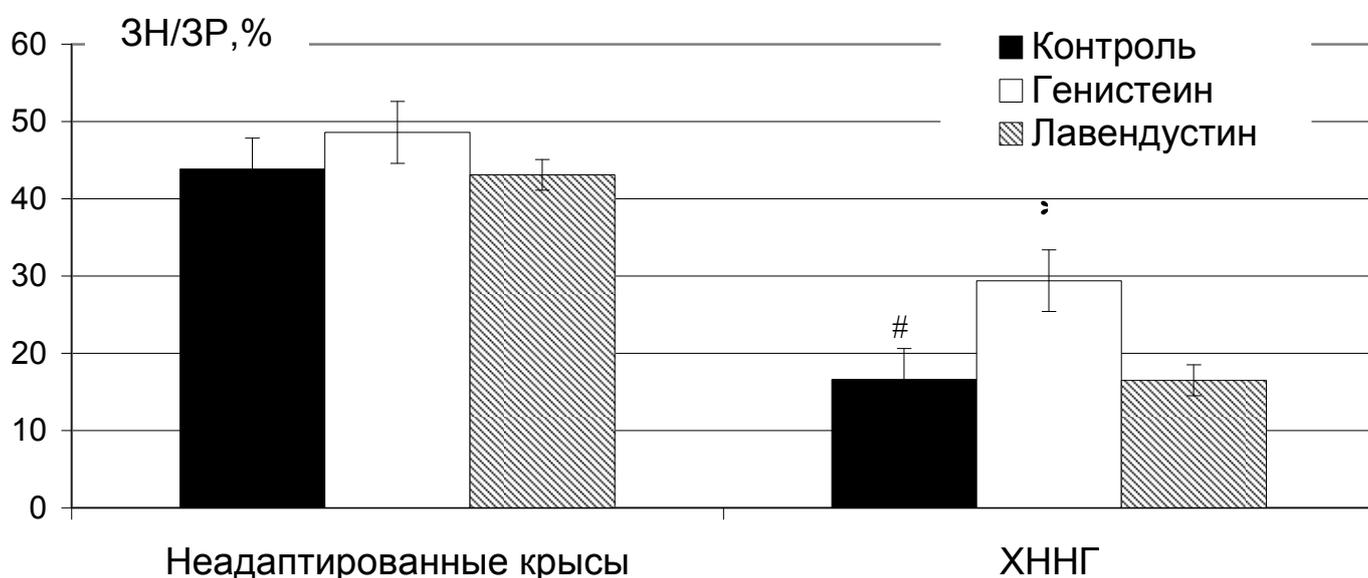


Рисунок 4 – Влияние блокады тирозинкиназ на размер зоны некроза при коронароокклюзии-реперфузии у крыс после ХННГ (М ± SEM)

- $p < 0,01$ - относительно неадаптированных крыс, * - $p < 0,01$ относительно группы «ХННГ», U-критерий Манна-Уитни.

Инкубация изолированных кардиомиоцитов крыс группы «ХННГ» с генистеином приводила к увеличению гибели клеток при аноксии–реоксигенации до $19,0 \pm 2,5\%$ (Табл. 3). При этом выживаемость кардиомиоцитов интактных крыс под влиянием генистеина достоверно не изменялась. 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% (Табл. 3). 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 (Табл. 3). Эти данные свидетельствуют о важной роли тирозинкиназ в защитном эффекте ХННГ.

Таблица 3 – Гибель клеток и выброс лактатдегидрогеназы изолированными кардиомиоцитами крыс при аноксии–реоксигенации в присутствии ингибитора тирозинкиназ ($M \pm SEM$)

Группа животных	Выброс ЛДГ, %		Гибель кардиомиоцитов, %
	Аноксия	Реоксигенация	
Интактные, n=8	199,5 ± 13,12	217,71 ± 12,96	17,23 ± 2,50
ХННГ, n=10	168,88 ± 6,46 p1<0,05	189,59 ± 13,30 p1<0,05	6,76 ± 0,92 p1<0,05
Генистеин, n=6, 5 мкМ/л	185,46 ± 13,73	225,57 ± 18,57	14,4 ± 2,98
ХННГ + генистеин, n=6, 5 мкМ/л	209,1 ± 19,55 p2<0,05	251,9 ± 12,76 p2<0,01	19,0 ± 2,55 p2<0,001

p1 – достоверность относительно неадаптированных крыс; p2 – относительно группы «ХННГ», U-критерий Манна-Уитни.

При введении ингибитора Р13-киназы вортманнина мы не обнаружили какого-либо влияния на размер зоны некроза у подвергнутых хронической непрерывной нормобарической гипоксии крыс (Табл. 4).

Инкубация изолированных кардиомиоцитов с ингибитором Р13-киназы вортманнином не приводила изменению количества погибших клеток при моделировании аноксии–реоксигенации, то есть не повлияла на выживаемость кардиомиоцитов как в группе интактных крыс, так и в группе «ХННГ» (Табл. 5). Кроме того, вортманнин не изменил содержание ЛДГ в среде инкубации клеток у крыс, адаптированных к ХННГ, ни при аноксии, ни при реоксигенации. На основании полученных данных мы можем сделать вывод о том, что Р13-киназа не участвует в реализации кардиопротекторного эффекта ХННГ.

Таблица 4 – Влияние блокады Р13-киназы на размер зоны некроза при коронароокклюзии-реперфузии у крыс после курса ХННГ ($M \pm SEM$)

Группа	n	ЗН/ЗР (%)
Контроль	14	43,84 ± 4,6
Вортманнин 0,015 мг/кг	12	46,4 ± 4,1
ХННГ	14	16,6 ± 2,3 p<0,01
ХННГ + вортманнин 0,015 мг/кг	12	22,2 ± 4 p<0,01

p – уровень достоверности относительно группы контроля, U-критерий Манна-Уитни.

Таблица 5 – Гибель клеток и выброс лактатдегидрогеназы изолированными кардиомиоцитами крыс при аноксии–реоксигенации в присутствии ингибитора P13-киназы вортманнина (M±SEM)

Группа животных	Выброс ЛДГ, %		Гибель кардиомиоцитов, %
	Аноксия	Реоксигенация	
Интактные, n=8	206,87 ± 13,54	217,71 ± 12,96	17,23 ± 2,50
ХННГ, n=10	171,43 ± 6,32 p1<0,05	189,59 ± 13,30 p1<0,05	6,76 ± 0,92 p1<0,05
Вортманнин, 100 нМ/л, n=8	226,79 ± 16,12 p1>0,05	233,88 ± 19,78	14,35 ± 2,9 p1>0,05
ХННГ + вортманнин, 100 нМ/л, n=10	193,99 ± 11,3 p2<0,05	204,57 ± 10,76	10,52 ± 1,91 p2>0,5

p1 – достоверность относительно неадаптированных крыс; p2 – относительно группы «ХННГ», U-критерий Манна-Уитни.

Введение ингибитора протеинкиназы С хелеритрина интактным животным не оказывало влияния на размер зоны некроза при коронароокклюзии–реперфузии. У крыс, подвергавшихся ХННГ, ингибирование протеинкиназы С хелеритрином приводило к увеличению зоны некроза с 17% в случае ХННГ до 55% в группе «ХННГ +хелеритрин» (Табл. 6).

Таблица 6 – Влияние блокады протеинкиназы С на размер зоны некроза при 20-минутной коронароокклюзии и 180-минутной реперфузии (M±SEM).

Группа	n	ЗН/ЗР (%)
Контроль	14	44 ± 4,6
Хелеритрин, 5 мг/кг	12	47 ± 5,1
ХННГ	14	17 ± 2,3 p<0,01
ХННГ + хелеритрин, 5 мг/кг	12	55 ± 6,1 p1<0,01

p – уровень достоверности относительно группы контроля; p1– уровень достоверности относительно группы адаптированных крыс, U-критерий Манна-Уитни.

После добавления хелеритрина в среду инкубации изолированных кардиомиоцитов перед моделированием аноксии, гибель клеток оказалась равной 13,97 ± 0,95, что было сопоставимо с показателем группы неадаптированных крыс (Табл. 7). Эти результаты подтверждаются данными о содержании лактатдегидрогеназы в инкубационном буфере (Табл. 7). Инкубирование кардиомиоцитов крыс группы «ХННГ» с хелеритрином приводило к повышению выброса ЛДГ до уровня интактных животных (Табл. 7). Инкубация кардиомиоцитов адаптированных крыс с ингибитором протеинкиназы С_δ роттлерином приводила к увеличению гибели клеток при последующей аноксии–реоксигенации с 6,76 ± 0,92% до 17,82 ± 2,22% (Табл. 7). 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 (Табл. 7). Следовательно, мы можем заключить, что блокада протеинкиназы С_δ устраняет

цитопротекторное действие адаптации к хронической нормобарической гипоксии. Полученные данные свидетельствуют о том, что протеинкиназа Сδ играет важную роль в кардиопротекторном действии ХННГ.

Таблица 7 – Гибель клеток и выброс лактатдегидрогеназы изолированными кардиомиоцитами крыс при аноксии–реоксигенации (M±SEM)

Группа животных	Выброс ЛДГ, % от нормоксического контроля		Гибель кардиомиоцитов, %
	Аноксия	Реоксигенация	
Интактные, n=8	215,72 ± 11,83	218,54 ± 17,74	16,5 ± 2,29
ХННГ, n=10	149,05 ± 2,45 p1<0,05	186,08 ± 11,56 p1<0,05	6,76 ± 0,92 p1<0,05
Хелеритрин, n=8	191,12 ± 15,64 p1>0,05	205,2 ± 19,31 p1>0,05	15,41 ± 3,5 p1<0,05
Хелеритрин + ХННГ, n=10	173,87 ± 21,48 p2>0,05	238,25 ± 19,32 p2=0,035	13,97 ± 0,95 p2<0,01
Ротглерин, n=8	211,25 ± 25,17 p1>0,05	224,3 ± 7,95 p1>0,05	12,17 ± 2,62 p1<0,05
ХННГ + ротглерин, n=10	168,83 ± 14,96 p2>0,05	220,51 ± 10,06 p2<0,05	17,82 ± 2,22 p2<0,05

p1 – относительно неадаптированных крыс; p2 – относительно группы «ХННГ», U-критерий Манна-Уитни.

Обнаружено, что курс хронической непрерывной нормобарической гипоксии способствует увеличению суммарного содержания нитратов и нитритов в сыворотке крови крыс в 1,5 раза по сравнению с интактными животными (Табл. 8). Возрастание количества нитратов и нитритов в ткани миокарда адаптированных крыс оказалось двукратным по сравнению с контрольными особями (Табл. 8). Эти результаты свидетельствуют о повышении выработки оксида азота в ткани миокарда и других органах крыс, подвергнутых хронической непрерывной нормобарической гипоксии.

При проведении коронароокклюзии и реперфузии исследование нитритов и нитратов проводили после окончания ишемии, через 5 мин после начала реперфузии. В этом случае количество нитратов и нитритов в сыворотке крови и миокарде крыс, подвергнутых ХННГ, оказалось, соответственно, в 1,65 и 2,1 раза более высоким, чем у неадаптированных крыс, подвергнутых ишемии-реперфузии (Табл. 8). Полученные данные говорят о том, что повышение активности NO-синтазы в организме адаптированных к ХННГ животных сохраняется и преумножается при воздействии на миокард ишемии.

Введение ингибитора всех изоформ NO-синтазы L-NAME животным, подвергнутым ХННГ, сопровождалось формированием большего ишемического некроза, чем в группе адаптированных крыс, не получавших препаратов (Рис. 5). Эти данные позволяют предположить участие NO-синтазы в формировании инфаркт-лимитирующего эффекта ХННГ (Рис. 5). Внутривенное введение селективного ингибитора индуцибельной формы NO-синтазы S-метилизотиомочевины крысам, адаптированным к ХННГ перед моделированием коронароокклюзии-реперфузии,

сопровождалось значительным (в 3 раза) увеличением размера зоны некроза по сравнению с группой «ХННГ» (Рис. 5).

Таблица 8 – Содержание нитратов и нитритов в крови и миокарде крыс после курса хронической непрерывной нормобарической гипоксии (M±SEM)

Группа животных	Без ишемии		После ишемии	
	Сыворотка крови, мкМ/л	Миокард, зона риска мкМ/мг	Сыворотка крови, мкМ/л	Миокард, зона риска мкМ/мг
Интактные, n= 12	3,75 ± 0,49	0,20±0,058	3,68±0,376	0,17±0,044
ХННГ, n=10	5,53 ± 0,65 p<0,05	0,43±0,068 p<0,05	6,10 ± 1,34 p<0,05	0,367±0,07 p<0,05

p – достоверность различий относительно неадаптированных крыс, t-тест Стьюдента.

Введение ингибитора нейрональной изоформы NO-синтазы - 7-нитронидазол – крысам, адаптированным к ХННГ, не устраняло инфаркт-лимитирующий эффект адаптации к гипоксии (Рис. 5). Ни один из использованных ингибиторов не повлиял на размер некроза миокарда при коронароокклюзии-реперфузии у неадаптированных животных (Рис. 5). Полученные результаты свидетельствуют о важной роли индуцибельного пула NO-синтазы в защитном эффекте адаптации к ХННГ. Нейрональная NO-синтаза, по-видимому, не участвует в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта ХННГ при коронароокклюзии и реперфузии.



Рисунок 5 – Влияние блокады NO-синтазы на размер зоны некроза при 20-минутной коронароокклюзии и 180-минутной реперфузии у крыс после курса хронической непрерывной нормобарической гипоксии (M ± SEM)

- p<0,01 - достоверность относительно группы неадаптированных крыс, * p<0,01- достоверность относительно ХННГ, U-критерий Манна-Уитни.

Введение блокатора митохондриальных и сарколеммальных K_{ATP} -каналов глибенкламида или блокатора митохондриальных K_{ATP} -каналов 5-гидроксидеканоата неадаптированным крысам не изменяло соотношение ЗН/ЗР при моделировании коронароокклюзии и реперфузии (Табл. 9). Если эти препараты вводились животным, подвергнутым ХННГ, индекс ЗН/ЗР оказывался больше, чем в группе «ХННГ» (Табл. 9). Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что инфаркт-лимитирующее действие ХННГ реализуется через активацию K_{ATP} -каналов.

Таблица 9 – Влияние блокады АТФ-зависимых K^+ -каналов на размер зоны некроза при 20-минутной коронароокклюзии и 180-минутной реперфузии у крыс после курса ХННГ ($M \pm SEM$).

Серия	n	ЗН/ ЗР, %
Контроль	20	$62 \pm 7,2$
ХННГ	20	$37 \pm 6,5$ $p < 0,05$
ХННГ + глибенкламид, 0,3 мг/кг	13	$58 \pm 4,5$ $p_1 < 0,05$
ХННГ + 5-гидроксидеканоат, 5 мг/кг	12	$56 \pm 5,7$ $p_1 < 0,05$

n – количество животных в группе; p – уровень достоверности относительно группы контроля; p_1 – уровень достоверности относительно группы адаптированных крыс, U- критерий Манна-Уитни.

Исследование влияния хронической непрерывной нормобарической гипоксии на **функциональное состояние митохондрий миокарда** крыс проводили после моделирования тотальной 45-минутной ишемии и 30-минутной реперфузии изолированного перфузируемого сердца².

Митохондрии, изолированные из миокарда, подвергшегося ишемии-реперфузии, демонстрировали значимо меньшую скорость АДФ-зависимого дыхания и поглощения кислорода при разобщении (Табл. 10). Этого не наблюдалось в случае, если ишемии-реперфузии подвергали сердца крыс, прошедших курс ХННГ (Табл. 10). Как показано в таблице 10, налоксон устранял ХННГ-индуцированное увеличение скорости дыхания митохондрий в состоянии 3. Перфузия миокарда интактных крыс раствором, содержащим налоксон, не повлияла на параметры дыхания митохондрий интактных крыс. По показателям абсолютной скорости сукцинат-зависимого дыхания достоверных различий между всеми тремя группами животных обнаружено не было. Наряду со снижением скорости дыхания, ишемия-реперфузия приводила к достоверному снижению коэффициента АДФ/О в митохондриях миокарда неадаптированных крыс в 1,5 раза, что говорит о разобщении процессов окисления и фосфорилирования (Табл. 10).

В группе крыс, прошедших курс ХННГ, мы не наблюдали достоверного снижения этого параметра в ответ на ишемию-реперфузию. Перфузия миокарда налоксоном перед моделированием тотальной ишемии-реперфузии приводила к тому, что эффективность дыхания митохондрий в группе «ХННГ» снизилась на 25% (Табл. 10).

² Исследование выполнено совместно с Е.С.Прокудиной

Таблица 10 – Влияние хронической непрерывной нормобарической гипоксии на скорость и эффективность дыхания митохондрий миокарда крыс после ишемии-реперфузии ($M \pm SEM$)

Группа животных	Скорость дыхания в присутствии АДФ, нМ(O ₂)/мг/мин	АДФ/О
Неадаптированные крысы		
Контроль	97 ± 8	1,8 ± 0,137
Налоксон	93 ± 8	1,62 ± 0,181
Хроническая нормобарическая гипоксия		
Контроль	148 ± 9, p1 < 0,01	2,35 ± 0,109, p1 < 0,05
Налоксон	101 ± 4, p2 < 0,01	1,77 ± 0,217, p2 < 0,05

p1 – по отношению к ишемии-реперфузии у неадаптированных крыс; p2 - по отношению к группе «ХННГ + ишемия-реперфузия», U-критерий Манна-Уитни.

Исследование трансмембранного потенциала ($\Delta\psi$) митохондрий показало значительное (в 2,5 раза) снижение этого показателя для митохондрий, выделенных из миокарда после ишемии-реперфузии (Рис. 6А). У крыс после курса хронической гипоксии величина трансмембранного потенциала ($\Delta\psi$) митохондрий при ишемии-реперфузии оставалась значимо выше и достоверно не отличалась от соответствующего показателя интактных крыс (Рис. 6А). Применение налоксона перед моделированием ишемии-реперфузии привело к снижению трансмембранного потенциала в 3 раза по сравнению с группой «ХННГ» (Рис. 6А). Выявленные изменения скорости дыхания и трансмембранного потенциала митохондрий миокарда крыс после курса ХННГ косвенно свидетельствуют об улучшении клеточного энергетического метаболизма.

Подтверждением этому служат и результаты исследования содержания АТФ в ткани миокарда. В результате наших исследований обнаружено, что содержание АТФ в ткани миокарда интактных крыс и животных, подвергнутых ХННГ, в условиях нормоксии не различалось (Рис. 6Б). В ответ на моделирование тотальной ишемии и реперфузии изолированного сердца содержание АТФ в миокарде неадаптированных крыс оказалось значимо сниженным (с $2,2 \pm 0,23$ нМ/г до $0,92 \pm 0,15$ нМ/г, $p=0,001$, Рис. 6Б). В ткани миокарда крыс, адаптированных к ХННГ, подобного снижения не происходило (Рис. 6Б). Следовательно, увеличение скорости митохондриального дыхания и трансмембранного потенциала может способствовать увеличению уровня АТФ в клетке. Если миокард крыс экспериментальной группы «ХННГ» перед моделированием ишемии перфузировали раствором налоксона, содержание АТФ в нем оказывалось сопоставимым с группой неадаптированных животных после ишемии-реперфузии (Рис. 6Б).

На основании полученных данных мы можем предполагать, что увеличение скорости митохондриального дыхания, трансмембранного потенциала и соответствующее этому увеличению содержания АТФ у крыс после ХННГ зависит от активации опиоидных рецепторов.

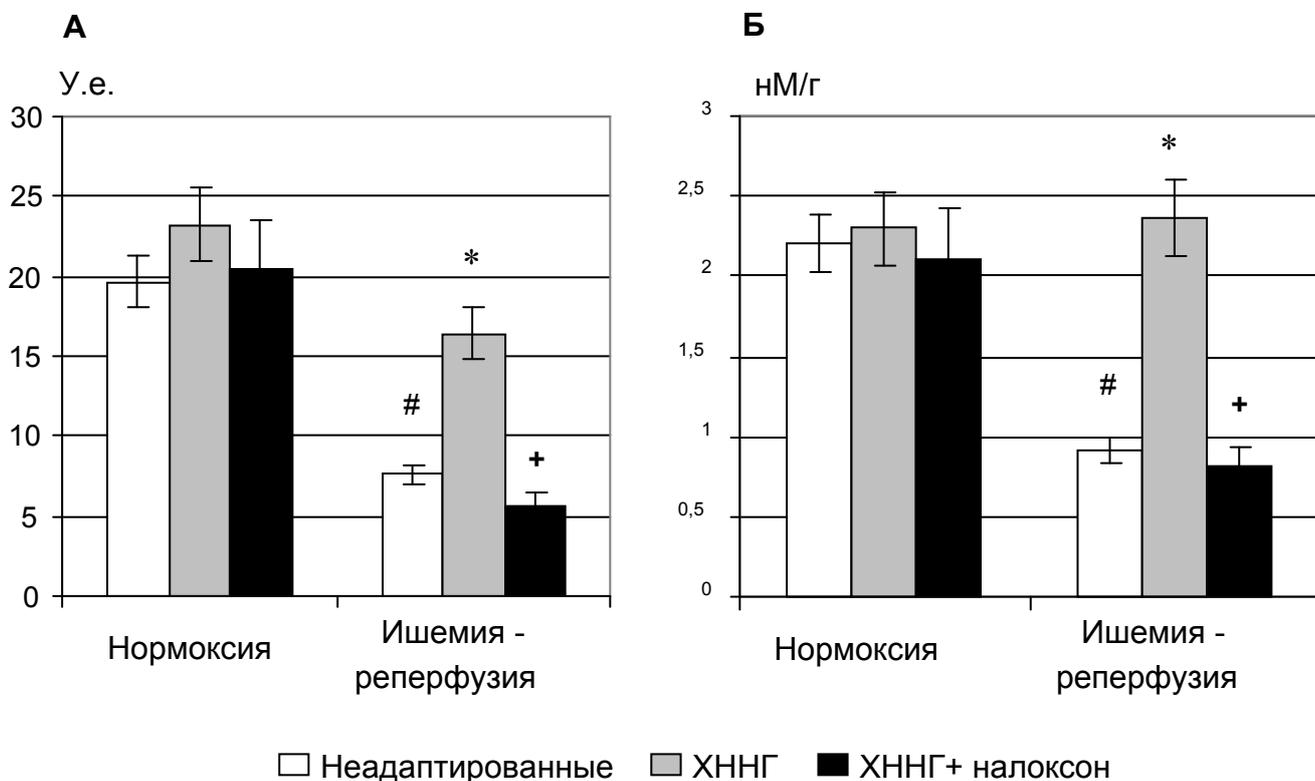


Рисунок 6 – Величина трансмембранного потенциала митохондрий (А) и содержание АТФ в ткани миокарда (Б) ($M \pm SEM$)

$p < 0,01$ по отношению к интактным; * $p < 0,025$ по отношению к ишемии-реперфузии у неадаптированных крыс; + $p < 0,025$ по отношению к группе «ХННГ + ишемия-реперфузия», U-критерий Манна-Уитни.

Как показали наши исследования (Рис. 7), открытие mPTP-пор митохондрий миокарда крысы после воздействия ишемии-реперфузии происходит под влиянием меньшего количества Ca^{2+} , чем у интактных крыс. Таким образом, Ca^{2+} -связывающая способность митохондрий после ишемии-реперфузии оказалась на 40% ($p < 0,01$) ниже таковой в митохондриях контрольных сердец (Рис. 7). Величина Ca^{2+} -связывающей способности митохондрий крыс, подвергнутых хронической нормобарической гипоксии, не снижалась при моделировании ишемии-реперфузии и оставалась достоверно не отличимой от этого показателя в группе нормоксического контроля. (Рис. 7). В группе «ХННГ + налоксон + ишемия-реперфузия» показатель устойчивости mPTP-пор митохондрий был статистически не отличим от группы «ишемия-реперфузия», то есть эффект адаптации к ХННГ не проявлялся (Рис. 7). Полученные результаты свидетельствуют о том, что увеличение чувствительности mPTP-поры к Ca^{2+} , наблюдаемое при ишемии-реперфузии, значительно менее выражено у крыс после адаптации к ХННГ. Этот эффект связан с активацией опиоидных рецепторов, поскольку не выявляется в присутствии их антагониста налоксона. Полученные данные позволяют говорить о том, что адаптация крыс к хронической непрерывной нормобарической гипоксии улучшает параметры дыхания митохондрий и этот эффект зависит от опиоидных рецепторов.

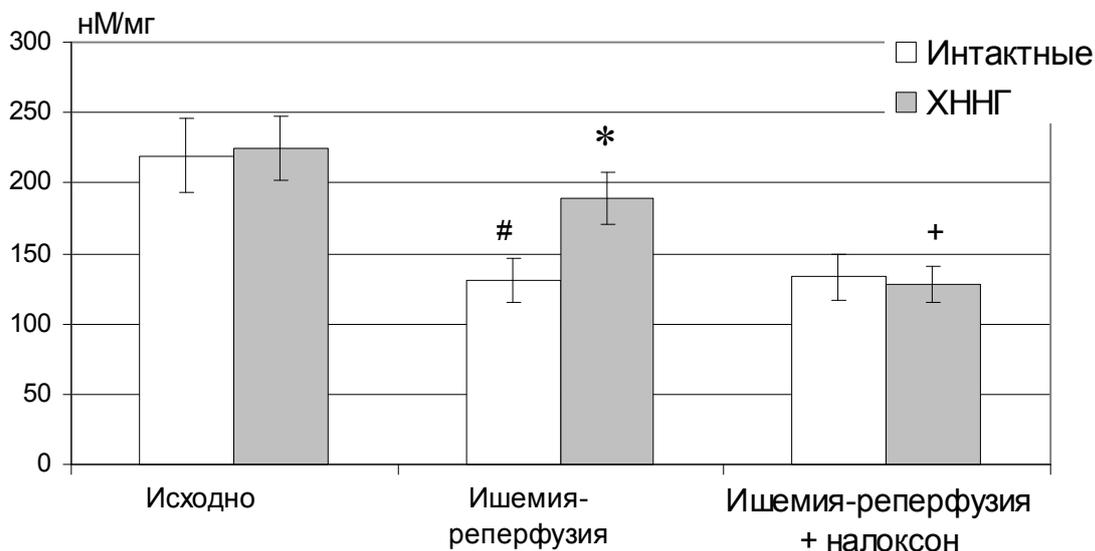


Рисунок 7 – Кальций-связывающая способность митохондрий ($M \pm SEM$)
 # $p < 0,01$ по отношению к интактным; * $p < 0,001$ по отношению к ишемии-реперфузии у неадаптированных крыс; + $p < 0,001$ по отношению к группе «ХННГ + ишемия-реперфузия», U-критерий Манна-Уитни.

Выбранная модель исследования позволила сопоставить параметры функционального состояния митохондрий и сократительную активность изолированного сердца крысы (Рис.8).

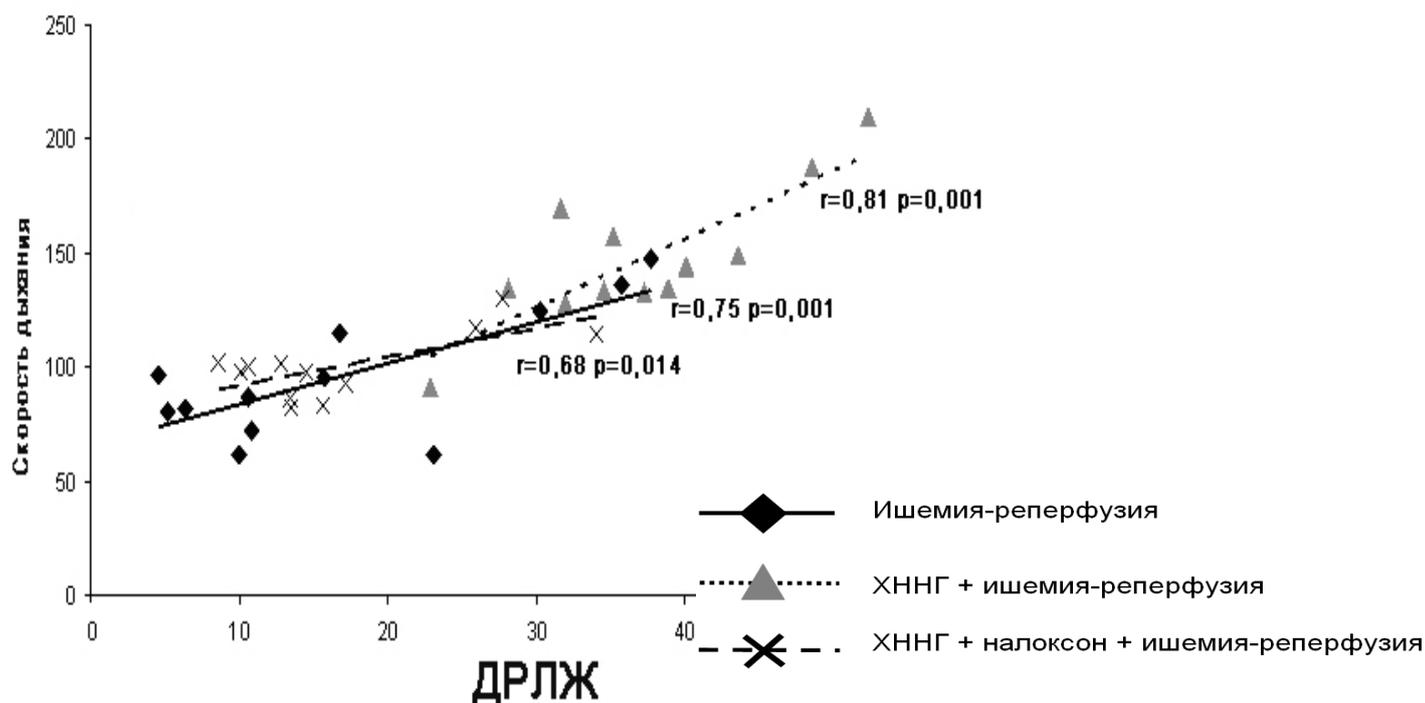


Рисунок 8 – Корреляционная зависимость скорости дыхания митохондрий и силы сокращения изолированного сердца крыс

Скорость митохондриального дыхания исследовали в присутствии малата, пирувата и 200 нМ АДФ, O_2 /мг/мин. Сила сокращения (ДРЛЖ) – мм рт. ст.

Результаты корреляционного анализа свидетельствуют о прямой зависимости скорости АДФ-индуцированного дыхания митохондрий в присутствии НАД⁺-зависимых субстратов (состояние 3) и силой сокращения изолированного сердца крысы в период реперфузии (Рис. 8). При этом корреляционная связь между этими двумя показателями сохранялась во всех экспериментальных группах (Рис. 8). Эти результаты свидетельствуют о взаимном влиянии силы сокращения миокарда и скорости дыхания митохондрий. Во всех экспериментальных группах мы наблюдали прямую корреляционную зависимость между давлением, развиваемым левым желудочком в период реперфузии и кальций-связывающей способностью митохондрий.

Резюмируя сказанное, мы можем предположить, что сигнальный механизм реализации кардиопротекторного действия ХННГ последовательно включает δ_2 -ОР и μ -ОР \rightarrow GPCR \rightarrow тирозинкиназы \rightarrow PKC δ \rightarrow NOS \rightarrow K_{АТФ}-каналы \rightarrow улучшение функционального состояния митохондрий \rightarrow mPTP-поры \rightarrow повышение толерантности миокарда к повреждающему действию ишемии-реперфузии (Рис. 9).

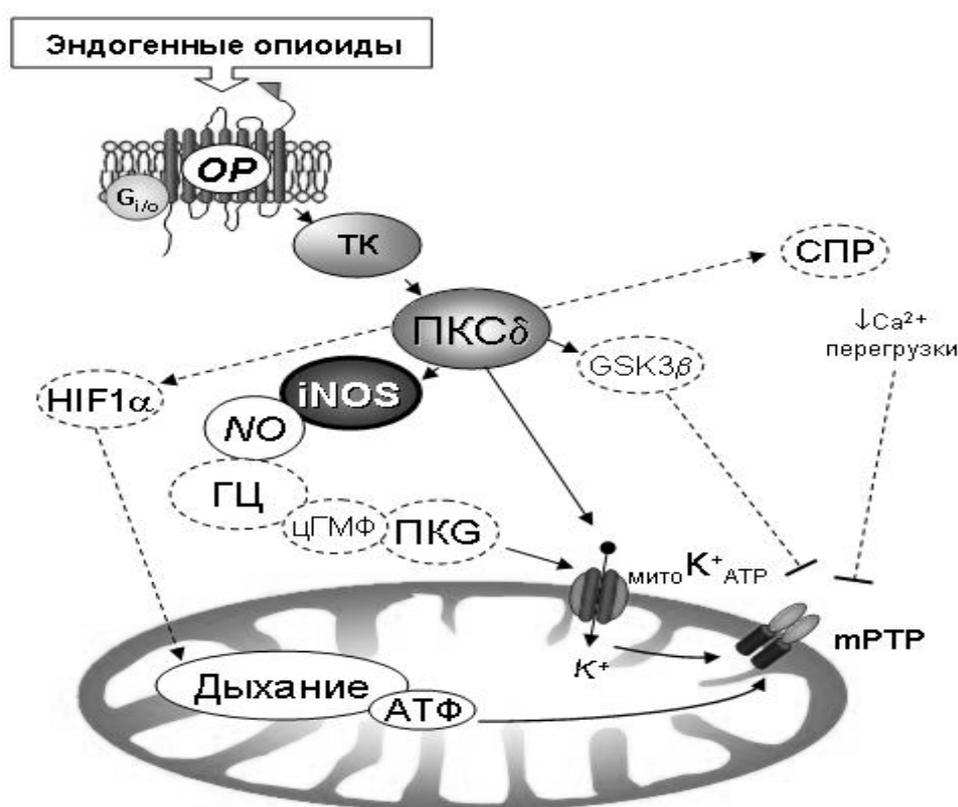


Рисунок 9 – Механизм кардиопротекторного действия хронической непрерывной нормобарической гипоксии

Примечания: **ОР** – опиоидные рецепторы; **ТК** – тирозинкиназы; **ПКС** – протеинкиназа С; **iNOS** – индуцибельная 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 гликоген-синтазы 3 β .

Сплошными линиями указаны обоснованные в работе механизмы; прерывистыми – предполагаемые, основанные на данных литературы.

Антиаритмический эффект хронической прерывистой гипобарической гипоксии и его механизмы

В структурах мозга крыс, подвергнутых хронической прерывистой гипобарической гипоксии (ХПГГ), гистохимическим методом определяли содержание предшественника мет-энкефалина мет-энкефалин-Arg₆-Phe₇ [Benuck M. et al., 1981] и эндогенного агониста к-ОР диноρφина В [Merg F. et al., 2006]. Было обнаружено, что адаптация к хронической гипобарической гипоксии сопровождается усилением флюоресценции материала, содержащего мет-энкефалин-Arg₆-Phe₇ в переднем и заднем гипоталамусе, по сравнению с интактными крысами (Рис. 10А). Статистически достоверных изменений содержания диноρφина В в структурах головного мозга у крыс, адаптированных к гипобарической гипоксии не наблюдали (Рис. 10Б).

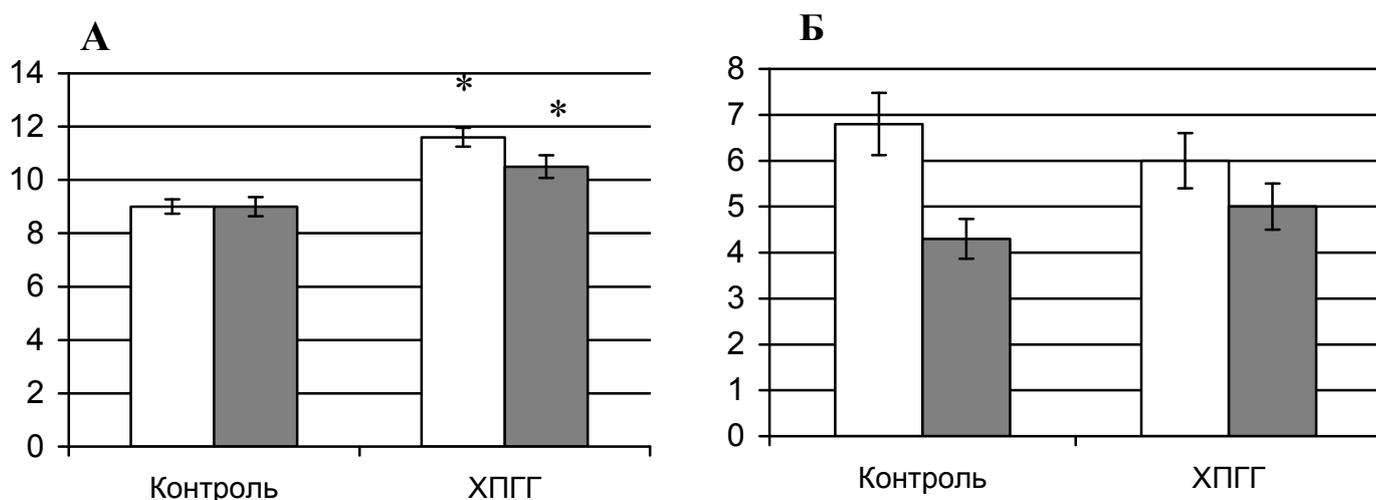


Рисунок 10 – Содержание мет-энкефалина-Arg⁶-Phe⁷ (А) и диноρφина В (Б) в структурах головного мозга у крыс, адаптированных к гипобарической гипоксии, усл. ед. (M±SEM).

□ - передний гипоталамус, ■ - задний гипоталамус, *p<0,05 - достоверность по отношению к контролю, U-критерий Манна-Уитни.

При моделировании 10-минутной коронароокклюзии *in vivo* у крыс контрольной группы в 81% наблюдений возникали нарушения сердечного ритма. При этом у 17 из 21 крысы (81%) отмечали множественные желудочковые аритмии, у 16 животных (76%) наблюдали желудочковую тахикардию и у 38% - фибрилляцию желудочков (Табл. 11). Восстановление коронарного кровообращения у контрольных крыс сопровождалось нарушениями ритма сердца, в 74% представленными множественными желудочковыми аритмиями и желудочковой тахикардией, у 26% крыс этой группы реперфузия провоцировала фибрилляцию желудочков (Табл. 11). Адаптация животных к прерывистой гипобарической гипоксии способствовала снижению частоты возникновения нарушений ритма сердца при последующей коронароокклюзии. Так, у 80% крыс этой группы не возникало нарушений ритма во время 10-минутной ишемии и более чем у 70% - во время реперфузии, в 10 раз сократилась частота появления ишемических тахикардий (Табл. 11). Во время

реперфузии частота встречаемости желудочковых тахикардий у адаптированных крыс была на 54% ниже по сравнению с контролем (Табл. 11). Следует отметить, что предварительная адаптация крыс к гипобарической гипоксии полностью предотвращала появление фибрилляции желудочков при ишемии и реперфузии. Блокада δ -опиоидных рецепторов с помощью инъекции ТИРР(ψ) крысам, адаптированным к гипоксии, способствовала достоверному увеличению частоты возникновения желудочковых экстрасистол во время ишемии в 3,6 раза, желудочковых тахикардий - в 7,5 раз по сравнению с адаптационным контролем (Табл. 11). Животные без нарушений ритма сердца в этой группе встречались в 3 раза реже, чем в группе адаптированных крыс с незаблокированными опиоидными рецепторами (Табл. 11).

После ингибирования δ -рецепторов у адаптированных особей мы наблюдали возрастание частоты возникновения реперфузионных нарушений ритма сердца (Табл. 11). Эти данные свидетельствуют об устранении антиаритмического эффекта адаптации к гипоксии при блокаде δ -опиоидных рецепторов. Предварительная блокада μ -ОР или κ -рецепторов у адаптированных крыс не изменяла процент животных с окклюзионными и реперфузионными нарушениями ритма сердца (Табл. 11).

Следует отметить, что введение неадаптированным особям антагонистов μ -, δ -, и κ -ОР не влияло на частоту появления окклюзионных и реперфузионных аритмий.

Таким образом, мы можем заключить, что адаптация к прерывистой гипобарической гипоксии повышает устойчивость миокарда к аритмиям при 10-минутной ишемии и последующей реперфузии. В формирование антиаритмического эффекта адаптации к прерывистой гипобарической гипоксии вовлечены δ -ОР, а μ -ОР и κ -ОР не участвуют в адаптационном увеличении электрической стабильности сердца.

После 45-минутной тотальной ишемии изолированных перфузируемых сердец крыс интактных животных мы наблюдали реперфузионные нарушения ритма у 6 (57%) из 14 крыс (Табл. 12). Желудочковая тахикардия возникала в 7 (50%), а фибрилляция – в 2 (14%) из 14 случаев. Среднегрупповой показатель тяжести нарушений ритма составил $1,79 \pm 0,45$ балла (Табл. 12). Нам не удалось выявить статистически значимых различий между группой контроля и адаптированными на «высоте» 5000 м крысами как по частоте встречаемости и тяжести реперфузионных аритмий, так и по выбросу КФК в перфузат изолированного сердца во время реоксигенации (Табл. 12). Хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия не повлияла на параметры сократительной активности миокарда как в исходном состоянии, так и при реперфузии.

Таким образом, проведенные нами исследования показали, что адаптация крыс к гипобарической гипоксии защищает миокард от возникновения нарушений ритма при экспериментальной ишемии и реперфузии, но этот эффект проявляется только в условиях моделирования ишемии-реперфузии *in vivo*.

Таблица 11 - Влияние блокады опиоидных рецепторов на частоту возникновения ишемических и реперфузионных аритмий у крыс, адаптированных к хронической прерывистой гипобарической гипоксии (M±SEM)

Группа	Ишемия									Реперфузия								
	N	БНР		МЖЭ		ЖТ		ЖФ		N	БНР		МЖЭ		ЖТ		ЖФ	
		n ³	%	n ⁴	%	n ⁴	%	n ⁴	%		n ³	%	n ⁴	%	n ⁴	%	n ⁴	%
Контроль	21	4	19%	17	81%	16	76%	8	38%	19	5	26%	14	74%	14	74%	5	26%
ХПГГ	15	12 **	80%	3 **	20%	1 **	7%	0 **	0	15	11 **	73%	4 **	27%	3 **	20%	0 *	0
ТИРР(ψ), 0,5 мг/кг	14	3	21%	10	71%	8	57%	0	0	14	2	14%	12	86%	10	71%	1	7%
ХПГГ + ТИРР(ψ), 0,5 мг/кг	15	4 ##	27%	11 ##	73%	8 ##	53%	0 **	0	15	5 #	33%	10 #	67%	8	53%	1	7%
СТАР, 0,5 мг/кг	14	2	14%	11	79%	8	57%	3	21%	14	2	14%	12	86%	10	71%	1	7%
ХПГГ + СТАР, 0,5 мг/кг	18	12 **	80%	3 **	20%	1 **	7%	0 **	0	18	8 **	44%	5 **	28%	5 **	28%	2	11%
Норбиналторфимин, 9 мг/кг	15	2	13%	13	87%	12	80%	3	20%	15	2	13%	13	87%	11	73%	3	20%
ХПГГ + норбиналторфимин, 9 мг/кг	15	12 **	80%	3 **	20%	2 **	13%	0 **	0	15	10	67%	4	27%	5	33%	2	13%

N – количество животных в группе; *-p<0,05; **-p<0,01 – уровень достоверности по отношению к контролю #, ## - то же по отношению к группе адаптированных крыс, критерий Пирсона χ^2 .

³ количество животных без нарушений ритма;

⁴ количество животных с нарушением ритма.

Таблица 12 - Влияние хронической прерывистой гипобарической гипоксии на частоту возникновения аритмий (%), тяжесть нарушений ритма и активность креатинфосфокиназы в перфузате изолированного сердца крысы при его тотальной ишемии-реперфузии (M±SEM)

Группа	БНР n ⁵ (%)	МЖЭ n ⁶ (%)	ЖТ n ⁶ (%)	ЖФ n ⁶ (%)	Тяжесть аритмий, баллы	КФК, ед/г
Контроль, N=14	6 43%	8 57%	7 50%	2 14%	1,79 ± 0,45	38,3 ± 3,11
ХПГГ N=14	7 50%	7 50%	4 28%	3 21%	1,5 ± 0,45	41,5 ± 5,96

N – количество животных в группе. Критерий Манна-Уитни и критерий Пирсона χ^2

Обнаружено, что подкожное введение изадрина в дозе 40 мг/кг за 24 часа до эвтаназии вызывает снижение содержания катехоламинов в хромоаффинных клетках мозгового вещества надпочечников на 25%, а плотность адренергических волокон в миокарде оказывается снижена под действием изадрина на 40% (Табл. 13). У животных, подвергнутых ХПГГ, снижения содержания КА в миокарде и надпочечниках мы не наблюдали (Табл. 13). Следовательно, мы можем говорить о том, что у крыс, адаптированных к ХПГГ, происходит снижение выброса КА в ответ на стимуляцию АР. В том случае, если крысам, адаптированным к ХПГГ, за 20 минут до изадрина внутривенно вводили антагонист ОР налоксон, содержание КА в хромоаффинных клетках мозгового вещества надпочечников и в миокарде оказывалось ниже, чем в группе «ХПГГ» и была сопоставима с показателями у неадаптированных крыс (Табл. 13). Полученные результаты позволяют нам предполагать, что ХПГГ препятствует выбросу КА из терминалей в миокарде и из надпочечников, а сам эффект опосредован через опиоидные рецепторы.

Таблица 13 – Влияние ХПГГ на гистохимические показатели содержания катехоламинов в надпочечниках и сердце крыс при введении изадрина (M±SEM)

Группы животных	Флуоресценция катехоламинов в надпочечниках, усл.ед.	Плотность адренергических волокон в миокарде, %
Интактные	6,0 ± 0,3	12,3 ± 0,7
Изадрин, 40 мг/кг	4,6 ± 0,2, p ₁ < 0,05	7,3 ± 0,3, p ₁ < 0,05
ХПГГ + изадрин	6,6 ± 0,3, p ₂ < 0,05	12,5 ± 0,2, p ₂ < 0,05
ХПГГ + налоксон + изадрин	4,5 ± 0,2, p ₃ < 0,01	7,2 ± 0,2, p ₃ < 0,01

p₁ – достоверность различий по отношению к группе интактных животных, p₂ – по отношению к группе животных с введением изадрина; p₃ – по отношению к группе ХПГГ, U-критерий Манна-Уитни.

⁵ количество животных без нарушений ритма;

⁶ количество животных с нарушением ритма.

Внутривенное введение адреналина (80 мкг/кг) вызывало нарушения ритма сердца у 72% животных контрольной группы (Табл. 14). В 72% случаев регистрировались множественные желудочковые экстрасистолы, у 32% крыс наблюдали желудочковую тахикардию, фибрилляция желудочков возникала в 28% наблюдений (Табл. 14).

Введение адреналина крысам, адаптированным к ХПГГ, приводило к возникновению нарушений ритма сердца в 13% случаев, в то время как у 87% крыс аритмий не наблюдалось. Желудочковая тахикардия возникла лишь у 1 крысы из 15, а фибрилляций желудочков в этой группе не было (Табл. 14). Эти данные свидетельствуют о том, что антиаритмический эффект ХПГГ воспроизводится на модели адреналиновых аритмий. При блокаде всех типов опиоидных рецепторов налоксоном введение адреналина вызывало нарушения ритма у 60% животных (Табл. 14). Предварительное введение селективного антагониста δ -ОР ICI-174864 крысам, адаптированным к ХПГГ, достоверно увеличивало частоту возникновения множественных желудочковых экстрасистол и желудочковых тахикардий при введении адреналина (Табл. 14). Блокада μ -ОР перед введением адреналина у животных, подвергнутых ХПГГ, приводило к возрастанию встречаемости МЖЭ до 93%, по отношению к 13% в группе ХПГГ без блокады ОР, однако частота возникновения желудочковой тахикардии и фибрилляции осталась такой же низкой, как в группе «ХПГГ» (Табл. 14).

Таблица 14 - Влияние антагонистов опиоидных рецепторов на частоту возникновения адреналин-индуцированных аритмий у крыс, адаптированных к ХПГГ (M \pm SEM)

Экспериментальные группы	N	БНР		МЖЭ		ЖТ		ЖФ	
		n ⁷	%	n ⁸	%	n ⁸	%	n ⁸	%
Контроль	25	7	28	18	72	8	32	7	28
ХПГГ	15	13	87 **	2	13 **	1	7 *	0	0 *
Налоксон, 2 мг/кг	17	4	24	11	65	10	59	6	35
ХПГГ + налоксон, 2 мг/кг	15	6	40 ##	9	60 ##	0	0	0	0
ICI-174864, 2,5 мг/кг	20	2	10	13	65	9	45	3	15
ХПГГ + ICI 174864, 2,5 г/кг	16	6	38 ##	10	62 ##	0	0	1	6
СТАР, 1 мг/кг	20	4	20	16	80	9	45	3	15
ХПГГ + СТАР, 1 мг/кг	15	1	7 ##	14	93 ##	0	0	2	13
Норбинаторфимин, 10 мг/кг	19	0	0	18	72	8	32	7	28
ХПГГ + норбинаторфимин, 10 мг/кг	15	1	7 ##	13	93 ##	3	21	6	43 #

N – количество животных в группе. *- p<0,05,**- p<0,01 по сравнению с контрольной группой; # - p<0,05; ##p<0,01, по сравнению с группой ХПГГ, критерий Пирсона χ^2 .

⁷ количество животных без нарушений ритма;

⁸ количество животных с нарушением ритма.

Блокада к-ОР у животных после ХПГГ приводила к увеличению встречаемости не только множественных экстрасистол (93% против 13% в группе ХПГГ), но и фибрилляции желудочков (до 43%) (Табл. 143).

Следовательно, мы можем полагать, что антиаритмический эффект ХПГГ на модели адреналиновых аритмий зависит от активации опиоидных рецепторов, при этом возможно участие всех трех типов ОР. Следует отметить, что ни один из антагонистов ОР не оказывал влияние на частоту встречаемости нарушений ритма у неадаптированных животных (Табл. 14). Полученные данные свидетельствуют о том, что антиаритмический эффект ХПГГ проявляется на модели адреналиновых аритмий и зависит от опиоидных рецепторов.

Таким образом, мы можем заключить, что адаптация к прерывистой гипобарической гипоксии повышает устойчивость миокарда к аритмогенному действию ишемии, реперфузии и адреналина. Обнаружено, что δ -ОР вовлечены в формирование антиаритмического эффекта адаптации к прерывистой гипобарической гипоксии, μ -ОР и к-ОР не участвуют в регуляции ритма сердца у крыс при ХПГГ.

Полученные результаты позволяют нам предполагать, что адаптация к ХПГГ препятствует выбросу КА из надпочечников и симпатических терминалей в миокарде и этот эффект опосредован через опиоидные рецепторы. Механизм антиаритмического действия ХПГГ представлен на рис. 11.

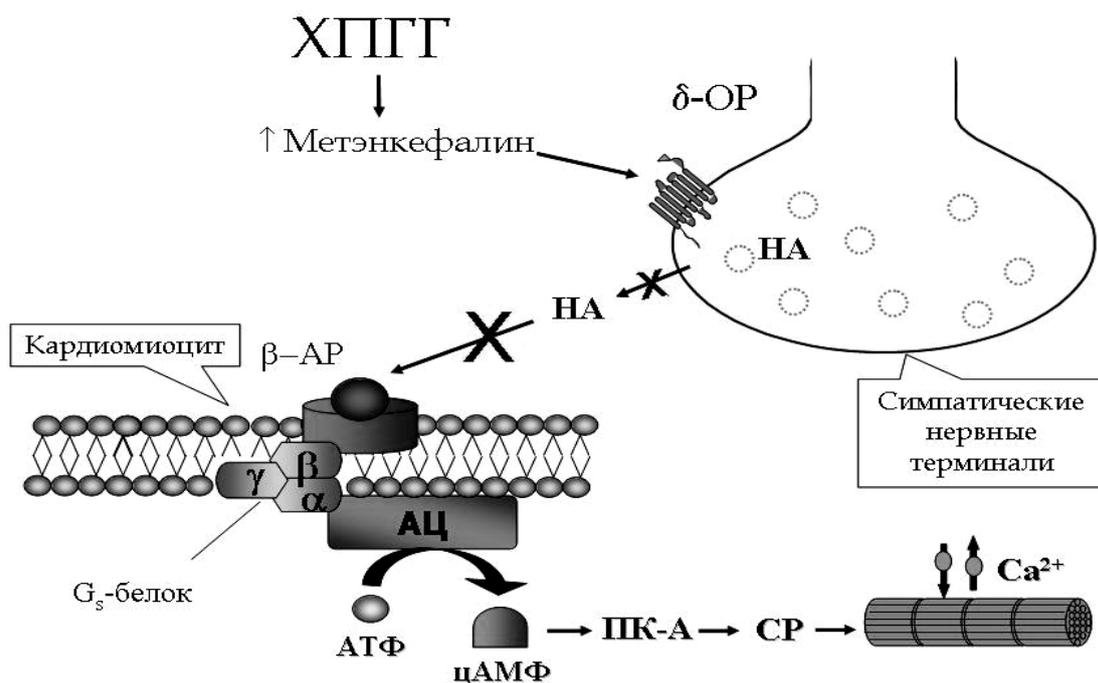


Рисунок 11 - Механизм антиаритмического действия хронической прерывистой гипобарической гипоксии

Примечания: ХПГГ – хроническая прерывистая гипобарическая гипоксия; ОР – опиоидные рецепторы; НА – норадреналин; АР – адренорецепторы; АЦ – аденилатциклаза; ПК-А – протеинкиназа А; СР – саркоплазматический ретикулум.

Изменение устойчивости миокарда к аритмогенному действию адреналина при введении ингибиторов энкефалиназ

Известно, что наибольший вклад в катаболизм энкефалинов вносит нейтральная эндопептидаза («энкефалиназа») (24.11) [Gupta A. et al., 2014]. В нашем исследовании обнаружено, что введение ингибитора нейтральной эндопептидазы ацеторфана снижает частоту возникновения адреналиновых аритмий с 80% в контрольной группе до 20% (Рис. 12). Сходные результаты были получены с использованием другого ингибитора энкефалиназы RB 101 (Рис. 12). Полученные результаты подтверждают возможность увеличения устойчивости миокарда к адреналиновым аритмиями путем введения энкефалиназ. Однако оставалось неясным, связано ли действие ингибиторов энкефалиназ с увеличением содержания эндогенных опиоидов и воздействием на ОР. Выяснить это мы смогли, проведя эксперименты с блокадой ОР.

На фоне блокады ОР налоксоном (2 мг/кг внутривенно) антиаритмический эффект ацеторфана не проявляется (Рис. 12). Блокада δ -ОР препаратом ICI 174864 перед введением ацеторфана так же приводила к возрастанию частоты нарушений ритма, вызванных адреналином (Рис. 12). Вместе с тем, блокада μ -ОР при помощи инъекции СТАР не повлияла на проявление антиаритмического действия ацеторфана.

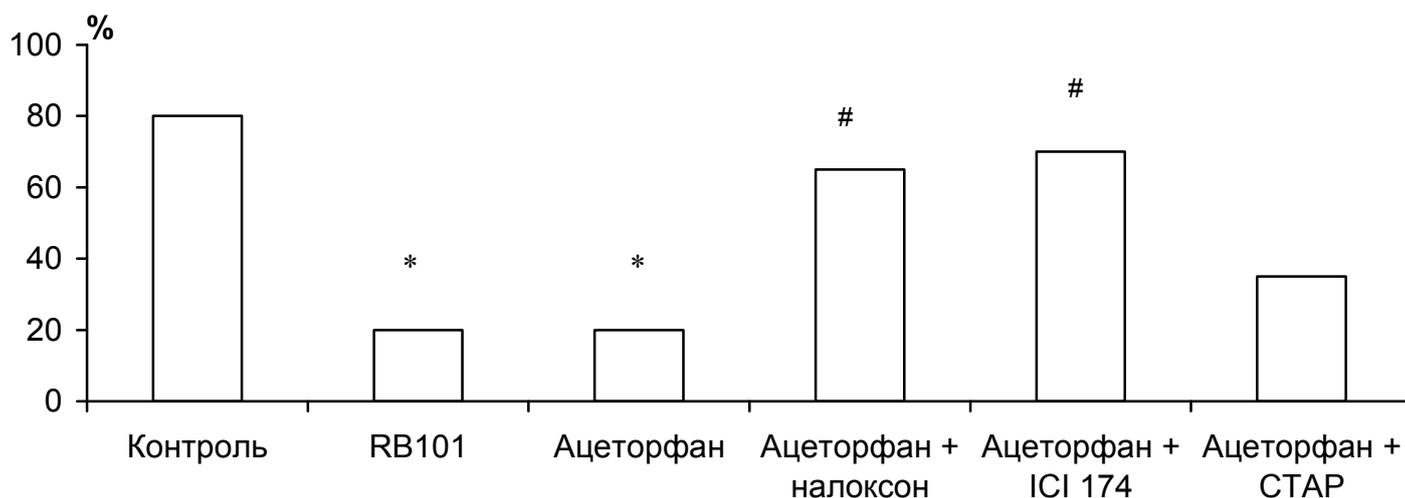


Рисунок 12 – Влияние ингибиторов энкефалиназ и антагонистов опиоидных рецепторов на частоту возникновения экстрасистол при введении адреналина.

* $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе, # $p < 0,05$ по отношению к введению ацеторфана, критерий Пирсона χ^2 .

Проведенное исследование подтверждает возможность увеличения электрической стабильности сердца путем блокады энкефалиназ, при этом наблюдаемый антиаритмический эффект эндогенных опиоидов реализуется через активацию δ -ОР.

ВЫВОДЫ

1. В процессе адаптации крыс к хронической гипоксии происходит активация опиоидной системы, о чём свидетельствует повышение уровня опиоидных пептидов в крови и тканях, как в состоянии физиологического покоя, так и при ишемии-реперфузии.
2. Инфаркт-лимитирующий, кардиопротекторный и цитопротекторный эффекты хронической непрерывной нормобарической гипоксии опосредуются через активацию кардиальных δ_2 - и μ -опиоидных рецепторов.
3. Адаптационное повышение устойчивости сердца к аритмогенному действию ишемии и реперфузии, происходящее при хронической прерывистой гипобарической гипоксии, связано с активацией экстракардиальных δ -опиоидных рецепторов.
4. Сигнальными звеньями связанной с опиоидными рецепторами кардиопротекции при хронической непрерывной нормобарической гипоксии являются тирозинкиназы, протеинкиназа $C\delta$, iNO-синтаза и мито K_{ATP} -каналы.
5. Сопряженная с опиоидными рецепторами PI3-протеинкиназа не участвует в обеспечении повышенной резистентности миокарда к ишемии и реперфузии у адаптированных к непрерывной нормобарической гипоксии животных.
6. Улучшение функционального состояния митохондрий миокарда (скорость дыхания, величина трансмембранного потенциала, содержание АТФ и устойчивость mPTP-поры к открытию) у крыс после адаптации к хронической непрерывной нормобарической гипоксии связано с активацией опиоидных рецепторов.
7. Антиадренергическое действие эндогенных опиоидов играет важную роль в формировании повышенной толерантности сердца к аритмогенным воздействиям у адаптированных к хронической гипобарической гипоксии животных.
8. Повышение устойчивости миокарда к аритмогенным воздействиям может быть реализовано путём увеличения уровня опиоидов в крови и тканях.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Лишманов, Ю. Б. Участвуют ли эндогенные опиоидные пептиды в реализации кардиопротекторного эффекта адаптации? / Ю. Б. Лишманов, Л. Н. Маслов, Н. В. Нарыжная // Пат. физиол. и экспер. терапия. – 1997. – № 3. – С. 3-5. ИФ (РИНЦ) 0,424.
2. Нарыжная, Н. В. Об участии δ -опиатных рецепторов и их лигандов в формировании адаптационной защиты сердца при аритмогенных воздействиях / Н. В. Нарыжная, А. В. Крылатов, Л. Н. Маслов, Ю. Б. Лишманов, Г. Дж. Гросс, Дж. Б. Стефано // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2001. – Т. 87, № 12. – С. 1617-1625. ИФ (РИНЦ) 0,489
3. Лишманов, Ю. Б. Опиатергическое звено антиаритмического эффекта адаптации к гипоксии на модели ишемии и реперфузии *in vivo* / Ю. Б. Лишманов, Н. В. Нарыжная, Л. Н. Маслов, Г. Дж. Гросс // Пат. физиол. экспер. терапия. – 2003. – № 1. – С. 19-21. ИФ (РИНЦ) 0,424.
4. Лишманов, Ю. Б. Роль опиатных рецепторов и АТФ-зависимых калиевых каналов митохондрий в формировании адаптационной устойчивости миокарда к аритмогенному действию ишемии и реперфузии / Ю. Б. Лишманов, Н. В. Нарыжная, А. В. Крылатов, Л. Н. Маслов, С. А. Богомаз, Д. С. Угдыжекова, Г. Дж. Гросс, Дж. Б. Стефано // Известия РАН. Серия биологическая. – 2003. – № 6. – С. 720-727. ИФ (РИНЦ) 0,616.
5. Колар, Ф. Значение АТФ-чувствительных K^+ -каналов в механизме антиаритмического и кардиопротекторного действия адаптации к периодической гипобарической гипоксии / Ф. Колар, Я. Некар, Б. Остадал, Л. Н. Маслов, Д. Л. Стахеев, Н. В. Нарыжная, А. С. Таюрская, Ю. Б. Лишманов // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2008. – Т. 94, № 4. – С. 448-455. ИФ (РИНЦ) 0,489.
6. Лишманов, Ю. Б. Устойчивость миокарда к ишемическим и реперфузионным повреждениям при хроническом введении агонистов и антагонистов опиоидных рецепторов / Ю. Б. Лишманов, Д. Л. Стахеев, А. В. Крылатов, Н. В. Нарыжная, Л. Н. Маслов, М. В. Овчинников, Ф. Колар // Бюлл. экспер. биол. и мед. – 2008. – Т. 145, № 6. – С. 642-644. ИФ (РИНЦ) 0,623.
7. Нарыжная, Н. В. Роль сарколеммальных и митохондриальных K_{ATP} -каналов в реализации кардиопротекторного и антиаритмического эффектов разных режимов гипобарической адаптации / Н. В. Нарыжная, Я. Некар, Л. Н. Маслов, Ю. Б. Лишманов, Ф. Колар, Т. В. Ласукова // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2009. – Т. 95, № 8. – С. 837-849. ИФ (РИНЦ) 0,489.
8. Нарыжная, Н. В. Внутриклеточные механизмы кардиопротекции при адаптации к гипоксии. Триггеры и киназные каскады / Н. В. Нарыжная, Ю. Б. Лишманов, Ф. Колар, Л. Н. Маслов, И. Жанг, А. Г. Портниченко // Росс. физиол. журн. им. Сеченова. – 2011. – Т. 97, № 9. – С. 923-938. ИФ (РИНЦ) 0,489.
9. Нарыжная, Н. В. К вопросу о рецепторной специфичности опиоидергического повышения электрической стабильности сердца при адаптации крыс к стрессу и гипобарической гипоксии. / Н. В. Нарыжная, Л. Н. Маслов, А. С. Таюрская, Ю. Б. Лишманов // Сиб. мед. журнал (г. Томск) . – 2011. – Т. 26, № 4, вып. 1. – С. 143-147. ИФ (РИНЦ) нет.
10. Лишманов, Ю. Б. Роль мю, дельта и каппа-опиоидных рецепторов в формировании кардиопротекторного эффекта адаптации к хронической нормобарической гипоксии / Ю. Б. Лишманов, Н. В. Нарыжная, С. Ю. Цибульников, Л. Н. Маслов, Ф. Колар, И. Жанг, Х. Ванг // Сиб. мед. журнал (г. Томск) . – 2012. – Т. 27, №1. – С. 111-115. ИФ (РИНЦ) нет.
11. Лишманов, Ю. Б. Эндогенная опиоидная система как звено срочной и долговременной адаптации организма к экстремальным воздействиям. Перспективы клинического применения опиоидных пептидов / Ю. Б. Лишманов, Л. Н. Маслов, Н. В. Нарыжная, Ж. М. Пей, Ф. Колар, И. Жанг, А. Г. Портниченко, Х. Ванг // Вестник РАМН. – 2012. – № 6. – С. 73-82. ИФ (РИНЦ) нет.

12. Маслов, Л. Н. Перспективы создания препаратов на основе опиоидов, повышающих устойчивость сердца к патогенному действию ишемии-реперфузии / Л. Н. Маслов, Ю. Б. Лишманов, Дж. П. Хедрик, Ж.-М. Пей, Л. Хануш, А. В. Крылатов, Н. В. Нарыжная // Экспер. и клин. фармакология. – 2012. – Т. 75, № 10. – С. 22-28. ИФ (РИНЦ) 0,517.
13. Маслов, Л. Н. Сигнальный механизм кардиопротекторных эффектов опиоидов / Л. Н. Маслов, Л. Хануш, Ж.-М. Пей, А. В. Крылатов, Х. Ванг, Н. В. Нарыжная, Е. И. Барзах, А. Ю. Лишманов // Экспер. и клин. фармакология. – 2013. – Т. 76, № 3. – С. 41-48. ИФ (РИНЦ) 0,517
14. Маслов, Л. Н. Рецепторный и сигнальные механизмы антиаритмических эффектов ишемического прекодиционирования / Л. Н. Маслов, Дж. П. Хедрик, А. В. Крылатов, А. Ю. Лишманов, Е. И. Барзах, Н. В. Нарыжная, И. Жанг, А. Г. Портниченко, Ю. К. Подоксенов // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2013. – Т. 99, № 2. – С. 321-339. ИФ (РИНЦ) 0,489.
15. Лишманов, Ю. Б. Функциональное состояние миокардиальных митохондрий при ишемии-реперфузии сердца у крыс, адаптированных к гипоксии. / Ю. Б. Лишманов, Н. В. Нарыжная, Л. Н. Маслов, Е. С. Прокудина, А. С. Горбунов, С. Ю. Цибульников // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 2013. –Т. 156, № 11. – С. 589-592. ИФ (РИНЦ) 0,623.
16. Маслов, Л. Н. Роль трансактивации рецепторов в кардиопротекторных эффектах прекодиционирования и посткодиционирования. / Л. Н. Маслов, Хедрик Дж.П., Мешоулам Р., Крылатов А.В., Лишманов А.Ю., Барзах Е.И., Нарыжная Н.В., Жанг И. // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2012. – Т. 98, № 3. – С. 305-317. ИФ (РИНЦ) 0,489.
17. Нарыжная, Н. В. Участие опиоидных рецепторов в реализации кардиопротекторного эффекта хронической нормобарической гипоксии. / Н. В. Нарыжная, С. Ю. Цибульников, Л. Н. Маслов, Ю. Б. Лишманов // Сиб. мед. журнал (Томск). – 2013. –Т. 28, № 4. – С. 102-106. ИФ (РИНЦ) нет.
18. Маслов, Л. Н. Перспективы применения агонистов аденозиновых и опиоидных рецепторов для предупреждения реперфузионных повреждений сердца. Анализ экспериментальных и клинических данных. / Л. Н. Маслов, А. Г. Мрочек, И. Г. Халиулин, А. В. Крылатов, А. Г. Портниченко, Е. Чаусская, Н. В. Нарыжная, А. С. Горбунов, С. Ю. Цибульников // Вестник РАМН. – 2014. Т. – 69, № 5-6. – С. 5-13. ИФ (РИНЦ) нет.
19. Нарыжная, Н. В. Участие опиоидных рецепторов в цитопротекторном эффекте адаптации к хронической гипоксии при гипоксии—реоксигенации изолированных кардиомиоцитов. / Н. В. Нарыжная, Л. Н. Маслов, Е. С. Прокудина, Ю. Б. Лишманов // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 2015. – Т. 159, № 2. – С. 166-169. ИФ (РИНЦ) 0,623.
20. Нарыжная, Н. В. Участие NO-синтазы в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта хронической непрерывной нормобарической гипоксии. / Н. В. Нарыжная, Л. Н. Маслов, С. Ю. Цибульников, Е. С. Прокудина, Ю. Б. Лишманов // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2015. – Т. 101, № 8. – С. 921-928. ИФ (РИНЦ) 0,489.
21. Маслов, Л.Н. Активные формы кислорода – триггеры и медиаторы повышения устойчивости сердца к действию ишемии-реперфузии / Л.Н. Маслов, Н.В. Нарыжная, Ю.К. Подоксенов, Е.С. Прокудина, А.С. Горбунов, И. Жанг, Ж.М. Пей // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. - 2015. - Т. 101. № 1. - С. 3-24. ИФ (РИНЦ) 0,489.

Публикации в зарубежных высокорейтинговых изданиях:

1. Maslov, L. N. Comparative analysis of the cardioprotective properties of opioid receptor agonists in a rat model of myocardial infarction / L. N. Maslov, Y. B. Lishmanov, P. R. Oeltgen, E. I. Barzakh, A.V. Krylatov, N. V. Naryzhnaya, J. M. Pei, S. A. Brown // Acad. Emerg. Med. – 2010. – Т. 17, № 11. – P. 1239-1246. ИФ (WoS)1.52.
2. Maslov, L. N. Role of endogenous opioid peptides in the infarct size-limiting effect of adaptation to chronic continuous hypoxia / L. N. Maslov, N. V. Naryzhnaya, S. Yu. Tsibulnikov, F. Kolar, Y. Zhang, H. Wang, A. M. Gusakova, Yu. B. Lishmanov // Life science. – 2013. – Vol. 93, № 9-11. – P. 373-379. ИФ (WoS) 2.607

3. Maslov, L. N. Preserved cardiac mitochondrial function and reduced ischaemia/reperfusion injury afforded by chronic continuous hypoxia: Role of opioid receptors. / L. N. Maslov, N. V. Naryzhnaya, E. S. Prokudina, F. Kolar, A. S. Gorbunov, Y. Zhang, H. Wang, S. Yu. Tsibulnikov, A. G. Portnichenko, T. V. Lasukova, Yu. B. Lishmanov // Clin. Exper. Pharmacol. Physiol. – 2015. – Vol. 42, № 5. – P. 496-501. ИФ (WoS) 2.372

Прочие публикации:

Лишманов, Ю.Б. Опиоидергическое звено морфофункциональных изменений миокарда при стрессе и адаптации. / Ю. Б. Лишманов, Н. В. Нарыжная, Л. Н. Маслов // Томск: Изд-во «Красное знамя» 2003; 224 с.

Патент РФ № 2488404 от 27 июля 2013 г. Маслов Л.Н., Нарыжная Н.В., Цибульников С.Ю., Горбунов А.С. «Средство, увеличивающее устойчивость сердца к ишемическим и последующим реперфузионным повреждениям».

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АР – адренорецепторы;

АТФ – аденозинтрифосфат;

АФК – активные формы кислорода;

БНР – без нарушений ритма;

ДРЛЖ – давление, развиваемое левым желудочком;

ДХФ - 2',7'-дихлорфлуоресцеин;

ЖТ – желудочковая тахикардия;

ЖФ - желудочковая фибрилляция;

ЗН – зона некроза;

ЗН/ЗР – соотношение зоны некроза к зоне риска;

ЗР – зона риска;

ИБС – ишемическая болезнь сердца;

КА – катехоламины;

КДД - конечное диастолическое давление;

КФК – креатинфосфокиназа;

ЛДГ – лактатдегидрогеназа;

МЖЭ – множественные желудочковые экстрасистолы;

миток_{АТФ}-канал – митохондриальный АТФ-чувствительный K⁺-канал;

НАДФН – никодинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный;

ОР – опиоидные рецепторы;

ПКС – протеинкиназа С;

СР – саркоплазматический ретикулум;

ТК – тирозинкиназа;

ХННГ – хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия;

ХППГ – хроническая прерывистая гипобарическая гипоксия;

mPTP-пора - mitochondrial permeability transition pore, пора переменной проницаемости;

NOS – NO-синтаза – синтаза оксида азота;

PI3-киназа – инозитолтрифосфат-активируемая протеинкиназа;

PKC - протеинкиназа С;

Src-киназа – субтип тирозинкиназ.