

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ  
УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

Горбунов  
Александр Сергеевич

Адаптивный феномен ишемического посткондиционирования сердца: значение  
опиоидных рецепторов, протеинкиназы С, PI3-киназы и  $K_{ATP}$ -каналов

03.03.01 физиология  
14.03.03 патологическая физиология

Диссертация  
на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор биологических наук  
Ласукова Т.В.

доктор медицинских наук, профессор  
Маслов Л. Н.

Томск - 2013

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	6
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
1.1. Адаптивный феномен ишемического посткондиционирования	11
1.2. Некротическая и апоптотическая гибель клетки при ишемии и реперфузии	21
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	
2.1. Моделирование тотальной ишемии изолированного сердца по Лангендорфу	25
2.2. Моделирование Ишемического посткондиционирования на модели изолированного сердца	35
2.3. Регистрация сократительной активности изолированного сердца	35
2.4. Оценка кардиопротекторного эффекта	36
2.5. Характеристика использованных блокаторов	
2.5.1. Блокаторы опиоидных рецепторов	38
2.5.2. Блокаторы для изучения роли протеинкиназы C, PI3- киназы в реализации кардиотропных эффектов ишемического посткондиционирования	41
2.5.3. Блокаторы для изучения роли $K_{ATP}$ - каналов в реализации кардиотропных эффектов ишемического посткондиционирования	42
2.6. Методы статистической обработки результатов	43
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	

3.1. Кардиопротекторный эффект ишемического посткондиционирования	44
3.2. Роль опиоидных рецепторов в реализации кардиопротекторного эффекта посткондиционирования изолированного перфузируемого сердца	54
3.3. Роль протеинкиназы С в реализации кардиопротекторного эффекта ишемического посткондиционирования	62
3.4. Роль PI3-киназы в реализации протективного эффекта посткондиционирования	68
3.5. Роль Катф-каналов в реализации устойчивости изолированного сердца к ишемическим и реперфузионным воздействиям	73
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	79
ВЫВОДЫ	83
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	84

## **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

**5-ГД**- 5-гидроксидеканоат

**АФК**- активные формы кислорода

**БАВ**- биологически активные вещества

**ГК**- гексокиназа

**ГФДГ**- глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа

**ГЦ**- гуанилатциклаза

**ДРЛЖ** – давление, развиваемое левым желудочком изолированного сердца

**ИП**- ишемическое посткондиционирование

**ИР**- ишемические и реперфузионные, ишемия и реперфузия

**К<sub>АТФ</sub>-канал**- АТФ-чувствительный K<sup>+</sup>-канал

**КДД** – конечное диастолическое давление

**КФК**- креатинфосфокиназа

**ЛДГ**- лактатдегидрогеназа

**МАПК**- митоген-активируемая протеинкиназа

**НАД**- никотинамиддинуклеотид

**ОИМ**- острый инфаркт миокарда

**ОР**- опиоидные рецепторы

**РИ/ОР**- соотношение размер инфаркта/область риска

**цГМФ**- циклический гуанозинмонофосфат

**ЧСС**- частота сердечных сокращений

**ЭПР**- эндоплазматический ретикулум

**АIF**- apoptosis inducing factor

**Akt**- anti-apoptotic kinase

**Apaf**- apoptosis protease-activating factor  
**eNOS**- эндотелиальная NO-синтаза  
**ERK**- extracellular signal regulating  
**FADD**- Fas-associating death domen  
**FGF**- фактор роста фибробластов  
**GSK**- glucogen synthase kinase  
**IGF**- инсулиноподобный фактор роста  
**JAK**- Janus kinase  
**MCC** – максимальная скорость сокращения  
**MCP** – максимальная скорость расслабления  
**MPTP**- mitochondrial permeability transition pore  
**PI3K**-фосфоинозитид-3-киназа  
**PKC**- протеинкиназа C  
**PKG**- протеинкиназа G  
**RISK**- reperfusion injury signalling kinase  
**STAT**- signal transduced and activator of trascription  
**TNF**- фактор некроза опухолей  
**TNFRs**- tumor necrosis factor receptors

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность.** Одна из наиболее актуальных проблем современной физиологии и патофизиологии является изучение механизмов адаптации с целью разработки новых подходов к повышению устойчивости сердца к ишемическим и реперфузионным повреждениям. Это связано с тем, что основной причиной инвалидизации и смертности среди взрослого населения России и развитых стран является ишемическая болезнь сердца и, прежде всего, острый инфаркт миокарда (ОИМ) [Марков В.А. и др., 2011; Braunwald E., 2011]. На данном этапе единственным эффективным методом лечения ОИМ является реканализация инфаркт-связанной коронарной артерии [Марков В.А. и др., 2011; Braunwald E., 2011]. При ишемии-реперфузии необратимые повреждения кардиомиоцитов возникают слишком быстро. Так, по данным некоторых авторов обширный очаг некроза формируется уже при 20-минутной экспериментальной коронароокклюзии и последующей реперфузии (3 ч) [Neckar J. et al., 2003]. В России среднее время поступления больного с ОИМ в стационар составляет 2,5 – 2,8 ч [Марков В.А. и др., 2011]. Для спасения жизни пациентов с ОИМ на догоспитальном этапе неоценимую помощь могло бы оказать применение препаратов, заметно повышающих устойчивость сердца к действию ишемии-реперфузии. К сожалению, таких лекарственных средств пока не существуют. Для создания подобных препаратов, необходимо изучение механизмов адаптационных феноменов, обеспечивающих устойчивость сердца к ишемии и реперфузии. К таким адаптивным феноменам следует отнести ишемическое пре- и посткондиционирование.

В 1986 г Murry и соавт. открыли адаптивный феномен, впоследствии названный «ишемическим преко́ндиционированием» [Murry C. E. et al., 1986]. Физиологи установили, что четыре сеанса пятиминутной окклюзии коронарной артерии в сочетании с пятиминутными сеансами реперфузии непосредственно перед длительной ишемией позволяют уменьшить размер инфаркта миокарда

сердца собаки в среднем на 75% [Yetgin T. et al, 2010; Turer A. T. и Hill J. A., 2010]. В 2003 г исследователи из группы J. Vinten-Johansen и соавт. обнаружили [Zhao Z.Q. et al., 2003] ещё один адаптивный феномен. Оказалось, что сеансы кратковременной коронароокклюзии и реперфузии, повторяемые несколько раз сразу после прекращения длительной ишемии сердца, также оказывают кардиопротекторный эффект. Это явление получило название «ишемического посткондиционирования» [Zhao Z.Q. et al., 2003; Sorensson P. et al., 2010]. В обоих случаях речь идёт об адаптивном феномене, который реализуется на уровне сердца, поскольку прекондиционирование и посткондиционирование удаётся воспроизвести как *in vivo*, так и *in vitro*.

Позднее кардиопротекторный эффект ишемического посткондиционирования (ИП) был подтвержден независимыми исследователями на различных видах животных. Эксперименты проводились на собаках, кроликах, крысах, обезьянах, мышах, свиньях [Argaud L. et al., 2005; 2008; Tong G. et al., 2010; Zhao Z.Q. et al., 2010]. Кроме того, клинические наблюдения, выполненные на пациентах с острым инфарктом миокарда, подтвердили существование феномена ишемического посткондиционирования у человека [Tarantini G. et al., 2010].

Наличие защитного эффекта посткондиционирования было зафиксировано не только в опытах *in vivo*, но и *in vitro* на изолированном сердце [Crisostomo P. R. et al., 2006] и изолированных кардиомиоцитах [Wang H. C. et al., 2006]. Так, в работе А. Tsang и соавт. [Tsang A. et al., 2004] на изолированном сердце крысы было показано, что ишемическое посткондиционирование после 35-минутной ишемии способствовало уменьшению размера зоны инфаркта на 20%. В работе Н. Sasaki и соавт. [Sasaki H. et al., 2007] было установлено значительное сокращение продолжительности реперфузионных желудочковых аритмий после посткондиционирования.

Во время ишемии главной причиной гибели кардиомиоцитов является некроз, но после возобновления коронарной перфузии в клетках миокарда запускаются процессы, обуславливающие апоптоз клеток сердца [Mosanu M.M. et al., 2000]. В работе Y. Lu и соавт. [Lu Y. et al., 2008] было установлено, что посткондиционирование позволяет уменьшить число кардиомиоцитов, погибших в результате апоптоза. Кардиопротекторные свойства ИП не ограничиваются только уменьшением области инфаркта миокарда и антиапоптотическим действием. Согласно данным A. Moriguchi и соавт. [Moriguchi A. et al., 2010], ИП позволяет ослабить реперфузионную контрактуру сердца, тем самым способствуя более полному восстановлению сократительной активности миокарда после ишемии. Кроме того, в ряде независимых работ был подтверждён положительный эффект посткондиционирования в отношении реперфузионной насосной функции сердца [Sasaki H. et al., 2007; Deyhimy D.I. et al., 2007], в уменьшении реперфузионного выброса из миокарда лактатдегидрогеназы, креатинфосфокиназы (КФК) и тропонина I [Vorassa J.C. et al., 2006] и восстановления функции эндотелия [Zhao J.L. et al., 2007].

Следует отметить, что до сих пор не существует общепринятой модели ИП, и каждый коллектив исследователей вырабатывает свою методику моделирования названного феномена, базируясь на собственных данных. Во многом неясным остаётся рецепторный и сигнальный механизм ишемического посткондиционирования.

**Цель:** Изучить роль опиоидных рецепторов, протеинкиназы С и  $K_{ATP}$ -каналов, PI3-киназы в механизме адаптивного феномена ишемического посткондиционирования изолированного перфузируемого сердца.

**Задачи:**

1. Выполнить сравнительный анализ пяти моделей посткондиционирования и выбрать оптимальный для дальнейшего изучения.



2. Изучить роль опиоидных рецепторов в опосредование толерантности сердца к ишемии и реперфузии при ишемическом посткондиционировании.

3. Исследовать роль протеинкиназы С в реализации кардиопротекторного эффекта адаптивного феномена посткондиционирования.

4. Оценить вклад  $K_{ATP}$ -каналов в кардиопротекторный эффект ишемического посткондиционирования.

5. Изучить значение PI3-киназы в механизме формирования кардиопротекторного эффекта адаптивного феномена посткондиционирования.

### **Научная новизна**

Впервые проведен сравнительный анализ кардиопротекторного эффекта ишемического посткондиционирования по пяти моделям.

Несомненную новизну представляют данные о роли  $\delta_1$ -опиоидных рецепторов в механизме адаптивного феномена посткондиционирования сердца.

Впервые показана роль  $\delta$ -изоформы протеинкиназы С в реализации кардиопротекторного эффекта адаптивного феномена посткондиционирования.

### **Научно-практическая значимость**

Теоретическая и практическая значимость работы заключается в том, что получены принципиально новые данные о механизме кардиопротекторного действия ишемического посткондиционирования. Полученные результаты могут быть востребованы кардиохирургическими клиниками, проводящими операции с использованием искусственного кровообращения, кафедрами и институтами, изучающими проблемы ишемических и реперфузионных повреждений сердца, фармацевтическими компаниями, разрабатывающими препараты для лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы.

Кроме того, данные выполненной работы расширяют представления о взаимодействии опиоидных рецепторов сердца с внутриклеточными сигнальными системами в кардиомиоцитах при ишемическом

посткондиционировании.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Установлено, что опиоидная система является одним из ключевых звеньев повышенной устойчивости сердца к действию ишемии и реперфузии при ишемическом посткондиционировании.

2. Кардиопротекторный эффект ишемического посткондиционирования реализуется при участии протеинкиназы С, PI3-киназы и  $K_{ATP}$ -каналов.

**Апробация работы:** Материалы диссертации представлены на конференциях: 6 российская конференция с международным участием «Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция» (Москва, 2011); V Всероссийская с международным участием школа-конференция (Москва, 2012); Российский национальный конгресс кардиологов (Санкт-Петербург, 2013).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 12 печатных работ, из них 9 работ в журналах списка ВАК, 3 публикаций в материалах международных и российских конференций.

Автор выражает глубокую благодарность своим научным руководителям д.б.н. Т.В. Ласуковой и профессору Л.Н. Маслову, с.н.с. Н.В. Нарыжной, член-корр. РАМН Лишманову Ю.Б. за неоценимую помощь при работе над диссертационной работой.

## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 АДАПТИВНЫЙ ФЕНОМЕН ИШЕМИЧЕСКОГО ПОСТКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ

Общеизвестно, что ишемические и реперфузионные (ИР) повреждения сердца является главной причиной гибели пациентов с острым инфарктом миокарда. Они же провоцируют появление послеоперационных осложнений у кардиохирургических больных, после кардиopleгической остановки сердца и применения искусственного кровообращения. Как известно, главными проявлениями ИР миокарда являются: некроз и апоптоз кардиомиоцитов; реперфузионная сократительная дисфункция сердца; аритмии; дисфункция эндотелия коронарных артерия, которая приводит к феномену неполного восстановления коронарной перфузии (no-reflow phenomenon) [Vinten-Johansen J. et al., 2005].

После того, как в 1986 г трое американских исследователей открыли феномен ишемического preconditionирования (ИП) [Murry C.E. et al., 1986], стало вполне очевидным, что можно эффективно предупреждать ишемические и реперфузионные повреждения сердца. Однако было неясно, можно ли как-то повлиять на реперфузионные повреждения сердца, воздействуя на миокард после коронароокклюзии. В литературе даже обсуждался сам факт существования реперфузионных повреждений [Alker K.J. et al., 1996], поскольку не были известны воздействия, способные эффективно улучшить состояние миокарда уже после возобновления коронарной перфузии. На реперфузионные повреждения сердца *in situ* предлагали воздействовать с помощью реперфузии сердца раствором с пониженным содержанием  $Ca^{2+}$ , с pH 7,8, с повышенной концентрацией  $K^+$ , с увеличенной осмолярностью [Follette D.M. et al., 1981]. Эти воздействия только незначительно ослабляли реперфузионное повреждение сердца [Follette D.M. et al., 1981]. Некоторые исследователи для защиты сердца

от ИР повреждений предлагали постепенное восстановление коронарной перфузии после коронароокклюзии [Okamoto F. et al., 1986]. В 1997 г Н. Sato и соавт. [Sato H. et al., 1997] опубликовали результаты своих исследований на собаках с 60-минутной коронароокклюзией и последующей реперфузией сердца. Оказалось, что постепенное увеличение коронарного кровотока обеспечивает уменьшение соотношения размер инфаркта/область риска (областью риска принято называть зону ишемии) на 32% по сравнению с контролем [Sato H. et al., 1997]. Постепенное возобновление мозгового кровотока оказывает нейропротекторный эффект при экспериментальном инсульте [Gao X. et al., 2008a].

Однако настоящий успех ожидал исследователей только в 2003 г, именно в этот год физиологи из Атланты (США) под управлением проф. J. Vinten-Johansen [Zhao Z.Q. et al., 2003] обнаружили адаптивный феномен, который был назван «ишемическим посткондиционированием» (ischemic postconditioning). Экспериментальные исследования проводили на собаках с 60-минутной коронароокклюзией и последующей 3-часовой реперфузией левой нисходящей коронарной артерии. Выяснилось, что, если в реперфузионном периоде применялись 3 сеанса 30-секундной коронароокклюзии, чередующиеся с 30-секундными интервалами возобновления коронарного кровотока, то миокард становится устойчивым к реперфузионным повреждениям. Проявляется этот защитный эффект уменьшением соотношения размер инфаркта/область риска (РИ/ОР) на 44% по сравнению с контролем [Zhao Z.Q. et al., 2003].

В опытах *in vivo* было показано, что посткондиционирование оказывает антифибрилляторный эффект при моделировании коронароокклюзии и реперфузии у собак [Halkos M.E. et al., 2004] и повышает устойчивость сердца к аритмогенному действию реперфузии у крыс [Dow J. et al., 2008; Kloner R.A. et al., 2006]. Антиаритмический эффект посткондиционирования отмечается у молодых и старых животных [Dow J. et al., 2008].

Кардиопротекторный эффект посткондиционирования, впервые обнаруженный физиологами из Атланты, был подтвержден в независимых исследованиях, выполненных на собаках [Fujita M. et al., 2007], кроликах [Argaud L. et al., 2005; 2008; Piodromitis E.K. et al., 2006; Philipp S. et al., 2006; Tessier-Vetzel D. et al., 2006; Wang C. et al., 2006; Yang X.M. et al., 2004a; 2005], свиньях [Zhao J.L. et al., 2007], мышцах [Boengler K. et al., 2008; Gomez L. et al., 2007; 2008; Heusch G. et al., 2006; Kaljusto M.L. et al., 2006; Lauzier B. et al., 2008; Lim S.Y. et al., 2007; Morrison R.R. et al., 2007; Tsutsumi Y.M. et al., 2007], крысах [Kloner R.A. et al., 2006; Manintveld O.C. et al., 2007; Tang X.L. et al., 2006; Zhu M. et al., 2006] и в клинических наблюдениях, выполненных на пациентах с острым инфарктом миокарда [Cokkinos D.V. и Pantos C., 2007; Staat P. et al., 2005; Thibault H. et al., 2007].

Необходимо отметить, что *in vivo* положительный инотропный эффект посткондиционирования в реперфузионном периоде пока не подтвержден в независимых исследованиях.

В опытах на изолированном перфузируемом сердце крысы было показано, что посткондиционирование предупреждает возникновение реперфузионных желудочковых аритмий [Galagudza M. et al., 2004; Sasaki H. et al., 2007] и уменьшает соотношение РИ/ОР на 39% [Tsang A. et al., 2004] или на 70% [Yang X.M. et al., 2005]. Кардиопротекторный эффект посткондиционирования отмечен и в ряде других исследований, выполненных на изолированном сердце [Cohen M.V. et al., 2007; Deyhimy D.I. et al., 2007; Donato M. et al., 2007; Li D. et al., 2008; Morrison R.R. et al., 2007; Penna C. et al., 2007; Zheng M.Z. et al., 2007]. Вместе с тем, некоторым исследователям в опытах на изолированном посткондиционированном сердце не удалось обнаружить улучшения сократимости миокарда в реперфузионном периоде [Xi L. et al., 2008]. Эти же исследователи после посткондиционирования не выявили улучшения коронарной перфузии в реперфузионном периоде [Xi L. et al., 2008]. Согласно

данным группы проф. J.M. Downey [Yang X.M. et al., 2005], наибольшего усиления толерантности изолированного сердца к действию ИР удаётся добиться с помощью 6 сеансов ишемии (10 с) и реперфузии (10 с). Инфаркт-лимитирующий эффект посткондиционирования был подтвержден в экспериментах, выполненных на сердце, изолированном из организма крыс с постинфарктным кардиосклерозом [Zhu M. et al., 2006]. Следовательно, постинфарктное ремоделирование сердца не является серьёзным препятствием для посткондиционирования. Китайские исследователи попытались оценить кардиопротекторный эффект посткондиционирования в опытах на изолированном сердце крысы, которое предварительно хранили при +4°C в растворе, который используют для хранения донорского сердца перед трансплантацией (раствор Celsior) [Zheng M.Z. et al., 2007]. После 3 ч или 5 ч подобной консервации сердце подвергали реперфузии *in vitro* по методу Лангендорфа. Посткондиционирование моделировали с помощью трёх сеансов 30-секундной реперфузии и ишемии. Оказалось, что посткондиционирование после 3 ч ишемии способствовало восстановлению насосной функции сердца в реперфузионном периоде и увеличению коронарного протока. Кроме того, уменьшалась тяжесть и частота возникновения реперфузионных желудочковых аритмий. При более протяженной 5-часовой ишемии посткондиционирование не оказывало кардиопротекторного эффекта [Zheng M.Z. et al., 2007]. Положительный эффект посткондиционирования в отношении донорского сердца, хранившегося при +4°C в растворе Рингера или в растворе Celsior, был подтвержден в независимом исследовании [Ferrera R. et al., 2007; Lauzier B. et al., 2007]. Однако французские исследователи [Ferrera R. et al., 2007] в отличие от их китайских коллег [Zheng M.Z. et al., 2007] смогли обнаружить протекторный эффект посткондиционирования и после 8-часового хранения сердца при +4°C. Данный факт говорит о том, что посткондиционирование может найти применение в трансплантологии.

Феномен посткондиционирования удаётся моделировать на изолированных кардиомиоцитах [Cserepes B. et al., 2007; Sun H.Y. et al., 2005; 2006; Wang H.C. et al., 2006].

Учитывая определенное сходство ишемического прекондиционирования и посткондиционирования, уместно было предположить, что триггерными факторами того и другого адаптационного феномена являются одни и те же биологически активные вещества. Известно, что в первой фазе ишемического прекондиционирования решающую роль играют: аденозин, брадикинин, опиоиды и активные формы кислорода (АФК) [Yellon D.M. и Downey J.M., 2003]. В отсроченном (поздняя фаза) прекондиционировании ключевую роль играет радикал оксида азота ( $\text{NO}\cdot$ ) и продукты метаболической активности циклооксигеназы-2 [Yellon D.M. и Downey J.M., 2003]. Уже в одной из первых работ, посвященных изучению механизмов посткондиционирования, исследователи обратили внимание на то, что прекондиционирование не усиливает кардиопротекторный эффект посткондиционирования [Halkos M.E. et al., 2004]. Это могло говорить о сходстве механизма пре- и посткондиционирования. Опираясь на эти данные, при поиске эндогенных триггеров посткондиционирования исследователи прежде всего обратили внимание на вышеперечисленные биологические активные вещества.

В первую очередь ученые обратили внимание на аденозин. Необходимо отметить, что способность агонистов аденозиновых (А) рецепторов избирательно предупреждать реперфузионные повреждения была обнаружена в 1997 г ещё до открытия феномена посткондиционирования в лаборатории проф. J. Vinten-Johansen [Jordan J.E. et al., 1997].

Таким образом, в настоящее время доказано, что аденозин является одним из триггерных факторов посткондиционирования. Среди исследователей пока нет единства взглядов в вопросе о том, с активацией какого субтипа аденозиновых рецепторов связан кардиопротекторный эффект аденозина.

Однако большинство авторов полагает, что инфаркт-лимитирующий эффект посткондиционирования связан с оккупацией  $A_{2a}$ -рецепторов эндогенным аденозином.

В 2005 г физиологи из Атланты (США) [Kin H. et al., 2005a] впервые получили данные о том, что периферические опиоидные рецепторы (ОР) могут участвовать в посткондиционировании сердца. В экспериментах на крысах было показано, что внутривенное введение за 5 мин до реперфузии неселективного антагониста ОР налоксона устраняет инфаркт-лимитирующий эффект посткондиционирования. Также действует налоксона метиодида - блокатор ОР, непроникающий через гематоэнцефалический барьер. Китайские исследователи показали, что в механизме посткондиционирования могут участвовать эндогенные агонисты  $\kappa$ -ОР [Wang J. et al., 2007]. В экспериментах, выполненных на изолированных перфузируемых по методу Лангендорфа сердцах крыс, было показано, что посткондиционирование уменьшает реперфузионный выброс из миокарда ЛДГ и предупреждает возникновение реперфузионной сократительной дисфункции. Кардиопротекторное действие посткондиционирования не проявлялась в условиях селективной блокады  $\kappa$ -ОР норбиналторфимином [Wang J. et al., 2007]. Этот факт говорит об участии  $\kappa$ -ОР в посткондиционировании. Прямо противоположные данные были получены в экспериментах на крысах *in vivo* [Zatta A.J. et al., 2008]. Посткондиционирование моделировали с помощью трёх сеансов реперфузии (10 с) и реоокклюзии (10 с) после 30-минутной коронароокклюзии. Антагонисты опиоидных рецепторов вводили внутривенно за 5 минут до начала реперфузии. На основании полученных данных авторы сделали вывод о том, что посткондиционирование связано с активацией периферических  $\mu$ -ОР и, возможно,  $\delta$ -ОР, а  $\kappa$ -ОР не участвуют в инфаркт-лимитирующем эффекте посткондиционирования. По данным авторов посткондиционирование вызывает



увеличение в миокарде уровня энкефалинов в 1,5 раза, а уровень проэнкефалина повышается в 3 раза [Zatta A.J. et al., 2008].

В 2005 г W.L. Chang и соавт. впервые обнаружили [Chang W.L. et al., 2005], что опиоиды могут имитировать феномен посткондиционирования. Оказалось, что внутривенная инъекция за 10 минут до реперфузии неселективного агониста ОР морфина (0,3 мг/кг) или опиоида талипорфина обеспечивает уменьшение размера инфаркта и ингибирует реперфузионную аккумуляцию в миокарде нейтрофилов [Chang W.L. et al., 2005]. Защитный эффект талипорфина не проявлялся в условиях блокады ОР налоксоном или налтрексоном. Эти данные были подтверждены в независимом исследовании, выполненном в 2007 г [Gross E.R. et al., 2007a; 2007b].

Подводя итог вышесказанному, следует резюмировать, что все исследователи единодушны в том, что эндогенные опиоиды и опиоидные рецепторы играют важную роль в посткондиционировании. Однако авторы расходятся в вопросе о том, какие именно ОР участвуют в посткондиционировании. Вопрос о механизме кардиопротекторного действия опиоидов во время реперфузии нуждается в дальнейшем изучении.

В настоящее время имеются данные о триггерной роли аденозина, опиоидов, брадикинина, CGRP, АФК в посткондиционировании. Показано, что предсердный натрийуретический пептид В, TGF- $\beta$ 1, кардиотрофин-1, урокортин, ацетилхолин могут имитировать феномен посткондиционирования.

Основываясь на сходстве эффектов пре- и посткондиционирования исследователи предположили, что в механизме посткондиционирования задействованы те же самые сигнальные системы, что и в прекондиционировании: PI3-киназа (PI3K), Akt-киназа (anti-apoptotic kinase), протеинкиназа С (PKC), МАПК, ERK, тирозинкиназа, p38-киназа (МАПК с молекулярным весом в 38 кДа), JNK (от c-Jun N-terminal kinase), митК<sub>АТФ</sub>-каналы, МРТ-поры [Yellon D.M. и Downey J.M., 2003].

Предполагают, что митохондриальные  $K_{ATP}$ -каналы являются одним из конечных звеньев в цепи сигнальных событий во время посткондиционирования [Vinten-Johansen J. et al., 2005; Zhao Z.Q. и Vinten-Johansen J., 2006]. Первая публикация об участии  $K_{ATP}$ -каналов в механизме посткондиционирования появилась в 2004 г [Yang X.M. et al., 2004b]. В экспериментах на изолированном сердце кролика было показано, что неселективный ингибитор  $K_{ATP}$ -каналов глибенкламид и селективный блокатор мит $K_{ATP}$ -каналов 5-гидроксидеканоат полностью устраняют инфаркт-лимитирующий эффект посткондиционирования.

МРТ-пора является гипотетическим конечным эффектором посткондиционирования [Gateau-Roesch O. et al., 2006; Vinten-Johansen J. et al., 2005]. Известно, МРТ-пора находится в закрытом состоянии во время ишемии, её открытие во время реперфузии индуцирует апоптоз кардиомиоцитов [Griffiths E.J. и Halestrap A.P., 1995; Halestrap A.P. et al., 2004]. Первые данные об участии названной поры в механизме посткондиционирования были получены в 2005 г [Argaud L. et al., 2005]. Французские исследователи установили, что посткондиционирование блокирует открытие МРТ-поры, а селективный ингибитор МРТ-поры NIM811 имитирует инфаркт-лимитирующий эффект посткондиционирования [Argaud L. et al., 2005]. Годом позже они подтвердили свои данные [Vorassa J.C. et al., 2006]. Исследователи из Милуоки (США) изучали роль белка Bcl-2 (B-cell lymphoma 2 protein) в механизме посткондиционирования [Wang C. et al., 2006]. Это белок является блокатором МРТ-поры [Halestrap A.P. et al., 2002]. Оказалось, что внутрибрюшинное введение кроликам селективного ингибитора Bcl-2 HA14-1 полностью устраняет кардиопротекторный эффект посткондиционирования. Авторы сделали вывод, что защитный эффект посткондиционирования связан с блокадой МРТ-пора белком Bcl-2 [Wang C. et al., 2006].

В настоящее время показано существование функциональной взаимосвязи между гуанилатциклазой (ГЦ), протеинкиназой G (PKG), которые расположены в цитоплазме, и митохондриальной ПКСε (митПКСε), митK<sub>ATФ</sub>-каналами и МРТ-порой, которые локализованы в митохондриях.

Анализ представленных данных позволяет предполагать, что во время посткондиционирования выстраивается следующая цепочка событий: посткондиционирование → G-белок сопряженные рецепторы → PI3K → Akt → eNOS → NO → ГЦ → цГМФ → PKG → R1 → митПКСε1 → K<sub>ATФ</sub>-канал → АФК → митПКСε2 → МРТ-пора → супрессия апоптоза. Другой сигнальный путь, который включает: посткондиционирование → G-белок сопряженные рецепторы → белок Ras → MEK → ERK1/2 → супрессия апоптоза [Hausenloy D.J. и Yellon D.M., 2007] не представляется бесспорным и требует дополнительного изучения. Выше мы неоднократно отмечали сходство прекондиционирования и посткондиционирования. Однако речь всё же идёт о двух разных феноменах, механизм которых должен быть различен. Таких различий пока найдено немного. Так, установлено, что прекондиционирование вызывает активацию p38 MAPK и JNK [Hausenloy D.J. и Yellon D.M., 2007], в то время как посткондиционирование сопровождается ингибированием названных киназ [Sun H.Y. et al., 2006; Zhao Z.Q. et al., 2005]. Видимо, различия в сигнальном механизме пре- и посткондиционирования будут выявлены в будущих исследованиях.

Таким образом, анализ литературных данных позволяет нам утверждать, что в посткондиционировании сердца триггерную роль играют рецепторы аденозина, опиоидов, брадикинина, CGRP, а сигнальная система посткондиционирования включает: PI3K, Akt eNOS, NO, ГЦ, PKG, R1, митПКСε1, митK<sub>ATФ</sub>-канал, АФК, митПКСε2, МРТ-пора или белок Ras, MEK, ERK1/2. Вполне вероятно, что в недалёком будущем для профилактики реперфузионных повреждений сердца будут использоваться агонисты

названных рецепторов или активаторы перечисленных звеньев сигнальной цепи.

## 1.2. НЕКРОТИЧЕСКАЯ И АПОПТОТИЧЕСКАЯ ГИБЕЛЬ КЛЕТКИ ПРИ ИШЕМИИ И РЕПЕРФУЗИИ

Некротическая гибель кардиомиоцита характеризуется набуханием клетки, денатурацией цитоплазматических белков, разрушением клеточных органелл и, наконец, гибелью клетки. Характерной особенностью некроза является повреждение плазматической мембраны и освобождение цитозольных компонентов, в результате чего развивается воспалительный ответ [Festjens N. et al. 2006], который является одним из механизмов ишемического-реперфузионного повреждения. Основными патогенетическими факторами, вызывающими повреждение клеточной мембраны, являются: повышение внутриклеточного содержания ионов  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ), выработка активных форм кислорода (АФК) и последующая активация калпаина (протеаза, осуществляющая гидролиз белков) и  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой фосфолипазы  $\text{A}_2$  (разрушает сарколемму и другие клеточные мембраны) [Atsma D.E. et al., 1995; Butler T.L. et al., 2009; Chien K.R. et al. 1985; Levraut J. et al. 2003]. Эти события ведут к отеку, набуханию кардиомиоцитов и деструкции цитолеммы с выходом внутриклеточных белков в межклеточное пространство, а затем в кровоток. Некоторые исследователи выделяют состояние, предшествующее некрозу – онкоз [Majno G. и Joris I., 1995; Moriguchi A. et al., 2010]. Это состояние характеризуется отеком клеток при сохранении целостности клеточной мембраны и, соответственно, без освобождения цитозольных белков в межклеточное пространство [Majno G. и Joris I., 1995; Moriguchi A. et al., 2010]. Онкоз развивается в результате нарушения работы ионных насосов и увеличения в цитоплазме концентрации  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$  [Majno G. и Joris I., 1995].

Для количественной оценки гибели кардиомиоцитов в клинической практике используют определение уровня в сыворотке крови креатинфосфокиназы (КФК), КФК-МВ и тропонин I. В экспериментах на изолированном сердце используют определение КФК или лактатдегидрогеназы

(ЛДГ). Согласно данным П.Ф. Литвицкого и соавт. [Литвицкий П.Ф. и др., 1994], уже после 10-минутной коронароокклюзии в сыворотке крови крыс отмечается достоверный подъем уровня ЛДГ, что свидетельствует о некрозе кардиомиоцитов. Согласно данным нашей лаборатории [Цибульников С.Ю., 2011], после 20-минутной коронароокклюзии и 3-часовой реперфузии соотношение зона инфаркта/область риска (ЗИ/ОР) у крыс может достигать 50%. Областью риска принято называть зону ишемии-реперфузии. Следовательно, некроз кардиомиоцитов может развиваться достаточно быстро и минимальное время, необходимое для некротической гибели, кардиомиоцитов составляет 10 мин.

Феномен апоптоза был впервые обнаружен в 1972 г группой шотландских морфологов из Абердинского Университета J. Kerr, A. Wyllie и A.R. Currie [Kerr J, et al., 1972], которые показали, что гибель клеток может происходить на фоне сохранённой целостности клеточных мембран. Они же и предложили термин «апоптоз», что в переводе с греческого означает опадение лепестков с цветов или листьев с деревьев [Kerr J. et al., 1972]. При этом наблюдается конденсация и фрагментация ядерного хроматина, уменьшение объема («сморщивание») клетки и образование так называемых апоптотических телец, представляющих собой конгломерат погибших клеточных органелл. Апоптотические тельца впоследствии фагоцитируются макрофагами. Важно отметить, что апоптоз не сопровождается воспалением [Ярилин А.А., 2001]. Апоптоз может быть инициирован как экстраклеточными, так и внутриклеточными сигналами.

В настоящий момент установлено, что экстраклеточный апоптоз связан с активацией так называемых «рецепторов смерти» (death receptors), к которым относятся рецепторы фактора некроза опухолей- $\alpha$  – TNFRs (tumor necrosis factor receptors) и рецептор Fas-лигандов – Fas-рецептор, он же Fas-антиген [Ярилин А.А., 2001; Kroemer G. et al, 2007].

Внутриклеточный запуск апоптоза инициируется изменением проницаемости митохондриальной мембраны вследствие образования двух типов пор – МРТ-поры (mitochondrial permeability transition pore) [Halestrap AP., 2010; Kroemer G. et al., 2007] и Вах/Вак-поры [Wei M.C. et al., 2001; Zhou L. и Chang D.C., 2008], где Вах – Bcl-2 associated protein X, а Вак – Bcl-2 homologous antagonist/killer. МРТ-пора интегрирована во внутреннюю и внешнюю мембрану митохондрий (Мх), её открытие приводит к падению потенциала на внутренней мембране митохондрий ( $\Delta\psi$ ), появлению проницаемости внутренней мембраны для молекул меньше 1400 Да, набуханию Мх [Halestrap AP., 2010; Kroemer G. et al., 2007]. Набухание митохондрий приводит к разрыву внешней мембраны и выходу из межмембранного пространства цитохрома С, белка АИФ (apoptosis inducing factor), эндонуклеазы G, которые индуцируют апоптоз [Halestrap AP., 2010; Kroemer G. et al., 2007]. Вах/Вак-пора интегрирована во внешнюю мембрану Мх образована олигомерами из проапоптотических белков Вах и Вак [Wei M.C. et al., 2001; Zhou L. и Chang D.C., 2008], где Вах - Bcl-2 associated protein X, а Вак - Bcl-2 homologous antagonist/killer – проапоптотический белок. МРТ-поры чувствительны к повышению уровня митохондриального  $[Ca^{2+}]_m$  и увеличению количества АФК, оба фактора индуцируют открытие МРТ-поры [Halestrap AP., 2010]. Регуляция недавно открытой Вах/Вак-поры изучена намного меньше, известно, что она регулируется проапоптотическим белком tBID (BH 3 interacting domain death agonist) [Wei M.C. et al., 2001]. Следствием образования этих пор является падение трансмембранного потенциала, выход из Мх цитохрома С и других проапоптотических факторов, вход в Мх ионов и воды, их набухание и разрыв митохондриальной мембраны.

Вышедший из Мх цитохром С связывается в цитозоле с адаптерным белком Араф1 (apoptosis protease-activating factor 1) и при использовании молекулы АТФ образует апоптосому [Kroemer G. et al., 2007; Mace P.D. и Riedl S.J. 2010]. Присоединение к апоптосоме неактивного фермента прокаспазы-9

приводит к образованию активной каспазы-9, которая, в свою очередь, активирует каспазы-3 и -7 [Movassagh M. и Foo R.S. 2008]. Каспазы-3 и -7 активируют каспаз-зависимые ДНКазы (CAD/DFF40), вызывая разрушение хроматина [Li L.Y. et al., 2001], где CAD/DFF40 - Caspase-activated DNase DNA Fragmentation Factor 40. Каспаза-3 разрушает актиновый цитоскелет [Kroemer G. et al., 2007]. Эти процессы приводят к конденсации хроматина и апоптотическому сморщиванию клетки.

Внутриклеточный запуск апоптоза регулируется балансом про- и антиапоптотических белков, большинство из которых ассоциированы с Мх. Классификация и функции этих белков подробно описаны в обзоре М.С. Wei и соавт. [Wei M.C. et al., 2001]. Интересно, что мыши, нокаутированные по гену проапоптотического белка Вах, оказались более устойчивыми к повреждению сердца при ишемии-реперфузии [Hochhauser E. et al., 2003]. У животных с гиперэкспрессией антиапоптотического белка Bcl-2 (B cell lymphoma 2) был получен аналогичный эффект [Imahashi K. et al., 2004]. Указанные факты свидетельствуют о том, что механизм «программируемой клеточной смерти» зависит от динамического равновесия про- и антиапоптотических белков.

В настоящий момент принято считать, что апоптоз является обратимым процессом, но лишь на начальном этапе. Достигнув определенной стадии (предполагают, что это активация каспазы 3 и падение  $\Delta\psi$ ), процесс апоптоза переходит так называемую «точку невозврата» и приводит к гибели клетки [Movassagh M. и Foo R.S. 2008].



## **2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Эксперименты исследования были проведены на крысах-самцах линии Вистар массой 250-300г. До проведения экспериментов животные находились в стандартных условиях вивария. При проведении экспериментов мы руководствовались рекомендациями, изложенными в Приказе МЗ СССР за № 755 от 12 августа 1977 г. Все болезненные процедуры проводили на наркотизированных животных.

### **2. 1. МОДЕЛИРОВАНИЕ ТОТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ИЗОЛИРОВАННОГО СЕРДЦА ПО ЛАНГЕНДОРФУ**

Все проведенные исследования проводились на модели изолированного перфузируемого по методу Лангендорфу сердца крысы. С помощью этой модели мы оценивали инотропные и кардиопротекторные эффекты ишемического посткондиционирования. Преимущество исследований проводимых *in vitro*, по сравнению с аналогичными работами, выполняемыми *in vivo*, заключается в том, что сердце в такой модели выведено из-под воздействия регуляторных систем организма. Это позволяет обнаружить изменения биохимических процессов и сократительной функции, зависящие только от нарушений метаболизма и структуры миокарда. В нашей работе мы использовали модель тотальной ишемии, которая позволяет полностью остановить доступ кислорода и питательных веществ к клеткам сердца, а также остановить отток метаболитов.

После наркотизации эфиром у крыс удаляли кожный покров с грудной клетки и вскрывали ее ножницами, делая три разреза: один – поперек грудины и два продольных. Пинцетом с мягкими браншами захватывали подходящие к сердцу сосуды, затем отсекали их выше места захвата. Выделенное сердце для остановки спонтанных сокращений переносили в раствор Кребса-Хензелята охлажденный до +4°C, в дальнейшем помещали в термостабилизированную

увлажненную камеру и проводили канюлирование сердца в восходящую дугу аорты, и начинали перфузию изотоническим раствором [Doring H. J. и Dehnert H., 1988]. В нашей работе мы использовали изотонический раствор Кребса-Хензеля состава (в ммоль/л): NaCl – 120; KCl – 4,8; CaCl<sub>2</sub> – 2,0; MgSO<sub>4</sub> – 1,2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,2; NaHCO<sub>3</sub> – 20; глюкоза – 10. Перфузионный раствор оксигенировали газовой смесью, содержащей 95% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub>. Для приготовления изотонического раствора Кребса-Хензеля использовали реактивы, произведенные компаниями «Sigma-Aldrich» (Сент-Луис, США) и «MP Biomedicals» (Ирвин, США).

Перфузию сердца проводили по методу Лангендорфа по открытому контуру [Doring H. J. и Dehnert H., 1988; Pepe S. et al., 1997]. Поддерживалась постоянная температура раствора на уровне +37±0,5°C, перфузионное давление – 52 мм рт. ст., pH=7,4. Изотонический Раствор Кребса-Хензеля готовился на деионизованной воде, полученной на установке “Simplicity” компании «Millipore» (Франция).

Регистрацию параметров сократимости сердца проводили с помощью латексного баллончика введенного в полость левого желудочка. Баллончик заполнялся дистиллированной водой, давление в котором поддерживалось на уровне 10-15 мм рт. ст. Измерение показателей насосной функции сердца проводили в изоволюмическом режиме с применением датчика давления SS13L (Biopac System Inc., Goleta, Калифорния, США), сопряженного с указанным баллончиком. Запись показаний осуществлялась с помощью аппарата для электрофизиологических исследований MP35 (Biopac System Inc., Goleta, США). Количественную обработку полученных данных проводили с применением программного обеспечения INSTBSL-W компании Biopac System Inc., (Goleta, США). Для снятия ЭКГ, электроды сопряженные с датчиками MP35, прикрепляли в район правого предсердия и на верхушке сердца [Driscoll P., 1981; Wong T. M. и Lee A. Y., 1987].

Блок-схема экспериментальной установки изолированного сердца представлена на рис. 1.



рис.1. Схема установки изолированного сердца.

Преимуществами используемой нами модели тотальной ишемии, являются следующие:

- 1). Полная остановка транспорта кислорода и питательных субстратов и отсутствие оттока продуктов метаболизма позволяет воспроизвести комплекс отрицательных метаболических изменений, а так же электрофизиологических изменений в миокарде, которые характерны для ишемии;
- 2). Возможность воспроизведения ишемии любой длительности;
- 3). Равномерное нарушения кровотока во всех отделах миокарда, соответственно ставящие их в одинаковые условия;
- 4). Устранение действия на сердце вегетативной нервной системы и находящихся в крови гуморальных факторов, что позволяет проводить изучение прямого действия на сердце фармакологических агентов.

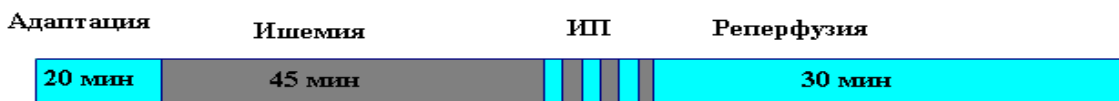
В сериях экспериментов после периода адаптации сердца мы проводили моделирование тотальной ишемии в течение 45 минут и после ишемии заканчивали эксперимент реперфузией в течение 30 минут. Хотя в эксперименте мы не можем в полной мере воспроизвести условия, которые приводят к развитию сердечно-сосудистых заболеваний, ценность такого

подхода заключается в том, что он позволяет провести изучение механизмов повреждения и защитного действия кардиотропных веществ [Aitchison K. A. et al., 2000; Kark M. et al., 2001; Yu X. C. et al., 1999].

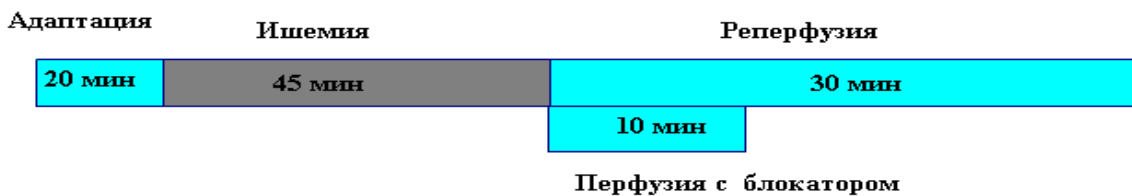
В других сериях экспериментов мы после периода адаптации сердца моделировали тотальную ишемию в течение 45 минут и заканчивали эксперимент 30 минутной реперфузией. В начале реперфузии моделировалось ишемическое посткондиционирование. Перфузию раствора Кребса-Хензелята с блокаторами проводили в первые 10 минут реперфузии. Схемы экспериментов изображена на рисунке 2.



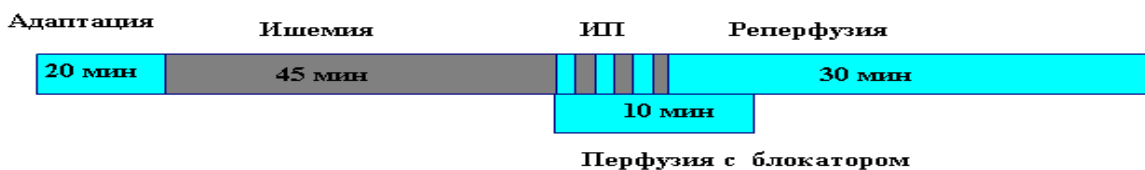
(а)



(б)



(в)



(г)

Рис. 2. Схема экспериментов, проводимых на изолированном сердце. (а) контроль, (б) ишемическое посткондиционирование, (в) контроль с блокатором, (г) ишемическое посткондиционирование с блокатором. ИП –ишемическое посткондиционирование.

Ниже представлена таблица с распределением животных по сериям экспериментов.

## Распределение животных по сериям экспериментов

№ п/п	Название серий экспериментов	Число опытов
1	Контроль: Адаптация 20 мин + ишемия (45 мин)+ реперфузия (30 мин)	364
2	Нормоксическая перфузия 10 мин без препаратов	14
3	адаптация (20 мин) + ишемия (45 мин) + реперфузия (30 мин). В начале реперфузии проводилось ишемическое посткондиционирование: 3 эпизода (реперфузия 10 сек + ишемия 10 сек).	14
4	адаптация (20 мин) + ишемия (45 мин) + реперфузия (30 мин). В начале реперфузии проводилось ишемическое посткондиционирование: 6 эпизода (реперфузия 10 сек + ишемия 10 сек).	14
5	адаптация (20 мин) + ишемия (45 мин) + реперфузия (30 мин). В начале реперфузии проводилось ишемическое посткондиционирование: 3 эпизода (реперфузия 20 сек + ишемия 20 сек).	14
6	адаптация (20 мин) + ишемия (45 мин) + реперфузия (30 мин). В начале реперфузии проводилось ишемическое посткондиционирование: 6 эпизода (реперфузия 20 сек +	14

	ишемия 20 сек).	
7	адаптация (20 мин) + ишемия (45 мин) + реперфузия (30 мин). В начале реперфузии проводилось ишемическое посткондиционирование: 3 эпизода (реперфузия 30 сек + ишемия 30 сек).	14
8	адаптация (20 мин) + ишемия (45 мин) + реперфузия (30 мин). В начале реперфузии проводилось ишемическое посткондиционирование: 3 эпизода (реперфузия 30 сек + ишемия 30 сек). Налоксон (300 нМ/л) перфузировали в течении 10 минут в начале реперфузии.	14
9	адаптация (20 мин) + ишемия (45 мин) + реперфузия (30 мин).. Налоксон (300 нМ/л) перфузировали в течении 10 минут в начале реперфузии.	14
10	адаптация (20 мин) + ишемия (45 мин) + реперфузия (30 мин). В начале реперфузии проводилось ишемическое посткондиционирование: 3 эпизода (реперфузия 30 сек + ишемия 30 сек). Норбиналторфимин (3 нМ/л) перфузировали в течении 10 минут в начале реперфузии.	14
11	адаптация (20 мин) + ишемия (45 мин) + реперфузия (30 мин). Норбиналторфимин (3 нМ/л) перфузировали в течении 10 минут в начале реперфузии.	14

12	адаптация (20 мин) + ишемия (45 мин) + реперфузия (30 мин). В начале реперфузии проводилось ишемическое посткондиционирование: 3 эпизода (реперфузия 30 сек + ишемия 30 сек). BNTX (1 нМ/л ) перфузировали в течении 10 минут в начале реперфузии.	14
13	адаптация (20 мин) + ишемия (45 мин) + реперфузия (30 мин). BNTX (1 нМ/л ) перфузировали в течении 10 минут в начале реперфузии.	14
14	адаптация (20 мин) + ишемия (45 мин) + реперфузия (30 мин). В начале реперфузии проводилось ишемическое посткондиционирование: 3 эпизода (реперфузия 30 сек + ишемия 30 сек). Налтриндол (30 нМ/л ) перфузировали в течении 10 минут в начале реперфузии.	14
15	адаптация (20 мин) + ишемия (45 мин) + реперфузия (30 мин).  Налтриндол (30 нМ/л ) перфузировали в течении 10 минут в начале реперфузии.	14
16	адаптация (20 мин) + ишемия (45 мин) + реперфузия (30 мин). В начале реперфузии проводилось ишемическое посткондиционирование: 3 эпизода (реперфузия 30 сек + ишемия 30 сек). Налтрибен (1 нМ/л ) перфузировали в течении 10 минут в начале реперфузии.	14



17	адаптация (20 мин) + ишемия (45 мин) + реперфузия (30 мин). Налтрибен (1 нМ/л ) перфузировали в течении 10 минут в начале реперфузии.	14
18	адаптация (20 мин) + ишемия (45 мин) + реперфузия (30 мин). В начале реперфузии проводилось ишемическое посткондиционирование: 3 эпизода (реперфузия 30 сек + ишемия 30 сек). глибенкламид (10 μМ/л ) перфузировали в течении 10 минут в начале реперфузии.	14
19	адаптация (20 мин) + ишемия (45 мин) + реперфузия (30 мин). глибенкламид (10 μМ/л ) перфузировали в течении 10 минут в начале реперфузии.	14
20	адаптация (20 мин) + ишемия (45 мин) + реперфузия (30 мин). В начале реперфузии проводилось ишемическое посткондиционирование: 3 эпизода (реперфузия 30 сек + ишемия 30 сек). 5-гидроксидеканоат (100 μМ/л) перфузировали в течении 10 минут в начале реперфузии.	14
21	адаптация (20 мин) + ишемия (45 мин) + реперфузия (30 мин). 5-гидроксидеканоат (100 μМ/л) перфузировали в течении 10 минут в начале реперфузии.	14
22	адаптация (20 мин) + ишемия (45 мин) + реперфузия (30 мин). В начале реперфузии проводилось ишемическое посткондиционирование: 3 эпизода (реперфузия 30 сек + ишемия 30 сек). Хелеритрин (5 μМ/л) перфузировали в течении 10 минут в начале реперфузии.	14

23	адаптация (20 мин) + ишемия (45 мин) + реперфузия (30 мин). Хелеритрин (5 $\mu\text{M}/\text{л}$ ) перфузировали в течении 10 минут в начале реперфузии.	14
24	адаптация (20 мин) + ишемия (45 мин) + реперфузия (30 мин). В начале реперфузии проводилось ишемическое посткондиционирование: 3 эпизода (реперфузия 30 сек + ишемия 30 сек). Роттлерин (1 $\mu\text{M}/\text{л}$ ) перфузировали в течении 10 минут в начале реперфузии.	14
25	адаптация (20 мин) + ишемия (45 мин) + реперфузия (30 мин). Роттлерин (1 $\mu\text{M}/\text{л}$ ) перфузировали в течении 10 минут в начале реперфузии.	14
26	адаптация (20 мин) + ишемия (45 мин) + реперфузия (30 мин). В начале реперфузии проводилось ишемическое посткондиционирование: 3 эпизода (реперфузия 30 сек + ишемия 30 сек). Вортманин (100 нМ/л) перфузировали в течении 10 минут в начале реперфузии.	14
27	адаптация (20 мин) + ишемия (45 мин) + реперфузия (30 мин). Вортманин (100 нМ/л) перфузировали в течении 10 минут в начале реперфузии.	14

В проведенной работе было проведено 27 серий экспериментов и использовано 728 животных.

## **2.2 МОДЕЛИРОВАНИЕ ИШЕМИЧЕСКОГО ПОСТКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ НА МОДЕЛИ ИЗОЛИРОВАННОГО СЕРДЦА**

В контрольной серии по окончании 20-минутной адаптации сердца к условиям нормоксической перфузии его подвергнут 45-минутной тотальной ишемии и 30-минутной реперфузии. Ишемическое посткондиционирование моделировали с помощью нескольких сеансов ишемии на фоне реперфузии. Были использованы следующие модели посткондиционирования: (1) три сеанса реперфузии (10 секунд) и ишемии (10 секунд), цикл – 20 секунд; (2) шесть циклов реперфузии (10 секунд) и ишемии (10 секунд), цикл – 20 секунд; (3) три сеанса реперфузии (20 секунд) и ишемии (20 секунд), цикл – 40 секунд; (4) шесть циклов реперфузии (20 секунд) и ишемии (20 секунд), цикл – 40 секунд; (5) три сеанса реперфузии (30 секунд) и ишемии (30 секунд), цикл – 60 секунд. В первые 10 минут реперфузии сердце перфузировали раствором Кребса-Хензelayта, содержащим фармакологические агенты.

## **2.3 РЕГИСТРАЦИЯ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ИЗОЛИРОВАННОГО СЕРДЦА**

Параметры сократительной функции изолированного сердца записывались в течение 10 секунд до моделирования ишемии и на 5-й, 15-й и 30-й минутах реперфузии. В начале периода реперфузии осуществляли запись в течение 10 минут.

Сокращения сердца отображались в виде графиков в режиме реального времени и для дальнейшей обработки сохранялись на жесткий диск компьютера.

Характеристика измеряемых параметров сократимости изолированного сердца.

ЧСС – частота сердечных сокращений (уд/мин) – число сокращений сердца за одну минуту;

ДРЛЖ – давление, развиваемое левым желудочком изолированного сердца (мм рт. ст.) – разница между систолическим и диастолическим давлением [Sargent C. A. et al., 1994]. Данный показатель характеризует силу сокращений изолированного сердца. Снижение этого параметра при постишемической реперфузии является одним из важнейших показателей повреждения сердечной мышцы;

КДД – конечное диастолическое давление (выражается в % от исходного) необходимо для оценки величины расслабления миокарда и характеризует контрактуру сердца. Так как контрактура полностью зависит от уровня  $Ca^{2+}$  в миоплазме, то конечное диастолическое давление можно интерпретировать как косвенный показатель концентрации ионов  $Ca^{2+}$  в цитоплазме кардиомиоцита [Капелько В.И. и Горина М.С., 1987; Капелько В.И. и др., 1988].

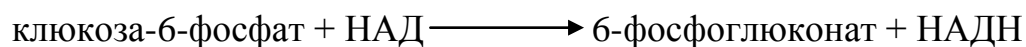
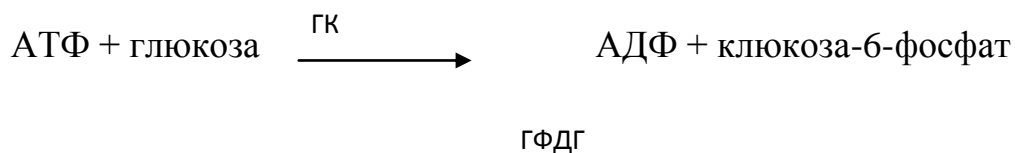
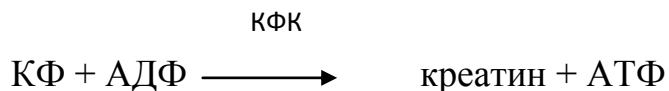
МСС – максимальная скорость сокращения (мм рт. ст./с) рассчитывается как максимум производной первого порядка от кривой давления в левом желудочке.

МСП – максимальная скорость расслабления (мм рт. ст./с) – характеризует состояние процесса расслабления миокарда

## **2.4 ОЦЕНКА КАРДИОПРОТЕКТОРНОГО ЭФФЕКТА**

Кардиопротекторный эффект оценивали по уровню активности креатинфосфокиназы (КФК) в оттекающем от сердца перфузате за весь период реперфузии.

Активность КФК в перфузате мы определяли с помощью коммерческих энзиматических наборов фирмы "Analiticon Biotechnologies AG" (Германия). Метод основан на увеличении поглощения света длиной 340 нм, которое строго пропорционально активности КФК в образце, добавляемого в кювету с инкубационной смесью. Это трехступенчатый метод:



В состав инкубационной среды входит глюкоза, гексокиназа (ГК), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (ГФДГ) и никотинамиддинуклеотид (НАД<sup>+</sup>). Полученная на первом этапе АТФ вступает в реакцию фосфорилирования глюкозы. Образовавшийся при этом глюкозо-6-фосфат на третьем этапе принимает участие в восстановлении НАД<sup>+</sup> до НАДН. Следовательно, скорость образования НАДН, которая измеряется спектрофотометрически при длине волны  $\lambda=340\text{нм}$ , пропорциональна активности КФК.

В термостатируемую кювету вносили 1 мл реакционной смеси и грели в течение 2 минут. После этого добавляли 0,1 мл перфузата и инкубировали при температуре 30°C, проводя измерения оптической плотности на 3-й и 5-й минуте от начала инкубации. Активность КФК вычисляли по формуле:

$$KФК\left(\frac{\text{мкмоль}NADH}{\text{мин} \times \text{л}}\right) = \frac{(A_{нач} - A_{конеч}) \times V \times 10000}{6,22 \times P \times 2},$$

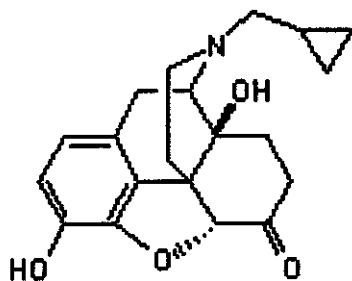
$A_{нач}$  – оптическая плотность на 3 минуте инкубации пробы,  $A_{конеч}$  – оптическая плотность на 5 минуте инкубации пробы,  $V$  - общий объем (мл),  $P$  – объем пробы (мл), 6,22 – коэффициент молярной экстинкции НАДН при 340 нм, 1000 - коэффициент пересчета на литр. Оптическую плотность образцов

регистрировали на спектрофотометре Smart Spec PLus (фирма «Bio-Rad», США) при длине волны 340 нм.

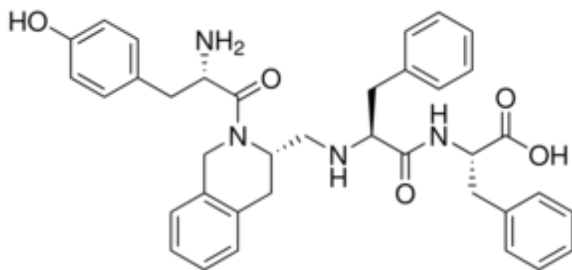
## 2.5 ХАРАКТЕРИСТИКА ИСПОЛЬЗОВАННЫХ БЛОКАТОРОВ

### 2.5.1 БЛОКАТОРЫ ОПИОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

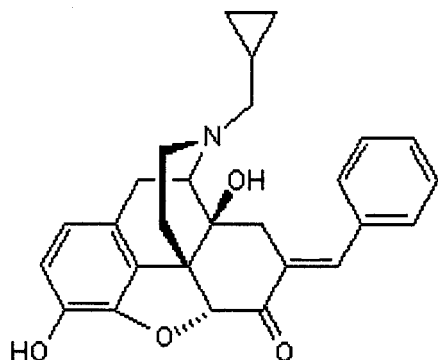
Неселективный блокатор всех типов опиоидных рецепторов налоксон использовали в конечной концентрации 300 нМ/л [Маслов Л.Н. и др., 2006; Munday M.K. et al., 2000]. Он был синтезирован в компании «Sigma-Aldrich» (St. Louis, США).



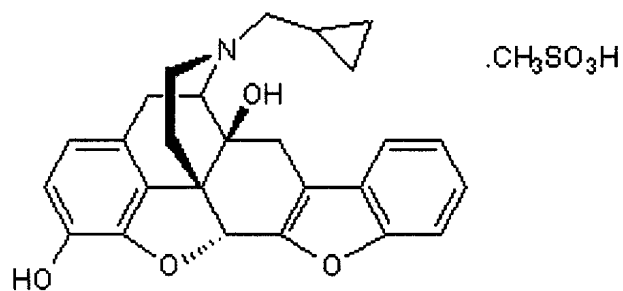
Селективный блокатор  $\delta$ -рецепторов TIPP[ $\psi$ ] (*H-Tyr-Tic*  $\psi$ [CH<sub>2</sub>-NH]Phe-Phe-OH) использовали в конечной концентрации 30 нМ/л [Schiller P. W. et al., 1993]. Он был синтезирован компанией “Multiple Peptide Systems”, (San Diego, США).



Селективный блокатор  $\delta_1$ -опиоидных рецепторов 7-Benzylidenenaltrexone maleate (BNTX) в конечной концентрации 1 нМ/л [Sanchez-Blazquez P. et al., 1999; Portoghese P. S. et al., 1992] Синтезирован компанией Tocris Bioscience (Bristol, Великобритания).

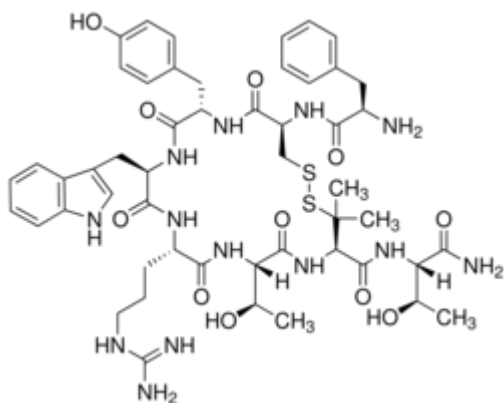


Селективный блокатор  $\delta_2$ -опиоидных рецепторов налтрибен:  $C_{26}H_{25}NO_4 \cdot CH_4O_3S \cdot x H_2O$  (Naltriben) растворяли в 0,1 мл DMSO. Использовали в конечной концентрации 1 нМ/л [Buzas V. et al., 1994; Sanchez-Blazquez P. et al., 1999; Sofuoglu M. et al., 1992; Tang T. et al., 1994] Он был синтезирован компанией «Tocris Bioscience» (Bristol, Великобритания).

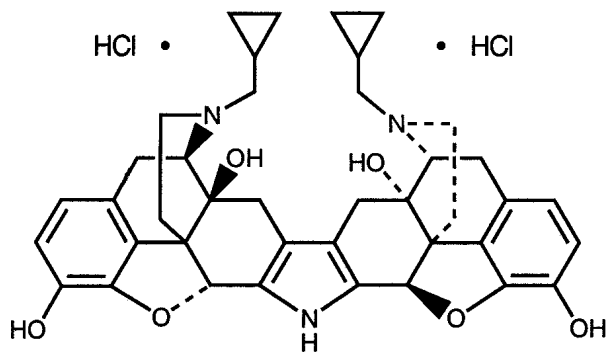


Блокатор  $\mu$ -опиоидных рецепторов СТАР (H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Arg-Thr-Pen-Thr-NH<sub>2</sub>) [ Garcia-Barrado M.J. et al., 2002; Ortiz-Miranda S.I. et al., 2003;

Scherrer G. et al., 2004] использовали в конечной концентрации 100 нМ/л. Он был синтезирован компанией “Multiple Peptide Systems”, (San Diego, США).



Для инактивации κ-ОР использовали блокатор κ-опиоидных рецепторов норбиналторфимина гидрохлорид в конечных концентрации 3 нМ/л [Heijna M.H., et al., 1990]. Он был синтезирован в компании «Sigma-Aldrich» (St. Louis, США)

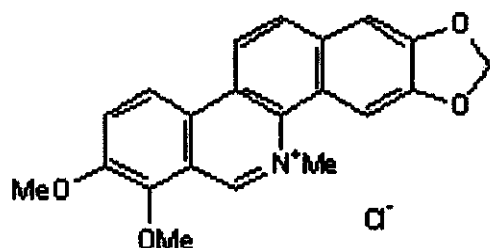




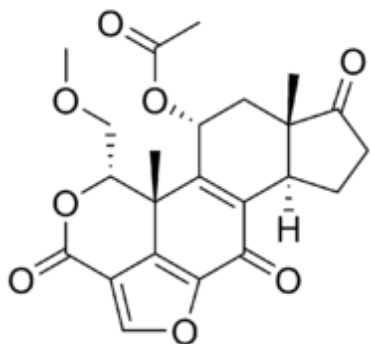
## 2.5.2 БЛОКАТОРЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ РОЛИ ПРОТЕИНАКИАЗЫ C, P13-КИНАЗЫ В РЕАЛИЗАЦИИ КАРДИОТРОПНЫХ ЭФФЕКТОВ ИШЕМИЧЕСКОГО ПОСТКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ

Блокатор протеинкиназы C (ПКС) хелеритрина хлорид: 1,2-Dimethoxy-12-methyl[1,3]benzodioxolo[5,6-c]phenanthridinium chloride (Chelerythrine chloride) использовали в конечной концентрации 5  $\mu\text{M}/\text{л}$  [Fryer R. M. et al., 1999; Hedayati N. et al., 2003; Zhu Z., et al. 2000]. Блокатор ПКС предварительно растворяли в DMSO. Перфузия с хелеритрином велась в течение 10 мин, начиная с момента начала реперфузии.

Хелеритрин был синтезирован в компании «LCLabs Company» (Woburn, США).

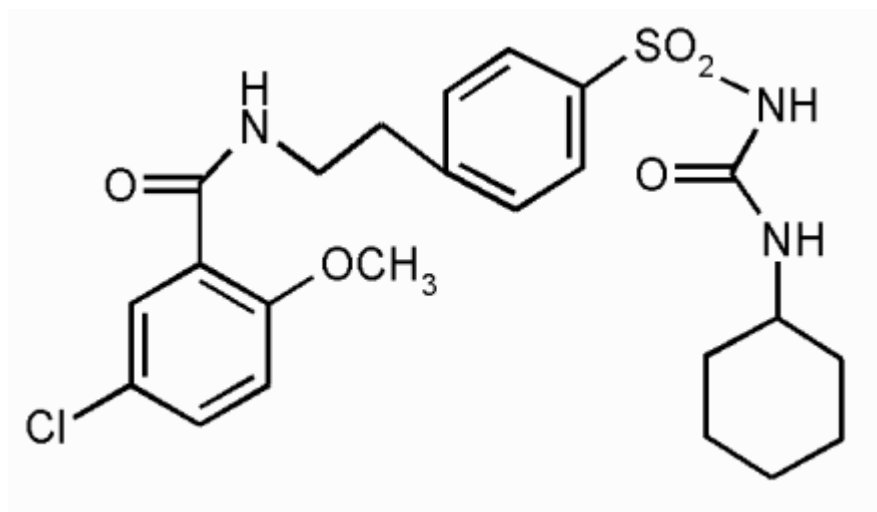


Блокатор P13-киназы вортманнин использовали в конечной концентрации 100 нМ/л. Вортманнин предварительно растворяли в DMSO. Перфузия с вортманнином велась в течение 10 мин, начиная с момента начала реперфузии [Powis G. et al., 1994]. Он был синтезирован в компании «Sigma-Aldrich» (St. Louis, США).



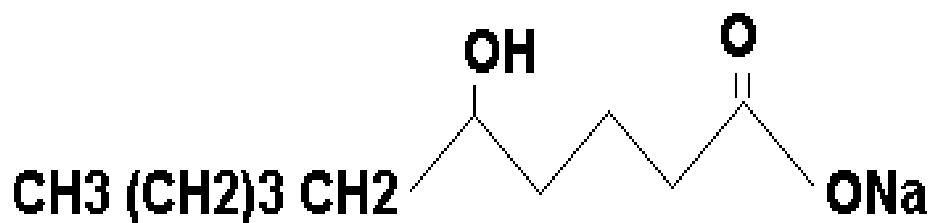
### 2.5.3 БЛОКАТОРЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ РОЛИ $K_{ATP}$ – КАНАЛОВ В РЕАЛИЗАЦИИ КАРДИОТРОПНЫХ ЭФФЕКТОВ ИШЕМИЧЕСКОГО ПОСТКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ

Для фармакологического изучения роли  $K_{ATP}$  – каналов в реализации кардиотропных эффектов ИП применялся блокатор сарколеммальных и митохондриальных  $K_{ATP}$ -каналов глибенкламид, который был предварительно растворен в DMSO и использован в конечной концентрации 10  $\mu$ M/л [Burley D.S., Baxter G.F., 2007; Nishida H., 2009]. Перфузия с глибенкламидом продолжалась в течение 10 мин.



Блокатор митохондриальных  $K_{ATP}$ -каналов 5-гидроксидеканоат (5-ГД) использовали в конечной концентрации 100  $\mu$ M/л [Burley D.S., Baxter G.F., 2007]. Препарат растворялся в растворе Кребса-Хензелейта. 5-

Гидроксидеканоат добавлялся в перфузионный раствор в момент начала реперфузии. Перфузия с 5-ГД велась в течение 10 мин.



## 2. 6. МЕТОДЫ СТАТИСТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ данных производился с помощью пакетов программы STATISTICA 6.0. Для выявления межгрупповых различий использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Статистически значимыми считались различия при  $p < 0,05$ . Результаты всех экспериментов приведены в таблицах в виде  $X \pm m$ , где  $X$  – среднее,  $m$  – стандартная ошибка среднего,  $n$  – объем анализируемой подгруппы,  $p$  – достигнутый уровень значимости.

Параметры сократительной функции миокарда выражали в абсолютных значениях (мм рт. ст., мм рт.ст./с, уд/мин). Конечное диастолическое давление (КДД) выражали в процентах относительно исходного уровня, принятого за 100%.

### **3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

#### **3.1 КАРДИОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ ИШЕМИЧЕСКОГО ПОСТКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ**

Для исследования кардиопротекторного эффекта ишемического посткондиционирования было необходимо подобрать оптимальную модель с максимальным кардиопротекторным эффектом посткондиционирования. Были использованы пять моделей ишемического посткондиционирования: (1) 3 цикла реперфузии (10 секунд) и ишемии (10 секунд), цикл – 20 секунд; (2) 6 сеансов реперфузии (10 секунд) и ишемии (10 секунд), цикл – 20 секунд; (3) 3 цикла реперфузии (20 секунд) и ишемии (20 секунд), цикл – 40 секунд; (4) 6 сеансов реперфузии (20 секунд) и ишемии (20 секунд), цикл – 40 секунд; (5) 3 цикла реперфузии (30 секунд) и ишемии (30 секунд), цикл – 60 секунд (Рисунок 3). Для исключения возможности влияния сезонных колебаний на результаты проводимых экспериментов, проводился контрольный эксперимент (ишемия-реперфузия) и в этот же день опыт по посткондиционированию.

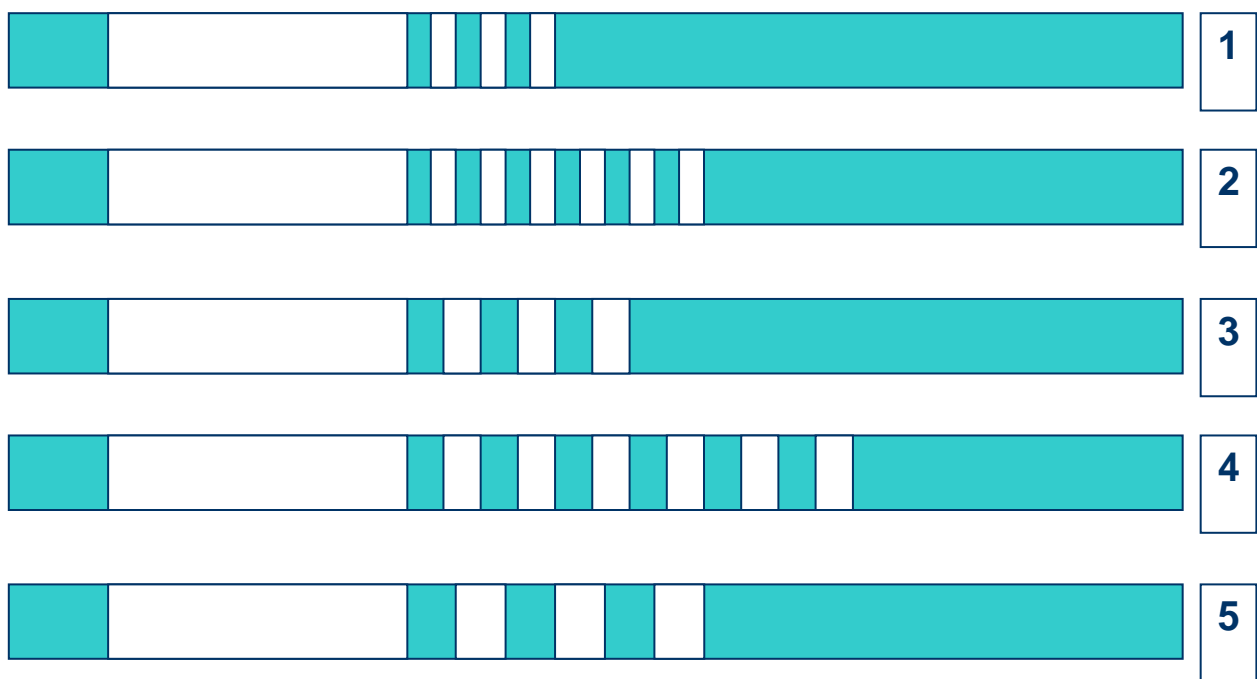


Рис. 3 модели посткондиционирования

(1) 3 сеанса реперфузии (10 секунд) и ишемии (10 секунд), цикл – 20 секунд; (2) 6 циклов реперфузии (10 секунд) и ишемии (10 секунд), цикл – 20 секунд; (3) 3 сеанса реперфузии (20 секунд) и ишемии (20 секунд), цикл – 40 секунд; (4) 6 циклов реперфузии (20 секунд) и ишемии (20 секунд), цикл – 40 секунд; (5) 3 сеанса реперфузии (30 секунд) и ишемии (30 секунд), цикл – 60 секунд.

Как показано на рис. 4, три сеанса реперфузии (10 секунд) и ишемии (10 секунд) не оказывали, достоверного влияния по сравнению с контролем на уровень КФК в перфузате. Так же не удалось продемонстрировать повышение толерантности сердца к действию реперфузии и с применением 6 циклов реперфузии и ишемии (РИ) по 20 секунд. Ишемическое посткондиционирование которое проводилось с применением 3 циклов РИ по 40 секунд достоверно снижало уровень КФК в перфузате на 19% по отношению к контролю. Использование 6 сеансов РИ длительностью по 40 секунд получилось зарегистрировать снижение уровня КФК на 29% по сравнению с группой контроля (рис. 4). Максимальный кардиопротекторный эффект ишемического посткондиционирования мы получили при проведении 3 циклов

реперфузии-ишемии по 60 секунд. В данном случае нами было показано, что уровень КФК в перфузате был на 32% ниже, чем в контрольной группе (рис. 4).

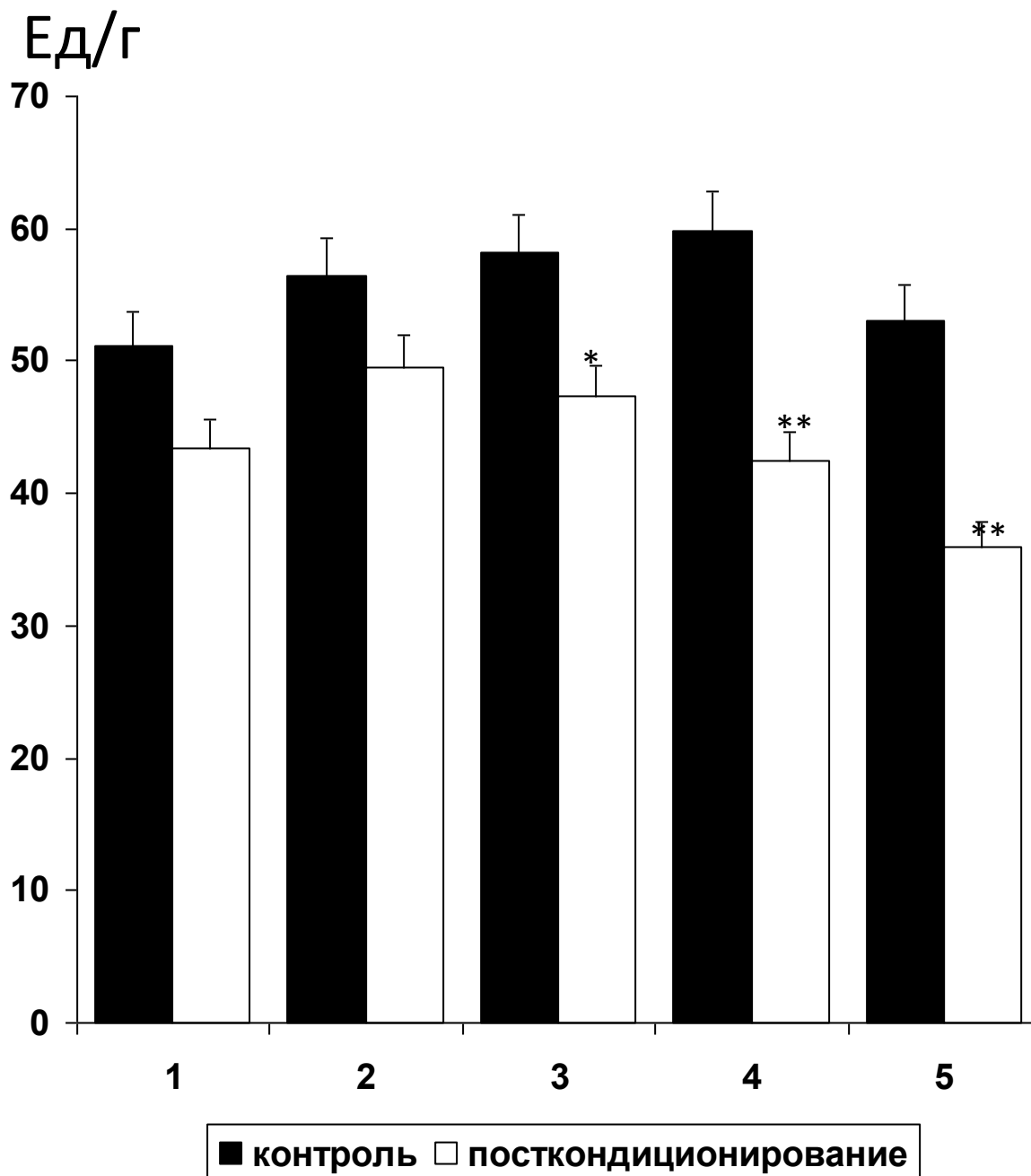


Рис. 4. Активность креатинфосфокиназы в перфузионном растворе после ишемического посткондиционирования: (1) 3 сеанса реперфузии (10 секунд) и ишемии (10 секунд), цикл – 20 секунд; (2) 6 циклов реперфузии (10 секунд) и ишемии (10 секунд), цикл – 20 секунд; (3) 3 сеанса реперфузии (20 секунд) и ишемии (20 секунд), цикл – 40 с; (4) 6 циклов реперфузии (20 секунд) и ишемии (20 секунд), цикл – 40 секунд; (5) 3 сеанса реперфузии (30 секунд) и ишемии (30 секунд), цикл – 60 секунд.

Достоверность относительно аналогичных значений в контроле: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$

Как показано на рис. 5, в контрольной группе спустя 5 минут после 45-минутной ишемии ДРЛЖ составляло 13% от исходного значения. В случае применения 3 циклов РИ изменение ДРЛЖ была практически идентичной. В группе контроля ЧСС через 5 минут от начала реперфузии снижалось на 52% от исходного значения (рис. 6). Когда к сердцу было применено кондиционирование, снижение ЧСС составило 52%. На 5-минуте реперфузии в группе контроля КДД было выше исходной величины в 5,5 раза (рис. 7). В группе посткондиционирования КДД увеличивалось в 4,5 раза. Различия между группами по КДД оказались статистически не достоверны. Следовательно, ИП с помощью 3 циклов РИ по 20 секунд препятствует формированию реперфузионной контрактуры, но не оказывает достоверного эффекта на ЧСС, ДЛРЖ.

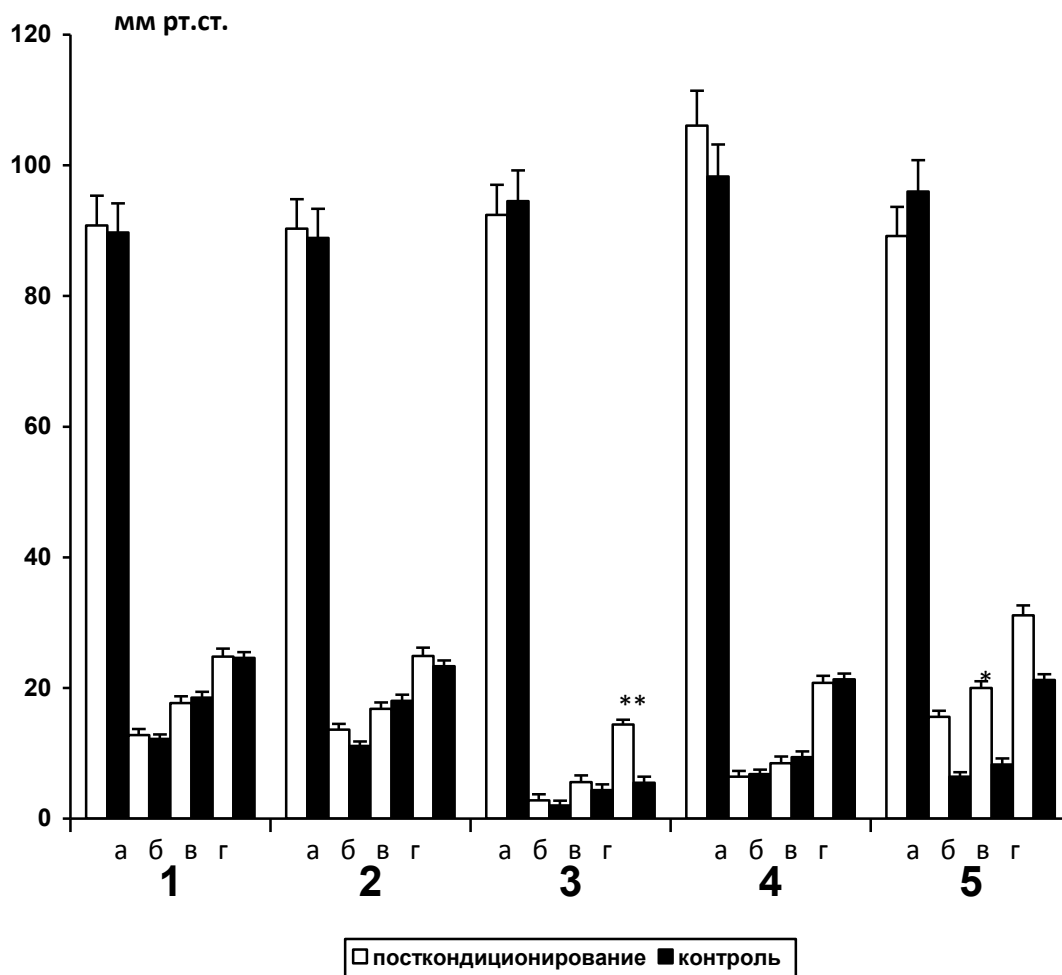


Рис.5. Давление развиваемое левым желудочком после ишемического посткондиционирования: (1)3 сеанса реперфузии (10 секунд) и ишемии (10 секунд), цикл – 20 секунд; (2) 6 циклов реперфузии (10 секунд) и ишемии (10 секунд), цикл – 20 секунд; (3) 3 сеанса реперфузии (20 секунд) и ишемии (20 секунд), цикл – 40 секунд; (4) 6 циклов реперфузии (20 секунд) и ишемии (20 секунд), цикл – 40 секунд; (5) 3 сеанса реперфузии (30 секунд) и ишемии (30 секунд), цикл – 60 секунд. а – 20 минут адаптации; б – 5 минут реперфузии; в – 15 минут реперфузии; г – 30 минут реперфузии.

Достоверность относительно аналогичных значений в контроле: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ .



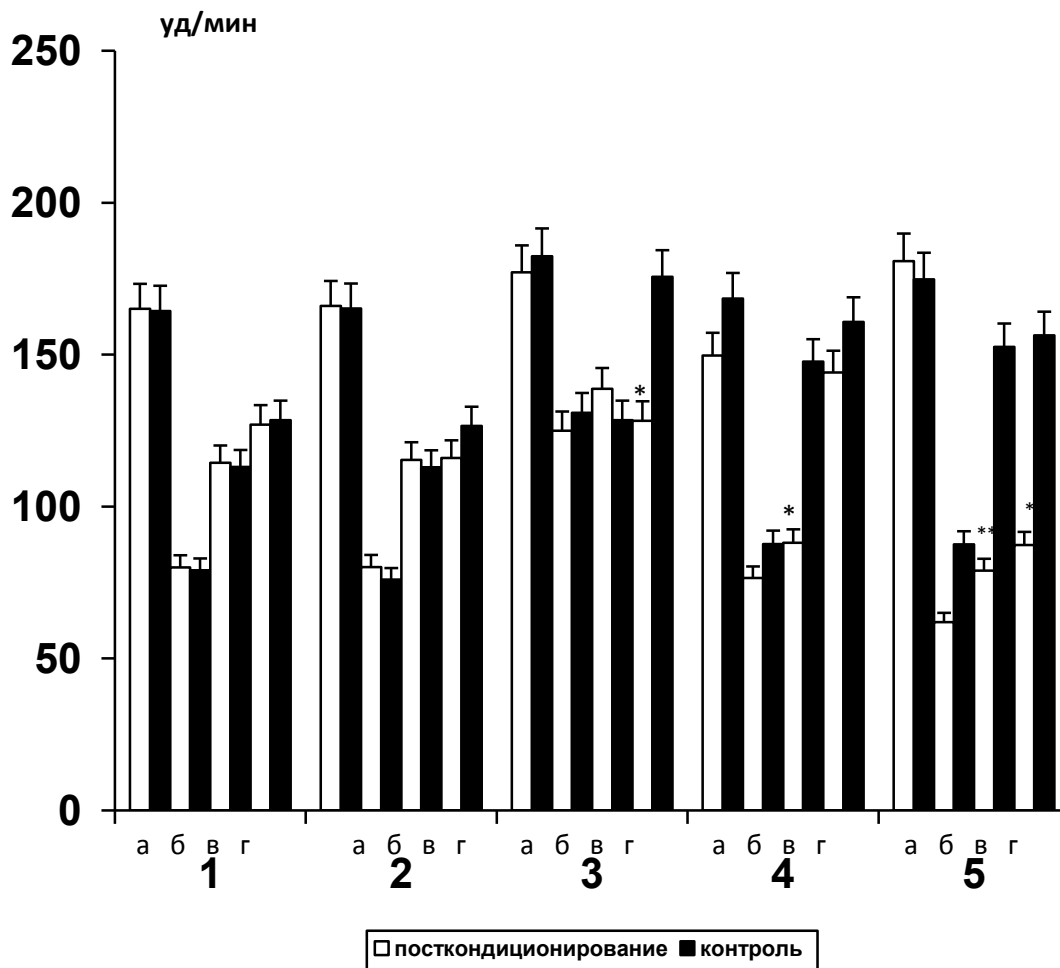


Рис. 6. Частота сердечных сокращений после ишемического посткондиционирования: (1) 3 сеанса реперфузии (10 секунд) и ишемии (10 секунд), цикл – 20 секунд; (2) 6 циклов реперфузии (10 секунд) и ишемии (10 секунд), цикл – 20 секунд; (3) 3 сеанса реперфузии (20 секунд) и ишемии (20 секунд), цикл – 40 секунд; (4) 6 циклов реперфузии (20 секунд) и ишемии (20 секунд), цикл – 40 секунд; (5) 3 сеанса реперфузии (30 секунд) и ишемии (30 секунд), цикл – 60 секунд. а – 20 минут адаптации; б – 5 минут реперфузии; в – 15 минут реперфузии; г – 30 минут реперфузии.

Достоверность относительно аналогичных значений в контроле: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$

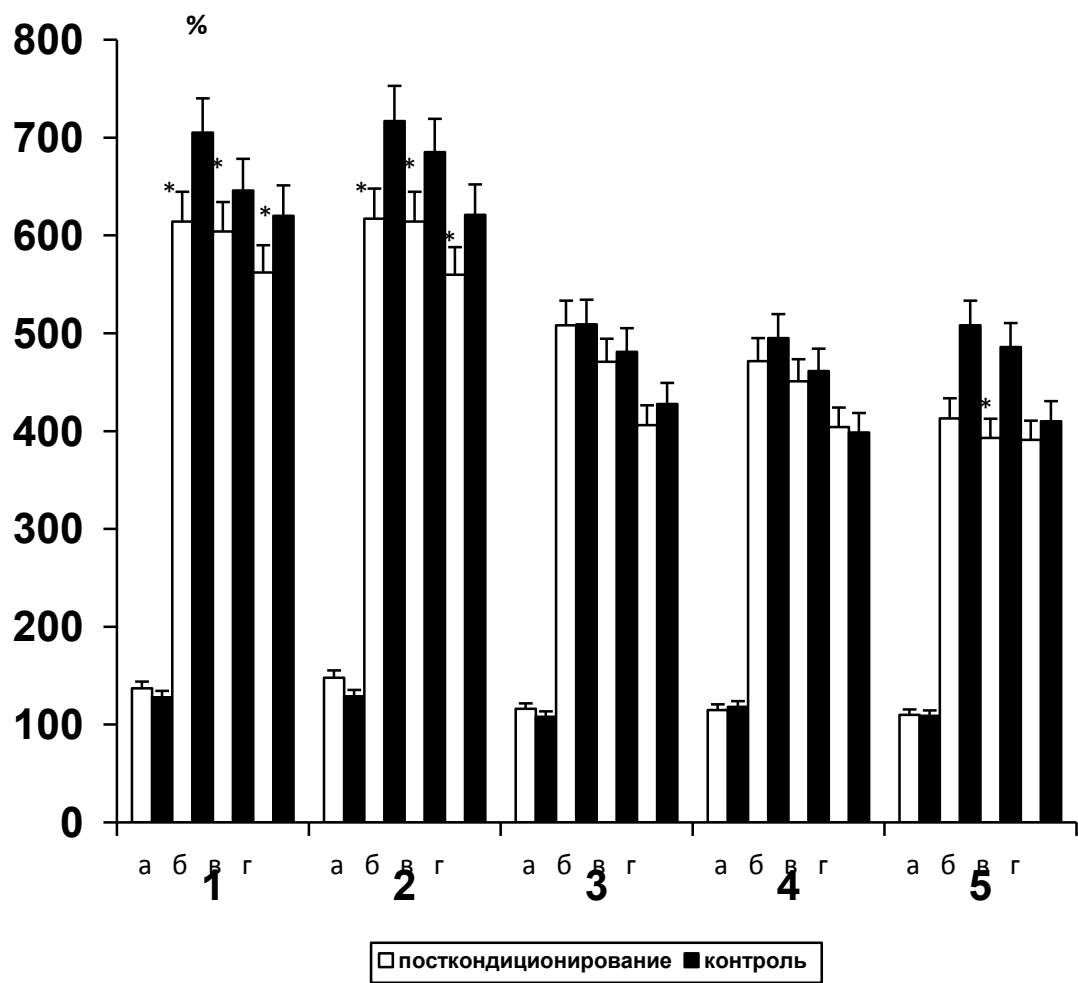


Рис.7. Конечное диастолическое давление после ишемического посткондиционирования: (1)3 сеанса реперфузии (10 секунд) и ишемии (10 секунд), цикл – 20 секунд; (2) 6 циклов реперфузии (10 секунд) и ишемии (10 секунд), цикл – 20 секунд; (3) 3 сеанса реперфузии (20 секунд) и ишемии (20 секунд), цикл – 40 секунд; (4) 6 циклов реперфузии (20 секунд) и ишемии (20 секунд), цикл – 40 секунд; (5) 3 сеанса реперфузии (30 секунд) и ишемии (30 секунд), цикл – 60 секунд. а – 20 минут адаптации; б – 5 минут реперфузии; в – 15 минут реперфузии; г – 30 минут реперфузии.

Достоверность относительно аналогичных значений в контроле: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$

В следующей серии экспериментов нами было показано, что в контроле на 5 минуте реперфузии ДЛРЖ составляет 12% от исходной величины (рис. 5). Если было проведено посткондиционирование сердца с помощью 6 циклов РИ по 20 секунд, ДЛРЖ снижалось на 85%. В контроле через 5 минут реперфузии ЧСС снижалось в 2,2 раза относительно исходной величины, в группе

посткондиционирования этот показатель уменьшался в 2 раза (рис. 6). В группе контроля КДД увеличивалось в 5,5 раза. Для сердец, подвергшихся ИП, этот показатель повышался в 4,2 раза (рис. 7). Различия между группами по КДД оказались достоверны статистически. Полученные нами данные говорят о том, что посткондиционирование с помощью 6 циклов РИ по 20 секунд уменьшает КДД, но не оказывает действия на реперфузионное понижение силы и частоты сокращений сердца.

На рисунке 6, видно, что в группе контроля через 5 минут после начала реперфузии ДЛРЖ составляет 2% от исходного значения. Такой же показатель был характерен сердец, подвергшихся посткондиционированию с помощью трёх циклов по 40 секунд. Однако, через 30 минут реперфузии в контроле ДЛРЖ было равно 5,8% от исходной величины, а в группе посткондиционирования – 15,5%. Различия между исследуемыми группами были достоверны статистически. Через 5 минут реперфузии в контроле и в группе посткондиционирования выявилась выраженная брадикардия. Через 30 минут в группе контроля отмечалось восстановление сердечного ритма, а в группе посткондиционирования восстановления ритма не наблюдалось (рис. 6). После ишемии-реперфузии в обеих группах было зафиксировано практически идентичное увеличение КДД (рис. 7). Следовательно, ИП с помощью 3 циклов РИ по 40 секунд увеличивает силу сокращений сердца, но не оказывает достоверного эффекта на КДД. К сожалению, посткондиционирование приводило к усугублению реперфузионной брадикардии.

Как показано на рис. 5 и рис 7, посткондиционирование с помощью 6 сеансов реперфузии-ишемии по 40 секунд не оказывало достоверного эффекта на реперфузионные значения ДЛРЖ и КДД, но приводило к усугублению реперфузионной брадикардии (рис. 6). Следовательно, ИП с помощью шести циклов РИ по 40 секунд не оказывает положительного эффекта на насосную функцию изолированного сердца.

При использовании 3 циклов РИ по 60 секунд на 15-ой минуте реперфузии отмечалось увеличение в 2,4 раза ДРЛЖ по сравнению с контрольной группой (рис.5). Использование этой модели посткондиционирования приводило к снижению КДД 15-ой минуте реперфузии (Рис. 7). К нашему великому сожалению, посткондиционирование так же приводило к замедлению восстановления ЧСС. Если на 5-ой минуте реперфузии разницы между контролем и посткондиционированием по ЧСС нам выявить не удалось, то на 15 и 30-ой минуте реперфузии в контрольной группе наблюдалось увеличение ЧСС, а в группе посткондиционирования ЧСС практически не изменялось и оставалось на том же уровне. Из этого следует, что посткондиционирование с использованием 3 циклов РИ по 60 секунд показывает транзиторный положительный инотропный эффект, но в свою очередь снижает скорость нормализации сердечного ритма.

Следовательно, повышения толерантности сердца к реперфузионным повреждениям удаётся добиться только с помощью циклов реперфузии-ишемии продолжительностью по 40 – 60 секунд. Мы полагаем, что имеет место быть пороговая по времени реперфузия-ишемия, которая запускает сигнальный механизм посткондиционирования. Этот порог представляется нам как цикл реперфузии-ишемии продолжительностью которого не превышает 40 с. Максимальный кардиопротекторный эффект мы зарегистрировали при применении 3 сеансов реперфузии (30 секунд) и ишемии (30 секунд).

Эффект посткондиционирования на насосную функцию сердца и сердечный ритм во многом зависит от выбранной модели посткондиционирования. Использование нескольких циклов РИ продолжительностью по 20 секунд не влияет на ДРЛЖ, но снижает величину реперфузионной контрактуры на протяжении всего реперфузионного периода. Посткондиционирование с помощью трёх циклов РИ по 40 секунд способствует восстановлению ДРЛЖ в реперфузионном периоде, но не влияет на КДД и

замедляет восстановление нормального сердечного ритма. Шесть циклов РИ по 40 секунд не влияют на ДЛРЖ и КДД, но препятствуют восстановлению ЧСС в реперфузионном периоде. Посткондиционирование с помощью трёх циклов РИ по 60 секунд способствует увеличению силы сокращений сердца, уменьшает контрактуру, но эти эффекты носят транзиторный характер и сопровождаются замедлением восстановления нормального сердечного ритма.

Все дальнейшие исследования проводились с использованием модели номер 5 (3 цикла реперфузии (30 секунд) и ишемии (30 секунд), цикл – (60 секунд) так как его применение показало наиболее выраженный кардиопротекторный эффект.

### **3.2 РОЛЬ ОПИОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В РЕАЛИЗАЦИИ КАРДИОПРОТЕКТОРНОГО ЭФФЕКТА ПОСТКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ ИЗОЛИРОВАННОГО ПЕРФУЗИРУЕМОГО СЕРДЦА.**

Как показано на рисунке 8, блокада ОР неселективным антагонистом опиоидных рецепторов налоксоном в конечной концентрации 300 нМ/л устраняла кардиопротекторный эффект ИП. Активность КФК в этом случае оказалась идентична показателю контрольной группы. Это говорит о том, что опиоидные рецепторы принимают участие в реализации кардиопротекторного эффекта посткондиционирования. Предварительная блокада  $\mu$ -ОР селективным блокатором СТАР в конечной концентрации 100 нМ/л не повлияла на кардиопротекторный эффект ИП. Следовательно,  $\mu$ -ОР не принимают участия в реализации кардиопротекторного эффекта ИП. Добавление в перфузионный раствор антагониста  $\kappa$ -ОР норбиналторфимины в конечной концентрации 3 нМ/л так же не сказалось на кардиопротекторном эффекте ИП. Следовательно,  $\kappa$ -ОР не участвуют в механизме кардиопротекторного эффекта ИП. При использовании смешанного антагониста  $\delta_1$ - и  $\delta_2$ -рецепторов налтриндола в конечной концентрации 30 нМ/л защитный эффект ИП также не удалось выявить. Эти данные свидетельствуют о том, что  $\delta$ -ОР принимают участие в формировании кардиопротекторного эффекта ИП. Дельта-ОР подразделяются на два субтипа:  $\delta_1$ -ОР и  $\delta_2$ -ОР, и дальнейшие эксперименты позволили выявить роль этих субтипов в кардиопротекции. Оказалось, что на фоне блокады  $\delta_1$ -ОР селективным антагонистом BNTX в конечной концентрации 1 нМ/л толерантность сердца к патогенному действию реперфузии после посткондиционирования не проявлялась. Применение селективного антагониста  $\delta_2$ -рецепторов налтрибена в конечной концентрации 1 нМ/л не повлияло на кардиопротекторный эффект ИП. Полученные данные свидетельствуют о том, что в реализации кардиопротекторного эффекта ИП важную роль играют  $\delta_1$ -ОР.

В ходе проведенных исследований нами было показано, что блокада  $\delta_1$ -рецепторов устраняла кардиопротекторный эффект ИП, а блокада  $\delta_2$ -рецепторов не влияла на уровень креатинфосфокиназы в перфузате, оттекающем от сердца за весь период реперфузии, после посткондиционирования. Следовательно, в механизме толерантности сердца к повреждающему действию реперфузии после ишемического посткондиционирования определяющее значение принадлежит активации  $\delta_1$ -ОР.

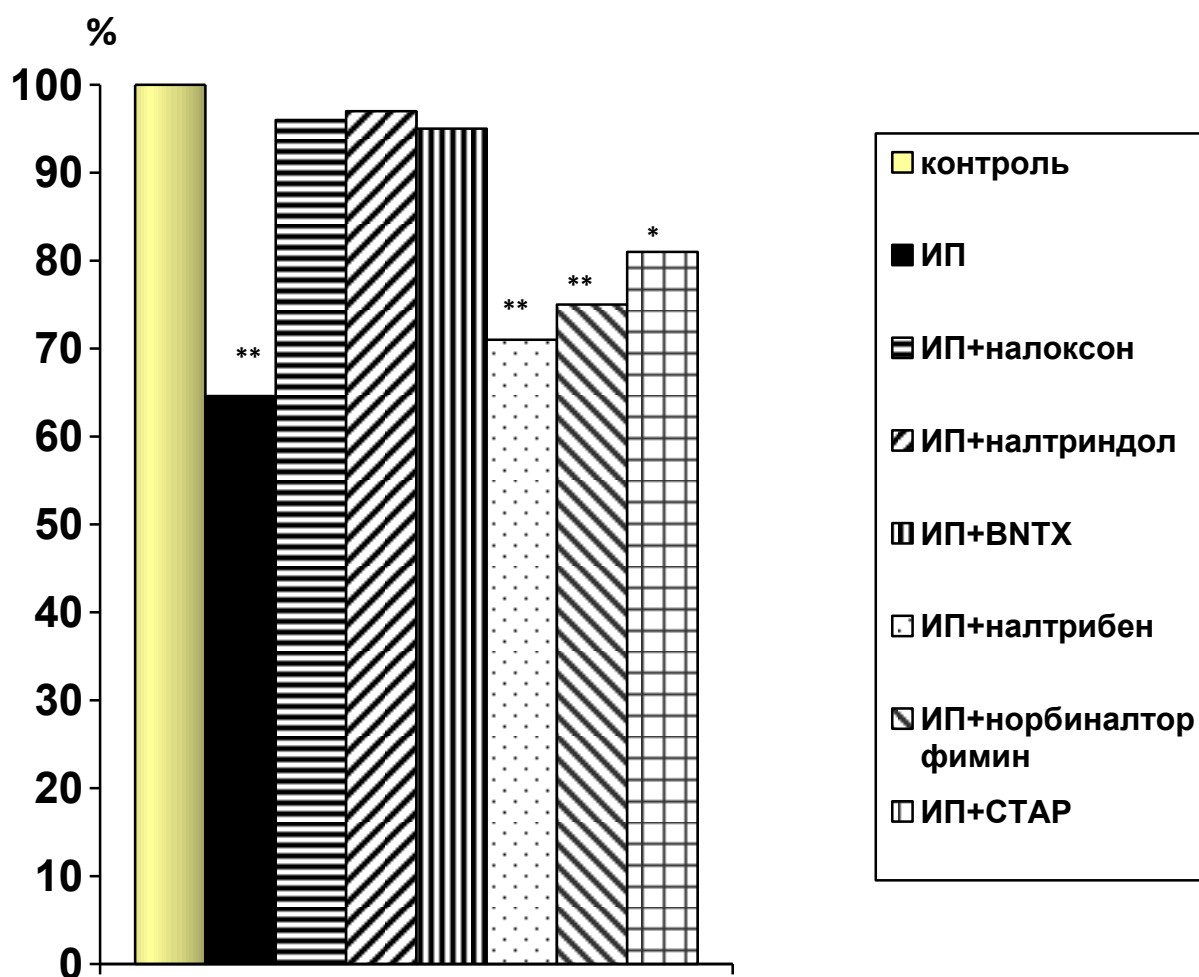


Рис. 8. Активность креатинфосфокиназы в перфузионном растворе после ишемического посткондиционирования и блокады опиоидных рецепторов.

Достоверность относительно аналогичных значений в контроле: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$

На рисунке 9 представлены результаты экспериментов на сердцах, которые подвергались воздействию ишемии-реперфузии без посткондиционирования. Как видно из рисунка 9, сами блокаторы достоверного влияния на уровень КФК в перфузате не оказывали. Этот факт говорит о том, что эндогенные агонисты опиоидных рецепторов не участвуют в регуляции устойчивости сердца к действию ишемии и реперфузии, если эксперимент проводился на непосткондиционированных сердцах.

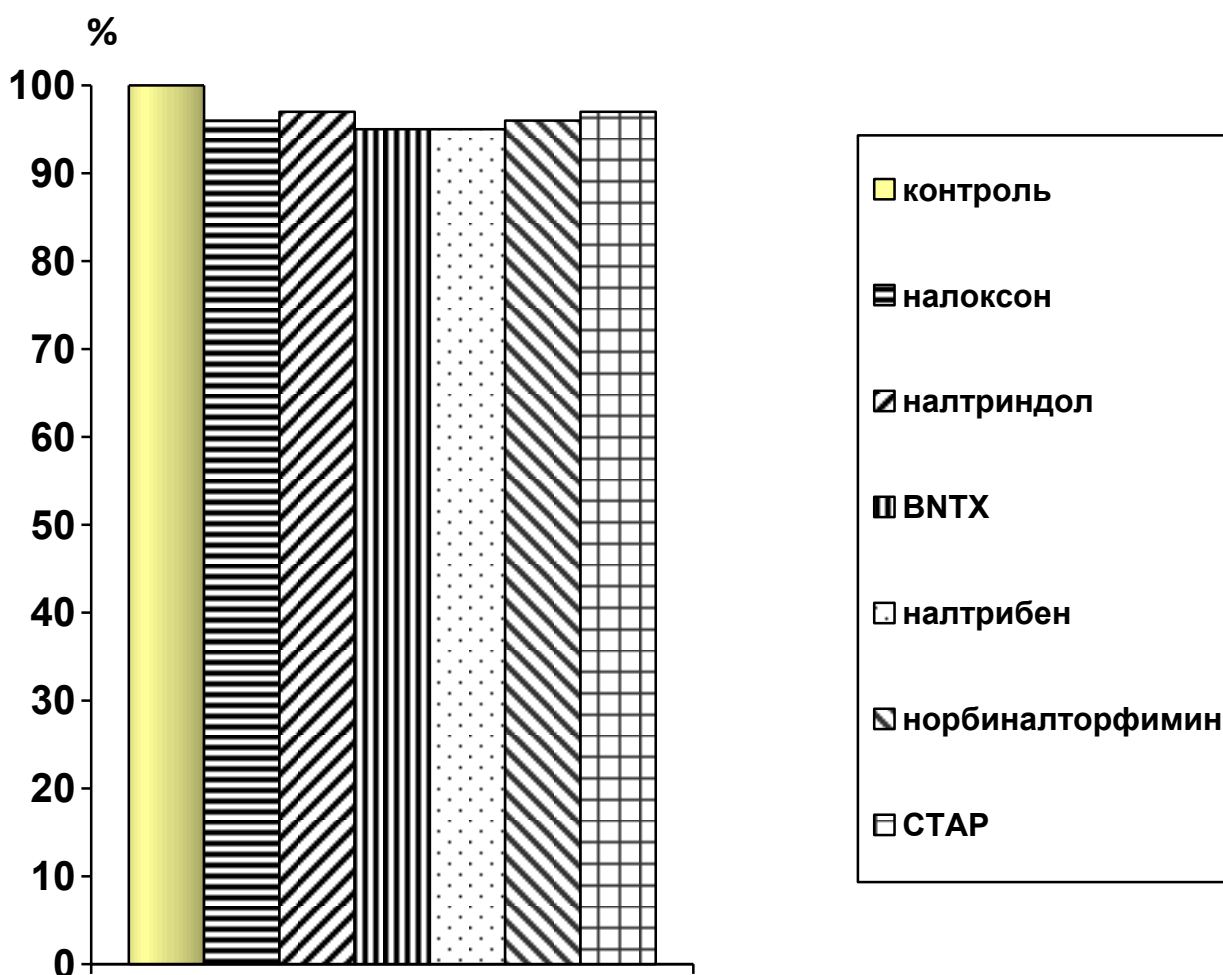


Рис. 9. Активность креатинфосфокиназы в перфузионном растворе в экспериментах на сердцах, которые подвергали только воздействию ишемии-



реперфузии. Достоверность относительно аналогичных значений в контроле: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ .

При сравнении параметров сократимости нам не удалось зарегистрировать достоверных отличия от контроля. Сами блокаторы ОР так же не оказывали достоверного влияния на параметры сократимости сердца (рис. 10, 11, 12)

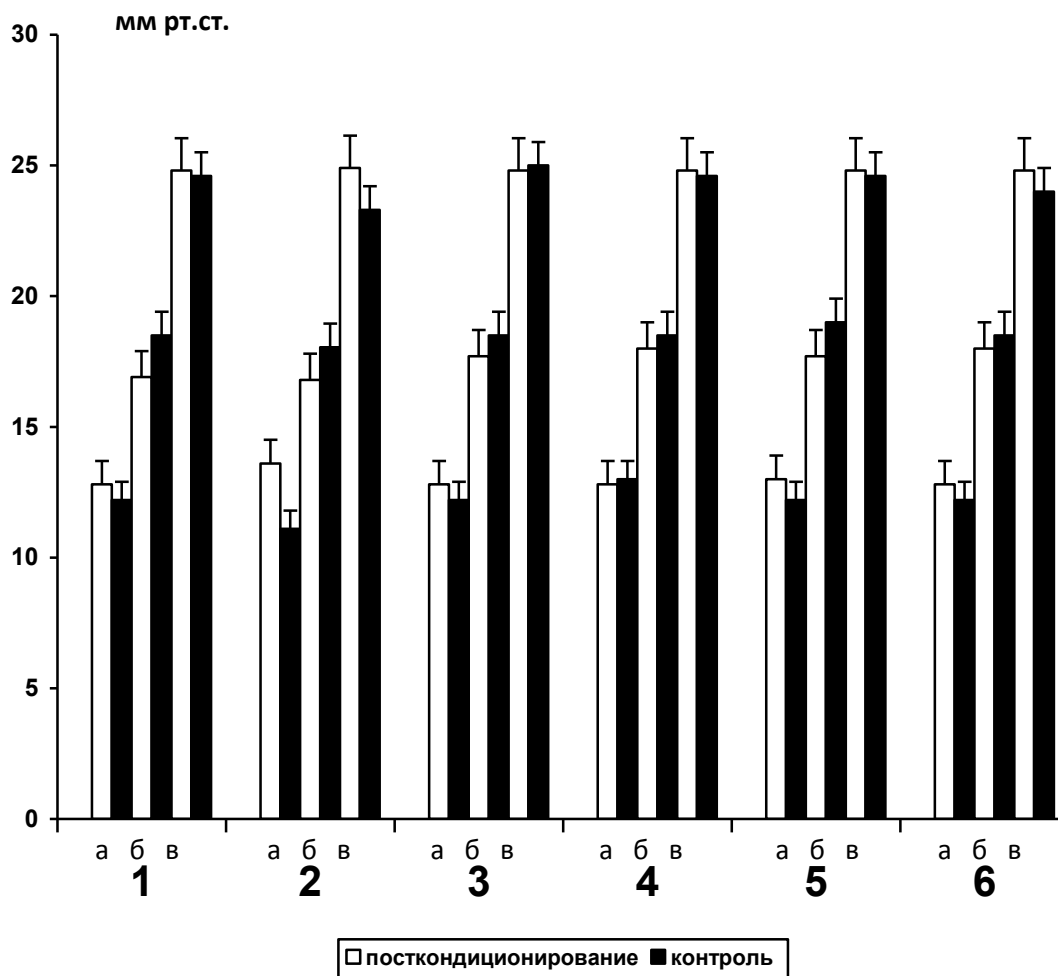


Рис. 10. Давление, развиваемое левым желудочком, после ишемического посткондиционирования: (1) налоксон; (2) норбиналторфимин; (3) СТАР; (4) BNTX; (5) налтриндол; (6) налтрибен.

а – 5 мин реперфузии; б – 15 мин реперфузии; в – 30 мин реперфузии.

Достоверность относительно аналогичных значений в контроле: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$

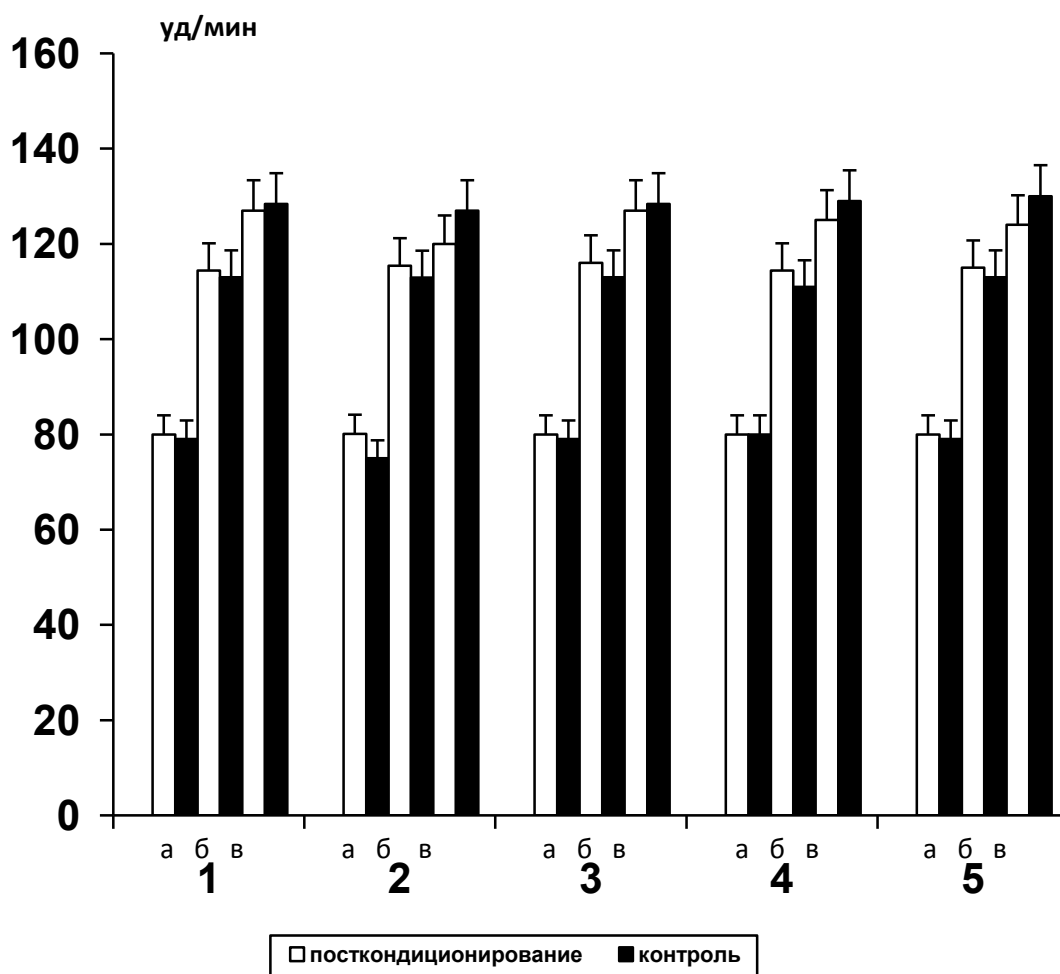


Рис. 11. Частота сердечных сокращений после ишемического посткондиционирования: (1) налоксон; (2) норбиналторфимин; (3) СТАР; (4) BNTX; (5) налтриндол; (6) налтрибен.

а – 5 мин реперфузии; б – 15 мин реперфузии; в – 30 мин реперфузии.

Достоверность относительно аналогичных значений в контроле: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$

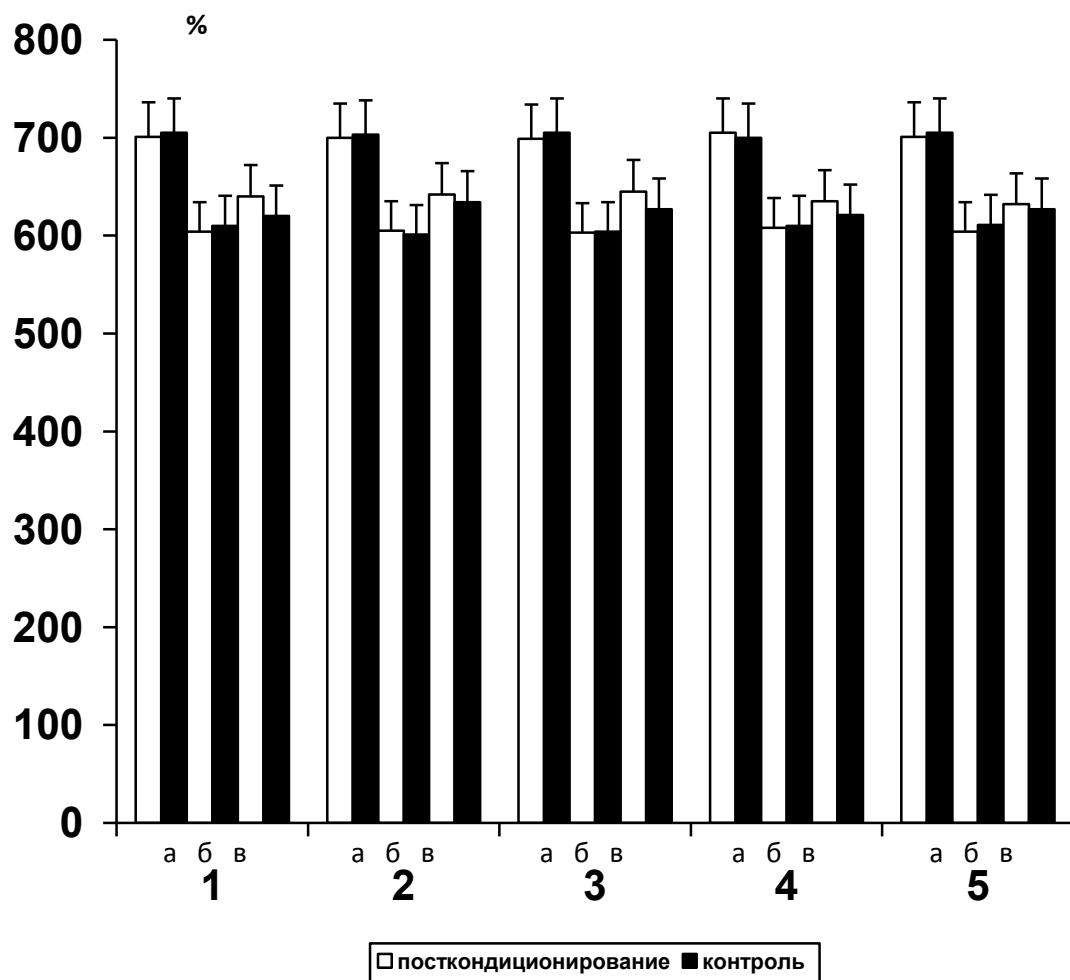


Рис. 12. Конечное диастолическое давление после ишемического посткондиционирования: (1) налоксон; (2) норбиналторфимин; (3) СТАР; (4) VNTX; (5) налтриндол; (6) налтрибен.

а – 5 мин реперфузии; б – 15 мин реперфузии; в – 30 мин реперфузии.

Достоверность относительно аналогичных значений в контроле: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$

Изучение роли опиоидной системы в кардиопротекторном эффекте ИП показало, что блокада ОР полностью устраняла кардиопротекторный эффект, формирующийся при этом воздействии. Этот факт доказывает наше предположение об участии эндогенной опиоидной системы в формировании повышенной устойчивости миокарда к ишемии/реперфузии при ИП. Резюмируя результаты исследования рецепторной специфичности участия опиоидной

системы в защитном эффекте ИП от ишемического-реперфузионного повреждения, следует отметить, что и при прекодиционировании опиоидная система играет важную роль в адаптационной защите миокарда, но ее эффекты реализуются через иные субтипы ОР. Так согласно G. J. Gross, кардиопротекторный эффект ишемического прекодиционирования опосредуется через  $\delta$ - и  $\kappa$ -ОР [Gross G. J., 2003]. Это представляется возможным, если принять во внимание тот факт, что к настоящему времени неизвестны селективные эндогенные агонисты  $\delta_1$ - или  $\delta_2$ -ОР. Эндогенные опиоидные пептиды лей- и мет-энкефалины обладают сродством как к  $\delta_1$ - или  $\delta_2$ -ОР, так и к  $\mu$ -ОР, поэтому защитные эффекты эндогенных опиоидов могут быть реализованы через любой из этих субтипов ОР. Мы можем предполагать, что, наряду с неспецифическим увеличением уровня эндогенных опиоидов, может происходить специфическое для каждого адаптирующего воздействия изменение рецепторного аппарата кардиомиоцитов, происходящее в различных ситуациях по отличающемуся «сценариям».

В 2005 г было обнаружено, что феномен посткодиционирования могут имитировать экзогенно вводимые опиоиды [Chang W.L. et al., 2005]. Так, внутривенная инъекция агониста всех типов ОР морфина в дозе 0,3 мг/кг, выполненная перед реперфузией, обеспечивала уменьшение размера инфаркта [Chang W.L. et al., 2005]. Эти данные были подтверждены в 2007 г Gross E.R. и соавт. [Gross E.R. et al., 2007a; 2007b].

Однако конкретный тип ОР ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$ ), с активацией которого связан кардиопротекторный эффект морфина, оставался неизвестным. Кроме того, было не ясно, где в организме расположены опиоидные рецепторы, участвующие в регуляции устойчивости сердца к действию реперфузии.

Ответом на первый вопрос могли бы послужить данные о том, что наряду с морфином посткодиционирование удастся воспроизвести с помощью селективных агонистов  $\delta$ -ОР - BW373U86 [Gross E.R. et al., 2007b]. Однако есть

данные и о том, что инфаркт-лимитирующий эффект морфина сохраняется на фоне действия селективного антагониста  $\delta$ -ОР налтриндола [Chen Z. et al., 2008]. Вместе с тем, в этой же работе Z. Chen и соавт. [Chen Z. et al., 2008] было установлено, что морфин-индуцированное посткондиционирование не развивается в условиях блокады  $\kappa$ -ОР норбиналторфимином. Вышеприведенные данные свидетельствуют о том, что опиоиды имитируют феномен посткондиционирования, активируя, преимущественно, рецепторы  $\delta$ - и  $\kappa$ -субтипов. Согласно полученным нами данным, в механизме толерантности сердца к повреждающему действию реперфузии после ишемического посткондиционирования определяющее значение принадлежит активации кардиальных  $\delta_1$ -ОР. Роль кардиальных  $\kappa$ -ОР в реализации кардиопротекторного эффекта ИП нам подтвердить не удалось.

### **3.3. РОЛЬ ПРОТЕИНКИНАЗЫ С В РЕАЛИЗАЦИИ КАРДИОПРОТЕКТОРНОГО ЭФФЕКТА ИШЕМИЧЕСКОГО ПОСТКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ**

При исследовании роли протеинкиназы С мы получили следующие результаты (Рис. 13). При ингибировании всех изоформ протеинкиназы С с помощью блокатора ПКС хелеритрина хлорида в конечной концентрации 5  $\mu\text{M}/\text{л}$  наблюдали устранение защитного эффекта ИП, что говорит об участии ПКС в реализации кардиопротекторного эффекта ИП. Дальнейшие исследования были направлены на изучение роли  $\delta$ -изоформы ПКС с помощью селективного блокатора ПКС- $\delta$  роттлерина в конечной концентрации 1  $\mu\text{M}/\text{л}$ . Как видно на рисунке 13, селективное ингибирование ПКС- $\delta$  так же устраняло защитный эффект ИП. Как показано на рисунке 13, в экспериментах на изолированных сердцах, которые подвергали воздействию ишемии-реперфузии, без посткондиционирования сами блокаторы ПКС достоверных изменений уровня КФК в перфузате не вызывали.

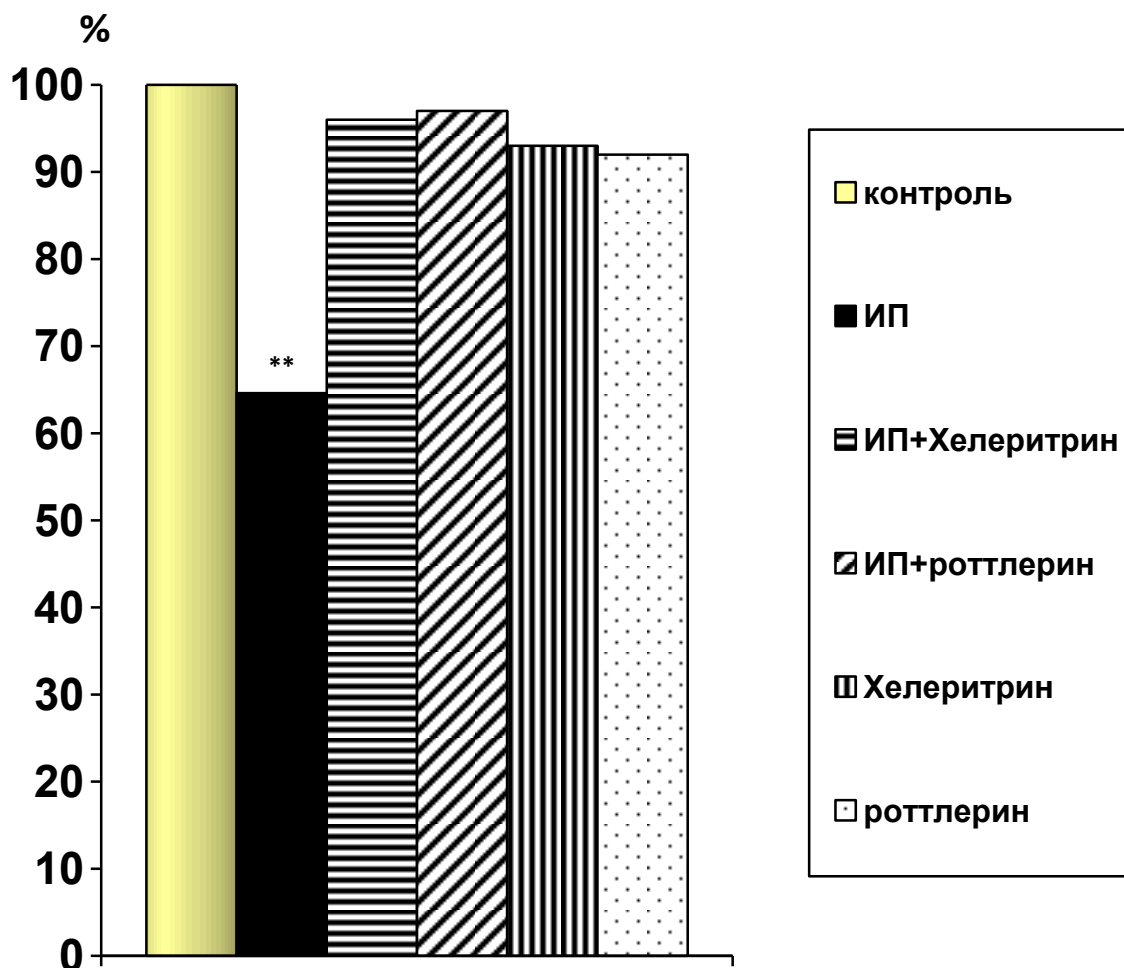


Рис. 13. Активность креатинфосфокиназы в перфузионном растворе после ишемического посткондиционирования и блокады ПКС.

Достоверность относительно аналогичных значений в контроле: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$

При сравнении параметров сократимости не удалось зарегистрировать достоверные отличия от контроля. Сами блокаторы ПКС так же не оказывали достоверных влияний на параметров сократимости (рис. 14, 15, 16).

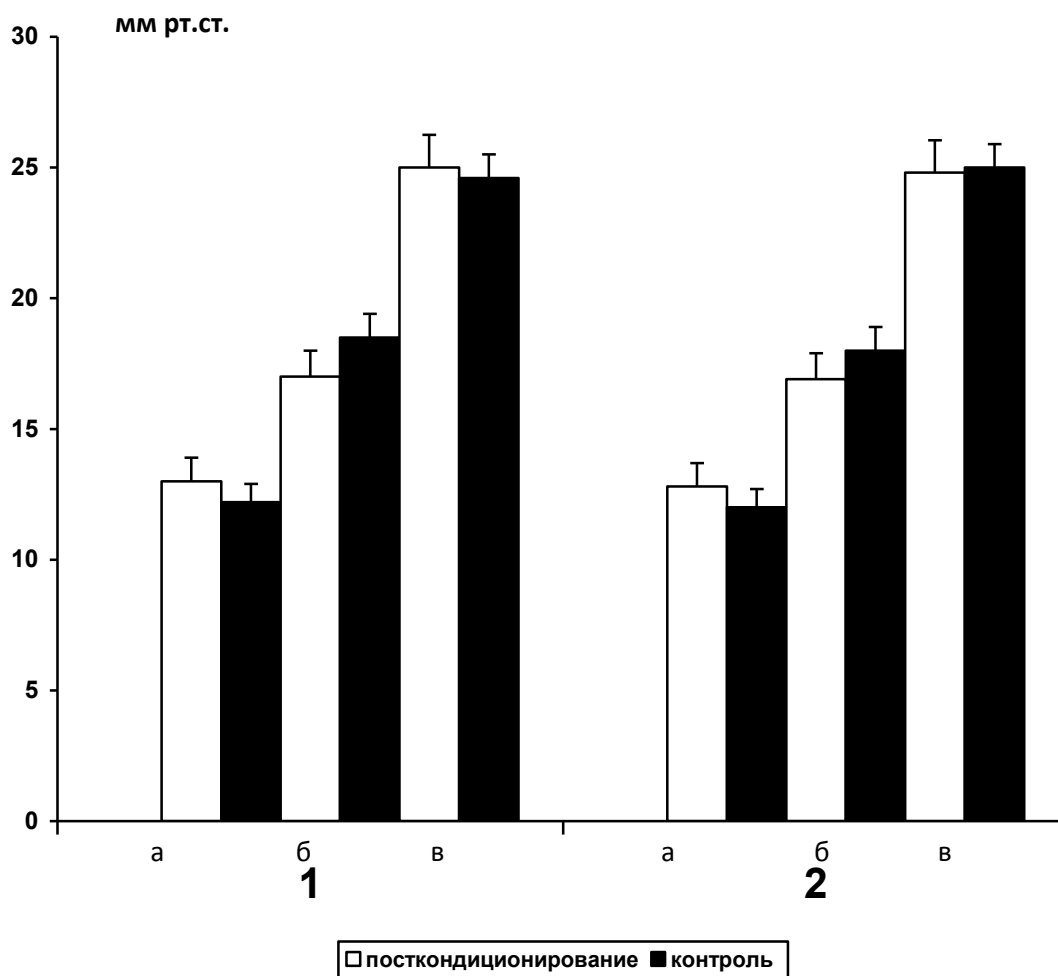


Рис. 14. Давление развиваемое левым желудочком после ишемического посткондиционирования: (1) хелеритрин; (2) ротлерин.

а – 5 мин реперфузии; б – 15 мин реперфузии; в – 30 мин реперфузии.

Достоверность относительно аналогичных значений в контроле: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$



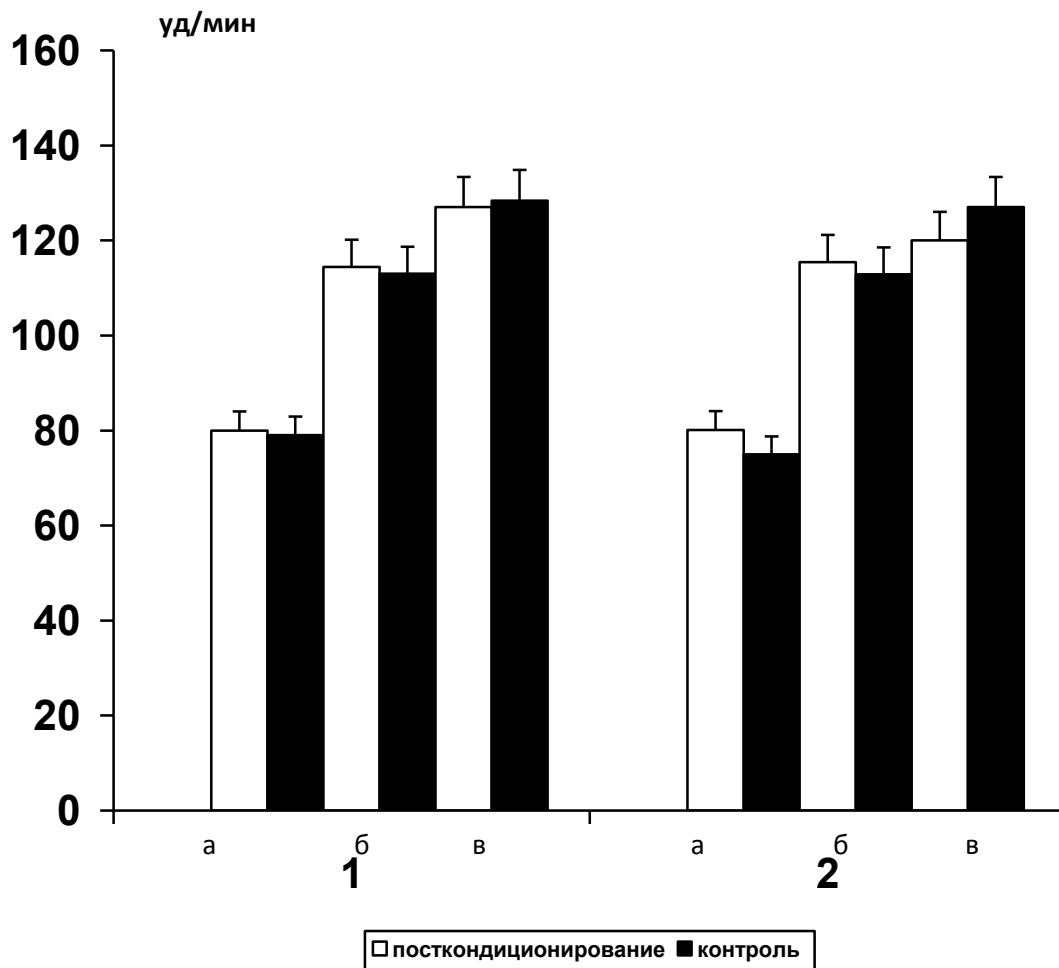


Рис. 15. Частота сердечных сокращений после ишемического посткондиционирования: (1) хелеритрин; (2) роттлерин.

а – 5 мин реперфузии; б – 15 мин реперфузии; в – 30 мин реперфузии.

Достоверность относительно аналогичных значений в контроле: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$

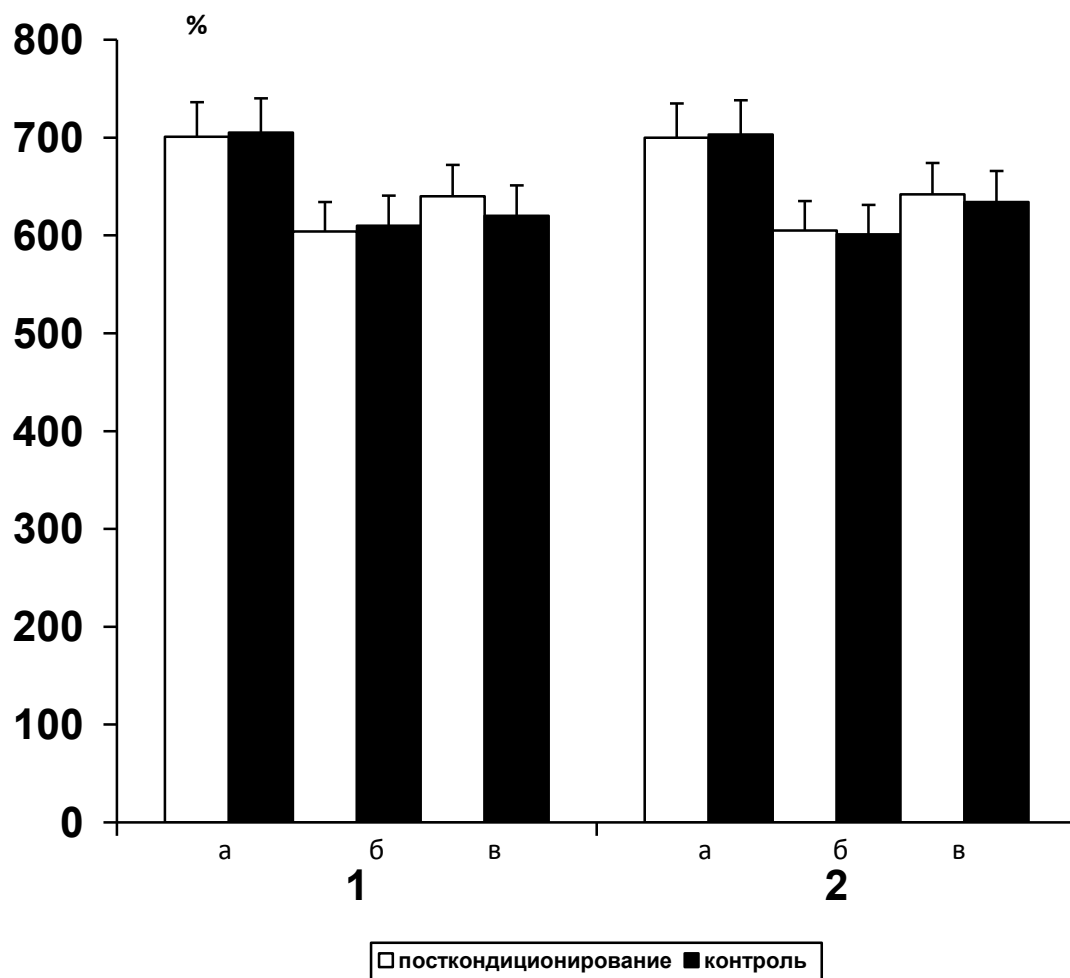


Рис. 16. Конечное диастолическое давление после ишемического посткондиционирования: (1) хелеритрин; (2) роттлерин.

а – 5 мин реперфузии; б – 15 мин реперфузии; в – 30 мин реперфузии.

Достоверность относительно аналогичных значений в контроле: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$

На основании полученных данных мы можем сделать вывод о том, что кардиопротекторный эффект ИП не проявляется на фоне блокады протеинкиназы С. Эти данные согласуются с данными литературы об участии этого фермента в формировании кардиопротекции при ишемическом посткондиционировании и других адаптивных воздействиях: адаптации к гипобарической гипоксии, ишемическом и фармакологическом

прекондиционировании [Zatta A.J. et al., 2006, Neckar J. et al., 2005, Fryer R.M., 1999, 2001a]. Активация протеинкиназы С приводит к фосфорилированию огромного количества внутриклеточных белков [Dempsey E.C. et al., 2000]. Анализ данных литературы позволяет выделить несколько мишеней ПКС, это прежде всего, АТФ-зависимые  $K^+$ -каналы ( $K_{\text{АТФ}}$ -каналы) [Fryer R.M. et al., 2001]. Одним из наиболее важных эффектов ПКС является ее способность транслоцироваться в митохондрии и запускать регуляторный каскад, приводящий к активации митохондриальных АТФ-чувствительных  $K^+$ -каналов (мито $K_{\text{АТФ}}$ -каналов) [Cohen M.V. et al., 2007; Costa A.D. et al., 2006; Penna C. et al., 2006; 2007; Uecker M., 2003].

Физиологами из Университета Атланты были получены данные об участии ПКС в механизме посткондиционирования [Zatta A.J. et al., 2006]. В опытах *in vivo* на крысах было показано, что неселективный ингибитор ПКС хелеритрин или селективный блокатор ПКС $\epsilon$  К1Е1-1 устраняют кардиопротекторный эффект посткондиционирования. Указанные ингибиторы не влияли на размер инфаркта у крыс с ишемией-реперфузией без посткондиционирования. Это согласуется с полученными нами данными. Селективный блокатор ПКС $\delta$  роттлерин у этих животных уменьшал соотношение РИ/ОР, но не влиял на инфаркт-лимитирующий эффект посткондиционирования [Zatta A.J. et al., 2006]. Посткондиционирование способствовало двукратному увеличению фосфорилированной ПКС $\epsilon$  в гомогенате сердца и вызывало двукратное уменьшение количество ПКС $\delta$ , связанной с митохондриями [Zatta A.J. et al., 2006]. Имеются литературные данные о том, что транслокация ПКС $\delta$  в митохондрии во время реперфузии способствует усилению продукции этими органеллами супероксидного радикала и нарушению функции митохондрий [Churchill E.N. и Szweda L.I., 2005]. Активация ПКС $\delta$  и транслокация фермента в митохондрии способствует гибели кардиомиоцитов во время реперфузии в результате апоптоза [Murriel

C.L. et al., 2004]. Ингибирование ПКСδ способствует увеличению устойчивости сердца к реперфузионным повреждениям [Inagaki K. et al., 2003a, b]. Однако результаты наших исследований свидетельствуют, что ПКСδ играет протективную роль и участвует в реализации кардиопротекторного эффекта посткондиционирования.

### 3.4 РОЛЬ R13-КИНАЗЫ В РЕАЛИЗАЦИИ ПРОТЕКТИВНОГО ЭФФЕКТА ПОСТКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ.

При исследовании роли R13-киназы мы получили следующие результаты. Как показано на рисунке 17, блокада R13-киназы с помощью вортманнина в конечной концентрации 100 нМ/л устраняла кардиопротекторный эффект ИП. Следовательно, R13-киназа участвует в реализации кардиопротекторного эффекта ИП. Использование вортманнина, в экспериментах на сердцах, которые подвергали воздействию только ишемии-реперфузии, никак не повлияло на значение КФК.

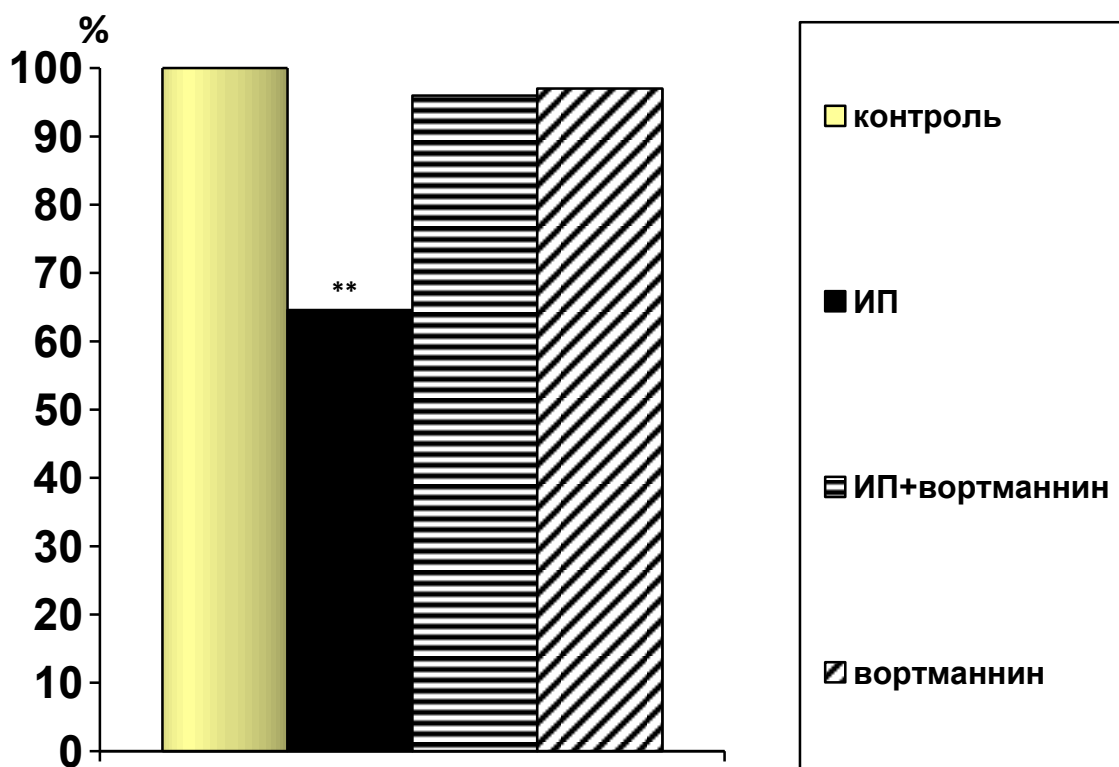


Рис. 17. Активность креатинфосфокиназы в перфузионном растворе после ишемического посткондиционирования и блокады R13-киназы вортманнином.

Достоверность относительно аналогичных значений в контроле: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$

При сравнении параметров сократимости нам не удалось зарегистрировать достоверные отличия от контроля. Вортманнин не оказывали достоверных влияний на параметры сократимости, сердец, которые подвергали воздействию посткондиционирования или только воздействию ишемии-реперфузии (рис. 18, 19, 20).

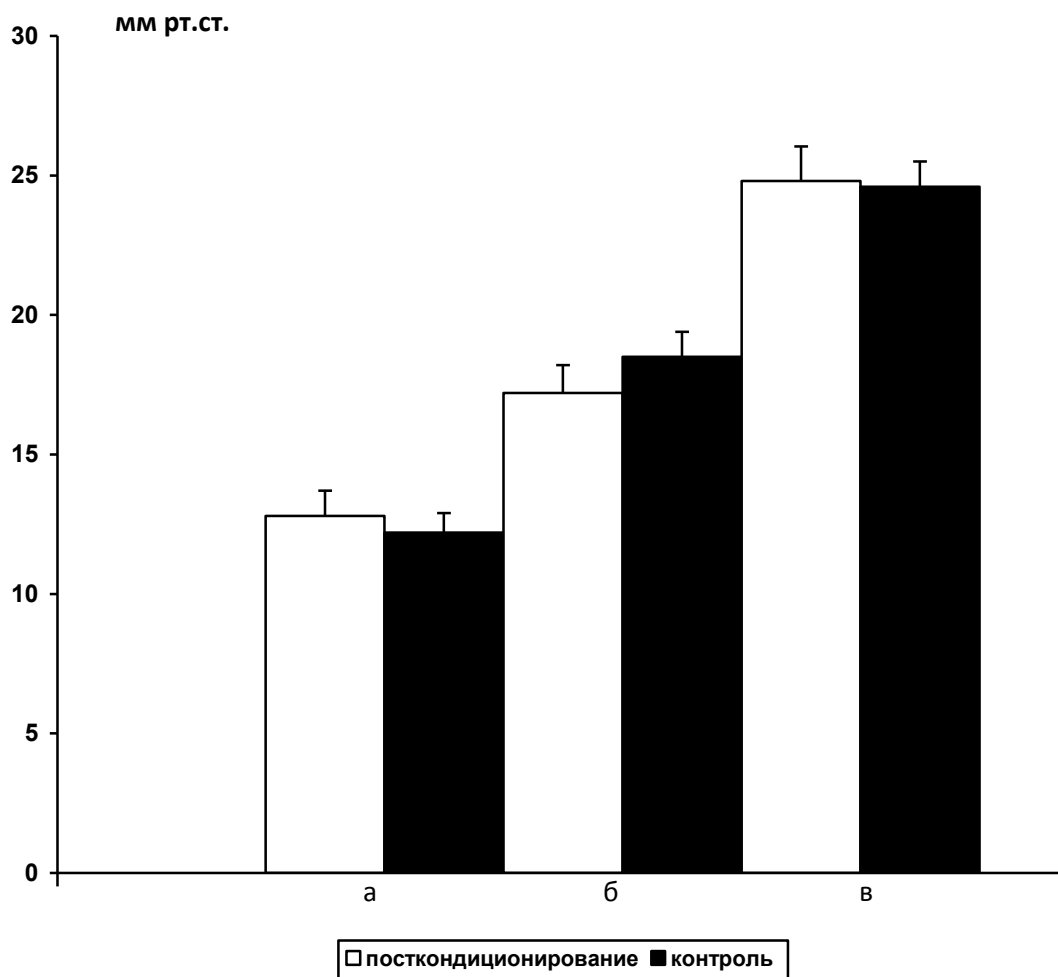


Рис. 18. Давление, развиваемое левым желудочком, после ишемического посткондиционирования и применения вортманнин

а – 5 мин реперфузии; б – 15 мин реперфузии; в – 30 мин реперфузии.

Достоверность относительно аналогичных значений в контроле: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$

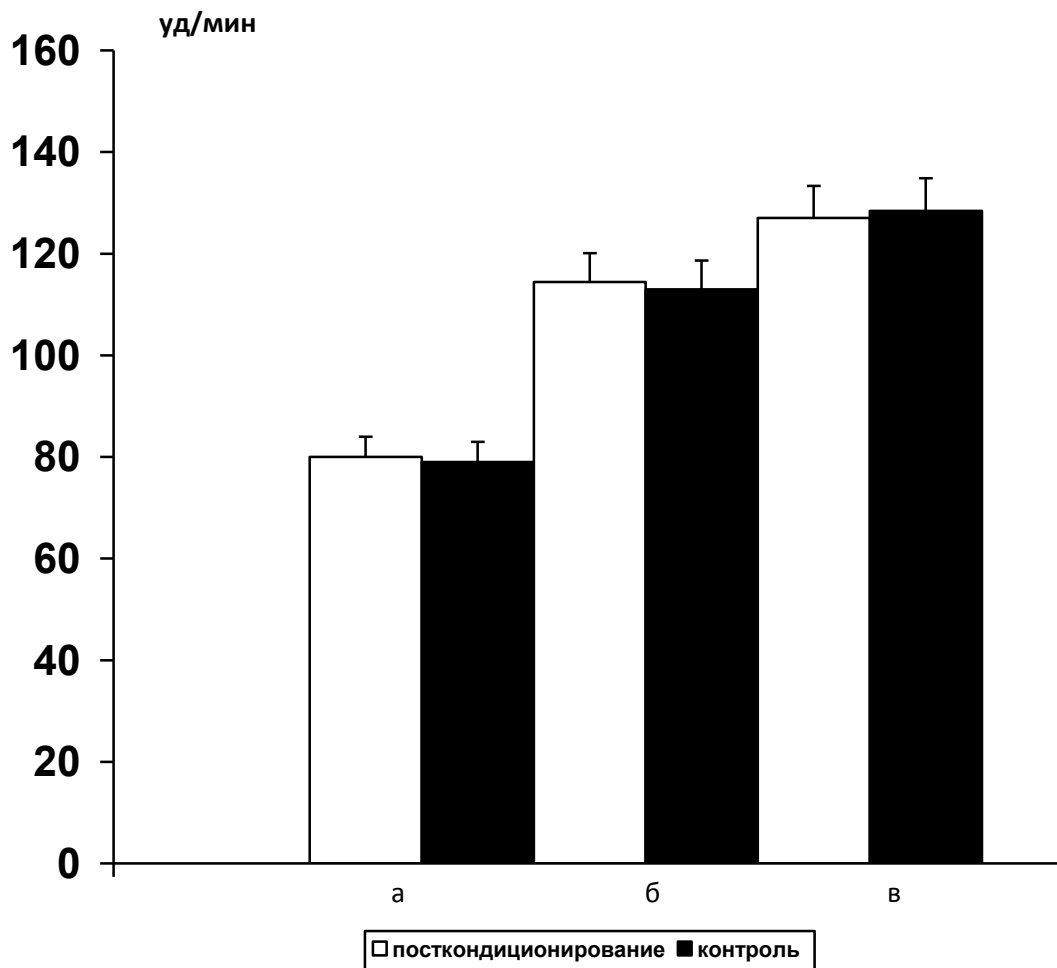


Рис. 19. Частота сердечных сокращений после ишемического посткондиционирования и применения вортманнина.

а – 5 мин реперфузии; б – 15 мин реперфузии; в – 30 мин реперфузии.

Достоверность относительно аналогичных значений в контроле: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$

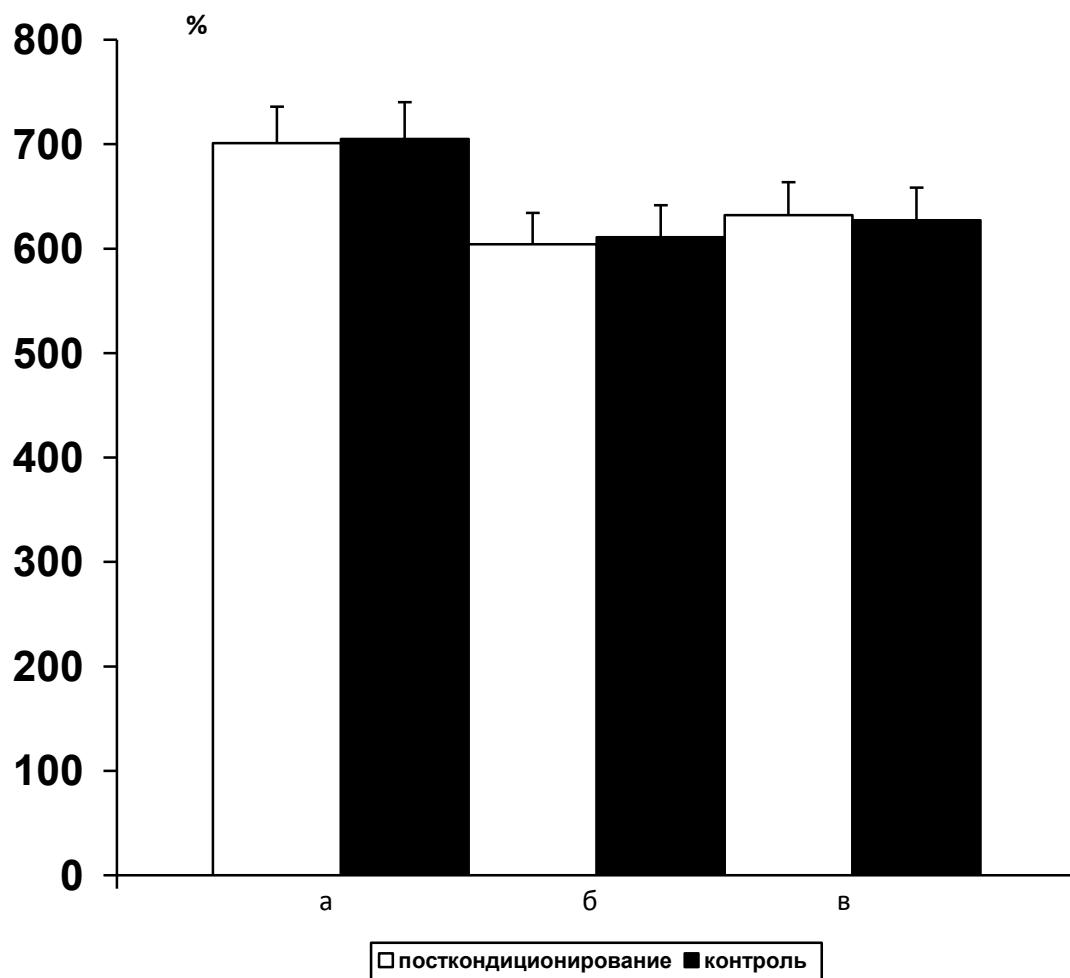


Рис. 20. Конечное диастолическое давление после ишемического посткондиционирования и внесения в перфузат вертаманина.

а – 5 мин реперфузии; б – 15 мин реперфузии; в – 30 мин реперфузии.

Достоверность относительно аналогичных значений в контроле: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$

На основании полученных данных мы можем сделать вывод о том, что кардиопротекторный ИП не проявляется на фоне блокады  $PI3$ -киназы. Следовательно,  $PI3$ -киназа является ключевым звеном в реализации кардиопротекторного эффекта ИП. Эти данные согласуются с данными литературы [Tsang A. et al., 2004].



### **3.5. РОЛЬ $K_{ATP}$ -КАНАЛОВ В РЕАЛИЗАЦИИ УСТОЙЧИВОСТИ ИЗОЛИРОВАННОГО СЕРДЦА К ИШЕМИЧЕСКИМ И РЕПЕРФУЗИОННЫМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ**

Изучение роли  $K_{ATP}$ -каналов в реализации устойчивости изолированного сердца к ишемическим и реперфузионным воздействиям дало следующие результаты. При ингибировании сарколеммальных и митохондриальных  $K_{ATP}$ -каналов глибенкламидом в конечной концентрации 10  $\mu\text{M}/\text{л}$  кардиопротекторный эффект ИП устранялся, что свидетельствует о том, что  $K_{ATP}$ -каналы участвуют в формировании защитного эффекта посткондиционирования. Дальнейшие исследования были проведены с применением блокатора митохондриальных  $K_{ATP}$ -каналов 5-гидроксидеканоата (5-ГД) в конечной концентрации 100  $\mu\text{M}/\text{л}$ . Как видно из рисунка 21, 5-ГД также устранял кардиопротекторный эффект ИП. Следовательно, митохондриальные  $K_{ATP}$ -каналы принимают участие в механизме кардиопротекторного эффекта посткондиционирования.

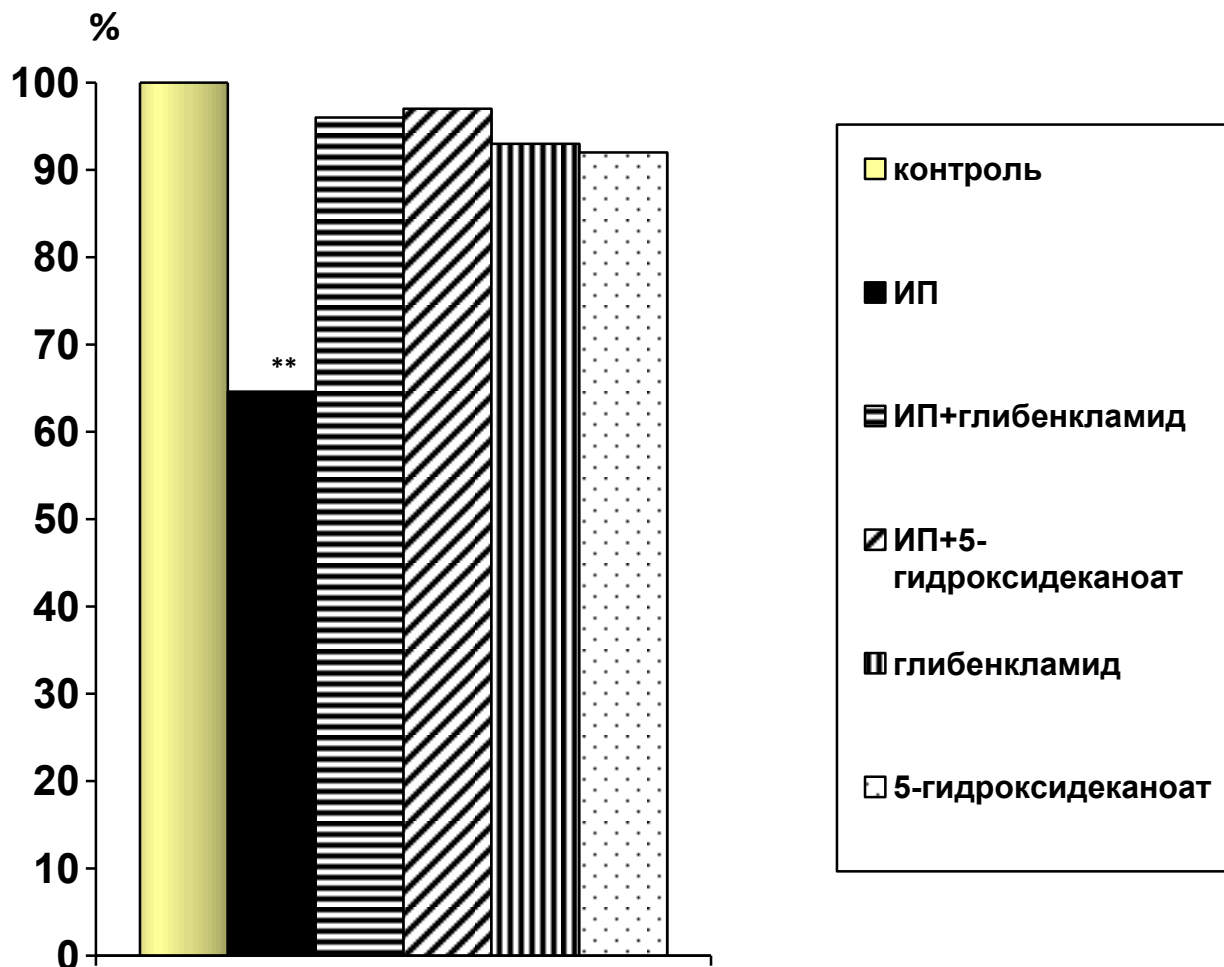


Рис. 21. Активность креатинфосфокиназы в перфузионном растворе после ишемического посткондиционирования и применения блокаторов  $K_{ATP}$ -каналов.

Достоверность относительно аналогичных значений в контроле: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$

При сравнении параметров сократимости не удалось зарегистрировать достоверные отличия от контроля. Блокаторы  $K_{ATP}$ -каналов так же не оказывали достоверного влияния на параметры сократимости изолированного

сердца, которое подвергали воздействию посткондиционирования или только влиянию ишемии-реперфузии (рис. 22, 23, 24).

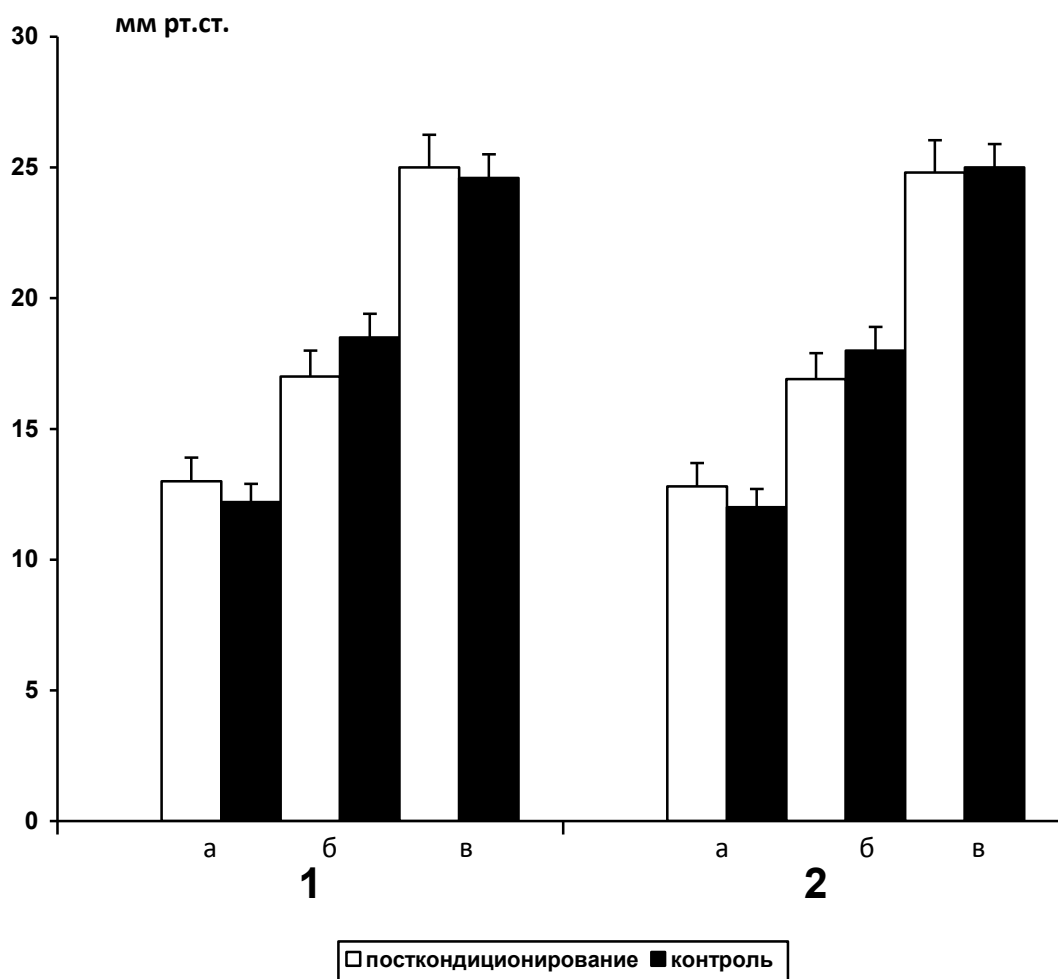


Рис. 22. Давление, развиваемое левым желудочком, после ишемического посткондиционирования и применение (1) глибенкламида и (2) 5-гидроксидеканоата.

а – 5 мин реперфузии; б – 15 мин реперфузии; в – 30 мин реперфузии.

Достоверность относительно аналогичных значений в контроле: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$

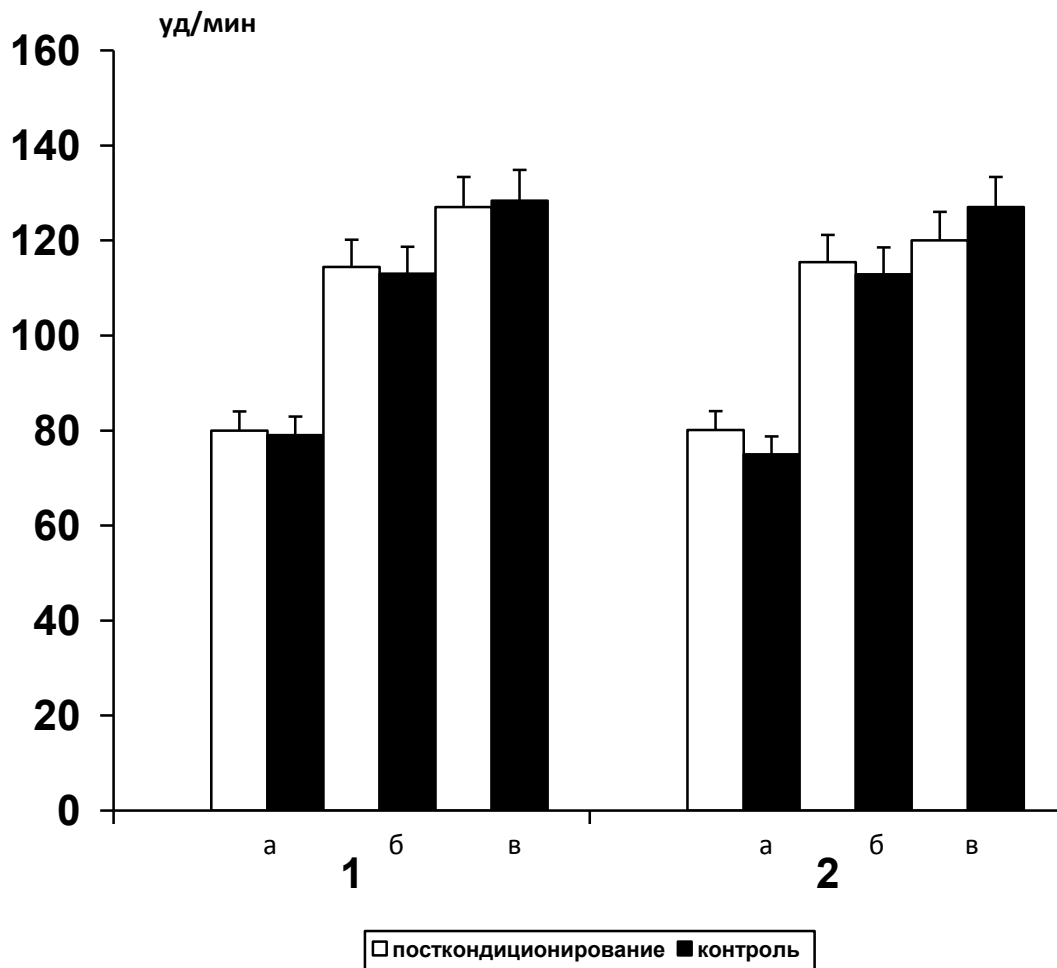


Рис. 23. Частота сердечных сокращений после ишемического посткондиционирования и добавления в перфузат (1) глибенкламида и (2) 5-гидроксидеканоата.

а – 5 мин реперфузии; б – 15 мин реперфузии; в – 30 мин реперфузии.

Достоверность относительно аналогичных значений в контроле: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$

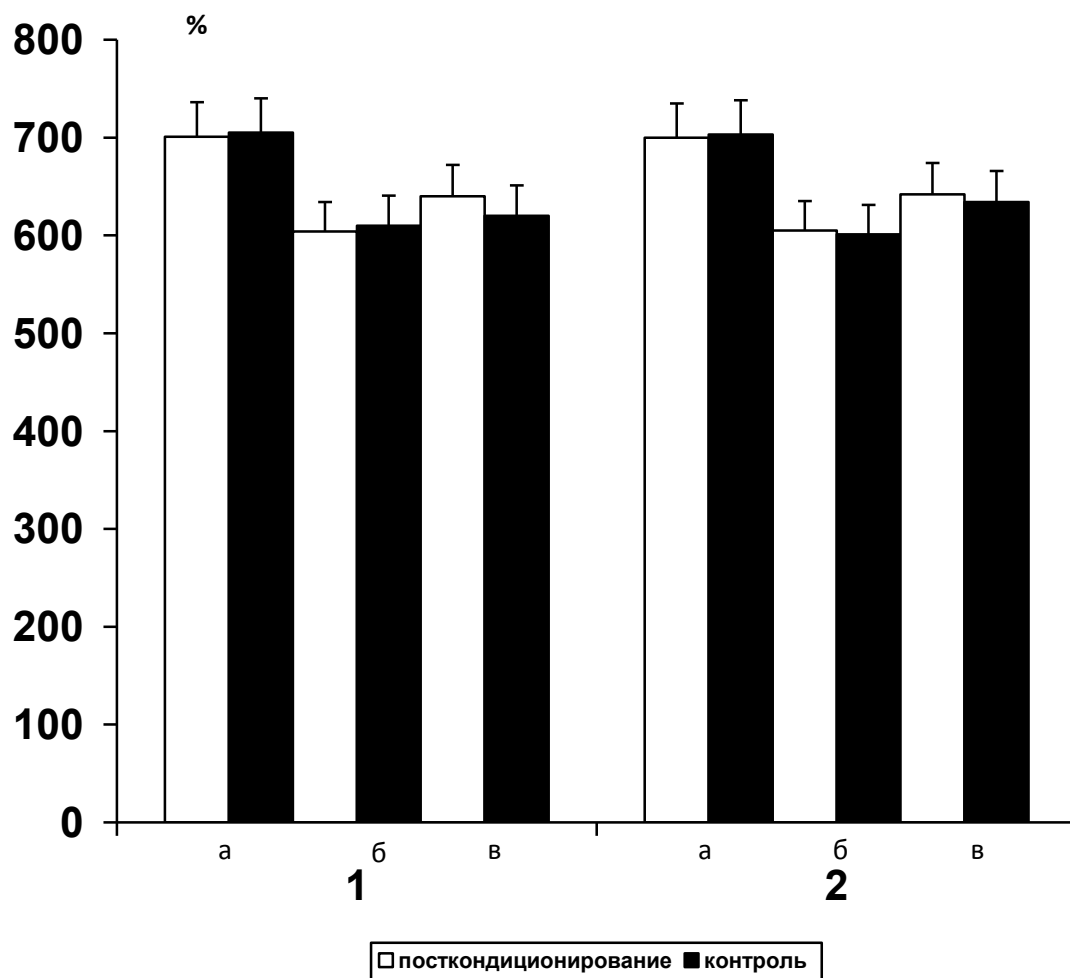


Рис. 24. Конечное диастолическое давление после ишемического посткондиционирования и применения (1) глибенкламида и (2) 5-гидроксидеканоата.

а – 5 мин реперфузии; б – 15 мин реперфузии; в – 30 мин реперфузии.

Достоверность относительно аналогичных значений в контроле: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$

По данным литературы митохондриальные  $K_{ATP}$ -каналы являются одним из конечных звеньев в цепи сигнальных событий во время посткондиционирования [Vinten-Johansen J., et al., 2005, Zhao Z.Q. и Vinten-Johansen J., 2006]. В экспериментах на изолированном сердце крысы нами было показано, что неселективный ингибитор  $K_{ATP}$ -каналов глибенкламид и

селективный блокатор митK<sub>ATФ</sub>-каналов 5-гидроксидеканоат полностью устраняют инфаркт-лимитирующий эффект посткондиционирования.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение механизмов срочной и долговременной адаптации является одной из приоритетных задач физиологии. В 2003 г группа физиологов из Атланты (США) во главе с проф. J. Vinten-Johansen [Zhao Z.Q. et al., 2003] обнаружила адаптивный феномен, названный «ишемическим посткондиционированием» (ischemic postconditioning). Необходимо отметить, что посткондиционирование ограничено жесткими временными рамками. Обычно первый сеанс ишемии моделируют уже через 10–30 с после возобновления коронарного кровотока, а продолжительность чередующихся сеансов реокклюзии и интервалов между ними не превышает 10-30 с [Boengler K. et al., 2008; Dow J. et al., 2008; Halkos M.E. et al., 2004; Kin H. et al., 2008; Kloner R.A. et al., 2006; Lim S.Y. et al., 2007; Tsutsumi Y.M. et al., 2007; Zhao Z.Q. et al., 2003]. Тем не менее, общепринятого модели посткондиционирования не существует, каждый коллектив исследователей вырабатывает свою методику моделирования названного феномена, базируясь на собственных данных.

Анализ литературы позволяет утверждать, что посткондиционирование способствует ограничению размеров зоны некроза и уменьшению интенсивности апоптоза кардиомиоцитов [Boengler K. et al., 2008; Gomez L. et al., 2007; Iliodromitis E.K. et al. 2006; Fang J. et al., 2008; Kin H. et al., 2008; Taki J. et al., 2007]. Развитие этого феномена сопровождается снижением реперфузионного уровня маркеров повреждения кардиомиоцитов в плазме крови [Li D. et al., 2008; Morrison R.R. et al., 2007; Peng L.Y. et al., 2006], ослаблением интенсивности перекисного окисления липидов [Zhao J.L et al., 2007], улучшением сократимости сердца [Gomez L. et al., 2007], повышением его электрической стабильности [Dow J. et al., 2008]. Поскольку феномен посткондиционирования удастся воспроизвести на изолированном сердце и культуре кардиомиоцитов [Sun H.Y. et al., 2006; Wang H.C. et al., 2006], есть основания полагать, что в механизме названного адаптационного феномена

решающее значение имеют процессы, происходящие на уровне кардиомиоцитов и миокарда.

В экспериментах, выполненных нами на изолированном перфузируемом сердце мы провели сравнительный анализ следующих моделей: (1) три сеанса реперфузии (10 секунд) и ишемии (10 секунд), цикл – 20 секунд; (2) шесть циклов реперфузии (10 секунд) и ишемии (10 секунд), цикл – 20 секунд; (3) три сеанса реперфузии (20 секунд) и ишемии (20 секунд), цикл – 40 секунд; (4) шесть циклов реперфузии (20 секунд) и ишемии (20 секунд), цикл – 40 секунд; (5) три сеанса реперфузии (30 секунд) и ишемии (30 секунд), цикл – 60 секунд.

Основным критерием для отбора модели являлся антинекротический эффект. По результатам исследования нами была выбрана пятая модель (три сеанса реперфузии (30 секунд) и ишемии (30 секунд), цикл – (60 секунд), который показал наиболее выраженную кардиопротекцию.

В 2005 г W.L. Chang и соавт. [Chang W.L. et al., 2005] обнаружили, что феномен посткондиционирования можно имитировать с помощью опиоидов. Так, внутривенная инъекция агониста всех типов ОР морфина в дозе 0,3 мг/кг, выполненная перед реперфузией, обеспечивала уменьшение размера инфаркта и супрессию реперфузионной аккумуляции нейтрофилов в миокарде [Chang W.L. et al., 2005]. Эти данные были подтверждены в 2007 г E.R. Gross и соавт. [Gross E.R. et al., 2007a; 2007b].

Однако конкретный тип ОР ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$ ), с активацией которого связан кардиопротекторный эффект морфина, оставался неизвестным. Кроме того, было не ясно, где в организме расположены опиоидные рецепторы, участвующие в регуляции устойчивости сердца к действию реперфузии.

Для выяснения роли отдельных типов опиоидных рецепторов в реализации кардиопротекторного эффекта ИП, мы провели серии экспериментов с блокаторами опиоидных рецепторов. В ходе проведенных исследований нами было показано, что блокада всех типов опиоидных рецепторов налоксоном



устраняла кардиопротекторный эффект ИП. Блокада  $\delta_1$ -рецепторов с помощью BNTX устраняла кардиопротекторный эффект ИП, а блокада  $\delta_2$ -рецепторов налтрибеном не влияла на уровень креатинфосфокиназы в перфузате, оттекающем от сердца за весь период реперфузии, после посткондиционирования. Блокада  $\mu$ - и  $\kappa$ -ОР с помощью СТАР и норбиналторфимина соответственно не повлияла на кардиопротекторный эффект ИП. Следовательно, в механизме толерантности сердца к повреждающему действию реперфузии после ишемического посткондиционирования определяющее значение принадлежит активации кардиальных  $\delta_1$ -ОР.

Далее мы изучали внутриклеточные регуляторные механизмы кардиопротекторного эффекта ИП. При исследовании роли протеинкиназы С мы установили, что кардиопротекторный эффект ИП не проявляется на фоне блокады протеинкиназы С хелеритрином. Следовательно, протеинкиназа С является важным звеном реализации кардиопротекторного эффекта ИП. Этот результат согласуется с данными литературы об участии этого фермента в формировании кардиопротекции при других неспецифических адаптивных воздействиях: адаптация к гипобарической гипоксии, ишемическое и фармакологическое прекондиционирование, ишемическое посткондиционирование [Neckar J. et al., 2005, Fryer R.M., 1999, 2001a; Zatta A.J. et al., 2006].

При исследовании роли Р13-киназы мы получили следующие результаты. Ингибирование Р13-киназы с помощью вортманнина устраняло кардиопротекторный эффект ИП. Следовательно, Р13-киназа является важным звеном реализации кардиопротекторного эффекта ИП. Эти данные согласуются с данными литературы об участии Р13-киназы в посткондиционировании [Tsang A. et al., 2004].

Изучение роли  $K_{ATP}$ -каналов в реализации устойчивости посткондиционированного изолированного сердца к ишемическим и

реперфузионным воздействиям дало следующие результаты. В экспериментах на изолированном сердце крысы нами было показано, что неселективный ингибитор  $K_{ATP}$ -каналов глибенкламид и селективный блокатор мит $K_{ATP}$ -каналов 5-гидроксидеканоат полностью устраняют инфаркт-лимитирующий эффект посткондиционирования. Следовательно, мит $K_{ATP}$ -каналы являются важным звеном реализации кардиопротекторного эффекта ИП. Полученные нами данные согласуются с данными литературы об участии  $K_{ATP}$ -каналов в ишемическом посткондиционировании [Vinten-Johansen J. et al., 2005; Zhao Z.Q. et al., 2006].

Таким образом, на основании полученных результатов мы можем заключить, что опиоидные рецепторы играют важную роль в опосредовании кардиопротекторного эффекта ИП, при этом доказано участие  $\delta_1$ -ОР, в то время как  $\delta_2$ -,  $\kappa$ - и  $\mu$ -ОР не принимают участие в реализации защитного эффекта посткондиционирования. В качестве сигнального механизма посткондиционирования задействованы: протеинкиназа  $C\delta$ , PI3-киназа и мит $K_{ATP}$ -каналы. (Рисунок 25)

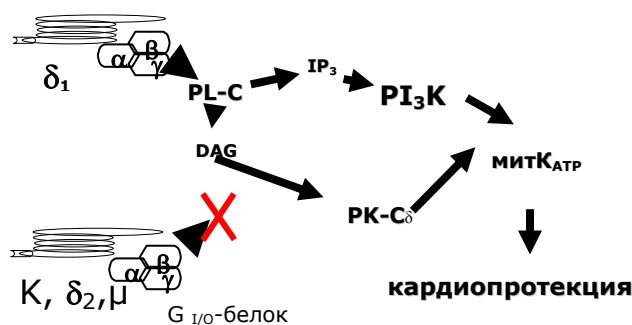


Рис. 25 Гипотетическая схема участия опиоидных рецепторов и внутриклеточных сигнальных каскадов в механизме кардиопротекторного эффекта ишемического посткондиционирования.

## **ВЫВОДЫ**

1. Наиболее выраженный кардиопротекторный эффект оказывает посткондиционирование с использованием трех сеансов реперфузии (30 с) и ишемии (30 с).
2. Толерантность сердца к ишемии и реперфузии при ишемическом посткондиционировании реализуется через активацию  $\delta_1$ -опиоидных рецепторов.
3. В обеспечении кардиопротекторного эффекта адаптивного феномена ишемического посткондиционирования принимает участие протеинкиназа С $\delta$ .
4. Р13-киназа участвуют в механизме формирования кардиопротекторного эффекта адаптивного феномена ишемического посткондиционирования.
5. Митохондриальные  $K_{ATP}$ -каналы играют ключевую роль в кардиопротекторном эффекте посткондиционирования.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Золоев Г. К. Влияние синтетического энкефалина даларгина на метаболические показатели у больных инфарктом миокарда/ Золоев Г. К., Слепушкин В. Д., Васильцев Я. С., Титов М. И. // Кардиология. – 1987. – № 2. – С. 93–94.
2. Золоев Г.К. Влияние энкефалинов на метаболические показатели при экспериментальном инфаркте миокарда у крыс/ Золоев Г.К., Слепушкин В. Д., Титов М. И. // Кардиология. – 1985. – № 8. – С. 72–74.
3. Касс Р.С. Ионные основы электрической активности сердца / Касс Р.С. // Физиология и патофизиология сердца Под ред. Н. Сперелакиса.– М.: Медицина, 1990. – Т.1. – С. 128–149.
4. Коган А. Х. Свободнорадикальные перекисные механизмы патогенеза ишемии и инфаркта миокарда и их ферментативная регуляция/ Коган А. Х., Кудрин А. Н., Кактурский Л.В., Лосев Н.И. // Патол. Физиол. эксп. терапия. – 1992. – №2. – С. 5–15.
5. Кушаковский М. С. Аритмии сердца . – С-Пб.: Фолиант.- 1998. – 640 с.
6. Ланкин В. В. Свободнорадикальные процессы при заболеваниях сердечно-сосудистой системы/ Ланкин В. В., Тихазе А.К., Беленков Ю.Н. // Кардиология. – 2000. – №7. – С. 48–61.
7. Литвицкий П.Ф. Адаптивные и патогенные эффекты реперфузии и реоксигенации миокарда./ Литвицкий П.Ф., Сандриков В.А., Демуров Е.А. // М.- Медицина.- 1994.-320с.
8. Литвицкий П.Ф. Патогенные и адаптивные изменения в сердце при его регионарной ишемии и последующем возобновлении коронарного кровотока/ Литвицкий П.Ф. // Пат.физ. эксп. Тер. – 2002. – № 2. – С. 2– 12.
9. Лишманов Ю.Б. Опиоидные нейропептиды, стресс и адаптационная защита сердца/ Лишманов Ю.Б., Маслов Л.Н.// Томск.- 1994. – 352 с.

10. Лишманов Ю.Б. Роль периферических опиатных рецепторов мю- и дельта-типов в регуляции устойчивости сердца к аритмогенным воздействиям/ Лишманов Ю.Б., Крылатов А.В., Маслов Л.Н.// Рос. физиол. журн. – 1997. – Т.83, № 7. – С.80 – 87.
11. Лишманов Ю.Б. Опиоидная система и устойчивость сердца к повреждениям при ишемии-реперфузии./ Лишманов Ю.Б., Маслов Л.Н., Там С.В., Богомаз С.А.//Росс физиол. журн. 2000.- Т.86, № 2.- С. 164-173.
12. Марков В.А. Вчера, сегодня, завтра в диагностики и лечении острого инфаркта миокарда./ Марков В.А., Рябов В.В., Максимов И.В., Вышлов Е.В., Демьянов С.В., Сыркина А.Г., Белокопытова Н.В., Шурупов В.С., Оюнаров Э.О., Максимов А.И., Васильев А.Г. // Сиб. мед. журн. (Томск).- 2011.- Т.26, № 2.- С. 8-14.
13. Маслов Л.Н. Механизмы устойчивости сердца к стресс-индуцированным повреждениям/ Маслов Л.Н., Нарыжная Н.В., Барбараш Н.Л., Лишманов Ю.Б. // Рос. физиол. журн. – 1997. – Т.83, №3. – С. 43–50.
14. Маслов Л.Н. Об участии различных типов опиатных рецепторов в механизме стрессорного повреждения сердца/ Маслов Л.Н., Лишманов Ю.Б., Нарыжная Н.В. // Рос. физиол. журн. – 1996. – Т. 82, № 5, 6. – С. 53 – 58.
15. Маслова Л.В. Участие опиоидных пептидов в регуляции биосинтеза миокардиального белка при стрессе и адаптации/ Маслова Л.В., Лишманов Ю.Б., Смагин Г.Н. // Вопр. мед. химии. – 1991. – Т.37, №1. – С. 63–65.
16. Меерсон Ф.З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца./ Меерсон Ф.З.// М.- Медицина, 1984. – 272 с.
17. Нарыжная Н. В. Роль периферических и центральных мю-опиатных рецепторов в модуляции адренергического повреждения при стрессе/ Нарыжная Н. В., Маслов Л. Н., Ревинская Ю. Г., Лишманов Ю. Б.// Рос. физиол. журн. – 1998. – Т. 84, № 8. – С. 791 – 797.

18. Нейлер В.Г. Кальций и повреждение кардиомиоцитов. / Нейлер В.Г., Дейли М.Дж.// Физиология и патофизиология сердца. Под ред. Н. Сперелакиса. – М.- Медицина.- 1990. – Т.1. – С. 556–578.
19. Опи Х. С. Обмен веществ и энергии в миокарде/ Опи Х. С. // Физиология и патофизиология сердца Под ред. Н. Сперелакиса. – М.- Медицина, 1990. – Т.1. – С. 7–62.
20. Панченко Л.Ф. Метаболизм энкефалинов при различных функциональных и патологических состояниях организма/ Панченко Л.Ф., Митюшина Н.В., Фирстова Н.В., Генгин М.Т. //Вопр.мед.химии. – 1999. – № 4. – С. 277–289.
21. Реброва Т. Ю. Стимуляция  $\mu$ - и  $\delta$ -опиатных рецепторов и устойчивость изолированного сердца к окислительному стрессу: роль NO-синтазы/ Реброва Т. Ю., Маслов Л. Н., Лишманов А. Ю., Там С.В. //Биохимия. – 2001. – Т. 66, № 4. – С. 520–528.
22. Сакс В.А. Биохимия нормального и ишемизированного кардиомиоцита: современное состояние исследований./ Сакс В.А., Конорев Е.А. //Кардиология. – 1992. – №3. – С. 82–91.
23. Сергеев П.В. Рецепторы физиологически активных веществ./ Сергеев П.В., Шимановский Н.Л. // М.- Медицина.- 1987.- 400с.
24. Сыркин А. Л. Инфаркт миокарда. М.- МИА.- 2003. – 466 с.
25. Цибульников С.Ю. Исследование рецепторной природы опиоидного компонента кардиопротекторного эффекта адаптации к хронической нормобарической гипоксии./ Цибульников С.Ю. // Патогенез.- 2011.- № 3: С.69.
26. Чиченков О.Н. Анальгетические свойства различных лигандов опиоидных рецепторов/ Чиченков О.Н. //Анестезиол. реаниматол. – 1994. – №4. – С. 5–8.

27. Шаров В.Г. Ультраструктура поврежденного кардиомиоцита //Регуляция сократительной функции и метаболизма миокарда./ Шаров В.Г.// М.- Наука.- 1987. – С.188–212.
28. Шерман Д.М. Влияние налоксона, налорфина и даларгина на течение шока от сочетания механической травмы и острой кровопотери./ Шерман Д.М., Форманчук О.К. //Пат. физиол. эксп. тер. – 2004. – № 2. – С. 11–14.
29. Ярилин А.А. Апоптоз: природа феномена и его роль в норме и при патологии./ Ярилин А.А. // В кн.: Актуальные проблемы патофизиологии: избранные лекции. Под ред. Б.Б. Мороза. – М. Медицина.- 2001.- С. 13—56..
30. Aitchison K. A. Opposing effects on infarction of delta and kappa opioid receptor activation in the isolated rat heart: implications for ischemic preconditioning/ Aitchison K. A., Baxter G. F., Awan M. M, Smith R. M., Yellon D. M., Opie L. H. //Basic Res. Cardiol. – 2000. – V.95.– P.1–10.
31. Alker K.J. Stuttering reperfusion of ischemic myocardium does not exacerbate myocardial infarction: evidence against lethal cell reperfusion injury in the rabbit./ Alker K.J., Bellows S.D., Kloner R.A.// J. Thromb. Thrombolysis.- 1996.- V.3, № 3.- P.185-188.
32. Argaud L. Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition./ Argaud L., Gateau-Roesch O., Raisky O., Loufouat J., Robert D., Ovize M. //Circulation.- 2005.- V.111, № 2.- P.194-197.
33. Argaud L. Increased mitochondrial calcium coexists with decreased reperfusion injury in postconditioned (but not preconditioned) hearts./ Argaud L., Gateau-Roesch O., Augeul L., Couture-Lepetit E., Loufouat J., Gomez L., Robert D., Ovize M.// Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.- 2008.- V.294, № 1.- P.386-391.
34. Asano G. Pathogenesis and protection of ischemia and reperfusion injury in myocardium/ Asano G., En Takashi E., Ichiwata T.// J. Nippon. Med. Sch. – 2003. – V.70, № 5. – P.384–392.

35. Atsma D. E. Role of calcium-activated neutral protease (calpain) in cell death in cultured neonatal rat cardiomyocytes during metabolic inhibition./ Atsma D. E., Bastiaanse E. M., Jerzewski A., Van der Valk L. J., Van der Laarse A.// *Circ. Res.*- 1995.- V.76, № 6.- P.1071—1078.
36. Baxter G.F. Cardioprotective effects of transforming growth factor-beta1 during early reoxygenation or reperfusion are mediated by p42/p44 MAPK./ Baxter G.F., Mocanu M.M., Brar B.K., Latchman D.S., Yellon D.M.// *J. Cardiovasc. Pharmacol.*- 2001.- V.38, № 6.- P.930-939.
37. Baxter G.F. The neutrophil as a mediator of myocardial ischemia-reperfusion injury: time to move on./ Baxter G.F.//*Basic Res Cardiol.*- 2002.- V.97, № 4.- P.268-275.
38. Bell R.M. Bradykinin limits infarction when administered as an adjunct to reperfusion in mouse heart: the role of PI3K, Akt and eNOS./ Bell R.M., Yellon D.M.// *J. Mol. Cell. Cardiol.*- 2003.- V.35, № 2.- P.185-193.
39. Bers D. Calcium and cardiac rhythms. Physiological and pathophysiological/ Bers D. // *Circ. Res.*– 2002.– V.90.– P.14–17.
40. Boengler K. Cardioprotection by ischemic postconditioning is lost in aged and STAT3-deficient mice./ Boengler K., Buechert A., Heinen Y., Roeskes C., Hilfiker-Kleiner D., Heusch G., Schulz R. //*Circ. Res.*- 2008.- V.102, № 1.- P.131-135.
41. Bopassa J.C. PI 3-kinase regulates the mitochondrial transition pore in controlled reperfusion and postconditioning./ Bopassa J.C., Ferrera R., Gateau-Roesch O., Couture-Lepetit E., Ovize M.//*Cardiovasc. Res.*- 2006.- V.69, № 1.- P.178-185.
42. Bopassa JC. Protection of the ischemic myocardium during the reperfusion: between hope and reality./ Bopassa JC.// *Am. J. Cardiovasc. Dis.*- 2012.- V.2, № 3.- P.223-236.
43. Braunwald E. Clinical efforts to reduce myocardial infarct size--the next step./ Braunwald E. //*J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.*- 2011.- V.16, № 3.- P.349-353.



44. Broom D. C. Comparison of receptor mechanisms and efficacy requirements for delta-agonist-induced convulsive activity and nociception in mice/ Broom D. C., Nitsche J. F., Pintar J. E., Rice K. C. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.*– 2002.– V.303.– P.723–729.
45. Brown D. R. Delta-opioid receptor mRNA expression and immunogistochemical localization in porcine ileum/ Brown D. R. // *Dig. Dis. Sci.*– 1998.– V. 43.– P. 1402–1410.
46. Burley D.S. B-type natriuretic peptide at early reperfusion limits infarct size in the rat isolated heart./ Burley D.S., Baxter G.F.// *Basic Res. Cardiol.*- 2007.- V.102, № 6.- P.529-541.
47. Butler T. L. Dysfunction induced by ischemia versus edema: does edema matter?/ Butler T. L., Egan J. R., Graf F. G., Au C. G., McMahon A. C., North K. N. // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*- 2009.- V.138, № 1.- P.141–147.
48. Caffrey J. L. Enkephalin inhibits vagal control of heart rate, contractile force and coronary blood flow in the canine heart in vivo/ Caffrey J. L.//*J. Auton. Nerv. Syst.*– 1999.– V.76, № 2-3.– P.75–72.
49. Carmeliet E. Cardiac ionic current and acute ischemia: from channels to arrhythmias// *Physiol. Rev.*– 1999.– V.79.– P.917–1017.
50. Chang W.L. Attenuation of post-ischemia reperfusion injury by thaliporphine and morphine in rat hearts./ Chang W.L., Lee S.S., Su M.J.// *J. Biomed. Sci.*- 2005.- V.12, № 4.- P.611-619.
51. Chen H. Ischemic postconditioning inhibits apoptosis after renal ischemia/reperfusion injury in rat./ Chen H., Xing B., Liu X., Zhan B., Zhou J., Zhu H., Chen Z.// *Transpl. Int.*- 2008.-V. 21, № 4.- P. 364-371.
52. Chen K. Evolving concepts of oxidative stress and reactive oxygen species in cardiovascular disease.// *Curr. Atheroscler. Rep.* -2012.-V.14, № 5.- P. 476-483.

53. Chen S. The  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger in cardiac ischemia/reperfusion injury. // *Med. Sci. Monit.*- 2012.- V. 18, № 11.- P. 161-165.
54. Chen Z. Morphine postconditioning protects against reperfusion injury in the isolated rat hearts // *J. Surg. Res.*- 2008.- V. 145, № 2. P. 287-294.
55. Chien K. R. Phospholipid alterations and membrane injury during myocardial ischemia.// *Adv. Myocardiol.*- 1985.-V.5. P. 347—353.
56. Churchill E.N. Translocation of  $\delta$ PKC to mitochondria during cardiac reperfusion enhances superoxide anion production and induces loss in mitochondrial function/ Churchill E.N., Szweda L.I.// *Arch. Biochem. Biophys.*- 2005.- V. 439, № 2. P. 194-199.
57. Coetzee W.A. Reperfusion damage: free radicals mediate delayed membrane changes rather than early ventricular arrhythmias/ Coetzee W.A., Owen P., Dennis S.C., Saman S.// *Cardiovasc. Res.* – 1990. – V. 24, № 2. – P.156–164.
58. Cohen M.V. The pH hypothesis of postconditioning: staccato reperfusion reintroduces oxygen and perpetuates myocardial acidosis. *Circulation.*- 2007.- V. 115, № 14. P. 1895-1903.
59. Cohen MV. Cardioprotective PKG-independent NO signaling at reperfusion./ Cohen M.V., Yang X.M., Liu Y., Solenkova N.V., Downey J.M.//*Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*- 2010.- V.299, № 6.- P.2028-2036.
60. Cokkinos D.V. Myocardial protection in man - from research concept to clinical practice. / Cokkinos D.V., Pantos C.//*Heart Fail. Rev.*- 2007.- V. 12, № 4.- P. 345-362.
61. Connor M. Opioid receptor signalling mechanisms/ Connor M., Christie M. D. // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 1999. – V. 26, № 7. – P. 493–499.
62. Coop A. Role of  $\delta$ -opioid receptors in biological processes/ Coop A., Rice K. C. // *Drug News Perspect.* – 2000. – V.13, № 8. – P. 481–487.

63. Costa A.D. Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria./ Costa A.D., Garlid K.D., West I.C., Lincoln T.M., Downey J.M., Cohen M.V., Critz S.D. //Circ. Res.- 2005.- V. 97, № 4.- P. 329-336.
64. Costa A.D. The mechanism by which the mitochondrial ATP-sensitive  $K^+$  channel opening and  $H_2O_2$  inhibit the mitochondrial permeability transition./ Costa A.D., Jakob R., Costa C.L., Andrukhiv K., West I.C., Garlid K.D.// J. Biol. Chem.- 2006.- V. 281, № 30.- P. 20801-20808.
65. Costa A.D. cGMP signalling in pre- and post-conditioning: the role of mitochondria./ Costa A.D., Pierre S.V., Cohen M.V., Downey J.M., Garlid K.D. // Cardiovasc. Res.- 2008.- V. 77, № 2.- P. 344-352.
66. Couvreur N. Differential effects of postconditioning on myocardial stunning and infarction: a study in conscious dogs and anesthetized rabbits./ Couvreur N., Lucats L., Tissier R., Bize A., Berdeaux A., Ghaleh B. // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.- 2006.-V. 291, № 3.- P. 1345-1350.
67. Crisostomo P.R. Postconditioning in females depends on injury severity/ Crisostomo P.R., Wang M., Wairiuko G.M.// J. Surg. Res.- 2006.- V.134, № 2.- P.342-347.
68. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death.// Biochem. J.- 1999.- V. 341, № 2.- P. 233-249.
69. Crompton M. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death. // J. Physiol.- 2000.-V. 529, № 1.- P. 11-21.
70. Cserepes B. Cardioprotective action of urocortin in early pre- and postconditioning./ Cserepes B., Jancsy G., Gasz B., Rócz B., Ferenc A., Benky L., Borsiczky B., Karthy M., Ferencz S., Lantos J., G.J., Araty E., Miseta A., Wíber G., Ryth E.//Ann. N. Y. Acad Sci.- 2007.- V.1095.- P.228-239.
71. Danielisova V. The changes in endogenous antioxidant enzyme activity after postconditioning./ Danielisova V., Nemethov. M., Gottlieb M., Burda J. // Cell. Mol. Neurobiol.- 2006.- V. 26, № 7.- P. 1181-1191.

72. Darling C.E. Postconditioning via stuttering reperfusion limits myocardial infarct size in rabbit hearts: role of ERK1/2. / Darling C.E., Jiang R., Maynard M., Whittaker P., Vinten-Johansen J., Przyklenk K.//Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.- 2005.- V. 289, № 4.- P. 1618-1626.
73. Dempsey, E.C. Protein kinase C izozyms and the regulation of diverse cell responses / E.C. Dempsey // Am J. Physiol. Lung Cell. Moll. Physiol. – 2000. – V. 279. – P. 429-438.
74. Di Lisa F. Mitochondrial contribution in the progression of cardiac ischemic injury// JUBMB Life. – 2001. – V.5, № 3-5. – P. 255-261.
75. Donato M. Ischemic postconditioning reduces infarct size by activation of A<sub>1</sub> receptors and K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> channels in both normal and hypercholesterolemic rabbits./ Donato M., D'Annunzio V., Berg G., Gonzalez G., Schreier L., Morales C., Wikinski R.L., Gelpi R.J.// J. Cardiovasc. Pharmacol.- 2007.- V. 49, № 5. – P. 287-292.
76. Dong S. Post-conditioning protects cardiomyocytes from apoptosis via PKC (epsilon)-interacting with calcium-sensing receptors to inhibit endo(sarco)plasmic reticulum-mitochondria crosstalk./ Dong S., Teng Z., Lu F.H., Zhao Y.J., Li H., Ren H., Chen H., Pan Z.W., Lv Y.J., Yang B.F., Tian Y., Xu C.Q., Zhang W.H.//Mol. Cell. Biochem.- 2010.- V.341, № 2.- P.195-206.
77. Dow J. Postconditioning does not reduce myocardial infarct size in an in vivo regional ischemia rodent model./ Dow J., Kloner R.A.// J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.- 2007.- V. 12, № 2.- P. 153-163.
78. Dow J. Ischemic postconditioning's benefit on reperfusion ventricular arrhythmias is maintained in the senescent heart./ Dow J., Bhandari A., Kloner R.A.//J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.- 2008a.- V. 13, № 2.- P.141-148.
79. Duchen M. R. Mitochondria and Ca<sup>2+</sup> in cells. Physiology and pathophysiology// Cell. Calcium. – 2000. – V. 28. – P. 339–348.

80. Eaton P. Lipid hydroperoxide modification of protein during myocardial ischaemia/ Eaton P., Hearse D. J., Shattock M. J.// *Cardiovasc. Res.* – 2001. – V. 51, №3. – P. 294–303.
81. Eguchi M. Recent advances in selective opioid receptor agonists and antagonists// *Medical Research Rev.* – 2004. – V. 24, № 2. – P. 182–212.
82. Elde R. Distribution of neuropeptide receptors. New views of peptidergic neurotransmission made possible by antibodies to opioid receptors// *Ann. NY Acad. Sci.* – 1995. – V. 757. – P. 390–404.
83. Fang J. Postconditioning attenuates cardiocyte ultrastructure injury and apoptosis by blocking mitochondrial permeability transition in rats./ Fang J., Wu L., Chen L.// *Acta Cardiol.*- 2008.- V. 63, № 3.- P. 377-387.
84. Fantinelli J.C. Comparative effects of ischemic pre and postconditioning on ischemia-reperfusion injury in spontaneously hypertensive rats (SHR)/ Fantinelli J.C., Mosca S.M.// *Mol. Cell. Biochem.*- 2007.- V. 296, № 1-2.- P. 45-51.
85. Ferrera R. Post-conditioning protects from cardioplegia and cold ischemia via inhibition of mitochondrial permeability transition pore./ Ferrera R., Bopassa J.C., Angoulvant D., Ovize M.//*J. Heart Lung Transplant.*- 2007.- V. 26, № 6.- P. 604-609.
86. Festjens N. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response./ Festjens N. Vanden Berghe T., Vandenabeele P.//*Biochim. Biophys. Acta.*- 2006.- V.1757.- P. 1371–1387.
87. Fryer R.M. Importance of PKC and tyrosine kinase in single or multiple cycles of preconditioning in rat hearts./ Fryer R.M., Schultz J.E.J., Hsu A.K., Gross G.J.// *Am. J. Physiol.*- 1999.- V. 276.- P. H1229-H1235.
88. Fujita M. Prolonged transient acidosis during early reperfusion contributes to the cardioprotective effects of postconditioning./ Fujita M., Asanuma H., Hirata A., Wakeno M., Takahama H., Sasaki H., Kim J., Takashima S.,

Tsukamoto O., Minamino T., Shinozaki Y., Tomoike H., Hori M., Kitakaze M.// *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*- 2007.- V. 292, № 4.- P. H2004-H2008.

89. Galagudza M. Ischemic postconditioning: brief ischemia during reperfusion converts persistent ventricular fibrillation into regular rhythm./ Galagudza M., Kurapeev D., Minasian S., Valen G., Vaage J.// *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*- 2004.- V. 25, № 6.- P. 1006-1010.

90. Gao X. Protective effects of ischemic postconditioning compared with gradual reperfusion or preconditioning./ Gao X., Ren C., Zhao H.//*J. Neurosci. Res.*- 2008a.- V. 86, № 11.- P. 2505-2511.

91. Gao X. The Akt signaling pathway contributes to postconditioning's protection against stroke; the protection is associated with the MAPK and PKC pathways./ Gao X., Zhang H., Takahashi T., Hsieh J., Liao J., Steinberg G.K., Zhao H. //*J. Neurochem.*- 2008b.- V. 105, № 3.- P. 943-955.

92. Gateau-Roesch O. Mitochondrial permeability transition pore and postconditioning./ Gateau-Roesch O., Argaud L., Ovize M. // *Cardiovasc. Res.*- 2006.- V. 70, № 2.- P. 264-273.

93. Gomez L. Inhibition of mitochondrial permeability transition improves functional recovery and reduces mortality following acute myocardial infarction in mice./ Gomez L., Thibault H., Gharib A., Dumont J.M., Vuagniaux G., Scalfaro P., Derumeaux G., Ovize M.// *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*- 2007.- V. 293, № 3.- P. H1654-H1661.

94. Gomez L. Inhibition of GSK3 $\beta$  by postconditioning is required to prevent opening of the mitochondrial permeability transition pore during reperfusion./ Gomez L., Paillard M., Thibault H., Derumeaux G., Ovize M.//*Circulation.*- 2008.- V. 117, № 21.- P. 2761-2768.

95. Gottlieb R.A. Mitochondria: execution central.//*FEBS Lett.*- 2000.- V. 482, № 1.- P. 6-12.

96. Gottlieb R.A. Mitochondrial signaling in apoptosis: mitochondrial daggers to the breaking heart./ /Basic. Res. Cardiol.- 2003.- V. 98.- P. 242-249.
97. Griffiths E.J. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion./ Griffiths E.J., Halestrap A.P. // Biochem J.- 1995.- V. 307, № 1.- P. 93-98.
98. Grinwald P. M. Calcium entry in the calcium paradox/ Grinwald P. M., Nayler W. G. // J. Molec. Cell. Cardiol. – 1981. – V. 13. – P. 867–880.
99. Gross G. J. Mechanisms of postischemic contractile dysfunction/ Gross G. J., Kersten J. R., Warltier D. C. // Ann. Thorac. Surg. – 1999. – V. 68. – P. 1898–1904.
100. Gross G. J. The role of opioids in acute and delayed preconditioning // J. Mol. Cell. Cardiol.- 2003.- V. 35, № 7.- P. 709-718.
101. Gross E.R. Diabetes abolishes morphine-induced cardioprotection via multiple pathways upstream of glycogen synthase kinase-3 $\beta$ / Gross E.R., Hsu A.K., Gross G.J.// Diabetes.- 2007a.- V. 56, № 1.- P. 127-136.
102. Gross E.R. GSK3 $\beta$  inhibition and K<sub>ATP</sub> channel opening mediate acute opioid-induced cardioprotection at reperfusion / Gross E.R., Hsu A.K., Gross G.J.// Basic Res. Cardiol.- 2007b.- V. 102, № 4.- P. 341-349.
103. Hahn E. F. Naloxonazine, a potent, long-acting inhibitor of opiate binding sites/ Hahn E. F., Pasternak G. W.// Life Sci. – 1982. – V. 31. – P. 1385–1388.
104. Hale S.L. Postconditioning fails to improve no reflow or alter infarct size in an open-chest rabbit model of myocardial ischemia-reperfusion./ Hale S.L., Mehra A., Leeka J., Kloner R.A.// Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.- 2008.- V. 294, № .- P. H421-H425.
105. Halestrap A.P. The permeability transition pore complex: another view./ Halestrap A.P., McSay G.P., Clarke S.J. // Biochimie.- 2002.- V. 84.- P. 153-166.

106. Halestrap A.P.. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion - a target for cardioprotection./ Halestrap A.P., Clarke S.J., Javadov S.A.// *Cardiovasc. Res.*- 2004.- V. 61, № 3.- P. 372-385.
107. Halestrap A.P. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die.// *Biochem. Soc. Trans.*- 2006.- V. 34, № 2.- P. 232-237.
108. Halestrap A.P. A pore way to die: the role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection.// *Biochem. Soc. Trans.*- 2010.- V.38.- P. 841–860..
109. Halkos M.E. Myocardial protection with postconditioning is not enhanced by ischemic preconditioning. / Halkos M.E., Kerendi F., Corvera J.S., Wang N.P., Kin H., Payne C.S., Sun H.Y., Guyton R.A., Vinten-Johansen J., Zhao Z.Q.// *Ann. Thorac. Surg.*- 2004.- V. 78, № 3.- P. 961-969.
110. Hausenloy D.J. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning?/ Hausenloy D.J., Maddock H.L., Baxter G.F., Yellon D.M. // *Cardiovasc. Res.*- 2002.- V. 55, № 3.- P. 534-543.
111. Hausenloy D.J. Preconditioning and postconditioning: united at reperfusion./ Hausenloy D.J., Yellon D.M.// *Pharmacol. Ther.*- 2007.- V. 116, № 2.- P. 173-191.
112. Hearse D. J. Free radicals and calcium: Simultaneous interacting triggers as determinants of vulnerability to reperfusion-induced arrhythmias in the heart / Hearse D. J., Tosaki A. // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 1988. – V. 20. – P. 213–223.
113. Herzog W.R. Short-term low dose intracoronary diltiazem administered at the onset of reperfusion reduces myocardial infarct size./ Herzog W.R., Vogel R.A., Schlossberg M.L., Edenbaum L.R., Scott H.J., Serebruany V.L.// *Int. J. Cardiol.*- 1997.- V. 59, № 1.- P. 21-27.
114. Hess M. L. M. Molecular oxygen: friend and foe. The role of oxygen free radical system in the calcium paradox, the oxygen paradox and ischemia/reperfusion injury/ Hess M. L., Manson N. M. // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 1984. – V. 16. – P. 969–985.



115. Heusch G. No loss of cardioprotection by postconditioning in connexin 43-deficient mice./ Heusch G., Bachert A., Feldhaus S., Schulz R. // *Basic Res. Cardiol.*- 2006.- V. 101, № 4.- P. 354-356.
116. Higgins I. J. The relationship between glycolysis fatty acid metabolism and membrane integrity in neonatal myocytes/ Higgins I. J., Allsopp D., Bailey P. J., D'Souza E. D. A. // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 1981. – V. 13, № 6. – P. 599–617.
117. Hochhauser E. Bax ablation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in transgenic mice./ Hochhauser E., Kivity S., Offen D., Maulik N., Otani H., Barhum Y., Pannet H., Shneyvays V., Shainberg A., Goldshtaub V., Tobar A., Vidne B.A. // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*- 2003.- V.284.- P. H2351–H2359.
118. Hock V. T. L. Mitochondrial electron transport can become a significant source of oxidative injury in cardiomyocytes/ Hock V. T. L., Shao Z., Schumacker P. T., Becker L.// *J. Mol. Cell. Card.* – 1997. – V. 29, № 5. – P. 2441–2450.
119. Huang H. Effect of ischemic post-conditioning on spinal cord ischemic-reperfusion injury in rabbits./ Huang H., Zhang L., Wang Y., Yao J., Weng H., Wu H., Chen Z., Liu J. // *Can. J. Anaesth.*- 2007.- V. 54, №1.- P. 42-48.
120. Iliodromitis E.K. The effectiveness of postconditioning and preconditioning on infarct size in hypercholesterolemic and normal anesthetized rabbits./ Iliodromitis E.K., Zoga A., Vrettou A., Andreadou I., Paraskevaïdis I.A., Kaklamanis L., Kremastinos D.T.// *Atherosclerosis.*-2006.- V. 188, № 2.- P. 356-362.
121. Imahashi K. Transgenic expression of Bcl-2 modulates energy metabolism, prevents cytosolic acidification during ischemia, and reduces ischemia/reperfusion injury./ Imahashi K., Schneider M. D., Steenbergen C., Murphy E.// *Circ. Res.*- 2004.- V. 95.- P. 734–741.
122. Inagaki K. Inhibition of  $\delta$ -protein kinase C protects against reperfusion injury of the ischemic heart in vivo. / Inagaki K., Chen L., Ikeno F., Lee F.H.,

Imahashi K., Bouley D.M., Rezaee M., Yock P.G., Murphy E., Mochly-Rosen D.// Circulation.- 2003a.- V. 108, №19.- P. 2304-2307.

123. Inagaki K.. Additive protection of the ischemic heart ex vivo by combined treatment with  $\delta$ -protein kinase C inhibitor and  $\varepsilon$ -protein kinase C activator/ Inagaki K., Hahn H.S., Dorn G.W., Mochly-Rosen D. // Circulation.-2003b.-V. 108, № 7.- P. 869-875

124. Iwai T. Sodium accumulation during ischemia induces mitochondrial damage in perfused rat hearts/ Iwai T., Tanonaka K., Inouer R., Kasahara S., Motegi K., Nagaya S., Takeo S. // Cardiovasc. Res. – 2002a. – V. 55, №1. – P. 141–149.

125. Iwai T. Mitochondrial damage during ischemia determine post-ischemic contractile dysfunction in perfused rat heart/ Iwai T., Tanonaka K., Inouer R., Takeo S.// J. Mol. Cell.Cardiol. – 2002b. – V. 34, № 7. – P. 699– 702.

126. Iwase H. Nitric oxide during ischemia attenuates oxidant stress and cell death during ischemia and reperfusion in cardiomyocytes./ Iwase H., Robin E., Guzy R.D., Mungai P.T., Vanden Hoek T.L., Chandel N.S., Levraut J., Schumacker P.T.// Free Radic. Biol. Med.- 2007.- V. 43, № 4.- P. 590-599.

127. Jang Y. Postconditioning prevents reperfusion injury by activating  $\delta$ -opioid receptors./ Jang Y., Xi J., Wang H., Mueller R.A., Norfleet E.A., Xu Z.//Anesthesiology.- 2008.- V.108, № 2.- P.243-250.

128. Jennings R.B. Metabolism of preconditioned myocardium: effect of loss and reinstatement of cardioprotection./ Jennings R.B., Sebbag L., Schwartz L.M., Crago M.S., Reimer K.A. // J. Mol. Cell. Cardiol.- 2001.- V. 33, № 9.- P.1571-1588.

129. Jiang X. Co-application of ischemic preconditioning and postconditioning provides additive neuroprotection against spinal cord ischemia in rabbits./ Jiang X., Shi E., Li L., Nakajima Y., Sato S.// Life Sci.- 2008.- V. 82, №12.- P. 608-614.

130. Jiang X. Postconditioning, a series of brief interruptions of early reperfusion, prevents neurologic injury after spinal cord ischemia./ Jiang X., Shi E., Nakajima Y., Sato S.// *Ann. Surg.*- 2006.- V. 244, №1.- P. 148-153.
131. Jin Z.Q. Ischaemic postconditioning protects isolated mouse hearts against ischaemia/reperfusion injury via sphingosine kinase isoform-1 activation./ Jin Z.Q., Karliner J.S., Vessey D.A. // *Cardiovasc. Res.*- 2008.- V. 79, №1.- P. 134-140.
132. Juhaszova M. Role of glycogen synthase kinase-3beta in cardioprotection./ Juhaszova M., Zorov D.B., Yaniv Y., Nuss H.B., Wang S., Sollott S.J.//*Circ. Res.*- 2009.- V.104, № 11.- P.1240-1252.
133. Kaljusto M.L. Postconditioning in rats and mice./ Kaljusto M.L., Mori T., Mohammad Husain Rizvi S., Galagudza M., Frantzen M.L., Valen G., Vaage J. //*Scand. Cardiovasc. J.*- 2006.- V. 40, №6.- P. 334-341.
134. Kark M. Myocardial protection by ischemic preconditioning and delta opioid receptor activation in the isolated working rat heart/ Karck M., Tanaka S., Bolling S.F., Simon A., Su T.P., Oeltgen P.R., Haverich A.// *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 2001. – V. 122, №5.- P. 986-992.
135. Kim S. J. In vivo gene delivery of XIAP protects against myocardial apoptosis and infarction following ischemia/reperfusion in conscious rabbits./ Kim S. J., Kuklov A., Crystal G. J. //*Life Sci.*- 2011.- V.88, №14.- P. 572—577.
136. Kimura Y. Expression of urocortin and corticotrophin-releasing factor receptor subtypes in the human heart. //*J. Clin. Endocrinol. Metab.*- 2002.- V. 87.- P. 340-346.
137. Kin H. Activation of opioid receptors mediates the infarct size reduction by postconditioning./ Kin H., Zatta A.J., Jiang R., Reeves J.G., Mykytenko J., Sorescu G., Zhao Z.Q., Wang N.P., Guyton R.A., Vinten-Johansen J. // *J. Mol. Cell. Cardiol.*- 2005a.- V. 38, № 5.- P. 827.

138. Kloner R.A. The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. / Kloner R.A., Ganote C.E., Jennings R.B. // *J. Clin. Invest.* - 1974. - V. 54, № 6. - P. 1496-1508.
139. Kloner R.A. Postconditioning markedly attenuates ventricular arrhythmias after ischemia-reperfusion. / Kloner R.A., Dow J., Bhandari A. // *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* - 2006. - V. 11, №1. - P. 55-63.
140. Kojima A. Sevoflurane protects ventricular myocytes from Ca<sup>2+</sup> paradox-mediated Ca<sup>2+</sup> overload by blocking the activation of transient receptor potential canonical channels. / Kojima A, Kitagawa H, Omatsu-Kanbe M, Matsuura H, Nosaka S. // *Anesthesiology.* - 2011. - V. 115, №3. - P. 509-22.
141. Kostyak J.C. Acute PKC $\delta$  inhibition limits ischaemia-reperfusion injury in the aged rat heart: role of GSK-3 $\beta$ . / Kostyak J.C., Hunter J.C., Korzick D.H. // *Cardiovasc. Res.* - 2006. - V. 70, №2. - P. 325-334.
142. Kroemer G. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. / Kroemer G., Galluzzi L., Brenner C. // *Physiol. Rev.* - 2007. - V. 7, №1. - P. 99—163.
143. Kuno A. Infarct limitation by a protein kinase G activator at reperfusion in rabbit hearts is dependent on sensitizing the heart to A<sub>2b</sub> agonists by protein kinase C. / Kuno A., Solenkova N.V., Solodushko V., Dost T., Liu Y., Yang X.M., Cohen M.V., Downey J.M. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* - 2008. - V. 295, №3. - P. H1288-H1295.
144. Kunugi S. Negative-feedback regulation of ATP release: ATP release from cardiomyocytes is strictly regulated during ischemia. / Kunugi S., Iwabuchi S., Matsuyama D., Okajima T., Kawahara K. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2011. - V. 416, №4. - P. 409-15.
145. Lacerda L. Ischaemic postconditioning protects against reperfusion injury via the SAFE pathway. / Lacerda L., Somers S., Opie L.H., Lecour S. // *Cardiovasc. Res.* - 2009. - V. 84, № 2. - P. 201-208.

146. Lauzier B. After four hours of cold ischemia and cardioplegic protocol, the heart can still be rescued with postconditioning./ Lauzier B., Sicard P., Bouchot O., Delemasure S., Menetrier F., Moreau D., Vergely C., Rochette L. // Transplantation.- 2007.- V. 84, №11.- P. 1474-1482.

147. Lauzier B. Beneficial effects of myocardial postconditioning are associated with reduced oxidative stress in a senescent mouse model./ Lauzier B., Delemasure S., Debin R., Collin B., Sicard P., Acar N., Bretillon L., Joffre C., Bron A., Creuzot-Garcher C., Vergely C., Rochette L. //Transplantation.- 2008.- V. 85, №12.- P. 1802-1808.

148. Levac B. A. Oligomerization of opioid receptors: generation of novel signaling units/ Levac B. A., O'Dowd B. F., George S. R.// Curr. Opin. Pharmacol. – 2002. – V. 2, № 1. – P. 76–81.

149. Levraut J. Cell death during ischemia: relationship to mitochondrial depolarization and ROS generation. /Levraut J., Iwase H., Shao Z. H., Vanden Hoek T. L., Schumacker P. T. // Am J Physiol Heart Circ. Physiol.- 2003.- V. 284, № 2.- P. H549-H558.

150. Li D. Calcitonin gene-related peptide-mediated cardioprotection of postconditioning in isolated rat hearts./ Li D., Li N.S., Chen Q.Q., Guo R., Xu P.S., Deng H.W., Li Y.J. // Regul. Pept.- 2008.- V. 147, № 3.- P. 4-8.

151. Li L. Y. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria./ Li L. Y., Luo X., Wang X.// Nature.- 2001.- V.412.- P. 95–99.

152. Li S. Protective effects of ischemic postconditioning against hypoxia-reoxygenation injury and hydrogen peroxide-induced damage in isolated rat hearts./ Li S., Wu J., Watanabe M., Li C., Okada T. // Exp. Clin. Cardiol.- 2006.- V. 11, №4.- P. 280-285.

153. Lim S.Y. Preconditioning and postconditioning: the essential role of the mitochondrial permeability transition pore./ Lim S.Y., Davidson S.M., Hausenloy D.J., Yellon D.M. // Cardiovasc. Res.- 2007.- V. 75, № 3.- P. 530-535.

154. Liu X. Attenuation of reperfusion injury by renal ischemic postconditioning: the role of NO./ Liu X., Chen H., Zhan B., Xing B., Zhou J., Zhu H., Chen Z. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*- 2007.- V. 359, № 3.- P. 628-634.
155. Lu J. Effects of postconditioning of adenosine and acetylcholine on the ischemic isolated rat ventricular myocytes./ Lu J., Zang W.J., Yu X.J., Jia B., Chorvatova A., Sun L.// *Eur. J. Pharmacol.*- 2006.- V. 549, №3.- P. 133-139.
156. Lu Y. JAK/STAT and PI3K/AKT pathways form a mutual transactivation loop and afford resistance to oxidative stress-induced apoptosis in cardiomyocytes./ Lu Y., Zhou J., Xu C., Lin H., Xiao J., Wang Z., Yang B.// *Cell. Physiol. Biochem.*- 2008.- V.21, № 4.- P.305-314.
157. Mace P. D. Molecular cell death platforms and assemblies./ Mace P. D., Riedl S. J. // *Curr. Opin. Cell. Biol.*- 2010.- V. 22, № 4.- P.828—836.
158. Majno G. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death./ Majno G., Joris I.// *Am. J. Pathol.*- 1995.- V. 146, №1.- P. 3 – 15.
159. Mako E. Characterization of kappa and delta opioid receptors in isolated organs by using type/subtype selective agonists and antagonists/ Mako E., Ronai A. Z. // *Med. Sci. Monit.* – 2001. –V. 7, №3. – P. 350–356.
160. Manintveld O.C. Cardiac effects of postconditioning depend critically on the duration of index ischemia./ Manintveld O.C., Te Lintel Hekkert M., van den Bos E.J., Suurenbroek G.M., Dekkers D.H., Verdouw P.D., Lamers J.M., Duncker D.J. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*- 2007.- V. 292, № 3.- P. H1551-H1560.
161. Marks A. R. Calcium and the heart: a question of life and death// *J. Clin. Invest.* – 2003. – V.111. – P.597–600.
162. Maslov L. N. The anti-arrhythmic effect of D-Ala<sup>2</sup>, Leu<sup>5</sup>,Arg<sup>6</sup>-enkephalin and its possible mechanism/ Maslov L. N., Lishmanov Yu. B. // *Int. J. Cardiol.* – 1993. – V. 40, № 2. – P. 89–94.

163. McAllister S.E. Postconditioning for salvage of ischemic skeletal muscle from reperfusion injury: efficacy and mechanism./ McAllister S.E., Ashrafpour H., Cahoon N., Huang N., Moses M.A., Neligan P.C., Forrest C.R., Lipa J.E., Pang C.Y. // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*- 2008.- V. 295, № 2.- P. 681-689.

164. Minami M. Molecular biology of the opioid receptors: Structures functions and distributions// *Neurosci. Res.* – 1995. – V. 23. – P. 121–45.

165. Mocanu M.M. Caspase inhibition and limitation of myocardial infarct size: protection against lethal reperfusion injury./ Mocanu M.M., Baxter G.F., Yellon D.M. // *Br. J. Pharmacol.*- 2000.- V.130, № 2.- P.197 –200.

166. Moriguchi A. Inhibition of contractile activity during postconditioning enhances cardioprotection by restoring sarcolemmal dystrophin through phosphatidylinositol 3-kinase./ Moriguchi A., Otani H., Yoshioka K., Shimazu T., Fujita M., Okazaki T., Sato D., Kyoji S., Iwasaka T.//*Circ. J.*- 2010.- V.74, № 11.- P.2393 – 2402.

167. Morrison R.R. Targeted deletion of A<sub>2A</sub> adenosine receptors attenuates the protective effects of myocardial postconditioning. / Morrison R.R., Tan X.L., Ledent C., Mustafa S.J., Hofmann P.A. // *Am. J. Physiol. Heart Circ Physiol.*- 2007.- V. 293, №4.- P. H2523-H2529.

168. Movassagh M., Foo R. S. Simplified apoptotic cascades.// *Heart Fail. Rev.*- 2008.- V.13, №2.- P. 111-119.

169. Murry, C.E. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium./ Murry C.E., Jennings R.B., Reimer K.A. // *Circulation.*– 1986.– V.74, № 5.- P.1124-1136.

170. Musiai K. Matrix metalloproteinases and soluble Fas/FasL system as novel regulators of apoptosis in children and young adults on chronic dialysis./ Musiai K., Zwolicka D. // *Apoptosis.*- 2011.- V.16, № 7.- P. 653—659.

171. Nagata S. The Fas death factor./ Nagata S., Golstein P. // Science.- 1995.- V. 267, № 5203.- P. 1449-1456.
172. Namekata I. Reduction by SEA0400 of myocardial ischemia-induced cytoplasmic and mitochondrial  $Ca^{2+}$  overload./ Namekata I., Shimada H., Kawanishi T., Tanaka H., Shigenobu K. // Eur. J. Pharmacol.- 2006.- V.543.- P. 108–115.
173. Neckar J. Cardioprotective effect of chronic hypoxia is blunted by concomitant hypercapnia./ Neckar J., Sarszoi O., Herget J., Ostadal B., Kolar F. //Physiol. Res.- 2003.- V.52, № 2.- P.171-175.
174. Neckar J. Increased expression and altered subcellular distribution of PKC- $\delta$  in chronically hypoxic rat myocardium: involvement in cardioprotection / Neckar J., Markova I., Novak F. // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.- 2005.- V. 288.- P. 566–572.
175. Ovize M. Postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand?/ Ovize M., Baxter G.F., Di Lisa F., Ferdinandy P., Garcia-Dorado D., Hausenloy D.J., Heusch G., Vinten-Johansen J., Yellon D.M., Schulz R.// Cardiovasc. Res.- 2010.- V.87, № 3.- P.406-423.
176. Penna C. Post-conditioning induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism, mitochondrial ATP-sensitive  $K^+$  channel and protein kinase C activation. / Penna C., Rastaldo R., Mancardi D., Raimondo S., Cappello S., Gattullo D., Losano G., Pagliaro P.//Basic Res. Cardiol.- 2006.- V. 101, № 2.- P. 180-189.
177. Penna C. Intermittent activation of bradykinin B2 receptors and mitochondrial KATP channels trigger cardiac postconditioning through redox signaling./ Penna C., Mancardi D., Rastaldo R., Losano G., Pagliaro P. // Cardiovasc. Res.- 2007.- V. 75, № 1.- P. 168-177.
178. Ruiz-Meana M. Translational cardiovascular medicine (II). Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury: new therapeutic options for acute



myocardial infarction./ Ruiz-Meana M., Garcia-Dorado D.//Rev. Esp. Cardiol.- 2009.- V.62, № 2.- P.199-209.

179. Sasaki H. Brief ischemia-reperfusion performed after prolonged ischemia (ischemic postconditioning) can terminate reperfusion arrhythmias with no reduction of cardiac function in rats./ Sasaki H., Shimizu M., Ogawa K., Okazaki F., Taniguchi M., Taniguchi I., Mochizuki S. //Int. Heart J.- 2007.- V.48, № 2.- P.205-213.

180. Srensson P. Effect of postconditioning on infarct size in patients with ST elevation myocardial infarction./ Srensson P., Saleh N., Bouvier F., Buhm F., Settergren M., Caidahl K., Tornvall P., Arheden H., Rydén L., Pernow J.//Heart.- 2010.- V.96, № 21.- P.1710-1715.

181. Sugden PH. Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) in the heart: a point of integration in hypertrophic signalling and a therapeutic target?/ Sugden PH., Fuller S.J., Weiss S.C., Clerk A.//Br. J. Pharmacol.- 2008.- V.153, №1.- P.137-153.

182. Tarantini G. Design and methodologies of the POSTconditioning during coronary angioplasty in acute myocardial infarction (POST-AMI) trial./ Tarantini G., Favaretto E., Napodano M., Perazzolo Marra M., Cacciavillani L., Babuin L., Giovagnoni A., Renda P., De Biasio V., Plebani M., Mion M., Zaninotto M., Mistrorigo F., Panfili M., Isabella G., Bilato C., Iliceto S.// Cardiology.- 2010.- V.116, № 2.- P.110-116.

183. Tong G. U50,488H postconditioning reduces apoptosis after myocardial ischemia and reperfusion./ Tong G., Sun Z., Wei X., Gu C., Kaye A.D., Wang Y., Li J., Zhang Q., Guo H., Yu S., Yi D., Pei J.// Life Sci.- 2011.- V.88, № 1.- P.31-38.

184. Tsang A. Postconditioning: a form of "modified reperfusion" protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway./ Tsang A., Hausenloy D.J., Mocanu M.M., Yellon D.M.//Circ. Res.- 2004.- V.95, № 3.- P.230-232.

185. Tsang A. Postconditioning: a form of "modified reperfusion" protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway/Tsang A.,

Hausenloy D.J., Mocanu M.M., Yellon D.M. // *Circ. Res.*- 2004.- V. 95, № 3.- P. 230-232.

186. Turer A.T. Pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury and rationale for therapy./ Turer A.T., Hill J.A. // *Am. J. Cardiol.*- 2010.- V.106, № 3.- P.360-368.

187. Uecker M. Translocation of protein kinase C isoforms to subcellular targets in ischemic and anesthetic preconditioning./ Uecker M., da Silva R., Grampp T., Pasch T., Schaub M.C., Zaugg M. // *Anesthesiology.*- 2003.- V. 99.- P. 138–147.

188. Vinten-Johansen J. Postconditioning - a new link in nature's armor against myocardial ischemia-reperfusion injury/Vinten-Johansen J., Zhao Z.Q., Zatta A.J. // *Basic Res. Cardiol.*- 2005.-V. 100. № 4.- P. 295-310.

189. Wang H.C. Hypoxic postconditioning enhances the survival and inhibits apoptosis of cardiomyocytes following reoxygenation: role of peroxynitrite formation / Wang H.C., Zhang H.F., Guo W.Y.// *Apoptosis.*- 2006.- V.11, № 8.- P.1453-1460.

190. Yetgin T. Postconditioning against ischaemia-reperfusion injury: ready for wide application in patients?/ Yetgin T., Manintveld O.C., Duncker D.J., van der Giessen W.J. // *Neth. Heart J.*- 2010.- V.18, № 7.- P.389-392.

191. Yu L.N. Sevoflurane postconditioning reduces myocardial reperfusion injury in rat isolated hearts via activation of PI3K/Akt signaling and modulation of Bcl-2 family proteins./ Yu L.N., Yu J., Zhang F.J., Yang M.J., Ding T.T., Wang J.K., He W., Fang T., Chen G., Yan M.// *J. Zhejiang. Univ. Sci. B.*- 2010.- V.11, № 9.- P.661-672.

192. Zatta A.J. Infarct-sparing effect of myocardial postconditioning is dependent on protein kinase C signalling./ Zatta A.J., Kin H., Lee G., Wang N., Jiang R., Lust R., Reeves J.G., Mykytenko J., Guyton R.A., Zhao Z.Q., Vinten-Johansen J.// *Cardiovasc Res.*- 2006.- V.70, № 2.- P.315-324.

193. Zatta A.J. Evidence that cardioprotection by postconditioning involves preservation of myocardial opioid content and selective opioid receptor activation./

Zatta A.J., Kin H., Yoshishige D., Jiang R., Wang N., Reeves J.G., Mykytenko J., Guyton R.A., Zhao Z.Q., Caffrey J.L., Vinten-Johansen J.//Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.- 2008.- V.294, № 3.- P.1444-1451.

194. Zhao J.L. Different effects of postconditioning on myocardial no-reflow in the normal and hypercholesterolemic mini-swines./ Zhao J.L., Yang Y.J., You S.J., Cui C.J., Gao R.L.//Microvasc. Res.- 2007.- V.73, № 2.- P.137-142.

195. Zhao Z.Q. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning/ Zhao Z.Q., Corvera J.S., Halkos M.E.// Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.- 2003.- V.285, № 2.- P.579-588.

196. Zhao Z.Q. Postconditioning: reduction of reperfusion-induced injury/Zhao Z.Q., Vinten-Johansen J. // Cardiovasc. -Res. 2006.- V. 70. № 2.- P. 200-211.

197. Zhao Z.Q. Postconditioning in reperfusion injury: a status report.// Cardiovasc. Drugs. Ther.- 2010.- V.24, № 3.- P.265-279.