

Министерство образования и науки Российской Федерации
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ (НИ ТГУ)
Институт биологии, экологии, почвоведения, сельского и лесного хозяйства
(Биологический институт)
Кафедра физиологии человека и животных

ДОПУСТИТЬ К ПРЕДСТАВЛЕНИЮ ГЭК
Руководитель ООП
д-р биол. наук
_____ Д.С. Воробьев
« _____ » _____ 2018 г.

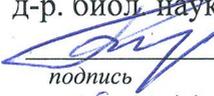
НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

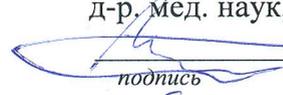
об основных результатах подготовленной научно – квалификационной работы
(диссертации)

СИГНАЛЬНЫЙ МЕХАНИЗМ ИНФАРКТ-ЛИМИТИРУЮЩЕГО ЭФФЕКТА
АДАПТИВНОГО ФЕНОМЕНА РАННЕГО ГИПОКСИЧЕСКОГО
ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ И ВОЗМОЖНОСТЬ ЕГО ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ
ИМИТАЦИИ

по основной образовательной программе подготовки научно-педагогических кадров в
аспирантуре
направление подготовки 06.06.01 – Биологические науки

Семенцов Андрей Сергеевич

Научный руководитель
д-р. биол. наук, профессор
 Ю.В. Бушов
подпись
« 15 » июня 2018 г.

Научный руководитель
д-р. мед. наук, профессор
 Л.Н. Маслов
подпись
« 15 » июня 2018 г.

Автор работы
аспирант
 А.С. Семенцов
подпись

Томск-2018

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет» на материально-технической базе лаборатории экспериментальной кардиологии Научно-исследовательского института кардиологии Томского национального исследовательского центра Российской академии наук.

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор

Бушов Юрий Валентинович

доктор медицинских наук, профессор

Маслов Леонид Николаевич

Рецензент:

кандидат биологических наук, доцент

Вымятина Зоя Кузьминична

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. В последние годы особую актуальность приобрели исследования в области физиологии и медицины, целью которых является поиск новых методов, позволяющих увеличить устойчивость органов и тканей к неблагоприятному действию ишемии и реперфузии. Известно, что вследствие высокой интенсивности метаболизма, необратимые повреждения кардиомиоцитов возникают при продолжительности ишемии более 10 мин [Trost S. U. et al., 1998]. Подобная чувствительность сердца к гипоксии обуславливает появление повреждений миокарда при развитии различных сердечно-сосудистых заболеваний или, к примеру, при выполнении хирургических вмешательств с использованием искусственного кровообращения [Walsh S.R. et al., 2010]. Вследствие этого, поиск и изучение альтернативных подходов к повышению толерантности органов и тканей к ишемии-реперфузии приобретает особую значимость. К подобным подходам можно отнести использование ишемического, дистанционного, гипоксического прекондиционирования – адаптационных процессов, позволяющего задействовать естественные механизмы адаптации организма к ишемическим и реперфузионным повреждениям [Маслов Л. Н. и др., 2011; Chen Ch.-L. et al., 2015]. Установлено, что применение как раннего, так и отсроченного гипоксического прекондиционирования (ГП), способствует повышению устойчивости органов и тканей к действию длительной ишемии после одного продолжительного (2,5 – 3 ч) [Beguín P. C., 2005; Bader A. M. et al., 2015] или нескольких кратковременных сеансов гипоксии (2 – 10 мин) и реоксигенации (2 – 10 мин) [Cai Z. et al, 2003; Lukyanova L. D. et al., 2009; Chen Ch.-L. et al., 2015]. Мы предполагаем, что раннее ГП задействует естественные механизмы срочной адаптации организма к неблагоприятным факторам, возникающим при ишемии-реперфузии, однако пути реализации этого феномена остаются неясными.

Анализ литературных данных показывает, что основная масса работ по ГП посвящена отсроченному кардиопротекторному эффекту гипоксии, и лишь малая часть – раннему ГП. Кроме того, многие из этих работ следует отнести к изучению ГП *in vitro* – на изолированном сердце или культурах клеток. Небольшое число исследований (и как следствие – недостаток фактического материала) не позволяют сделать каких-либо далеко идущих выводов относительно механизмов рецепции и передачи сигнала раннего гипоксического прекондиционирования в *in vivo*. Таким образом, сигнальные пути ГП остаются слабо изученными и требуют детального исследования.

Между тем, исследование феномена гипоксического прекондиционирования может расширить научные представления о механизмах срочной адаптации организма в целом и отдельных физиологических систем к неблагоприятным факторам среды, а также позволит уточнить пути передачи сигналов, обуславливающих развитие кардиопротекторного эффекта гипоксии. Кроме того, изучение ГП может послужить теоретической основой для создания новых методов борьбы с ишемическими и реперфузионными повреждениями сердца в клинической практике, а также при разработке фармакологических препаратов, обладающими кардиопротекторными свойствами.

Цель исследования: изучение сигнального механизма инфаркт-лимитирующего эффекта раннего гипоксического прекондиционирования у крыс *in vivo* на модели острой локальной ишемии-реперфузии миокарда и возможности фармакологической имитации феномена гипоксического прекондиционирования с помощью донов NO и активаторов K_{ATP} -каналов.

Задачи исследования:

1. Исследовать влияние вегетативной нервной системы и стресса на формирование кардиопротекторного эффекта раннего гипоксического прекондиционирования

2. Установить, участвуют ли опиоидные и аденозиновые рецепторы в сигнальном механизме инфаркт-лимитирующего действия раннего гипоксического прекондиционирования.
3. Изучить роль активных форм кислорода и протеинкиназы С в формировании инфаркт-лимитирующего эффекта раннего гипоксического прекондиционирования
4. Исследовать значение $K_{ATФ}$ -каналов и NO-синтазы при реализации кардиопротекторного эффекта раннего гипоксического прекондиционирования.
5. Оценить возможность фармакологической имитации феномена гипоксического прекондиционирования с помощью доноров NO и активаторов $K_{ATФ}$ -каналов.

Научная новизна

В нашем исследовании впервые выявлено, что защитное действие раннего ГП связано со специфическим влиянием гипоксии и не является результатом перекрестных эффектов адаптации к стрессу.

Впервые выявлено, что индуцибельная NO-синтаза и митохондриальные АТФ-чувствительные калиевые каналы ($K_{ATФ}$ -каналы) участвуют в формировании адаптивного эффекта раннего ГП. Впервые произведена фармакологическая имитация данного феномена с помощью препаратов-доноров оксида азота и активаторов $K_{ATФ}$ -каналов.

Впервые установлено, что активные формы кислорода (АФК) являются триггерами инфаркт-лимитирующего эффекта раннего ГП.

Впервые установлено, что автономная (вегетативная) нервная система, протеинкиназа С, опиоидные и аденозиновые рецепторы не участвуют в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта раннего ГП.

Научно-практическая значимость

Результаты работы позволяют расширить представления о механизмах срочной адаптации организма к гипоксии, о рецепторных и сопряженных с ними сигнальных путях, обеспечивающих повышение устойчивости сердца к действию ишемии и реперфузии.

Теоретические положения, основанные на результатах данного исследования, могут стать предпосылкой для создания качественно новых методов кардиопротекции в клинической практике, а также для синтеза новых фармакологических препаратов, обеспечивающих повышение устойчивости сердца к ишемическим и реперфузионным повреждениям.

Апробация работы: материалы, включенные в научный доклад, представлены на следующих конференциях: научно-практическая конференция «Актуальные вопросы клинической и экспериментальной кардиологии (Томск, 2014); Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Трансляционные исследования в инновационном развитии здравоохранения» (Санкт-Петербург, 2014 г.); VI всероссийская школа-конференция «Физиологии кровообращения» (Москва, 2016 г.); научно-практическая конференция с международным участием «Новые технологии восстановления деятельности сердца и других органов в эксперименте и клинике» (посвящ. 150-летию со дня рождения А. А. Кулябко) (Томск, 2016 г.); Всероссийская конференция и Школа-семинар с международным участием «Роль свободнорадикальных процессов в этиологии и патогенезе распространенных патологий» (Иркутск, 2016 г.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 13 работ. Из них 8 работ в журналах списка ВАК, 5 – в материалах международных и российских конференций.

Гранты. Работа поддержала 4 грантами: грант РФФИ № 14-04-31005 мол_а «Гипоксического прекондиционирования, как феномен срочной адаптации организма к экстремальным воздействиям: рецепторы и сигнальные пути», грант РФФИ №14-04-90004 бел_а «Адаптация на уровне целого организма: рецепторный и сигнальный механизм гипоксического прекондиционирования и дистантного кондиционирования», грант РФФИ №18-315-00009 мол_а «Роль Gi/o-белок-сопряженных рецепторов и сигнальных механизмов в адаптивном феномене раннего гипоксического прекондиционирования», грант РНФ «Инфаркт-лимитирующий эффект дистантного посткондиционирования, холодовой адаптации, гипоксического прекондиционирования и долговременной адаптации к гипоксии: рецепторный и сигнальный механизм»

Личный вклад автора. Автором сформулированы цель и задачи исследования. Экспериментальные исследования проведены в полном объеме. Произведен сбор и анализ литературных источников, посвященных изучению гипоксического прекондиционирования. Доля участия в сборе материала - 85%, в обработке материала – 90%, в обобщении и анализе материала 90%.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Диссертационное исследование проводили на самцах крыс линии Вистар массой 280-320 г.

При проведении научно-исследовательской работы мы руководствовались рекомендациями о гуманном отношении к лабораторным животным, изложенными в Приказе МЗ СССР за № 742 от 13.11.84 г. и № 48 от 23.01.85 г. Все болезненные процедуры на животных осуществляли с использованием комбинированного наркоза.

Распределения животных по сериям экспериментов представлено в таблице 1.

Животным моделировали гипоксическое прекондиционирование, воздействуя на них 6-ю циклами гипоксии-реоксигенации. Каждый цикл состоял из 10-минутного сеанса нормобарической гипоксии и 10-минутной реоксигенации атмосферным воздухом. Моделирование ГП осуществляли, помещая животное в герметичную камеру, внутри которой создавали воздушную среду с пониженным содержанием кислорода (8% O₂, 0,9% CO₂ и 91,1% N₂). Газовый состав атмосферы контролировали с помощью газоанализатора Stat Profile M (“Nova Biomedical Corporation”, Waltham, USA). Общая продолжительность ГП составляла 2 ч.

Определение количества эритроцитов в крови крысы производили в счетной камере Горяева по унифицированной методике [Меньшиков В. В. и др., 1987]. Подсчет эритроцитов вели при помощи оптического микроскопа AxioObserver.Z1 (“Carl Zeiss AG”, Oberkochen, Germany).

Локальную ишемию миокарда (45 мин) проводили, используя модифицированный метод коронароокклюзии [Schultz J.E. et al., 1997], накладывая лигатуру на левую переднюю нисходящую коронарную артерию. Во время реперфузии (120 мин) лигатуру ослабляли.

Изменение содержания АФК в тканях миокарда отслеживали флуоресцентным методом после 1-го, 3-го и 6-го циклов ГП с помощью микропланшетного ридера «Infinite 200 PRO» (“Tecan GmbH”, Австрия). В работе использовали неселективный флуоресцентный зонд дигидродихлорфлуоресцеин диацетат [Kalyanaraman V. et al., 2012; Koltai E. et al., 2012] и избирательно реагирующий с перекисью водорода флуоресцентный краситель Amplex Red [Dikalov S. et al., 2007; Aune S.E. et al., 2011]. Количество АФК в пробах нормализовали по концентрации белка в гомогенате, содержание которого определяли по методу Бредфорда [Bradford M. M., 1976], с использованием спектрофотометра SmartSpec Plus (“Bio-Rad Laboratories, Inc.”, Hercules, USA).

Иммобилизационный стресс моделировали, фиксируя животных в положении «на спине» в течение 2 ч. Наркотизированных α -хлоралозой животных (100 мг/кг, внутривенно) выводили из эксперимента методом декапитации спустя 40 мин после окончания стресса и забирали кровь и внутренние органы (тимус, селезенка, надпочечники, желудок) для анализа. В сыворотке крови определяли уровень гормонов (кортикостерон, кортизол, альдостерон, тестостерон, метаболиты адреналина и норадреналина) методами радиоиммунного и иммуноферментного анализов, используя радиометр многоканальный РИГ-12 («Прогресс-РИА», Россия, Санкт-Петербург) и микропланшетный ридер «Infinite 200 PRO» («Tecan GmbH», Австрия) соответственно.

Таблица 1. Распределение животных по сериям экспериментов

| № | Серия | Число наблюдений |
|----|--|------------------|
| 1 | Интактные животные | 122 |
| 2 | Контрольные животные, коронароокклюзия-реперфузия | 443 |
| 3 | ГП (1 цикл) | 12 |
| 4 | ГП (3 цикла) | 71 |
| 5 | ГП | 12 |
| 6 | ГП, коронароокклюзия-реперфузия | 235 |
| 7 | Налтрексон (2 мг/кг), коронароокклюзия-реперфузия | 14 |
| 8 | ГП, налтрексон до адаптации, коронароокклюзия-реперфузия | 14 |
| 9 | Налтрексон после адаптации, коронароокклюзия-реперфузия | 15 |
| 10 | 8-(p-сульфофенил)теофиллин, коронароокклюзия-реперфузия | 14 |
| 11 | ГП, 8-(p-сульфофенил)теофиллин до адаптации, коронароокклюзия-реперфузия | 14 |
| 12 | ГП, 8-(p-сульфофенил)теофиллин после адаптации, коронароокклюзия-реперфузия | 16 |
| 13 | ГП, L-NAME до адаптации, коронароокклюзия-реперфузия | 18 |
| 14 | ГП, L-NAME после адаптации, коронароокклюзия-реперфузия | 14 |
| 15 | ГП, S-метилтиомочевина до адаптации, коронароокклюзия-реперфузия | 14 |
| 16 | ГП, 7-нитронизадол до адаптации, коронароокклюзия-реперфузия | 14 |
| 17 | N-(2-меркаптопропионил)глицин, коронароокклюзия-реперфузия | 14 |
| 18 | Темпол, коронароокклюзия-реперфузия | 15 |
| 19 | Тролокс, коронароокклюзия-реперфузия | 12 |
| 20 | 1,3-диметилтиомочевина, коронароокклюзия-реперфузия | 12 |
| 21 | ГП, N-(2-меркаптопропионил)глицин до адаптации, коронароокклюзия-реперфузия | 15 |
| 22 | ГП, N-(2-меркаптопропионил)глицин после адаптации, коронароокклюзия-реперфузия | 14 |
| 23 | ГП, темпол до адаптации, коронароокклюзия-реперфузия | 16 |
| 24 | ГП, тролокс до адаптации, коронароокклюзия-реперфузия | 12 |
| 25 | ГП, 1,3-диметилтиомочевина до адаптации, коронароокклюзия-реперфузия | 12 |
| 26 | ГП, хелеритрин до адаптации, коронароокклюзия-реперфузия | 12 |
| 27 | ГП, глибенкламид до адаптации, коронароокклюзия-реперфузия | 15 |
| 28 | ГП, глибенкламид после адаптации, коронароокклюзия-реперфузия | 14 |
| 29 | ГП, 5-гидроксидеканоат, коронароокклюзия-реперфузия | 14 |
| 30 | ГП, NMR 1098 до адаптации, коронароокклюзия-реперфузия | 12 |
| 31 | ГП, гексаметоний до адаптации, коронароокклюзия-реперфузия | 14 |
| 32 | ГП, гексаметоний после адаптации, коронароокклюзия-реперфузия | 15 |
| 33 | ГП (3 цикла), N-(2-меркаптопропионил)глицин до адаптации | 14 |
| 34 | ГП (3 цикла), темпол до адаптации | 15 |

Таблица 1. Распределение животных по сериям экспериментов (продолжение)

| | | |
|----|--|----|
| 35 | ГП (3 цикла), тролокс до адаптации | 15 |
| 36 | ГП (3 цикла), 1,3-диметилтиомочевина до адаптации | 15 |
| 37 | Иммобилизационный стресс | 12 |
| 38 | Иммобилизационный стресс, коронароокклюзия-реперфузия | 12 |
| 39 | Пиначидил за 2 ч 40 мин до коронароокклюзии-реперфузии | 14 |
| 40 | Диазоксид за 2 ч 40 мин до коронароокклюзии-реперфузии | 16 |
| 41 | Диэтилентриамин за 2 ч 40 мин до коронароокклюзии-реперфузии | 16 |
| 42 | Диазоксид за 1 ч до коронароокклюзии-реперфузии | 16 |
| 43 | Диэтилентриамин за 1 ч до коронароокклюзии-реперфузии | 16 |
| 44 | Никорандил за 1 ч до коронароокклюзии-реперфузии | 16 |

Примечание: ГП – раннее гипоксическое прекондиционирование, 6 сеансов гипоксии-реоксигенации; ГП (3 цикла) – раннее гипоксическое прекондиционирование, 3 сеанса гипоксии-реоксигенации; ГП (1 цикл) – раннее гипоксическое прекондиционирование, 1 сеанс гипоксии-реоксигенации. Всего проведено 44 серии экспериментов. Общее число животных использованных в работе – 1437 особей.

Определение размера инфаркта у животных, подвергшихся длительной ишемии-реперфузии и 2-часовому иммобилизационному стрессу, осуществляли по методу J. Neckar и соавт. [Neckar J. et al., 2002]. Иссеченное из грудной клетки сердце последовательно промывали ретроградно через аорту раствором 0,9% NaCl и 5% раствором перманганата калия, после чего изготавливали поперечные срезы миокарда левого желудочка. Срезы инкубировали в 1% растворе 2,3,5-трифенил тетразолия хлорида при 37⁰С в течение 30 мин и помещали в 10% раствор формальдегида на 1 сутки. Далее срезы сканировали с обеих сторон (сканер HP Scanjet G2710), получая цифровое изображение в формате JPEG (2400 dpi), и анализировали компьютеризированным планиметрическим методом, определяя соотношение зоны некроза (ЗН) к области риска (ОР).

Регистрацию ЭКГ осуществляли с помощью аппарата для электрофизиологических исследований MP35 (“Biopac System Inc.”, Goleta, США) в первом и во втором основных отведениях в течение 5 мин перед ишемией, во время всего периода ишемии и 10-минутными интервалами, начиная с 1-ой, 55-ой и 110-ой минутами реперфузии. При анализе нарушений ритма сердца учитывали только желудочковые формы аритмий: множественные желудочковые экстрасистолы; желудочковая тахикардия, желудочковая фибрилляция.

В работе использованы следующие фармакологические препараты:

1) Налтрексона гидрохлорид – антагонист всех типов опиоидных рецепторов, внутривенно в дозе 2 мг/кг за 15 мин до ГП, либо после адаптации за 10 мин до ишемию

2) 8-(p-Сульфофенил)теофиллин – антагонист всех типов аденозиновых рецепторов, внутривенно в дозе 7,5 мкг/кг за 15 мин до ГП, либо после адаптации за 10 мин до коронароокклюзии.

3) Гексаметония хлорид – блокатор периферических ганглиев, внутривенно в дозе 10 мг/кг за 15 мин до ГП, либо после адаптации за 10 мин до ишемии;

4) Хелеритрина хлорид – ингибитор протеинкиназы С, внутривенно в дозе 5 мг/кг за 15 мин до ГП, либо после адаптации за 10 мин до ишемии;

5) L-NAME – неселективный ингибитор NO-синтазы, внутривенно в дозе 10 мг/кг за 15 мин до ГП, либо после адаптации за 10 мин до ишемии.

6) S-метилтиомочевины сульфат – селективный ингибитор индуцибельной NO-синтазы применяли в дозе 3 мг/кг внутривенно за 15 мин до ГП.

7) 7-нитроиндазол – селективный ингибитор нейрональной NO-синтазы в дозе 50 мг/кг внутривенно за 15 мин до ГП.

- 8) Глибенкламид - блокатор всех типов КАТФ-каналов в дозе 0,3 мг/кг внутривенно за 15 мин до ГП, либо после адаптации за 10 мин до ишемии.
- 9) 5-гидроксидеканоат – блокатор митохондриальных КАТФ-каналов в дозе 5 мг/кг внутривенно за 15 мин до ГП.
- 10) NMR 1098 – селективный ингибитор сарколеммальных КАТФ-каналов, внутривенно в дозе 10 мг/кг за 15 мин до ГП.
- 11) Диазоксид – активатор митохондриальных КАТФ-каналов диазоксид, внутривенно в дозе 3,5 мг/кг за 2 ч 40 мин до коронароокклюзии.
- 12) Пинацидил – активатор сарколеммальных и митохондриальных КАТФ-каналов в дозе 0,1 мг/кг за 2 ч 40 мин до ишемии.
- 13) Диэтилентриамин – донор оксида азота, внутривенно в дозе 2 мг/кг (инфузия в течение 5 мин) за 2 ч 40 мин, либо за 1 ч до коронароокклюзии.
- 14) Никорандил – донор NO и активатор КАТФ-каналов, внутривенно в дозе 0,47 мг/кг за 1 ч до коронароокклюзии.
- 15) N-(2-меркаптопропионил)глицин – тиоловый антиоксидант-«ловушка» гидроксильных радикалов в дозе 20 мг/кг внутривенно за 15 мин до ГП, либо после адаптации за 10 мин до ишемии.
- 16) Тролокс – ингибитор перекисного окисления липидов, внутривенно в дозе 2,5 мг/кг за 15 мин до ГП.
- 17) Темпол – «ловушка» супероксид-аниона в дозе 30 мг/кг внутривенно за 15 мин до ГП.
- 18) 1,3-диметилтиомочевина – антиоксидант-«ловушка» гидроксильных радикалов в дозе 300 мг/кг внутривенно за 30 мин до адаптации.

Статистический анализ полученных результатов производили с помощью прикладных программ STATISTICA 6.0 и Microsoft Excel 2010. Для выявления межгрупповых количественных различий использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни, внутригрупповых – непараметрический W-критерий Вилкоксона. Статистическую обработку качественных признаков осуществляли с помощью хи-критерия Пирсона (χ^2). Размер области инфаркта выражали в процентах (ЗН/ОР x 100%). Результаты всех экспериментов приведены в таблицах и на диаграммах в виде $M \pm SEM$ (где M – среднее, SEM – стандартная ошибка среднего), n – объем анализируемой подгруппы, p – достигнутый уровень значимости различий. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Исследование кардиопротекторного эффекта раннего гипоксического preconditionирования.

Кардиопротекторный эффект раннего ГП оценивали по двум показателям: 1) наличие или отсутствие инфаркт-лимитирующего эффекта, выражающегося в уменьшении отношения зоны некроза (ЗН) к области гипоперфузии (области риска, ОР) миокарда и 2) способность предотвращать развитие жизнеугрожающих аритмий.

Длительная ишемия (45 мин) и реперфузия (120 мин) способствовали возникновению некроза тканей миокарда, составлявшего 52,0 % от области гипоперфузии (рис. 1), и появлению желудочковых аритмий (табл.2). Желудочковые аритмии сердца возникали в 67% случаев (10 из 15 особей), причем у 27 % от общего количества животных зафиксированы желудочковые тахикардии (4 особи) и у 13 % – желудочковые фибрилляции (2 особи) (табл. 2).

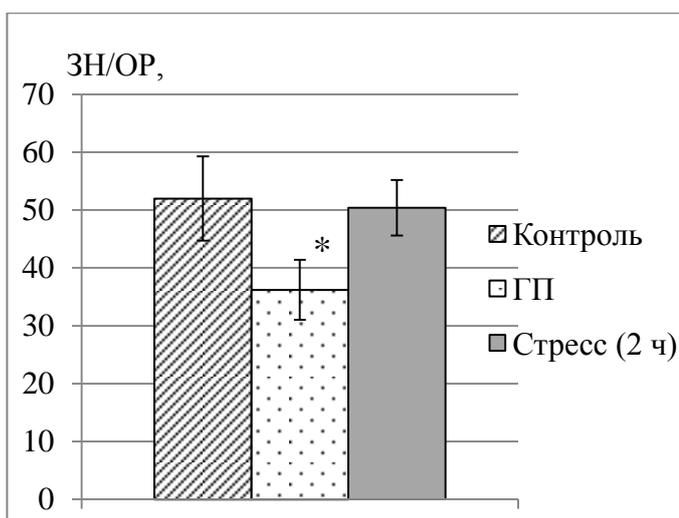


Рисунок 1. Инфаркт-лимитирующий эффект раннего гипоксического preconditionирования. Примечание: ГП – раннее гипоксическое preconditionирование; стресс – иммобилизация животных в положении «на спине» в течение 2-х часов; ЗН/ОР – отношение зоны некроза к области риска: ОР – область риска; ЗН – зона некроза; * $p < 0,05$ – уровень значимости различий.

Адаптация к раннему ГП способствовала уменьшению индекса ЗН/ОР, сокращая размер некроза на 30,4 % по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$) - до 36,2% (рис. 1). Однако ГП не предотвращало развитие аритмий – их количество находилось на сопоставимом уровне с контрольными значениями (табл. 2).

Таблица 2 – влияние раннего гипоксического preconditionирования на характер желудочковых аритмий.

| Серия | n | Ишемия, 45 мин | | | | Реперфузия, 30 мин | | | |
|-----------|----|----------------|------------|-----------|-----------|--------------------|------------|-----------|-----------|
| | | БЖА, n (%) | МЖЭ, n (%) | ЖТ, n (%) | ЖФ, n (%) | БЖА, n (%) | МЖЭ, n (%) | ЖТ, n (%) | ЖФ, n (%) |
| | | Контроль | 15 | 3 (20%) | 12 (80%) | 10 (67%) | 5 (33%) | 15 (100%) | 0 (0%) |
| Раннее ГП | 13 | 4 (31%) | 9 (69%) | 8 (62%) | 4 (31%) | 13 (100%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |

Примечание: более тяжелым нарушениям ритма сопутствовали менее тяжелые. Сокращения: ГП – раннее гипоксическое preconditionирование; БЖА – без желудочковых экстрасистол, МЖЭ – множественные желудочковые экстрасистолы, ЖТ – желудочковая тахикардия, ЖФ – желудочковая фибриляция. Значимых межгрупповых отличий не обнаружено.

Поскольку раннее ГП оказывает стрессорное воздействие на организм подопытных животных [Лишманов и соавт., 2015; Нарыжная и соавт., 2015], то инфаркт-лимитирующий эффект данного феномена может являться результатом неспецифической адаптации к кратковременному стрессу. Для проверки этой гипотезы были проведены серии экспериментов, в которых подопытных животных подвергали действию 2-х часового иммобилизационного стресса. Кардиопротекторный эффект 2-х часовой иммобилизации определяли по изменению индекса ЗН/ОР (рис. 2) и наличию

антиаритмического эффекта (табл. 3). Установлено, что у контрольных животных моделирование 45-минутной ишемии и 120-минутной реперфузии вызывало формирование инфаркта миокарда размер, которого составлял 57,3% от ОР. Имобилизация в течение 2-х часов не влияла на этот показатель (рис. 1).

Хотя общая частота возникновения нарушений ритма сердца в обеих группах была примерно одинакова (64% в группе стресса против 77% в контроле), у стрессированных животных преимущественно наблюдали более легкие формы аритмий (табл. 3). Так, в «стрессированной» группе зафиксировано значительно меньше случаев желудочковой тахикардии, чем в контроле (29% и 69% случаев от общего количества животных соответственно), и не зарегистрировано ни одного случая фибрилляции желудочков (табл. 3).

Таблица 3 – Частота возникновения желудочковых аритмий после 2-х часовой имобилизации.

| Серия | Желудочковые аритмии | | | | | | | |
|----------------------|----------------------|------------|-----------|-----------|---------------------|------------|-----------|-----------|
| | Ишемия, 45 мин | | | | Реперфузия, 120 мин | | | |
| | БЖА, n (%) | МЖЭ, n (%) | ЖТ, n (%) | ЖФ, n (%) | БЖА, n (%) | МЖЭ, n (%) | ЖТ, n (%) | ЖФ, n (%) |
| Контроль (n=13) | 3 (23%) | 10 (77%) | 9 (69%) | 6 (46%) | 13 (100%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| Иммоб. стресс (n=14) | 5 (36%) | 9 (64%) | 4** (29%) | 0*** (0%) | 13 (93%) | 1 (7%) | 0 (0%) | 0 (0%) |

Примечание: контроль – ишемия (45 мин) с последующей реперфузией (120 мин); иммоб. стресс – имобилизация животных в течение 2-х часов. Сокращения: БЖА – без желудочковых аритмий, МЖЭ – множественные желудочковые экстрасистолы, ЖТ – желудочковая тахикардия, ЖФ – желудочковая фибрилляция; % - частота возникновения данного вида аритмий по отношению к общему количеству животных в группе; **p < 0,01, ***p < 0,001 – уровень значимости различий относительно контрольной группы.

Таким образом, между двумя феноменами – кратковременным стрессовым воздействием и адаптацией организма к раннему ГП – наблюдаются принципиальные отличия. Раннее ГП, в отличие от 2-х часовой имобилизации, оказывает выраженный инфаркт-лимитирующий эффект (рис. 1), но не проявляет антиаритмического действия (табл. 2), тогда как кратковременный имобилизационный стресс, напротив, повышает устойчивость сердца к аритмогенному влиянию ишемии, но не влияет на размер повреждения миокарда при длительной коронароокклюзии-реперфузии (рис. 1, табл.3). Таким образом, эффекты ГП связаны со специфическим влиянием гипоксии на организм подопытных животных, а не с развитием у них общего адаптационного синдрома.

2. Изучение роли автономной (вегетативной) нервной системы, протеинкиназы С, аденозиновых и опиоидных рецепторов в сигнальном механизме раннего гипоксического прекондиционирования

Для установления роли автономной (вегетативной) нервной системы подопытным животным за 15 мин до ГП, либо после адаптации за 10 мин до ишемии вводили блокатор периферических вегетативных ганглиев гексаметония хлорид в дозе

10 мг/кг. Установлено, что введение гексаметония как перед адаптацией, так и после ГП не сказалось на развитии инфаркт-лимитирующего эффекта ГП (рис. 2).

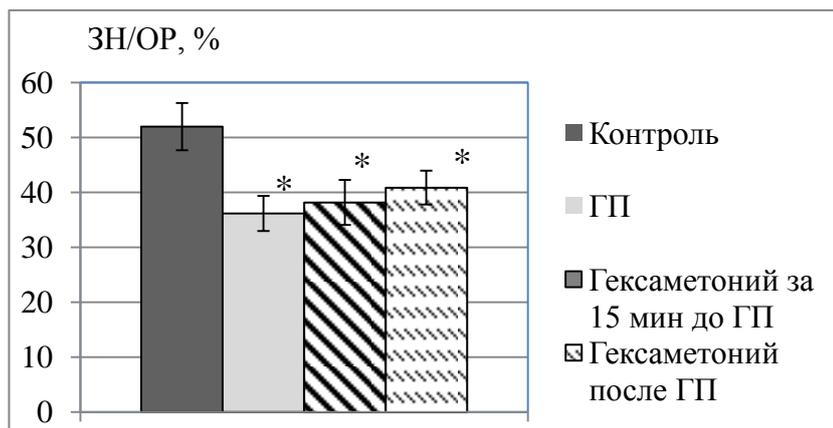


Рисунок 2. Значение автономной (вегетативной) нервной системы в формировании инфаркт-лимитирующего эффекта адаптации к раннему ГП. Примечание: ЗН/ОР – отношение зоны некроза к области риска; ГП – раннее гипоксическое preconditionирование; гексаметоний вводили в дозе 10 мг/кг за 15 мин до ГП, либо после ГП за 10 мин до ишемии; * $p < 0,05$ – уровень значимости различий по отношению к контролю.

Участие опиоидных и аденозиновых рецепторов в формировании инфаркт-лимитирующего эффекта раннего ГП *in vivo* устанавливали путем введения подопытным животным неселективного антагониста опиоидных рецепторов налтрексона в дозе 2 мг/кг и неселективного блокатора аденозиновых рецепторов 8-(*p*-сульфофенил)теофиллина в дозе 7,5 мкг/кг. Введение препаратов осуществляли либо за 15 мин до ГП, либо после адаптации – за 10 мин до коронароокклюзии. Согласно полученным результатам (рис. 3), ГП снижало размер некроза миокарда после ишемии-реперфузии более чем на 25% по сравнению контрольной группой, включавшей неадаптированных животных. Блокаторы опиоидных и аденозиновых рецепторов не устраняли данный кардиопротекторный эффект как при предварительном введении, так и в случае, когда налтрексон и 8-(*p*-сульфофенил)теофиллин применяли после адаптационного воздействия (рис. 3).

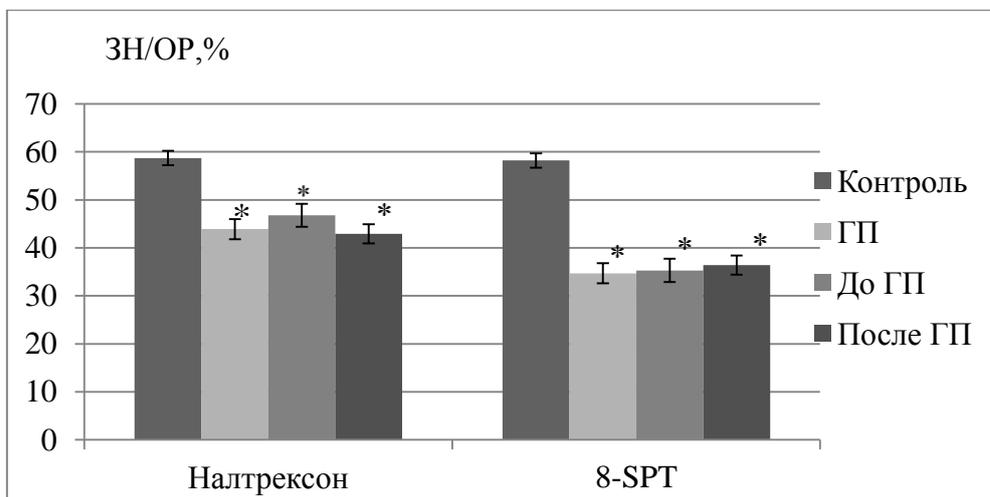


Рисунок 3. Влияние ингибиторов опиоидных и аденозиновых рецепторов на величину зоны некроза при их введении до и после гипоксического preconditionирования. Примечание: ГП – раннее гипоксическое preconditionирование; ЗН/ОР – отношение зоны некроза к области риска; налтрексон применяли в дозе 2 мг/кг; 8-SPT - 8-(p-сульфофенил)теофиллин в дозе 7,5 мг/кг. Все препараты вводили внутривенно за 15 мин до ГП, либо после ГП за 10 мин до коронароокклюзии; * $p < 0,05$ – уровень значимости различий.

Применение ингибитора протеинкиназы С (5 мг/кг) за 15 мин до адаптации не влияло на инфаркт-лимитирующий эффект ГП (рис. 4).

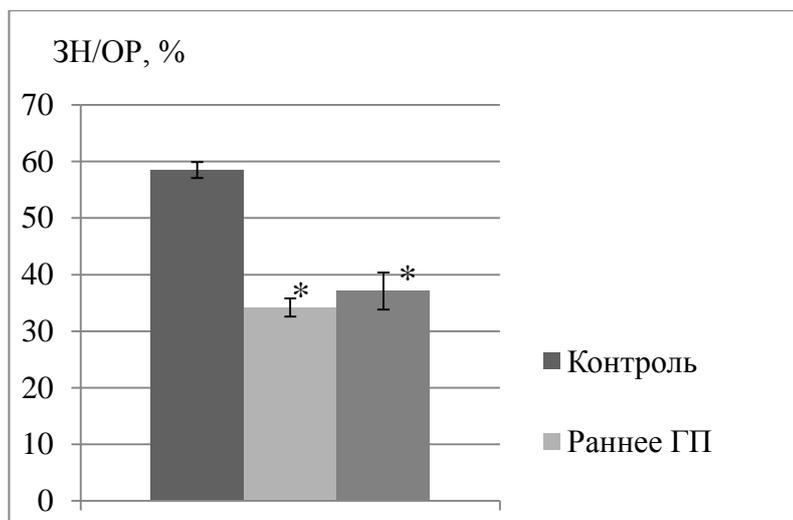


Рисунок 4. Влияние ингибитора протеинкиназы С на формирование инфаркт-лимитирующего эффекта раннего ГП. Примечание: ГП – раннее гипоксическое preconditionирование; ЗН/ОР – отношение зоны некроза к области риска; * $p < 0,05$ – уровень значимости различий относительно контрольной группы.

Таким образом, вегетативная нервная система, протеинкиназа С, аденозиновые и опиоидные рецепторы не играют значимой роли в формировании инфаркт-лимитирующего эффекта раннего ГП.

3. Участие NO-синтазы и АТФ-чувствительных калиевых каналов в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта раннего гипоксического preconditionирования

Исследование значения NO-синтазы и ее отдельных субтипов в инфаркт-лимитирующем эффекте ГП проводили путем ингибирования всего пула NO-синтазы, используя препарат L-NAME в дозе 10 мг/кг, либо ингибирования индуцибельной изоформы NO-синтазы препаратом S-метилтиомочевины сульфатом, либо блокированием нейрональной NO-синтазы препаратом 7-нитроиндазол.

Установлено, что предварительное введение ингибитора NO-синтазы L-NAME за 15 мин до ГП полностью устраняло защитное действие адаптации. Однако при ингибировании этого фермента после ГП инфаркт-лимитирующий эффект адаптации сохранялся (рис.5).

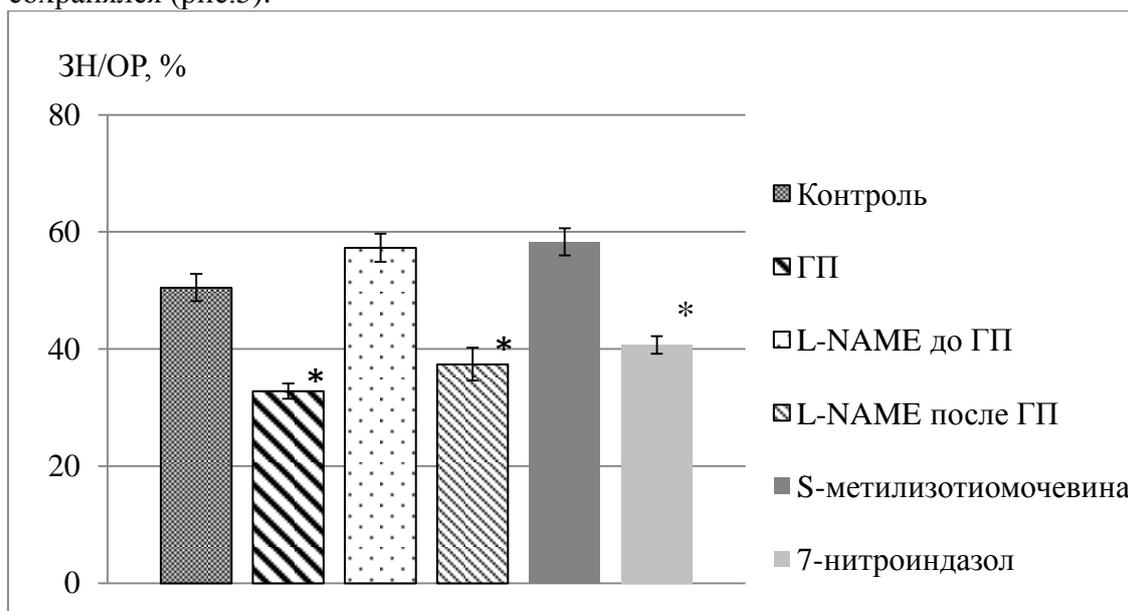


Рисунок 5. Участие NO-синтазы в механизме инфаркт-лимитирующего эффекта раннего ГП. Примечание: контроль – острая коронароокклюзия (45 мин) и реперфузия (120 мин); ГП – раннее гипоксическое preconditionирование; L-NAME в дозе 10 мг/кг вводили внутривенно либо за 15 мин до ГП, либо после адаптации за 10 мин до коронароокклюзии-реперфузии; S-метилтиомочевину применяли в дозе 3 мг/кг внутривенно за 15 мин до ГП; 7-нитроиндазол вводили в дозе 50 мг/кг внутривенно за 15 мин до ГП; * $p < 0,05$ – статистически значимые отличия по отношению к контролю.

Селективное ингибирование индуцибельной изоформы NO-синтазы препаратом S-метилизотиомочевина в дозе 3 мг/кг за 15 мин до моделирования ГП привело к увеличению размера инфаркта до уровня контрольных значений. В то же время, блокада нейрональной NO-синтазы не отразилась на проявлении кардиопротекторного эффекта ГП (рис. 5).

Из вышесказанного следует, что важную роль в развитии феномена ГП играет индуцибельная NO-синтаза, в то время как пул конститутивной NO-синтазы в механизме инфаркт-лимитирующего эффекта ГП существенного значения не имеет.

Роль K_{ATP} -каналов в защитном эффекте ГП устанавливали путем их фармакологического ингибирования за 15 мин до моделирования ГП, либо после адаптации за 10 мин до ишемии.

Установлено, что ГП оказывало кардиопротекторный эффект, уменьшая соотношение ЗН/ОР на 39,1% по сравнению с неадаптированными животными.

Предварительное введение крысам неселективного блокатора $K_{ATФ}$ -каналов глибенкламида в дозе 0,3 мг/кг полностью нивелировало защитный эффект раннего ГП (рис. 6). Однако применение глибенкламида после ГП не влияло на возникновение адаптации к ишемическим и реперфузионным повреждениям (рис.6)

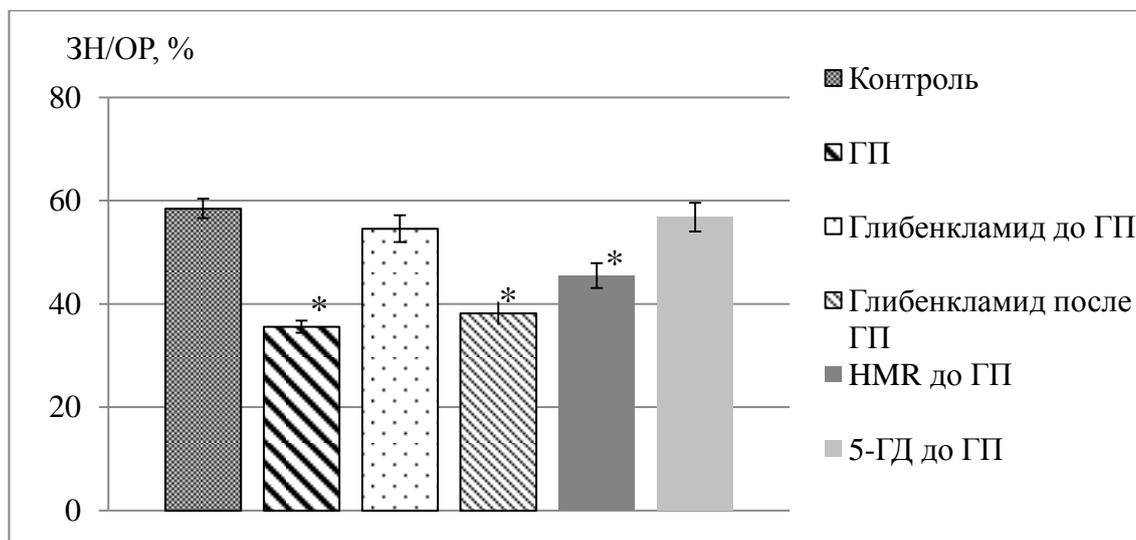


Рисунок 6. Участие $K_{ATФ}$ -каналов в сигнальном механизме ГП. Примечание: контроль – острая коронароокклюзия (45 мин) и реперфузия (120 мин); ГП – раннее гипоксическое preconditionирование: глибенкламид вводили в дозе 0,3 мг/кг внутривенно за 15 мин до ГП, либо после ГП за 10 мин до коронароокклюзии; НМР – НМР 1098 (Clamikalant sodium) в дозе 10 мг/кг внутривенно; 5-ГД – 5-гидроксидеканоат в дозе 5 мг/кг внутривенно; * $p < 0,05$ – статистически значимые отличия по отношению к контролю.

Селективное ингибирование $K_{ATФ}$ -каналов, расположенных на внутренней мембране митохондрий (мито $K_{ATФ}$ -каналов) препаратом 5-гидроксидеканоат в дозе 5 мг/кг привело к увеличению размера инфаркта до значений контрольной группы (рис. 6). Блокирование сарколеммальных $K_{ATФ}$ -каналов селективным ингибитором НМР 1098 (Clamikalant sodium) в дозе 10 мг/кг не устраняло инфаркт-лимитирующий эффект ГП (рис. 6).

Полученные результаты указывают на важную роль mito $K_{ATФ}$ -каналов в формировании защиты миокарда при ГП. В то же время, участие сарколеммальных $K_{ATФ}$ -каналов в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта ГП в отношении ишемических-реперфузионных повреждений сердца нами не подтверждено.

4. Фармакологическая имитация раннего гипоксического preconditionирования

Изучая возможность фармакологической имитации раннего ГП, мы предположили, что инфаркт-лимитирующий эффект, аналогичный действию раннего ГП возможно воспроизвести путем введения различным группам подопытных животных следующих препаратов: 1) неселективного активатора сарколеммальных и mito $K_{ATФ}$ -каналов пинацидила в дозе 0,1 мг/кг; 2) селективного активатора mito $K_{ATФ}$ -каналов диазоксида в дозе 3,5 мг/кг; 3) донора оксида азота (II) ДЭТА в дозе 2 мг/кг; 4) никорандила, являющегося как донором NO, так и «открывателем» $K_{ATФ}$ -каналов, в дозе 0,47 мг/кг. Указанные препараты вводили внутривенно за 2 ч 30 мин до ИР, либо за 1 ч до коронароокклюзии.

Длительная 45-минутная ишемия и последующая 120 мин реперфузия приводили к формированию очага некроза величиной 57,4% от ОР. Применение активатора митоK_{ATФ}-каналов диазоксида за 1 ч до ишемии-реперфузии позволило уменьшить размер зоны некроза на 36% по сравнению с группой ишемического контроля (рис. 7). Донор оксида азота (II) ДЭТА, введенный за 1 ч до коронароокклюзии, производил аналогичный эффект, сопоставимый с действием диазоксида. Однако применение обоих препаратов за 2 ч 30 мин до ИР не оказывало кардиопротекторного эффекта (рис. 7).

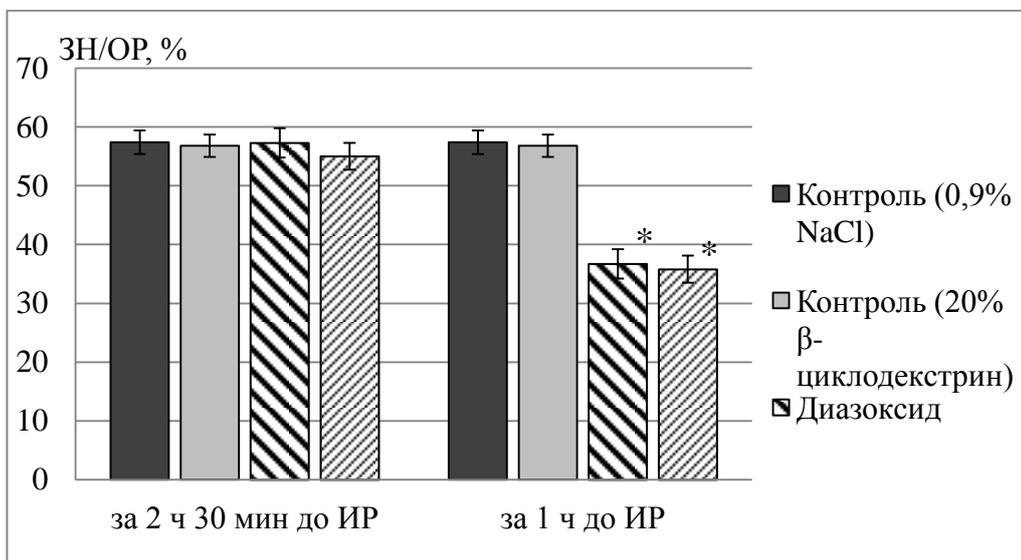


Рисунок 7. Фармакологическая имитация раннего гипоксического preconditionирования с помощью донора NO диэтилентриамина (2 мг/кг) и активатора митоK_{ATФ}-каналов диазоксида (3,5 мг/кг). Примечание: ЗН/ОР – отношение зоны некроза миокарда к области риска; ИР – ишемия-реперфузия; диазоксид вводили в дозе 3,5 мг/кг внутривенно; ДЭТА – диэтилентриамин в дозе 2 мг/кг (внутривенная инфузия в течение 5 мин); * $p < 0,05$ – статистически значимые отличия по отношению к соответствующему контролю.

Применение неселективного активатора K_{ATФ}-каналов пинацидила за 2 ч 30 мин до ИР не привело к значительному изменению размеров области некроза по сравнению с контролем, в то время как введение никорандила за 1 ч до коронароокклюзии оказывало инфаркт-лимитирующий эффект (рис. 8).

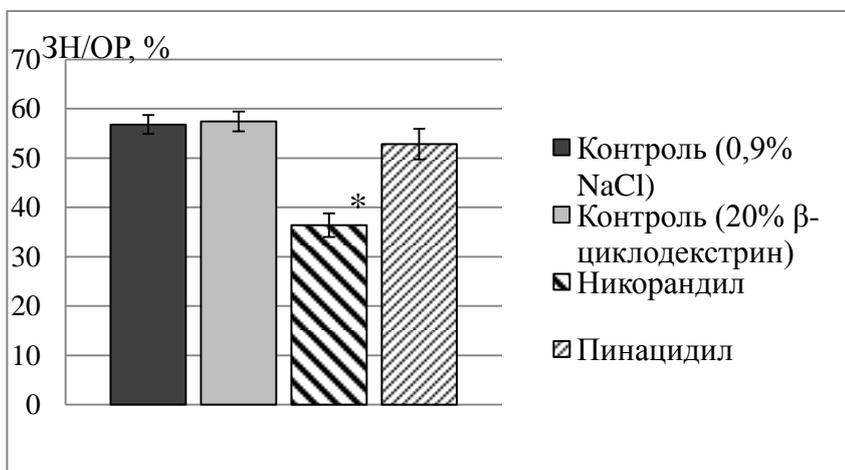


Рисунок 8. Влияние пинацидила (0,1 мг/кг) и никорандила (0,47 мг/кг) на ЗН/ОР. Никорандил вводили в дозе 0,47 мг/кг внутривенно за 1 час до ИР; пинацидил – в дозе

0,1 мг/кг за 2 ч 30 мин до ИР; * $p < 0,05$ – статистически значимые отличия по отношению к соответствующему контролю.

Таким образом, активаторы K_{ATP} -каналов и доноры NO способны имитировать феномен ГП при применении за 1 ч до коронароокклюзии. Более раннее использование препаратов данных типов не приводит к инфаркт-лимитирующему эффекту. Полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что NO-синтаза и K_{ATP} -каналы играют роль медиаторов в сигнальном механизме ГП.

5. Участие активных форм кислорода в формировании срочной адаптации к раннему гипоксическому прекондиционированию.

Роль АФК в сигнальном механизме раннего ГП устанавливали введением препаратов-антиоксидантов избирательного действия в отношении кислородных радикалов различных типов. Так, инъекция «ловушки» гидроксильных радикалов (OH^\bullet) 2-МПП за 15 мин до ГП полностью нивелировало инфаркт-лимитирующий эффект ГП, однако не оказывало значимого влияния, если препарат вводили после прекондиционирования за 10 мин до ишемии (рис. 9). Данный факт свидетельствует о том, что OH^\bullet являются триггерами в сигнальном механизме ГП.

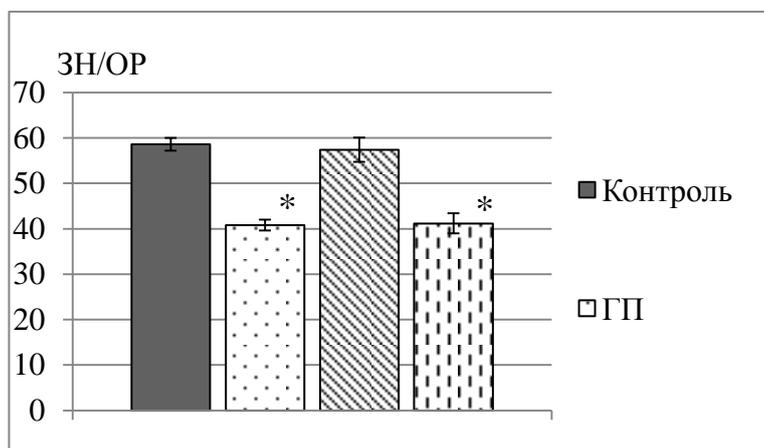


Рисунок 9. Роль OH^\bullet в сигнальном механизме раннего ГП. Примечание: ГП – раннее гипоксическое прекондиционирование; 2-МПП – N-(2-меркаптопропионил)глицин в дозе 20 мг/кг за 15 мин до адаптации, либо после адаптации за 10 мин до ишемии; * $p < 0,05$ – уровень значимости отличий относительно контрольной группы.

Применение водорастворимого аналога α -токоферола тролокса, подавляющего ПОЛ, не устраняло адаптивного действия ГП (рис. 10а). Однако введение «ловушки» OH^\bullet ДМТМ, наоборот, возвращало индекс ЗН/ОР к контрольным значениям (рис. 10б). Неоднозначные результаты были получены при введении темпола, который является «ловушкой» как супероксид-аниона ($O_2^{\bullet-}$), так и гидроксильного радикала. С одной стороны, данный препарат значительно увеличивал размер зоны некроза по сравнению с группой адаптированных животных, но с другой стороны, индекс ЗН/ОР оставался ниже контрольного уровня (рис 10в). Таким образом, можно предполагать, что основной вклад в формирование феномена ГП вносит гидроксильный радикал OH^\bullet и/или его дериваты, такие как перекись водорода (H_2O_2).

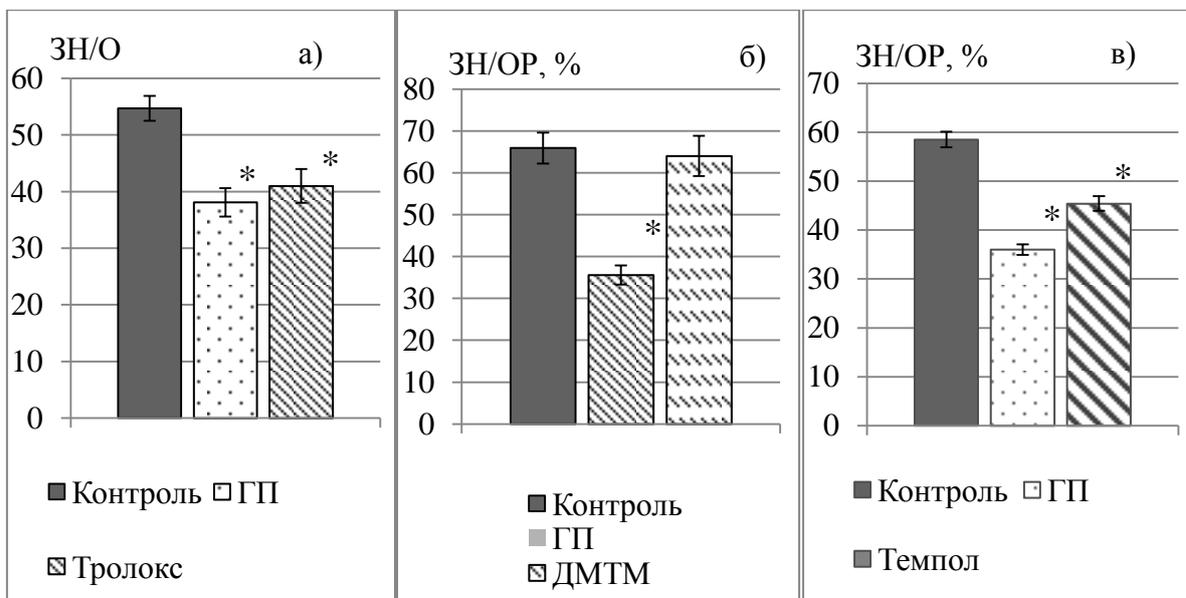


Рисунок 10. Влияние селективных антиоксидантов на инфаркт-лимитирующий эффект раннего ГП. Примечание: (а) тролокс в дозе 2,5 мг/кг внутривенно; б) ДМТМ – диметилтиомочевина в дозе 300 мг/кг внутрибрюшинно; в) темпол в дозе 30 мг/кг внутривенно (разведен в 20% гидроксипропил- β -циклодекстрине); ГП – раннее гипоксическое прекондиционирование; все препараты вводили за 15 мин до ГП; * $p < 0,05$ – уровень значимости отличий относительно контрольной группы.

Анализ содержания кислородных радикалов проводили в гомогенизированных образцах миокарда массой 200 мг, иссеченных из левого желудочка сердца адаптированных животных в области прохождения передней левой нисходящей коронарной артерии. Концентрацию АФК определяли после 1-го, 3-го и 6-го циклов ГП.

Согласно данным представленным на рис. 11, проба с 2',7'-дихлорфлуоресцином показала различия в общем уровне содержания АФК в миокарде адаптированных крыс по отношению к соответствующим контрольным группам. При этом повышение концентрации кислородных радикалов зафиксировано непосредственно после 1-го цикла ГП с максимумом, приходящимся на 3-ий цикл прекондиционирования. После 6-го цикла ГП общий уровень АФК снижается до контрольных значений (рис. 11).

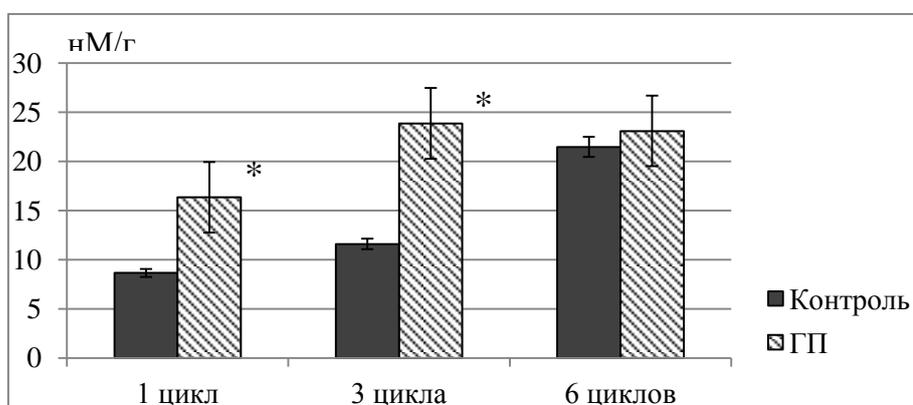


Рисунок 11. Динамика изменения общего уровня активных форм кислорода в миокарде крыс при адаптации к раннему гипоксическому прекондиционированию. Примечание: контроль – интактные животные; ГП – раннее гипоксическое прекондиционирование; концентрацию активных форм кислорода нормализовали по

содержанию белка в гомогенате; * $p < 0,05$ – к соответствующей группе интактных животных.

Определение содержания H_2O_2 в гомогенате левого желудочка миокарда крысы использовали пробу с флуоресцентной меткой Amplex Red, избирательно реагирующей с продуктами взаимодействия H_2O_2 и пероксидазы хрена. Установлено, что после 1-го цикла гипоксии-реоксигенации уровень H_2O_2 не отличался от контрольных значений, но повышался к 3-ему циклу, и после 6-го цикла возвращался к фоновым значениям (рис. 12).

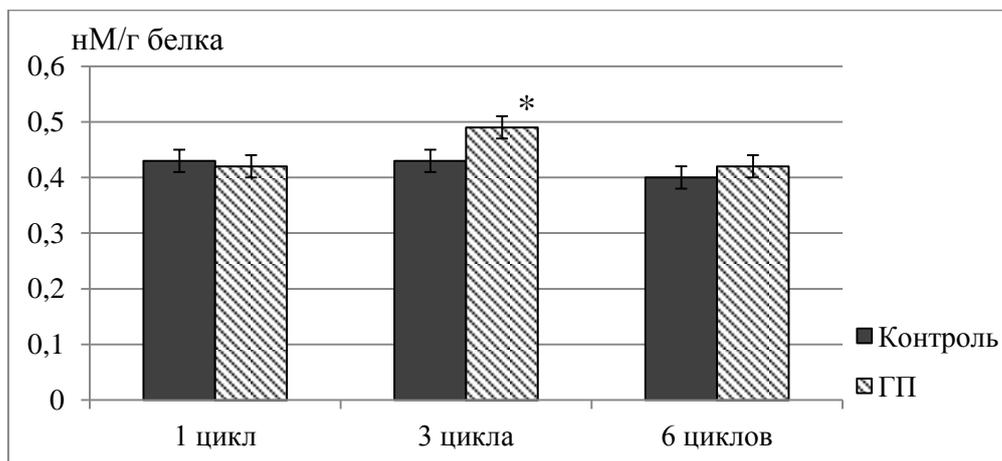


Рисунок 12. Изменения содержания пероксида водорода в миокарде крыс при раннем ГП. Примечание: контроль – интактные животные; ГП – раннее гипоксическое прекодиционирование; концентрацию активных форм кислорода нормализовали по содержанию белка в гомогенате; * $p < 0,05$ – к соответствующей группе интактных животных.

Таким образом, раннее ГП вызывает увеличение генерации АФК в миокарде адаптированных животных. Обращает на себя тот факт, что данное явление наблюдается в начале адаптации с максимумом после 3-го цикла гипоксии-реоксигенации. Однако это повышение не является лавинообразным, что нехарактерно для патологических процессов, и сходит на нет к концу адаптационного воздействия. Следовательно, АФК могут претендовать на роль триггера, необходимого для запуска процесса адаптации организма при моделировании раннего ГП.

Резюмируя вышесказанное, гидроксильный радикал и его производные являются наиболее вероятными кандидатами на роль сигнальных молекул, вызывающих запуск процесса адаптации к раннему ГП и возникновение перекрестных эффектов, обеспечивающих повышение устойчивости сердца к ишемическим и реперфузионным повреждениям.

ВЫВОДЫ

1. Раннее ГП повышает толерантность сердца к действию ишемии-реперфузии, что выражается в уменьшении зоны некроза после ишемии-реперфузии.
2. Раннее ГП оказывает умеренное стрессирующее воздействие на адаптируемых животных, однако инфаркт-лимитирующий эффект ГП вызван специфическим влиянием гипоксии и не связан с перекрестным эффектом стресса.
3. Повышение содержания активных форм кислорода, в частности перекиси водорода, в первые 3 цикла адаптации является необходимым условием для возникновения инфаркт-лимитирующего эффекта раннего ГП. Следовательно, АФК играют роль триггеров в сигнальном механизме раннего ГП.

4. Индуцибельная NO-синтаза и митохондриальные K_{ATФ}-каналы являются медиаторами сигнального механизма раннего ГП.
5. Вегетативная нервная система, протеинкиназа С, опиоидные и аденозиновые рецепторы не принимают участия в формировании инфаркт-лимитирующего эффекта раннего ГП.
6. Доноры оксида азота (II) и активаторы K_{ATФ}-каналов имитируют кардиопротекторный эффект раннего ГП при введении за 1 ч до коронароокклюзии, но не за 2,5 ч до ишемии.

СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Маслов Л. Н. Сравнительный анализ кардиопротекторной и антиаритмической эффективности раннего и позднего гипоксического preconditionирования / Л. Н. Маслов, Ю. Б. Лишманов, А. В. Крылатов, А. С. Семенов, А. Г. Портниченко, Ю. К. Подоксёнов, И. Г. Халиулин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т. 156, № 12. – С. 705-708. (Версии: Maslov L. N. Comparative analysis of early and delayed cardioprotective and antiarrhythmic efficacy of hypoxic preconditioning / L. N. Maslov, Yu. B. Lishmanov, A. V. Krylatov, A. S. Sementsov, A. G. Portnichenko, Yu. K. Podoksenov, I. G. Khaliulin // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2014. – Vol. 156, № 6. – С. 746-749.
2. Семенов А. С. Влияние NO-синтазы и активных форм кислорода на формирование кардиопротекторного эффекта гипоксического preconditionирования у крыс : тез. науч.-практ. конф. «Актуальные вопросы клинической и экспериментальной кардиологии» / А. С. Семенов; под ред. Ю. Б. Лишманова – Томск : ФГБУ «НИИ кардиологии» СО РАМН, 2014. – 34 с.
3. Семенов А. С. Сигнальный механизм кардиопротекторного эффекта раннего гипоксического preconditionирования : тез. Всероссийской науч.-практ. конф. с международным участием «Трансляционные исследования в инновационном развитии здравоохранения». Приложение №1 / А. С. Семенов, А. В. Крылатов. – СПб : Изд-во «Фонд высоких медицинских технологий», 2014. – С. 40.
4. Нарыжная Н. В. Влияние гипоксического preconditionирования на показатели стресс-реакции у крыс / Н. В. Нарыжная, Л. Н. Маслов, Е. А. Вычужанова, А. С. Семенов, Ю. К. Подоксёнов, А. Г. Портниченко, Ю. Б. Лишманов / Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. – Т. 159, № 4. – С. 439-441. (Версии: Naryzhnaya N. V. Effect of hypoxic preconditioning on stress reaction in rats / N. V. Naryzhnaya, L. N. Maslov, E. A. Vychuzhanova, A. S. Sementsov, Y. K. Podoksyonov, A. G. Portnichenko, Y. B. Lishmanov / Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2015. – Vol. 159, № 4. – P. 450-452).
5. Маслов Л. Н. Сигнальный механизм кардиопротекторного эффекта активных форм кислорода / Л. Н. Маслов, Н. В. Нарыжная, Ю. К. Подоксёнов, А. С. Семенов, А. С. Горбунов, И. Жанг, Ж. М. Пей / Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2015. – Т. 101, № 4. – С. 377-385.
6. Лишманов Ю. Б. Стресс- и инфаркт-лимитирующие эффекты раннего гипоксического preconditionирования / Ю. Б. Лишманов, Л. Н. Маслов, А. С. Семенов, Н. В. Нарыжная, С. Ю. Цибульников // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2015. – Т. 101, № 9. – С. 1013-1021.
7. Семенов А. С. Активные формы кислорода как триггеры инфаркт-лимитирующего эффекта раннего гипоксического preconditionирования миокарда крысы / А. С. Семенов, А. В. Крылатов // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2016. – Т. 1., № 3(109), ч. 2. – С. 128-130.

8. Маслов Л. Н. Роль активных форм кислорода и АТФ-чувствительных калиевых каналов в раннем гипоксическом preconditionировании : тез. VI всероссийской школы-конференции «Физиологии кровообращения» / Л. Н. Маслов, А. С. Семенцов, А. В. Крылатов. – М. : Изд-во МАКС Пресс, 2016. – С. 102-103.
9. Семенцов А. С. Участие активных форм кислорода и АТФ-чувствительных калиевых каналов в раннем гипоксическом preconditionировании : тез. науч.-практ. конф. с международным участием «Новые технологии восстановления деятельности сердца и других органов в эксперименте и клинике» : [посвящ. 150-летию со дня рождения А. А. Кулябко] / А. С. Семенцов, Н. С. Воронков. – Томск, 2016 г. – 78 с.
10. Mandel I. Hypoxic and hyperoxic preconditioning in myocardial protection against ischemia-reperfusion injury: experimental study / I. Mandel, Y. Podoxenov, I. Suhodolov, A. Podoxenov, Y. Svirko, N. Kamenschikov, S. Mikheev, A. Sementsov, A. Dzuman, L. Maslov // *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*. – Vol. 30, Supp. 1. - 2016. – P. S6–S7.
11. Каменщиков Н.О. Защита миокарда от ишемически-реперфузионного повреждения посредством подачи оксида азота в контур экстракорпоральной циркуляции при проведении искусственного кровообращения / Н. О. Каменщиков, И. А. Мандель, Ю. К. Подоксенов, С. Л. Михеев, А. С. Семенцов, Л. Н. Маслов, Б. Н. Козлов, В. М. Шипулин // *Патология кровообращения и кардиохирургия*. – 2017. – Т. 21, № 4. – С. 79-86.
12. Мандель И. А. Защита миокарда от ишемических и реперфузионных повреждений (экспериментальное исследование) / И. А. Мандель, А. Ю. Подоксенов, И. В. Суходоло, Ю. К. Подоксенов, Ю. С. Свирко, Н. О. Каменщиков, С. Л. Михеев, А. С. Семенцов, Ю. В. Роговская, Д. А. Ан, В. М. Шипулин, Л. Н. Маслов // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2017. – Т. 164, № 7. – С. 29-33.
13. Семенцов А. С. Кардиопротекторный эффект адаптивного феномена раннего гипоксического preconditionирования и его фармакологическая имитация / А. С. Семенцов, Л. Н. Маслов, Ю. В. Бушов // *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. – 2017. – Т. 103, № 9. – С. 1022-1031.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лишманов Ю. Б. Стресс- и инфаркт-лимитирующие эффекты раннего гипоксического preconditionирования / Ю. Б. Лишманов, Л. Н. Маслов, А. С. Семенцов, Н. В. Нарыжная, С. Ю. Цибульников // *Росс. физиол. жур.* – 2015. – Т. 101, № 9. – С. 1013-1021.
2. Маслов Л. Н. Гипоксическое preconditionирование, как новый подход к профилактике ишемических и реперфузионных повреждений головного мозга и сердца / Л. Н. Маслов, Ю. Б. Лишманов, Т. В. Емельянова, Д. А. Прут, Ф. Колар, А. Г. Портниченко, Ю. К. Подоксенов, И. Г. Халиулин, Х. Ванг, Ж. М. Пей // *Ангиология и сосудистая хирургия*. – 2011. – Т. 17, № 3. – С. 27-36.
3. Меньшиков В. В. Лабораторные методы исследования в клинике // М.: Медицина, 1987. – 368 с.
4. Нарыжная Н. В. Влияние гипоксического preconditionирования на показатели стресс-реакции у крыс / Н. В. Нарыжная, Л. Н. Маслов, Е. А. Вычужанова, А. С. Семенцов, Ю. К. Подоксенов, А. Г. Портниченко, Ю. Б. Лишманов // *Бюлл. экспер. биол. мед.* – 2015. – Т. 159, №4. – С. 439-441.
5. Aune S. E. Measurement of hydrogen peroxide and oxidant stress in a recirculating whole blood-perfused rat heart model / S. E. Aune, S. T. Yeh, D. P. Zelinski, M. G. Angelos // *Resuscitation* – 2011. – Vol. 82, N 2. – P. 222-227.

6. Bader A. M. Hypoxic Preconditioning Increases Survival and Pro-Angiogenic Capacity of Human Cord Blood Mesenchymal Stromal Cells In Vitro / A. M. Bader, K. Klose, K. Bieback, D. Korinth, M. Schneider, M. Seifert, Y.-H. Choi, A. Kurtz, V. Falk, C. Stamm // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10, N 9. – P. 1-17.
7. Beguin P.C. Acute intermittent hypoxia improves rat myocardium tolerance to ischemia. / P. C. Béguin, M. Joyeux-Faure, D. Godin-Ribuot, P. Lévy, C. Ribuot // *J. Appl. Physiol.* – 2005. - № 99(3). – P. 1064-1069.
8. Cai Z. Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury / Z. Cai, D. J. Manalo, G. Wei, E. R. Rodriguez, K. Fox-Talbot, H. Lu, J. L. Zweier, G. L. Semenza // *Circulation*. – 2003.– Vol. 108, N 1. – P. 79-85.
9. Chen Ch.-L. The cardioprotective effect of hypoxic and ischemic preconditioning in dogs with myocardial ischemia–reperfusion injury using a double-bypass model / Chen CL1, Zheng H2, Xuan Y1, Amat A1, Chen L1, Yu J1, Wang J1 // *Life Sciences* – 2015. – Vol. 15, N 141. – P. 25-31.
10. Dikalov S. Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies / S. Dikalov, K. K. Griendling, D. G. Harrison // *Hypertension* – 2007. – Vol. 49, N 4. – P. 717-27.
11. Kalyanaraman B. The use of fluorescence probes to measure reactive oxygen and nitrogen species in cell: challenges, potentials and caveats / B. Kalyanaraman, V. Darley-Usmar, K. J. A. Davies, P. Dennery, H. J. Forman, M. Grisham, G. Mann, J. L. Moor, J. I. Roberts, H. Ischiropoulos // *Free Radic Biol Med*. – 2012. – Vol. 52. – P. 1–6.
12. Koltai E. Age-associated declines in mitochondrial biogenesis and protein quality control factors are minimized by exercise training / E. Koltai, N. Hart, A. W. Taylor, S. Goto, J. K. Ngo, K. J. A. Davies, Z. Radak // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. – 2012. – Vol. 303, N2. – P. 127-134.
13. Lukyanova L. D. Development of resistance of an organism under various conditions of hypoxic preconditioning: role of the hypoxic period and reoxygenation / L.D. Lukyanova, E.L. Germanova, R.A. Kopaladze // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2009. - № 147(4). – P. 400-404.
14. Neckar J. Cardioprotective effects of chronic hypoxia and ischaemic preconditioning are not additive / J. Neckar, F. Papousek, O. Novakova, B. Ost'adal, F. Kolar // *Basic Res Cardiol*. – 2002. – Vol. 97. – P. 161 – 167.
15. Schultz J. E. J. The ischemia-selective KATP channel antagonist, 5-hydroxydecanoate, blocks ischemic preconditioning in the rat heart / J. E. J. Schultz, Y. Z. Qian, G. J. Gross, R. C. Kukreja // *J. Mol. Cell. Cardiol*. – 1997. - № 29. – P. 1055-1060.
16. Trost S.U. Protection against myocardial dysfunction after a brief ischemic period in transgenic mice expressing inducible heat shock protein 70 / S. U. Trost, J. H. Omens, W.J. Karlon, M. Meyer, R. Mestril, J.W. Covell, W.H. Dillmann // *J Clin Invest*. – 1998. - № 101. – P. 855–862.
17. Walsh T. Genomic duplication and overexpression of TJP2/ZO-2 leads to altered expression of apoptosis genes in progressive nonsyndromic hearing loss DFNA51 / T. Walsh, S.B. Pierce, D.R. Lenz, Z. Brownstein, O. Dagan-Rosenfeld, H. Shahin, W. Roeb, S. McCarthy, A.S. Nord, C.R. Gordon, Z. Ben-Neriah, J. Sebat, M. Kanaan, M.K. Lee, M. Frydman, M.C. King, K.B. Avraham // *Am J Hum Genet*. – 2010. – № 87. – P. 101-109.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТФ – аденозинтрифосфат;

АФК – активные формы кислорода;

ГП – гипоксическое preconditionирование;

ДМТМ – диметилтиомочевина;

ЗН – зона некроза;

K_{ATP} -каналы – АТФ-чувствительные калиевые каналы;

ОР – область риска (область гипоперфузии);

ПКС – протеинкиназа С;

ЭКГ – электрокардиограмма;

H_2O_2 – перекись водорода;

NO – оксид азота;

NO-синтаза – синтаза оксида азота

Отчет о проверке на заимствования №1

Автор: andregsem@mail.ru / ID: 1297343
 Проверяющий: andregsem@mail.ru / ID: 1297343)

Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат»- <http://www.antiplagiat.ru>

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 15
 Начало загрузки: 19.06.2018 09:47:29
 Длительность загрузки: 00:00:01
 Имя исходного файла: СеменцовАС_НД
 Размер текста: 639 кБ
 Символов в тексте: 51104
 Слов в тексте: 6231
 Число предложений: 761

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Последний готовый отчет (ред.)
 Начало проверки: 19.06.2018 09:47:30
 Длительность проверки: 00:00:03
 Комментарии: не указано
 Модули поиска:

| | | |
|---------------|-------------|----------------|
| ЗАИМСТВОВАНИЯ | ЦИТИРОВАНИЯ | ОРИГИНАЛЬНОСТЬ |
| 11,53% | 0% | 88,47% |



Заимствования — доля всех найденных текстовых пересечений, за исключением тех, которые система отнесла к цитированиям, по отношению к общему объему документа.
 Цитирования — доля текстовых пересечений, которые не являются авторскими, но система посчитала их использование корректным, по отношению к общему объему документа. Сюда относятся оформленные по ГОСТу цитаты; общеупотребительные выражения; фрагменты текста, найденные в источниках из коллекций нормативно-правовой документации.
 Текстовое пересечение — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.
 Источник — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.
 Оригинальность — доля фрагментов текста проверяемого документа, не обнаруженных ни в одном источнике, по которым шла проверка, по отношению к общему объему документа.
 Заимствования, цитирования и оригинальность являются отдельными показателями и в сумме дают 100%, что соответствует всему тексту проверяемого документа.
 Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые пересечения проверяемого документа с проиндексированными в системе текстовыми источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности заимствований или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

| № | Доля в отчете | Доля в тексте | Источник | Ссылка | Актуален на | Модуль поиска | Блоков в отчете | Блоков в тексте |
|------|---------------|---------------|-----------------------------|---|-------------|------------------------|-----------------|-----------------|
| [01] | 1,39% | 3,47% | Полный текст диссертации | http://ssmu.ru | 11 Дек 2016 | Модуль поиска Интернет | 13 | 24 |
| [02] | 0,67% | 1,52% | Полный текст диссертации | http://ssmu.ru | 18 Дек 2016 | Модуль поиска Интернет | 3 | 6 |
| [03] | 1,44% | 1,44% | Журнал №3 — II часть (2016) | http://byulleten.com | 02 Дек 2016 | Модуль поиска Интернет | 11 | 11 |

Еще источников: 14
 Еще заимствований: 8,04%