

**УЧАСТИЕ NO-СИНТАЗЫ
В РЕАЛИЗАЦИИ ИНФАРКТ-ЛИМИТИРУЮЩЕГО ЭФФЕКТА
ХРОНИЧЕСКОЙ НЕПРЕРЫВНОЙ
НОРМОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ**

© Н. В. Нарыжная, Л. Н. Маслов, С. Ю. Цибульников,
Е. С. Прокудина, Ю. Б. Лишманов

НИИ кардиологии, Томск, Россия
E-mail: natalynar@yandex.ru

Исследовали роль индуцибельной и эндотелиальной NO-синтазы в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта хронической непрерывной нормобарической гипоксии (ХННГ) на модели острой коронароокклюзии-реперфузии у крыс. ХННГ моделировали содержанием животных 21 день при 12 % O₂. Обнаружено, что ХННГ вызывает увеличение суммарного содержания нитратов и нитритов в депротеинизированной сыворотке крови крыс в 1.5 раза, а в миокарде — в 2 раза по сравнению с интактными животными. Полученный эффект проявляется как у интактных животных, так и у крыс с 20-минутной коронароокклюзией и реперфузией. Хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия оказывала выраженный инфаркт-лимитирующий эффект, который не проявлялся в условиях предварительного введения крысам блокатора NO-синтазы L-NAME (10 мг/кг, внутривенно), селективного ингибитора индуцибельной NO-синтазы S-метилизотиомочевины (3 мг/кг, внутрибрюшинно), однако сохранялся при блокировании нейрональной NO-синтазы 7-нитронидазолом (50 мг/кг, внутривенно). Полученные данные свидетельствуют, что индуцибельная NO-синтаза и оксид азота играют важную роль в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта хронической непрерывной нормобарической гипоксии.

Ключевые слова: хроническая гипоксия, сердце, ишемия, реперфузия.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 101. № 8. С. 921—928. 2015

N. V. Naryzhnaya, L. N. Maslov, S. Yu. Tsibulnikov, E. S. Prokudina, Yu. B. Lishmanov. INVOLVEMENT OF NO-SYNTASE IN THE INFARCT REDUCING EFFECT OF CONTINUOUS CHRONIC NORMOBARIC HYPOXIA. Research Institute for Cardiology, Tomsk, Russia; e-mail: natalynar@yandex.ru.

It was investigated the role of inducible and endothelial NO-synthase (NOS) in the infarct reducing effect of chronic continuous normobaric hypoxia (CCNH) on the model of coronary artery occlusion and reperfusion in rats. Rats were subjected to hypoxic exposure (12 % O₂ during 21 days). It has found that CCNH causes an increase in total levels of nitrate and nitrite in deproteinized blood serum in 1.5-fold and 2-fold in myocardium compared with intact animals. This effect is manifested in intact animals and in rats with a 20 minute coronary artery occlusion and reperfusion. Chronic continuous normobaric hypoxia exhibited infarct sparing effect, which does not ma-

nifest after pretreatment with NO-synthase inhibitor NAME (10 mg/kg intravenously), the selective inhibitor of inducible NOS S-methylisothiourea (3 mg/kg intraperitoneally), but remained after blocking neuronal NOS with 7-nitronidazol (50 mg/kg intravenously). The findings suggest that the inducible NO-synthase and nitric oxide play an important role in the implementation of the infarct limiting effect of chronic continuous normobaric hypoxia.

Key words: chronic hypoxia, heart, ischemia, reperfusion.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 101. N 8. P. 921—928. 2015

Инфаркт-лимитирующий эффект хронической непрерывной нормобарической гипоксии (ХННГ) хорошо известен [22, 23], однако его молекулярные механизмы, изучение которых позволило бы разработать новые подходы к повышению устойчивости сердца к действию ишемии и реперфузии, остаются малоизученными. В некоторых исследованиях авторам удалось получить данные, позволяющие предполагать важную роль NO-синтазы (NOS) и продукции оксида азота в развитии адаптационных изменений миокарда у особей, подвергнутых умеренной хронической гипоксии [1, 20]. Например, при длительном воздействии гипобарической гипоксии в крови субъектов увеличивалось содержание стабильных метаболитов NO-нитритов и нитратов [1, 20]. Кроме того, в миокарде животных, адаптированных к гипоксии, было обнаружено повышение активности NOS и усиление экспрессии генов, кодирующих структуру NOS [13, 16, 20]. Есть данные о том, что доноры NO оказывают инфаркт-лимитирующий эффект [19]. К сожалению, до настоящего времени не предпринимались исследования, направленные на изучение роли NO-синтазы и оксида азота в повышении толерантности сердца к ишемии-реперфузии после ХННГ.

Известно, что в кардиомиоцитах существуют различные типы NOS, в том числе так называемая эндотелиальная (конститутивная) (eNOS), нейрональная (nNOS) и индуцибельная (iNOS) [4]. Единого мнения относительно роли этих изоформ NOS в процессе адаптации к гипоксии не существует. Так, одними авторами показано, что при воздействии хронической гипобарической гипоксии увеличивается активность и содержание iNOS [17, 24], а также кодирующей ее мРНК [14, 16], а в работах других исследователей обнаружено увеличение активности eNOS при акклиматизации новорожденных кроликов к прерывистой нормобарической гипоксии [6, 11]. До настоящего времени роль различных изоформ NOS в формировании инфаркт-лимитирующего эффекта хронической непрерывной нормобарической гипоксии была не исследована.

Цель настоящей работы — оценка участия нейрональной и индуцибельной форм NO-синтазы в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта хронической непрерывной нормобарической гипоксии.

МЕТОДИКА

Эксперименты выполнены на крысах-самцах линии Вистар массой 280—320 г, которые содержались в стандартных условиях вивария. Животные были разделены на 2 группы. Животные опытной группы подвергались хронической непрерывной нормобарической гипоксии путем помещения их на 21 сутки в камеру, наполняемую воздухом, содержащим 12 % кислорода и 0.3 % CO₂, при нормальном атмосферном давлении [22, 23]. Парциальное давление O₂ и CO₂ внутри гипоксической камеры постоянно поддерживали системой «Био-нова-204G4R1» (НТО Био-нова, Россия, Москва) и контролировали датчиками TCOD-IR и OLC 20 (Oldham, Франция), через блок управле-

ния MX32 (Oldham, Франция). Животные извлекались из гипоксической камеры за 24 ч до начала эксперимента. Неадаптированные крысы при этом продолжали находиться в обычных условиях вивария.

Перед моделированием коронароокклюзии животным вводили один из следующих препаратов: ингибитор NO-синтазы L-NAME в дозе 10 мг/кг внутривенно за 25 мин до ишемии [18, 21]; блокатор iNOS S-метилизотиомочевин сульфат в дозе 3 мг/кг внутрибрюшинно за 25 мин до начала ишемии [15]; блокатор pNOS 7-нитронидазол в дозе 50 мг/кг внутривенно за 25 мин до ишемии [12]. Контрольные животные получали физиологический раствор в эквивалентном объеме. Каждая экспериментальная группа содержала 12 крыс.

Для моделирования 20-минутной коронароокклюзии и 180-минутной реперфузии животных наркотизировали пентобарбиталом натрия, который вводили внутрибрюшинно в дозе 50 мг/кг [22, 23]. Искусственную вентиляцию легких осуществляли комнатным воздухом с помощью интубационной трубки через трахеотомическое отверстие с частотой дыхания 60—65 вдохов в мин с помощью аппарата «SAR-830 Series» (CWE Inc., США). Торакотомию производили в пятом межреберье на 2—3 мм слева от грудины. В образовавшееся отверстие перемещали сердце. Лигатуру накладывали на переднюю нисходящую ветвь левой коронарной артерии на 2 мм ниже предсердия и возвращали сердце обратно в грудную полость [23]. Коронароокклюзию верифицировали по появлению эпикардального цианоза и подъему сегмента ST. Реперфузию осуществляли путем ослабления лигатуры на коронарной артерии. Восстановление кровотока подтверждали по возникшей эпикардальной гиперемии и снижению сегмента ST. Продолжительность коронароокклюзии составляла 20 мин, реперфузии — 3 ч [22, 23].

После окончания ишемии и реперфузии сердце изолировали и промывали физиологическим раствором через канюлированную аорту. Для определения размера зоны риска (ЗР, зона ишемии-реперфузии) лигатуру на коронарной артерии затягивали повторно, сердце через канюлированную аорту окрашивали насыщенным раствором перманганата калия, а правый желудочек удаляли. Срезы левого желудочка толщиной в 1 мм получали путем иссечения их перпендикулярно продольной оси сердца с помощью слайсера HSRA001-1 (Zivic Instruments, Pittsburgh, США) [22, 23]. Для определения размера зоны некроза (ЗН) срезы окрашивали 1%-ным раствором 2,3,5-трифенил тетразолия хлорида (30 мин при +37 °С). После окраски срезы помещали в 10%-ный раствор формальдегида на 1 сутки. Зону риска и размер некроза определяли планиметрическим компьютеризированным методом при помощи сканера HP Scanjet G2710 (США), используя прикладную программу фирмы-производителя. Величину очага инфаркта выражали в процентах от размера зоны риска.

В отдельной серии опытов эксперименты проводили по другому протоколу, подвергая сердце воздействию 20-минутной коронароокклюзии и 5-минутной реперфузии. О количестве оксида азота судили по содержанию его стабильных метаболитов (нитритов и нитратов) в сыворотке крови и ткани миокарда [9]. Для определения уровня нитритов и нитратов кровь и ткань миокарда забирали у интактных особей (количество животных в группе $n = 12$), у крыс после коронароокклюзии с последующей реперфузией ($n = 12$); у животных, повергнутых ХННГ без воздействия коронароокклюзии—реперфузии ($n = 10$) и после коронароокклюзии—реперфузии ($n = 10$). Полученные образцы крови центрифугировали 10 мин при 3000 g. Образцы сыворотки депротеинизировали центрифугированием в пробирках Amicon Ultra-10 (Merck

Millipore, Billerica, MA, США), оснащенных микрофилтрами для отделения белков от жидкой части в течение 30 мин при 14 000 g. Депротеинизированную сыворотку замораживали и хранили при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ [9].

Для получения образцов ткани миокарда сердце извлекали из грудной клетки, промывали через аорту 5 мл фосфатного буфера, содержащего (мМ): $10\text{ K}_2\text{HPO}_4$, $10\text{ K}_2\text{HPO}_4$, 2.7 KCl , 137 NaCl , 2.5 ЭДТА , рН 7.4, затем отсекали 100—150 мг ткани левого желудочка в зоне риска и немедленно замораживали. Полученные образцы ткани миокарда хранили в жидком азоте, а непосредственно перед исследованием гомогенизировали в 1.5 мл того же буфера и центрифугировали 15 мин при 12 000 g. Супернатант депротеинизировали, как описано выше для сыворотки крови [9].

Для определения суммарного уровня нитратов и нитритов в депротеинизированных экстрактах крови и ткани использовали набор 23479-1КТ-F фирмы Sigma (St. Louis, США). Измерение оптической плотности проводили на планшетном спектрофотометре INFINITE 200M (компании «Тесан», Зальцбург, Австрия).

Данные выражали в виде средней арифметической (M) \pm стандартная ошибка средней (SEM). Для проверки гипотезы о равенстве средних величин использовали непараметрический критерий Манна—Уитни. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

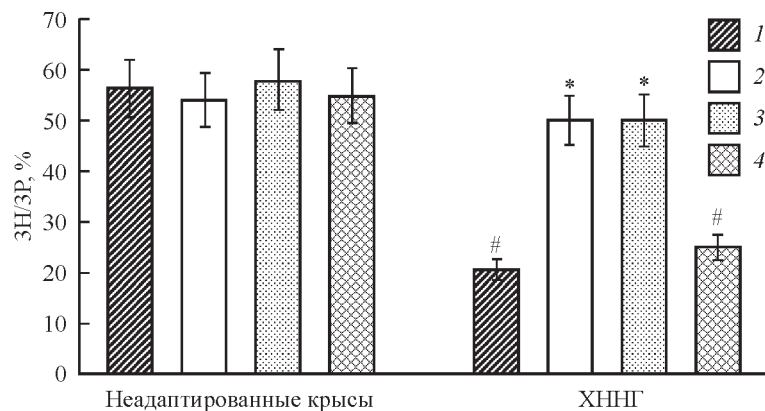
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Как следует из таблицы, проведение курса хронической непрерывной нормобарической гипоксии сопровождается увеличением суммарного содержания нитратов и нитритов в сыворотке крови крыс в 1.5 раза по сравнению с интактными животными ($p < 0.05$). Содержание нитратов и нитритов в ткани миокарда адаптированных крыс оказалось при этом в 2 раза больше, чем у контрольных особей (см. таблицу). Через 5 мин после начала реперфузии количество нитратов и нитритов в сыворотке крови и миокарде крыс, подвергнутых ХННГ, оказалось соответственно в 1.65 и 2.1 раза более высоким, чем у неадаптированных крыс, подвергнутых ишемии-реперфузии (см. таблицу). Полученные данные могут служить косвенным показателем повышения активности NO-синтазы в организме адаптированных животных. Наши последующие эксперименты были направлены на выявление значимости этих изменений для реализации инфаркт-лимитирующего эффекта ХННГ.

Содержание нитратов и нитритов в крови и миокарде крыс после курса хронической непрерывной нормобарической гипоксии ($M \pm SEM$)

| Показатель | Без ишемии | | После ишемии | |
|--|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| | сыворотка крови, мкМ/л | миокард, зона риска мкМ/мг | сыворотка крови, мкМ/л | миокард, зона риска, мкМ/мг |
| Неадаптированные | 3.75 ± 0.49 | 0.20 ± 0.06 | 3.68 ± 0.38 | 0.17 ± 0.04 |
| Хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия | 5.53 ± 0.65 $p = 0.045$ | 0.43 ± 0.07 $p = 0.021$ | 6.10 ± 1.34 $p = 0.027$ | 0.37 ± 0.07 $p = 0.03$ |

Примечание. Кровь и ткань миокарда забирали через 5 мин после начала реперфузии. p — достоверность различий относительно неадаптированных крыс.



Влияние блокады NO-синтазы на размер зоны некроза при 20-минутной коронароокклюзии и 180-минутной реперфузии у крыс после курса хронической непрерывной нормобарической гипоксии ($M \pm SEM$).

1 — контроль, 2 — L-NAME, 3 — S-метилизотиомочевина, 4 — 7-нитронидазол. ХННГ — хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия; ЗН/ЗР — соотношение зоны некроза и зоны риска; # $p < 0.01$ — достоверность относительно группы неадаптированных крыс, * $p < 0.01$ — достоверность относительно ХННГ.

На рисунке показано, что размер некроза миокарда, образовавшегося после ишемии-реперфузии в контрольной группе животных, составил 56.5 % от зоны риска. В то же время величина зоны ишемического некроза миокарда у крыс, подвергнутых предварительной хронической гипоксии, составила 20.4 % от зоны риска, что достоверно ($p < 0.01$) отличалось от соответствующего показателя контрольной группы. Эти результаты свидетельствуют о том, что хроническая непрерывная нормобарическая гипоксия способна оказывать выраженное кардиопротективное действие.

Предшествующее коронароокклюзии введение L-NAME (ингибитора всех изоформ NO-синтазы) животным, повергнутым ХННГ, сопровождалось трехкратным увеличением размера зоны некроза по сравнению с группой адаптированных крыс, не получавших препаратов (см. рисунок). При этом значение индекса ЗН/ЗР оказалось сопоставимым с этим показателем в группе «неадаптированного контроля» (см. рисунок). Введение L-NAME контрольным животным не повлияло на величину формирующегося после коронароокклюзии инфаркта. Наблюдаемые факты позволяют предположить активное участие NO-синтазы в формировании инфаркт-лимитирующего эффекта ХННГ.

Внутривенное введение S-метилизотиомочевины (селективного ингибитора индуцибельной формы NO-синтазы) крысам, адаптированным к ХННГ перед моделированием коронароокклюзии-реперфузии, сопровождалось значительным (в 3 раза) увеличением размера зоны некроза по сравнению с группой ХННГ. При этом значение индекса ЗН/ЗР оказалось сопоставимым с аналогичным показателем в группе «неадаптированного контроля» (см. рисунок). Введение блокатора нейрональной изоформы NO-синтазы — 7-нитронидазола крысам, адаптированным к ХННГ, не устраняло инфаркт-лимитирующий эффект адаптации к гипоксии. Введение указанных ингибиторов неадаптированным животным не повлияло на размер некроза миокарда при последующей коронароокклюзии-реперфузии (см. рисунок).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Вышеизложенные факты подтверждают данные чешских физиологов J. Necka и соавт. [23], а также результаты наших предыдущих исследований [22] об инфаркт-лимитирующем действии ХННГ. Кроме того, нам удалось показать важную роль NO-синтазы в реализации указанного кардиопротективного действия хронической непрерывной нормобарической гипоксии. Итогом настоящей работы явился вывод о важной роли NO-синтаз в формировании защитных эффектов нормобарической гипоксии. Об этом свидетельствуют как повышение уровня оксида азота в ткани миокарда и крови крыс, прошедших курс ХННГ, так и отсутствие проявлений инфаркт-лимитирующего эффекта этого вида адаптации при блокировании NO-синтазы. Эти данные согласуются и с результатами исследований других авторов, показавших важную роль NO-синтаз в формировании повышенной толерантности сердца к действию ишемии-реперфузии после нескольких сеансов гипобарической гипоксии [26] или ишемического preconditionирования [5, 7].

Известно, что NO-синтаза представлена в ткани сердца несколькими изоформами, участие каждой из которых в адаптационных процессах остается предметом дискуссий [8, 17]. Так, ранее было обнаружено, что экспрессия гена индуцибельной формы NO-синтазы возрастает при ишемическом preconditionировании сердца [8], которое, как известно, представляет собой повышение устойчивости миокарда к действию длительной ишемии-реперфузии после одного или нескольких сеансов кратковременной коронароокклюзии [2, 5]. Другая группа исследователей сообщает об увеличении активности iNOS при воздействии хронической гипобарической гипоксии [17, 24]. Также существуют данные о возрастании при подобном гипоксическом воздействии содержания iNOS и кодирующей ее мРНК [14, 16].

Большой вклад в изучение роли NOS в адаптации к гипоксии внес коллектив ученых, возглавляемый проф. J. E. Baker [6, 11, 25]. При исследовании защитного эффекта хронической гипоксии у новорожденных кроликов они обнаружили, что 9-дневная нормобарическая прерывистая гипоксия вызывает более чем 3-кратное увеличение активности eNOS в миокарде и содержания мРНК, кодирующей этот фермент. Повышение активности eNOS ведет к возрастанию уровня нитритов, нитратов и цГМФ в ткани сердца [6, 11, 25]. Авторы полагают, что именно эти изменения определяют увеличение устойчивости животных к гипоксии. Однако экспериментов, в которых инфаркт-лимитирующий эффект адаптации к ХННГ был бы исследован на фоне селективного ингибирования разных изоформ NOS, до настоящего времени не проводилось.

Наши исследования показали, что на фоне ингибирования iNOS инфаркт-лимитирующий эффект хронической нормобарической гипоксии не проявляется, а при блокировании нейрональной NO-синтазы защитный эффект ХННГ в отношении ишемического-реперфузионного повреждения миокарда сохранился. Полученные результаты свидетельствуют о важной роли индуцибельного пула NO-синтазы в защитном эффекте адаптации к ХННГ. Нейрональная NO-синтаза не участвует в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта ХННГ при коронароокклюзии и реперфузии. Эти данные согласуются с результатами группы проф. T. Zaoborný [13], которые обнаружили в цитоплазме кардиомиоцитов крыс, подвергнутых хронической гипобарической гипоксии, значительное возрастание содержания iNOS по сравнению с неадаптированными животными. Важную роль NO в ХННГ подтверждают результаты экспериментов по определению уровня стабильных

метаболитов оксида азота — нитритов и нитратов. Содержание этих соединений в сыворотке крови и миокарде адаптированных к ХННГ крыс увеличено до коронароокклюзии и во время реперфузии по сравнению с аналогичными показателями у неадаптированных особей.

Повышение толерантности сердца к действию ишемии-реперфузии под действием оксида азота является общеизвестным фактом [21]. По мнению М. V. Cohen и J. M. Downey J. M. [10], активация NO-синтазы включает следующую цепочку сигнальных событий: NOS → NO → ГЦ → цГМФ → ПКГ → митоK_{АТФ}-канал → АФК → ПКС → кардиопротекция, где ГЦ — гуанилатциклаза, ПКГ — протеинкиназа G, митоK_{АТФ}-канал — митохондриальный АТФ-чувствительный K⁺-канал, АФК — активные формы кислорода, ПКС — протеинкиназа С.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о важной роли индуцибельной NO-синтазы в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта хронической непрерывной нормобарической гипоксии.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 14-15-00008).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

[1] Долман Л. Б., Коцюруба А. В., Хромов А. С., Сагач В. Ф. Влияние высокогорной гипоксии на содержание стабильных метаболитов монооксида азота в крови человека. *Нур. Med. J.* 12(3/4) : 56—59. 2004.

[2] Маслов Л. Н., Крылатов А. В., Горбунов А. С., Цибульников С. Ю., Семенцов А. С. Вазопротекторный эффект классического ишемического прекондиционирования. *Сиб. мед. журн.* (Томск). 27 (1) : 9—17. 2012.

[3] Маслов Л. Н., Колар Ф., Барзах Е. И. Сигнальный механизм NO-индуцированного повышения толерантности сердца к ишемии/реперфузии. *Рос. физиол. журн.* 95 (11) : 1175—1189. 2009.

[4] Меньщикова Е. Б., Ланкин В. З., Зенков Н. К., Бондарь И. А., Круговых Н. Ф., Труфакин В. А. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. М. Слово. 2006.

[5] Шляхто Е. В., Нифонтов Е. М., Галагудза М. М. Пре- и посткондиционирование как способы кардиоцитопroteкции: патофизиологические и клинические аспекты. *Сердечная недостаточность.* 9 (1) : 4—10. 2008.

[6] Baker J. E., Holman P., Kalyanaraman B., Griffith O. W., Pritchard K. A. Adaptation to chronic hypoxia confers tolerance to subsequent myocardial ischemia by increased nitric oxide production. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 874 : 236—253. 1999.

[7] Bell R. M., Yellon D. M. The contribution of endothelial nitric oxide synthase to early ischaemic preconditioning: the lowering of the preconditioning threshold. An investigation in eNOS knockout mice. *Cardiovasc. Res.* 52 : 274—280. 2001.

[8] Bencsik P., Kupai K., Giricz Z., Görbe A., Pipis J., Murlasits Z., Kocsis G. F., Varga-Orvos Z., Puskás L. G., Csonka C., Csont T., Ferdinandy P. Role of iNOS and peroxynitrite-matrix metalloproteinase-2 signaling in myocardial late preconditioning in rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 299(2) : H512—H518. 2010.

[9] Bryan N. S., Grisham M. B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free. Radic. Biol. Med.* 43(5) : 645—657. 2007.

[10] Cohen M. V., Downey J. M. Is it time to translate ischemic preconditioning's mechanism of cardioprotection into clinical practice? *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 16 (3—4) : 273—280. 2011.

[11] Fitzpatrick C. M., Shi Y., Hutchins W. C., Su J., Gross G. J., Ostadal B., Tweddell J. S., Baker J. E. Cardioprotection in chronically hypoxic rabbits persists on exposure to normoxia: role of NOS and K_{АТР} channels. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288 : H62—H68. 2005.

[12] Fradolf J., Huhn R., Weber N. C., Ebel D., Wingert N., Preckel B., Toma O., Schlack W., Hollmann M. W. Sevoflurane-induced preconditioning: impact of protocol and aprotinin admi-

nistration on infarct size and endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation in the rat heart in vivo. *Anesthesiology*. 113(6) : 1289—1298. 2010.

[13] *Gonzales G. F., Chung F. A., Miranda S., Valdez L. B., Zaobornyj T., Bustamante J., Boveris A.* Heart mitochondrial nitric oxide synthase is upregulated in male rats exposed to high altitude (4.340 m). *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288 : H2568—H2573. 2005.

[14] *Grilli A., De Lutiis M. A., Patrino A., Speranza L., Gizzi F., Taccardi A. A., Di Napoli P., De Caterina R., Conti P., Felaco M.* Inducible nitric oxide synthase and heme oxygenase-1 in rat heart: direct effect of chronic exposure to hypoxia. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 33 (2) : 208—215. 2003.

[15] *Jiang X., Shi E., Nakajima Y., Sato S.* Inducible nitric oxide synthase mediates delayed cardioprotection induced by morphine in vivo: evidence from pharmacologic inhibition and gene-knockout mice. *Anesthesiology*. 101 (1) : 82—88. 2004.

[16] *Jung F., Palmer L. A., Zhou N., Johns R. A.* Hypoxic Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase via Hypoxia Inducible Factor-1 in Cardiac Myocytes. *Circ. Res.* 86 : 319—325. 2000.

[17] *Kolar F., Ostadal B.* Molecular mechanisms of cardiac protection by adaptation to chronic hypoxia. *Physiol. Res.* 53 : S3—S13. 2004.

[18] *Laude K., Favre J., Thuillez C., Richard V.* NO produced by endothelial NO synthase is a mediator of delayed preconditioning-induced endothelial protection. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 284 (6) : H2053—H2060. 2003.

[19] *Lochner A., Marais E., Genade S., Moolman J. A.* Nitric oxide: a trigger for classic preconditioning? *Am. J. Physiol. Heart Circ Physiol.* 279 (6) : H2752—H2765. 2000.

[20] *Manukhina E. B., Malyshev I. Yu., Smirin B. V., Mashina S. Yu., Saltykova V. A., Vainin A. F.* Production and Storage of Nitric Oxide in Adaptation to Hypoxia. *Nitric oxide: Biology Chemistry.* 3 (5) : 393—401. 1999.

[21] *Maslov L. N., Lishmanov Yu. B., Oeltgen P. R., Barzakh E. I., Krylatov A. V., Govindaswami M., Brown S. A.* Activation of peripheral $\delta 2$ opioid receptors increases cardiac tolerance to ischemia/reperfusion injury: Involvement of protein kinase C, NO-synthase, K_{ATP} channels and the autonomic nervous system. *Life Sci.* 84 (19—20) : 657—663. 2009.

[22] *Maslov L. N., Naryzhnaya N. V., Tsibulnikov S. Yu., Kolar F., Zhang Yi., Wang H., Guskova A. M., Lishmanov Yu. B.* Role of endogenous opioid peptides in the infarct size-limiting effect of adaptation to chronic continuous hypoxia. *Life Sci.* 93 : 373—379. 2013.

[23] *Neckar J., Szarszoi O., Herget J., Ostadal B., Kolar F.* Cardioprotective effect of chronic hypoxia is blunted by concomitant hypercapnia. *Physiol. Res.* 52 : 171—175. 2003.

[24] *Rouet-Benzineb P., Eddahibi S., Raffestin B., Laplace M., Depond S., Adnot S., Crozatier B.* Induction of cardiac nitric oxide synthase 2 in rats exposed to chronic hypoxia. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 31 : 1697—1708. 1999.

[25] *Shi Y., Baker J. E., Zhang C., Tweddell J. S., Su J., Pritchard K. A.* Chronic hypoxia increases endothelial nitric oxide synthase generation of nitric oxide by increasing heat shock protein 90 association and serine phosphorylation. *Circ. Res.* 91 (4) : 300—306. 2002.

[26] *Zaobornyj T., Valdez L. B., Iglesias D. E., Gasco M., Gonzales G. F., Boveris A.* Mitochondrial nitric oxide metabolism during rat heart adaptation to high altitude: effect of sildenafil, L-NAME, and L-arginine treatments. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 296 (6) : H1741—H1747. 2009.

Поступила 13 IV 2015
После доработки 25 V 2015