

## Ca<sup>2+</sup>-ЗАВИСИМЫЕ МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ КАРДИОПРОТЕКЦИИ

© 2020 г. И. В. Шемарова<sup>1,\*</sup>, С. М. Коротков<sup>1</sup>, В. П. Нестеров<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург

\*e-mail: irina-shemarova@yandex.ru

Поступила в редакцию 17.10.2019 г.

После доработки 18.03.2020 г.

Принята к публикации 19.03.2020 г.

В обзоре рассматриваются Ca<sup>2+</sup>-зависимые митохондриальные механизмы адаптации кардиомиоцитов к гипоксии и ишемии и анализируются сигнальные механизмы, ответственные за экспрессию антиоксидантных генов и формирование толерантности к гипоксии и ишемии. Особое внимание уделяется анализу роли фактора транскрипции Nrf2, АФК и Ca<sup>2+</sup>-зависимых K<sup>+</sup>-каналов высокой проводимости (VK<sub>Ca</sub>-каналов) в регуляции адаптивных ответов кардиомиоцитов при ишемии миокарда.

*Ключевые слова:* АФК, гипоксия, ишемия, кардиопротекция, прекондиционирование, VK<sub>Ca</sub>-каналы, Nrf2

DOI: 10.31857/S0044452920040087

При чрезмерной физической нагрузке и многих патологических состояниях в клетках нарушаются физиологические и обменные процессы, обусловленные недостатком кислорода. В первую очередь страдают метаболически активные ткани, функционирование которых зависит от митохондрий, играющих ключевую роль в энергетическом метаболизме клеток. Дисфункция митохондрий вызывает снижение работоспособности кардиомиоцитов, нейродегенеративные заболевания и “митохондриальные болезни”.

После открытия в 1949 г. дыхания митохондрий эти клеточные структуры активно изучаются во многих лабораториях мира. Однако, несмотря на многочисленные исследования митохондрий, механизмы цитопротекции и особенно кардиопротекции, опосредованные митохондриями, остаются малоизученными и далекими от полного понимания. Наблюдения последних лет показали, что в кардиомиоцитах (КМ) митохондрии, помимо основной энергопродуцирующей функции, также активно вовлечены во внутриклеточную сигнализацию и регуляцию специализированных функций КМ. При этом важную роль в реализации внутриклеточной сигнализации и функций самих митохондрий играют ионы Ca<sup>2+</sup>. Их дисбаланс в митохондриях КМ приводит к нарушению сердечной деятельности и развитию сердечно-сосудистой (СС) патологии [1]. Ранее мы уже отмечали патогенетическое значение ионов Ca<sup>2+</sup> в развитии постишемических повреждений миокарда и приводили примеры участия Ca<sup>2+</sup> в процессах, влияющих на энергетику

КМ и сократимость миокарда [2]. В экспериментах с использованием митохондрий, изолированных из сердца крыс, была изучена регуляция ионами Ca<sup>2+</sup> проницаемости внутренней мембраны митохондрий (ВММ) и установлено значение митохондриальных Ca<sup>2+</sup>-активируемых неспецифических пор (МРТ-пор – mitochondrial permeability transition pore) в индукции апоптоза и некроза КМ [3–5]. Но если механизмы участия митохондрий в развитии нарушений функциональной и структурной организации КМ достаточно хорошо освещены, то сведений о митохондриальных механизмах кардиопротекции, включая Ca<sup>2+</sup>-зависимые, в литературе мало, что может свидетельствовать о недостаточной изученности этой проблемы [1]. В настоящее время митохондрии рассматриваются в качестве объектов направленной лекарственной терапии при многих заболеваниях, в том числе сердечно-сосудистых, и с этой точки зрения задача суммировать знания, накопленные в данной области клеточной биологии, представляется важной и своевременной.

*Сокращения:*

АОС – антиоксидантная система

ИП – ишемическое прекондиционирование

СС система – сердечно-сосудистая система

КМ – кардиомиоциты

митоK<sub>АТФ</sub> – АТФ-зависимые K<sup>+</sup>-каналы

МРТ-пора – mitochondrial permeability transition pore

mtDNA – митохондриальная ДНК  
 NCX – Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> обменник  
 HIF-1 – Hypoxia Inducible Factor-1  
 HO-1 – гемоксигеназа-1  
 Nrf2 – nuclear factor – erythroid-derived 2 – related factor 2  
 РКК – регуляторы K<sup>+</sup>-проводимости  
 ВК<sub>Ca</sub>-каналы – Ca<sup>2+</sup>-активируемые K<sup>+</sup>-каналы высокой проводимости  
 ВММ – внутренняя мембрана митохондрий  
 МФК – митохондриальные ферментные комплексы  
 ПМ – плазматическая мембрана  
 СДГ – сукцинатдегидрогеназа

### ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИ НА ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТЬ КАРДИОМИОЦИТОВ И КЛЮЧЕВЫЕ ФУНКЦИИ МИТОХОНДРИЙ

Гипоксия является важнейшим звеном многих патологических процессов и хронических заболеваний, включая заболевания сердечно-сосудистой системы, среди которых наиболее распространенной является ишемическая болезнь сердца.

Молекулярную основу патогенетических нарушений при гипоксии и ишемии составляют, главным образом, процессы нарушения ключевых функций митохондрий – АТФ-продуцирующей и Ca<sup>2+</sup>-депонирующей, что приводит к энергетической дисфункции КМ, нарушению возбудимости миокарда, а также невозможности осуществления желудочковыми КМ сократительной функции [2, 6].

В исследованиях, проведенных на модели изолированных митохондрий, была установлена следующая последовательность изменений в клетках в результате прекращения доступа кислорода:

*0–5 мин:* снижение уровня АТФ в клетке в 2–4 раза, несмотря на активацию гликолиза;

*5–15 мин:* повышение внутриклеточной концентрации Ca<sup>2+</sup>. Активация гидролитических ферментов, в том числе митохондриальной фосфолипазы А<sub>2</sub>. Ca<sup>2+</sup>-перегрузка митохондрий при сохранении ими всех основных функций (митохондрии еще не повреждены);

*15–30 мин:* гидролиз митохондриальных фосфолипидов фосфолипазой А<sub>2</sub> и нарушение барьерных свойств митохондриальной мембраны. Реоксигенация ткани на этой стадии приводит к активному набуханию митохондрий. Дыхательный контроль в митохондриях нарушен, окислительное фосфорилирование разобщено, способность митохондрий накапливать ионы кальция снижена;

*30–60 мин:* частичное восстановление функций митохондрий, временное повышение дыхательно-

го контроля, способности накапливать кальций. Механизм компенсаторных процессов, приводящих к временному улучшению функций митохондрий, неизвестен, но, очевидно, что он связан с функцией клетки в целом, так как при анаэробной инкубации изолированных митохондрий это явление не наблюдается;

*60–90 мин:* необратимое повреждение митохондрий и полная гибель клеток” (цитируется по: [7]).

Важно отметить, что последовательность изменений в клетке в результате аноксии одинакова для самых различных тканей. Это показали опыты со срезами тканей, изолированными клетками и изолированными митохондриями [7].

Сердце является самым энергоемким органом, при этом основным источником энергии, обеспечивающим сократимость миокарда, является АТФ, аккумулируемая в процессе дыхания митохондрий [8]. Для того чтобы обеспечить миокард достаточным количеством АТФ, необходимо огромное количество функционально активных митохондрий, которые при нормоксии занимают около одной трети от общего объема КМ и соответственно более половины объема миофибрилл. При гипоксии количество митохондрий в КМ многократно возрастает [1]. Дисфункция митохондрий, вызванная развивающейся гипоксией или ишемией/реперфузией, приводит к нарушению клеточного дыхания, следствием чего являются аритмии и снижение сократительной способности миокарда [8].

В настоящее время влияние нарушения синтеза АТФ в митохондриях на функциональную активность КМ изучено в наибольшей степени. Установлено, что при уменьшении содержания в клетке АТФ на 10–20% снижается активность всех энергозависимых процессов на 70–80%. Угнетение процессов энергообразования в митохондриях сопровождается ослаблением β-окисления липидов, следствием чего являются нарушение липидного обмена в КМ и накопление ацил-СоА-тиоэфиров, ацилкарнитинов, церамидов и триглицеридов, обладающих потенциальной цитотоксичностью. При этом также происходит подавление анаболических процессов, нарушение работы ионных насосов и соответственно ионного гомеостаза в клетке, приводящего к нарушению специализированных клеточных функций и снижению жизнедеятельности КМ [1, 7–9]. Более подробно о влиянии гипоксии на энергозависимые процессы в КМ мы писали ранее [2].

Другим важным фактором, приобретающим патогенетическое значение при развитии гипоксии, является окислительный стресс, который индуцируется АФК при нарушении функционирования дыхательной цепи митохондрий КМ. Известно, что в процессе функционирования дыхательной цепи при нормоксии происходит образование незначительных количеств супероксидного радика-

ла, являющегося побочным продуктом дыхательных комплексов. В функционально полноценных митохондриях действие митохондриальной антиоксидантной системы, включающей глутатион, тиоредоксин-2, глутатион-пероксидазу, фосфолипид-гидропероксид-глутатион-пероксидазу и Mn-супероксиддисмутазу, предотвращает повреждение митохондриальных структур активными формами кислорода [9]. При нарушении переноса электронов между компонентами дыхательной цепи в условиях окислительного стресса при гипоксии генерация митохондриями супероксидного радикала существенно усиливается. Недостаточность функций митохондриальной антиоксидантной системы в этом случае будет способствовать развитию окислительного стресса, активизации самоподдерживающихся процессов перекисного окисления липидов, окислительным повреждением белков и нуклеиновых кислот. В конечном итоге эти события приводят к снижению функций клетки, накоплению мутаций в митохондриальной и ядерной ДНК. В свою очередь повреждение митохондриальных генов способствует нарушению процесса переноса электронов в дыхательной цепи, результатом чего является дополнительное усиление продукции свободных радикалов в митохондриях [9, 10].

На сегодняшний день показано, что образуемые митохондриями активные формы кислорода, воздействуя на внутриклеточные сигнальные механизмы, могут инициировать развитие в миокарде гипертрофических и фиброзных изменений. Избыточный уровень АФК может также способствовать уменьшению сократительной активности КМ и повышать чувствительность миофиламентов к  $\text{Ca}^{2+}$  вследствие нарушения в КМ ионнообменных процессов, за счет повреждения клеточных мембран и ионных каналов [10].

В настоящее время известно, что митохондрии играют центральную роль в реализации программируемой клеточной гибели КМ, к которой приводит, прежде всего, нерегулируемое повышение внутримитохондриальной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  [11, 12].

**$\text{Ca}^{2+}$ -перегрузка митохондрий.** Многочисленными исследованиями было показано, что при гипоксии происходит  $\text{Ca}^{2+}$ -перегрузка митохондрий, имеющая ряд негативных последствий для КМ. В числе главных следует назвать разобщение окислительного фосфорилирования, что снижает аэробный выход АТФ и препятствует восстановлению адекватного энергообеспечения миокарда; нарушается пассивный ионный транспорт в митохондрии; происходит набухание митохондрий и нарушение целостности внутренней митохондриальной мембраны.

На модели изолированных митохондрий было установлено, что накопление  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксе ми-

тохондрий происходит в две фазы. Первая фаза — это энергозависимый вход ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в матрикс митохондрий, стимуляция дыхания и выброс протонов из матрикса. Во второй фазе из-за открытия МРТ-пор во ВММ накопленные ионы  $\text{Ca}^{2+}$  начинают выходить из матрикса, и через некоторое время наблюдаются быстрое увеличение проницаемости ВММ, обратный захват ионов водорода и высвобождение из матрикса ионов  $\text{K}^+$ . Развитие  $\text{Ca}^{2+}$ -перегрузки изолированных митохондрий усугубляется нарушением механизмов пассивного ионного транспорта через наружную мембрану митохондрий [12].

Полагают, что в условиях ишемии и ишемии/реперфузии в митохондриях преобладают процессы свободного окисления, способствующие накоплению  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксе митохондрий КМ. На это указывают прекращение захвата  $\text{Ca}^{2+}$  митохондриями и даже выход из них уже накопленных ионов при подавлении процессов свободного окисления. При этом повреждающее действие избыточного накопления ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в КМ усиливается в условиях окислительного стресса, инициируемого гипоксией [10]. Моделирование ишемии и реперфузии в опытах на крысах одновременно со снижением  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающей способности митохондрий приводило к снижению трансмембранного потенциала, уменьшению коэффициента АДФ/О (соотношение количественных величин добавленного АДФ и поглощенного в течение состояния 3 кислорода) и замедлению дыхания митохондрий в состоянии 3 [13].

В то же время не следует забывать о том, что митохондрии являются важными  $\text{Ca}^{2+}$ -депонирующими органеллами КМ, которые по своей емкости лишь незначительно уступают  $\text{Ca}^{2+}$ -емкости саркоплазматического ретикула [3, 12]. Они принимают непосредственное участие в регуляции  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаза в КМ и могут быть задействованы в механизмах адаптации КМ к окислительному стрессу при реперфузии.

В целом к настоящему времени сложились представления о том, что митохондрии являются первичными мишенями при гипоксии и ишемии/реперфузии, и процессы, происходящие в них, могут приводить как к дисфункции и повреждению КМ, так и к их постишемической адаптации [1, 6, 9, 13]. Поэтому многие исследования направлены на изучение роли митохондрий, митохондриальных АФК и  $\text{Ca}^{2+}$  в кардиопротекторном механизме ишемического и фармакологического preconditionирования.

## РОЛЬ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ В РАЗВИТИИ АДАПТАЦИИ К ГИПОКСИИ

Системный ответ организма на гипоксию включает различные адаптивные реакции (возрастание объема альвеолярной вентиляции, повышение кислородной емкости крови, централизация кровотока, увеличение сердечного выброса крови и др.). На клеточном уровне они направлены, прежде всего, на сохранение энергосинтезирующей функции митохондрий. При этом используются два типа механизмов: а) срочный компенсаторный, цель которого состоит в предотвращении последствий острой гипоксии на молекулярном уровне и быстрое восстановление жизнедеятельности клеток в постгипоксический период, и б) долгосрочные механизмы, которые формируются в течение более длительного периода и способствуют увеличению неспецифической резистентности клеток к дефициту кислорода. Эти механизмы базируются на регуляторном репрограммировании активности митохондриальных ферментных комплексов (МФК) [14].

В нормоксических условиях работа дыхательной цепи митохондрий, как правило, зависит от окисления НАД-зависимых субстратов — основного поставщика восстановительных эквивалентов для дыхательной цепи через МФК I. Тем не менее 25–30% митохондриального дыхания в этих условиях ассоциируются с МФК II [9, 14] и окислением сукцината, содержание которого в матриксе митохондрий невелико (0.2–0.4 ммоль/л) [15].

На ранней стадии гипоксии наблюдается активация электрон-транспортной функции МФК I, способствующая усилению синтеза АТФ. Она отражает первичный компенсаторный механизм мобилизации базовых энергетических ресурсов клетки в условиях сравнительно небольших по силе внешних воздействий. При усиливающемся гипоксическом воздействии происходит снижение редокс-потенциала первого комплекса и соответственно окисления НАД-зависимых субстратов, а также компенсаторная активация альтернативных путей окисления ФАД-зависимых субстратов, поставляющих восстановительные эквиваленты к МФК II–IV. Среди них особую роль играет МФК II (сукцинатоксидазный путь окисления). В условиях гипоксии он имеет термодинамические преимущества перед окислением НАД-зависимых субстратов цикла трикарбоновых кислот, и, несмотря на то, что при этом сохраняются только два участка сопряжения окисления и фосфорилирования, высокие скорости реакции обеспечивают достаточную энергетическую эффективность процесса в целом [16]. Активация альтернативных метаболических путей, выполняющих функцию срочных компенсаторных механизмов, позволяет сохранить поступление восстановительных экви-

валентов на цитохромный участок дыхательной цепи, благодаря чему электрон-транспортная функция МФК III и IV и синтез АТФ в этом участке не нарушаются, что обеспечивает сохранение энергосинтезирующей функции. Этот процесс направлен на использование энергетически более эффективного в условиях гипоксии сукцинатоксидазного пути окисления дыхательных субстратов, благодаря чему компенсируется снижение скорости окислительных превращений и синтеза АТФ, а также устраняется характерный для гипоксии метаболический ацидоз и, как следствие, увеличивается резистентность сердечной мышцы к дефициту кислорода [14, 16]. Более того, поскольку активация МФК II обуславливает приток Ca<sup>2+</sup> в митохондрии, увеличиваются его внутримитохондриальные запасы, реализуемые в условиях гипоксии при снижении работоспособности миокарда [17].

Если перестройки работы субстратного участка дыхательной цепи при гипоксии не происходит, то наблюдается резкая деэнергизация митохондрий (снижение мембранного потенциала, потеря АТФ) и изменения в пуле адениннуклеотидов, нарушение дыхания, связанного с окислением НАД-зависимых субстратов — донаторов электронов для комплекса I, поэтому переключение путей окисления митохондриальных субстратов сопутствует практически любым формам гипоксии или ишемии/реперфузии [14, 16, 18, 19].

По мнению Л.Д. Лукьяновой [9] репрограммирование дыхательной цепи митохондрий при гипоксии, приводящее к переключению метаболических путей от окисления НАД-зависимых субстратов на окисление сукцината, обусловлено следующими причинами:

1) чувствительностью сукцинатдегидрогеназы (МФК II) к редокс-состоянию пиридиннуклеотидов, железо-серного кластера комплекса I и коэнзима Q, ее способностью активироваться при росте степени их восстановленности при гипоксии и тормозиться при их окислении;

2) ограничением щавелевоуксусного торможения, подавляющего сукцинатзависимое дыхание, так как в условиях высокой восстановленности дыхательной цепи оксалоацетат (конкурентный ингибитор СДГ) восстанавливается в малат, и его ингибирующее действие на фермент уменьшается;

3) кинетическими преимуществами окисления сукцината — ФАД-зависимого субстрата — в условиях высокой восстановленности НАДН (гипоксия) перед НАД-зависимыми субстратами благодаря тому, что флавины в этих условиях сохраняются в более окисленном состоянии;

4) способностью сукцинат-зависимого окисления поддерживать высокую скорость доставки восстановительных эквивалентов в дыхательную цепь и обеспечивать наибольший выход богатых энергией соединений в единицу времени. Для биологи-

ческой системы это важнее, чем высокий коэффициент полезного действия, оцениваемый числом участков сопряжения окисления и фосфорилирования, которое в данном случае уменьшается.

В процессе долгосрочной адаптации к гипоксии происходит транскрипционное ремоделирование свойств основных субъединиц МФК I, в результате чего последний восстанавливает способность к переносу электронов и окислительному фосфорилированию, утраченную в период срочной адаптации. При этом постепенно снижается преобладающее влияние сукцинатоксидазного окисления на энергообразование и дыхание митохондрий [14, 16, 19].

### СИГНАЛЬНАЯ И КАРДИОЗАЩИТНАЯ РОЛЬ МАЛЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ АФК

Очевидно, что дисфункция митохондрий КМ при гипоксии находится в фокусе внимания современной медицины. Однако, занимаясь изучением проблем фармакологической коррекции нарушений КМ, вызванных гипоксическим или реперфузионным повреждением митохондрий, не следует забывать, что эти органеллы высокоадаптированы к эндогенному окислительному стрессу, вызываемому периодическим снижением уровня кислорода в крови и способны противостоять физиологическим нагрузкам, сопряженным с кратковременным состоянием гипоксии [20]. При этом в КМ активируются механизмы антиоксидантной защиты и защиты митохондриальной ДНК (mtDNA), усиливается дыхательный контроль митохондрий, в то же время увеличивается продукция АФК, что способствует биогенезу митохондрий, повышению резистентности КМ к экстремальным воздействиям и индукции системной метаболической кардиозащиты [1].

Гомеостаз АФК в клетке — необходимое требование нормального протекания многочисленных физиологических и сигнальных процессов, в то время как избыточный внутриклеточный уровень свободных радикалов кислорода приводит к окислительному стрессу, снижению жизнеспособности клеток или даже их гибели [21–23].

При развитии гипоксии и ишемии/реперфузии при реоксигенезации миокарда продукция АФК в КМ резко возрастает [23, 24]. Это связано с понижением концентрации АДФ и нарушением работы электрон-транспортных цепей митохондрий, преимущественно на уровне комплексов I и III [25], снижением продукции митохондриальных антиоксидантов и внутримитохондриального пула глутатиона [26], а также синтеза белка фратаксина, который участвует в регуляции митохондриального транспорта железа [27] и ответственен за формирование митохондриального кластера Fe—S. Сниже-

ние синтеза фратаксина приводит к увеличению внутриклеточного содержания  $Fe^{2+}$ , в присутствии которого эндогенная перекись водорода может давать высокоактивный гидроксильный радикал, обладающий наибольшей цитотоксичностью среди других АФК [28]. Способствует образованию гидроксильного радикала снижение парциального давления кислорода в КМ во время ишемии, что также сопровождается переходом окисленных форм железа  $Fe^{3+}$  в восстановленные  $Fe^{2+}$  [29].

Следует отметить, что во многих случаях АФК-индуцированной дисфункции КМ и эндотелиальных клеток кровеносных сосудов СС системы сопутствует либо предшествует нарушение гомеостаза  $Ca^{2+}$  [30]. В КМ и эндотелиальных клетках кровеносных сосудов системы основным депо  $Ca^{2+}$  служит сарко/эндоплазматический ретикулум, который может включать до 75% всех запасов внутриклеточного  $Ca^{2+}$ , вторым по значению депо  $Ca^{2+}$  являются митохондрии, которые вносят существенный вклад в агонист-индуцированную мобилизацию  $Ca^{2+}$  [31]. Ионы  $Ca^{2+}$  поступают в митохондрии, главным образом, через унипортер ВММ, а удаляются через  $Na^+/Ca^{2+}$  обменник (NCX) [31].

В эндотелиальных клетках сосудов митохондрии тесно контактируют с  $Ca^{2+}$ -каналами эндоплазматического ретикулума и плазматической мембраны (ПМ). Представляется очевидным, что митохондрии эндотелия, в отличие от митохондрий КМ, не должны иметь существенного значения для клеток, энергетические потребности которых примерно на 2/3 покрываются анаэробным гликолизом [32]. Однако результаты экспериментов свидетельствуют о том, что в клетках эндотелия митохондрии, также как и в КМ, выполняют важные регуляторные и сигнальные функции, осуществляющиеся с участием АФК, которые нарушаются при развитии патологии СС системы и хирургических вмешательствах. Наиболее выраженные патологические изменения в клетках СС системы, инициируемые АФК, возникают при гипоксии, а в случае ишемии — при реперфузии. Основные источники АФК при реперфузии сосудов — NADPH-оксидазы, ксантинооксидаза и дыхательная цепь самих митохондрий (МФК IV) [33]. Усиление свободнорадикальных процессов в митохондриях эндотелиальных клеток может приводить к патологическому делению митохондрий и к продолжительному повышению внутримитохондриального уровня ионов  $Ca^{2+}$ , сопряженному с ингибированием митохондриального обменника NCX активными формами кислорода и со структурно-функциональным разобщением митохондрий и эндоплазматического ретикулума [34, 35].

Роль митохондриального кальция в повреждении эндотелиальных клеток при реперфузии, как и в целом, взаимосвязь кальция и АФК в клетках эндотелия, представляет собой важную, но малоизученную

проблему [29]. Имеющиеся данные позволяют предполагать, что при реоксигенации возникают инициируемые АФК осцилляции цитозольного кальция [36], которые, в свою очередь, влияют на состояние митохондрий, усиливая вторичную генерацию АФК [37] и экзоцитоз адгезивных молекул, усугубляющих дисфункцию эндотелия за счет инфильтрации лейкоцитов [38].

Негативное влияние АФК на эндотелий сосудов во многом обусловлено повреждающим действием радикалов кислорода на клеточные мембраны. При этом АФК могут активировать ряд каналов эндоплазматического ретикулаума и ПМ, включая IP<sub>3</sub>- и рианодинчувствительные каналы, а также некоторые катионные каналы суперсемейства TRP для неуправляемого входа Ca<sup>2+</sup>, что может вызвать кальциевую перегрузку клеток, увеличить проницаемость ВММ и стать причиной программируемой гибели эндотелиальных клеток [39–43].

Однако, как уже неоднократно отмечалось, в сердечно-сосудистой системе АФК выступают не только в качестве повреждающего фактора при чрезмерной интенсификации свободнорадикального окисления, но выполняют защитную роль, выступая и в качестве индукторов редокс-чувствительных кардиопротекторных сигнальных путей, ключевыми компонентами которых являются транскрипционные факторы HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1), и Nrf2 (nuclear factor – erythroid-derived 2 – related factor 2). О структуре и функциях HIF-1, как сигнальной молекулы, при адаптации к гипоксии мы писали ранее [20]. В данной статье представляется важным рассмотреть компоненты другого, менее изученного Nrf2-зависимого – сигнального пути, который активируется в условиях гипоксии и ишемии/реперфузии и направлен на защиту клеток от повреждений, сопряженных с гипоксией [44].

Транскрипционный фактор Nrf2 относится к семейству ДНК-связывающих белков, содержащих лейциновый мотив, так называемую «лейциновую молнию» (basic leucine zipper transcription factor), и является основным молекулярным регулятором во внутриклеточной антиоксидантной защите. Известно, что Nrf2 транслоцируется в ядро при возникновении окислительного или электрофильного стресса [44]. В ядре Nrf2 связывается с регуляторами антиоксидантного ответа в промоторах многочисленных генов, ответственных за синтез ферментов антиоксидантной защиты и детоксикации, таких как супероксиддисмутаза-1, глутатионтрансфераза, глутаматцистеинлигаза, гемоксигеназа-1 (HO-1) и др. [45]. В ряде работ было показано, что сверхэкспрессия Nrf2 оказывает цитопротекторное действие на клетки, в то время как отсутствие его экспрессии, напротив, увеличивает чувствительность тканей к окислительному стрессу [45–50]. Несмотря на то что многие виды струк-

турных нарушений клеток и тканей, вызванных окислительным стрессом, связаны с дисфункцией митохондрий, до последнего времени не было известно, защищает ли Nrf2 митохондрии от повреждений, индуцируемых АФК. В связи с этим большой интерес представляют работы, в которых обнаружено влияние Nrf2 на биогенез и функции митохондрий КМ в условиях окислительного стресса. В этих работах было показано, что сверхэкспрессия Nrf2 предотвращает развитие индуцируемых АФК нарушений в митохондриях, таких как повреждение митохондриальных сетей, потеря митохондриального мембранного потенциала, снижение экспрессии цитохрома *c*. Обнаружение локализации Nrf2 в наружной мембране митохондрий предполагает прямое взаимодействие Nrf2 со структурными компонентами митохондрий для сохранения их целостности и функциональной активности [44, 51, 52].

В экспериментах *in vitro* и *in vivo* на крысах и кроликах изучалось действие Nrf2 на процессы митофагии и клеточной гибели, инициируемой окислительным стрессом, как при остром повреждении миокарда, так и при развитии сердечной недостаточности [44, 53–57]. Было установлено, что Nrf2 защищает от деструкции мтДНК и белки, участвующие в биогенезе митохондрий, такие как Drp1, Drp2, hFis-1, mitofusin 1, mitofusin 2, OPA1 [44, 53, 57], а также подавляет протеотоксический некроз КМ путем усиления аутофагического клиренса токсичных убиквитинированных белков [58]. Установлено, что экспрессия Nrf2 в КМ снижает степень дезадаптивного ремоделирования левого желудочка в ответ на перегрузку кровяным давлением. При этом дефицит Nrf2 на системном уровне сопровождался ранним началом ремоделирования миокарда и последующим развитием сердечной недостаточности [59, 60]. Следует отметить, что к сердечной недостаточности и другим нарушениям в СС системе также могли приводить мутации самого гена Nrf2 либо полиморфизм Nrf2-регулируемых генов детоксикации и АОС (его ослабленные полиморфные формы), обусловленные длительным окислительным стрессом, что может служить еще одним доказательством важности этого фактора транскрипции для обеспечения нормальной жизнедеятельности КМ и непосредственно митохондрий в условиях гипоксии и ишемии/реперфузии [61, 62].

В качестве сигнальной молекулы Nrf2 может участвовать в передаче сигналов по редокс-зависимым сигнальным путям, в первую очередь, Akt/PKB/mTOR (mammalian target rapamycin)-пути, который играет ключевую роль в физиологии клеток сердечно-сосудистой системы в норме и при патологии [63, 64]. Активация образуемых mTOR-комплексов имеет важное значение для выживаемости клеток миокарда при ишемии. В частности, получены данные, согласно которым фос-

форилированные mTOR-комплексы, главным образом mTORC1, проявляют кардиопротекторные свойства за счет угнетения аутофагии и активации восстановительных процессов ишемизированного миокарда [64].

### РОЛЬ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ В РЕАЛИЗАЦИИ КАРДИОЗАЩИТНЫХ ЭФФЕКТОВ ИШЕМИЧЕСКОГО ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ

Учитывая важную роль калиевого транспорта в обеспечении нормального функционирования митохондрий КМ, очевидно, что разработка мер по оптимизации внутримитохондриального калиевого транспорта в условиях ишемии и ишемии/реперфузии является важным стратегическим направлением в метаболической кардиопротекции и молекулярной терапии. В нормальной физиологии КМ транспорт  $K^+$  в митохондриях имеет большое функциональное значение [65], но его роль многократно возрастает в условиях гипоксии, когда меняется клеточный метаболизм КМ и активируются механизмы срочной клеточной адаптации.

В митохондриях различают несколько систем транспорта  $K^+$ , включая пассивный транспорт, хотя с учетом большого электрохимического потенциала (~–200 мВ с матриксной стороны митохондрий) скорость такой диффузии будет невелика [66]. Что касается специфических систем транспорта, то в митохондриях существует система электрогенного входа калия через специфические  $K^+$ -каналы и  $K^+/H^+$ -антипортер [65, 67, 68], из которых  $K^+$ -каналы рассматриваются не только в качестве объектов транспортной системы митохондрий, но и с точки зрения прикладной медицины – в качестве основных объектов молекулярной терапии и профилактики последствий ишемии и, главным образом, реперфузии, возникающей при возобновлении кровотока в зоне ишемического повреждения миокарда [65]. При этом подразумеваются, прежде всего митохондриальные АТФ-зависимые  $K^+$ -каналы (миток<sub>АТФ</sub>), интерес к которым был стимулирован открытием кардиозащитного действия прерывистой гипоксии (феномен, получивший название ишемического прекондиционирования) [69].

Ишемическое прекондиционирование (ИП) – это адаптация миокарда к ишемии, развивающаяся после нескольких повторяющихся кратковременных эпизодов ишемии/реперфузии и приводящая к возникновению устойчивости сердечной мышцы к последующей более длительной ишемической атаке. Согласно данным литературы, ишемическое прекондиционирование позволяет в некоторых случаях предотвратить развитие инфаркта миокарда, а при его возникновении обеспечивает мень-

шие размеры зоны некроза, уменьшает вероятность появления аритмий, в том числе и реперфузионных, предупреждает развитие дисфункции левого желудочка [2].

Исследования, выполненные к настоящему времени, показывают, что механизм ИП представляет собой каскад метаболических и сигнальных процессов, начинающийся с активации рецепторов ишемическим стимулом (триггером), последовательным усилением сигнала и его передачи на конечные эффекторные мишени, включая сарколеммальные и митохондриальные АТФ-зависимые калиевые каналы [70].

При исследовании молекулярных механизмов ИП было установлено, что  $K_{АТФ}$ -каналы, открывающиеся в процессе ишемии в сарколемме и митохондриях КМ, играют центральную роль в реализации защитных эффектов прекондиционирования. Это доказывается тем, что кардиопротекторный эффект ИП может быть полностью блокирован ингибиторами  $K_{АТФ}$ -каналов типа глибенкламида и 5-гидроксидеканоата [71]. Первоначально ответственными за ИП считались исключительно сарколеммальные  $K_{АТФ}$ -каналы, однако позднее стало очевидным, что важнейшую роль в развитии этого процесса играют миток<sub>АТФ</sub> [65, 72].  $K_{АТФ}$ -каналы в митохондриях специфически открываются пинацидилем и диазоксидам, а сарколеммальные – только пинацидилем, и блокируются 5-гидроксидеканоатом и глибенкламидом, однако, в отличие от последних, ингибирование миток<sub>АТФ</sub> происходит при значительно более низких концентрациях этих веществ [65]. Подробнее о роли миток<sub>АТФ</sub>-каналов в процессе ИП, их структуре и регуляции мы писали ранее [2].

В данной статье мы хотим привлечь внимание к  $Ca^{2+}$ -активируемому  $K^+$ -каналом высокой проводимости ( $ВК_{Ca}$ ) – другой малоизученной разновидности митохондриальных  $K^+$ -каналов, принимающих участие в механизме кардиопротекции [73].

Первоначально была изучена структура  $ВК_{Ca}$ -каналов, локализованных на плазматической мембране. Было установлено, что эти каналы характеризуются большой проводимостью, а также чувствительностью к изменениям мембранного потенциала и концентрации внутриклеточного  $Ca^{2+}$  [74]. Исследование структурно-функциональной организации каналов показало, что каналный белок, кодируемый геном *Kcnma1*, образован четырьмя  $\alpha$ -субъединицами, состоящими из N-внеклеточной терминали, 7 трансмембранных доменов (S0–S7) и внутриклеточной C-терминали. Домен, являющийся сенсором потенциала, включает сегменты S0–S4, а пора и селективный фильтр формируются линкером S5–S6 [75, 76].

Внутриклеточная C-терминаль, являющаяся самым протяженным доменом  $ВК_{Ca}$ -канала, содер-

жит две Ca<sup>2+</sup>-чувствительные области, известные как регуляторы K<sup>+</sup>-проводимости (RCK) 1 и 2. Исследования мутагенеза показали, что RCK1 содержит два важнейших для Ca<sup>2+</sup>-регуляции остатков аспартата (D362/D367), а RCK2 – 5 консективных аспартатов в Ca<sup>2+</sup>-связывающих участках (“calcium bowl”), которые в сочетании друг с другом являются достаточными для активации BK<sub>Ca</sub>-канала при физиологических концентрациях Ca<sup>2+</sup> [77, 78]. Кроме Ca<sup>2+</sup>, BK<sub>Ca</sub>-каналы могут активироваться миллимолярными концентрациями Mg<sup>2+</sup>. Эта активность связана с наличием Mg<sup>2+</sup>-сенсора, представляющего собой совокупность аминокислотных остатков (D99, N172 и E374, E399), локализованных на разных α-субъединицах канала, но связанных электростатическими взаимодействиями [79].

Важно отметить, что ген *Kcnma1* при транскрибировании может подвергаться обширному альтернативному сплайсингу, что приводит к появлению нескольких изоформ BK<sub>Ca</sub>-каналов с различными функциональными характеристиками, включая потенциал- и Ca<sup>2+</sup>-чувствительность, ответы на фосфорилирование и модуляцию арахидоновой кислотой, а также субклеточную локализацию, в том числе митохондриальный таргетинг [80].

Первые доказательства того, что BK<sub>Ca</sub>-каналы с проводимостью около 300 pS (в 150 mM KCl) присутствуют на ВММ, были получены в конце 90-х годов [81]. Канал был охарактеризован авторами с использованием митопластов – митохондрий, лишенных внешней мембраны, выделенных из клеток глиомы LN-229. В дальнейшем BK<sub>Ca</sub>-каналы митохондрий (митоBK<sub>Ca</sub>) со сходными проводимостями (в диапазоне от 200 до 307 pS), были обнаружены и в других клеточных системах.

К настоящему времени известно, что mitoBK<sub>Ca</sub> и порообразующие α-субъединицы BK<sub>Ca</sub>-каналов ПМ кодируются одним и тем же геном (*Kcnma1*) [82]. Это объясняет, почему они имеют общие базовые биофизические свойства, включающие большую проводимость и сходные ответы на изменение потенциала и [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, хотя, очевидно, что конкретные значения исследуемых параметров могут отличаться. Сравнение свойств BK<sub>Ca</sub>-каналов ПМ и mitoBK<sub>Ca</sub> в клетках глиомы человека (LN 229) показало, что проводимость первых составила 199 ± 8 pS, а вторых – 278 ± 10 pS. Хотя обе разновидности каналов потенциал- и Ca<sup>2+</sup>-зависимы, их чувствительность была разной [83]. В конфигурации “inside-out” BK<sub>Ca</sub>-каналы ПМ показали низкую чувствительность к потенциалу, что свидетельствует о незначительной степени их открытия (P<sub>o</sub>) даже при высоком напряжении тока (P<sub>o</sub> < 0.1 при +80 mV and ~0.4 при 100 mV) и аппликации 400 мкМ Ca<sup>2+</sup> с цитозольной стороны канала. В то время как

порог открытия (P<sub>o</sub>) mitoBK<sub>Ca</sub> в конфигурации “on-mitoplast” и с той же концентрацией Ca<sup>2+</sup> в среде достигала P<sub>o</sub> ~0.6 уже при отрицательном потенциале (–40 mV) [83]. В дальнейшем было показано, что клетки различных типов экспрессируют mitoBK<sub>Ca</sub> с различной потенциал- и Ca<sup>2+</sup>-чувствительностью.

Например, mitoBK<sub>Ca</sub>-каналы КМ морской свинки имели наиболее высокий P<sub>o</sub> ~ 0.9 при достаточно широком диапазоне входного напряжения (от –60 до +60 мВ) и концентрации Ca<sup>2+</sup> [Ca<sup>2+</sup>] 0.5 мкМ, из чего можно предположить, что их молекулярный состав (например, ассоциация со вспомогательными субъединицами) может существенно отличаться от аналогов, экспрессируемых в митохондриях глиомы, у которых при [Ca<sup>2+</sup>] 1 мкМ, P<sub>o</sub> составляет 0.5 при входящем напряжении + 41 мВ (потенциал полуактивации, V<sub>1/2</sub> = 41 мВ). Такая же изменчивость характерна и для BK<sub>Ca</sub>-каналов плазматической мембраны, причем внутри одного и того же типа клеток [84]. Очевидно, что для того, чтобы понять природу изменчивости и гетерогенности BK<sub>Ca</sub>-каналов, необходима их детальная биофизическая и молекулярная характеристика [80].

Интерес к mitoBK<sub>Ca</sub>-каналам, как уже отмечалось выше, преимущественно связан с открытием их защитной роли при ишемии и реперфузии [73]. Авторам удалось показать, что фармакологическое preconditionирование с применением соединения NS1619-активатора BK<sub>Ca</sub>-каналов, в концентрации 10–30 мкМ до начала реперфузии, приводило к улучшению диастолического наполнения левого желудочка и уменьшало зону инфаркта. Оба эффекта отменялись при использовании 1 мкМ паксиллина (paxilline) – селективного ингибитора BK<sub>Ca</sub>. В пользу точки зрения, подразумевающей, что активаторы BK<sub>Ca</sub>-каналов действуют именно на митохондриальные BK<sub>Ca</sub>-каналы КМ, могут служить следующие аргументы: 1) NS1619 не может взаимодействовать с BK<sub>Ca</sub> плазматической мембраны, так как известно, что зрелые кардиомиоциты не экспрессируют сарколеммальных BK<sub>Ca</sub> [82, 85]; 2) поглощение K<sup>+</sup> митохондриями ускоряется в присутствии NS1619 и замедляется в присутствии 100 нМ ибериотоксина – селективного блокатора BK<sub>Ca</sub>; 3) защитный эффект preconditionирования с NS1619 не связан с миорелаксацией гладкомышечных клеток сосудов, так как эффект миорелаксации, инициируемый активацией BK<sub>Ca</sub>, является частью природного ионного механизма регуляции тонуса сосудов при гипоксии. Дальнейшие исследования подтвердили высказанную точку зрения [80]. Более того, в ряде работ было доказано, что защитное действие preconditionирования, опосредованного активацией BK<sub>Ca</sub>-каналов, связано с их ролью в поддержании нормального



(физиологического) уровня АФК, препятствующего развитию окислительного стресса, и нарушению  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаза [82, 85]. Прямое измерение  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающей способности митохондрий КМ показало, что защитный эффект фармакологического преколонизирования, вызванный NS1619, отсутствовал у нокаутированных по *Kcnma1* мышцей [82]. В других экспериментах было показано, что применение ибериотоксина также приводило к снижению  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающей способности митохондрий [87]. Эти результаты подразумевают, что активация  $\text{VK}_{\text{Ca}}$ -каналов в определенной степени может защитить митохондрии от неконтролируемого открытия МРТ-пор при гипоксии [87]. Механизм сопряжения  $\text{VK}_{\text{Ca}}$ -каналов с неселективными  $\text{Ca}^{2+}$ -порами ВММ пока не совсем ясен, на митохондриях КМ такие исследования пока не проводились, но, как показали исследования, проведенные на митохондриях из клеток мозга (близких по интенсивности энергетического обмена и уровню потребления  $\text{O}_2$  к КМ), ингибирование  $\text{mitoVK}_{\text{Ca}}$  ибериотоксином снижало количество  $\text{Ca}^{2+}$ , необходимого для деполяризации митохондрий, и тем самым повышало степень открытия МРТ-пор [88]. При этом из митохондрий глиальных клеток увеличивался выход цитохрома *c* — маркера открытия МРТ-пор, и апоптоза [87]. Предполагается, что ключевым белком, приводящим к взаимодействию  $\text{mitoVK}_{\text{Ca}}$ -каналов и МРТ-пор является проапоптотический белок Вах (Bcl-2 associated protein X), который, непосредственно связываясь с  $\text{mitoVK}_{\text{Ca}}$ , и тем самым снижая их активность, инициирует открытие МРТ-пор [87].

Подводя итог вышесказанному, можно с уверенностью утверждать, что  $\text{mitoVK}_{\text{Ca}}$ -каналы играют важную роль в кардиопротекции и их, наряду с более изученными  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ -каналами, следует рассматривать в качестве перспективных молекулярных объектов кардиопротекции и тангетной терапии ишемической болезни сердца.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена с использованием средств государственного бюджета по госзаданию № АААА-А18-118012290142-9.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pohjoismäki J.L., Goffart S. The role of mitochondria in cardiac development and protection. *Free Radic. Biol. Med.* 106: 345–354. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.032>
2. Shemarova I.V., Nesterov V.P., Korotkov S.M., Sobol' K.V. Involvement of  $\text{Ca}^{2+}$  in the development of ischemic disorders of myocardial contractile function. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 53: 368–379. 2017. <https://doi.org/10.1134/S0022093017050027>
3. Han X., Xu J., Xu S., Sun Y., He M., Li X., Li X., Pi J., Yu R., Tian W. Role of mitochondrial permeability transition pore in mediating the inhibitory effect of gastrodin on oxidative stress in cardiac myocytes in vitro. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 38: 1306–1311. 2018. <https://doi.org/10.12122/j.issn.1673-4254.2018.11.05>
4. Purroy R., Britti E., Delaspre F., Tamarit J., Ros J. Mitochondrial pore opening and loss of  $\text{Ca}^{2+}$  exchanger NCLX levels occur after frataxin depletion. *Biochim. Biophys. Acta.* 1864: 618–631. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.12.005>
5. Wacquier B., Romero Campos H.E., González-Vélez V., Combettes L., Dupont G. Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics in cells and suspensions. *FEBS J.* 284: 4128–4142. 2017. <https://doi.org/10.1111/febs.14296>
6. Цыпенкова В.Г., Сутягин П.В., Суслов В.Б., Эттингер А.П. Особенности митохондриального аппарата кардиомиоцитов при различных заболеваниях сердца и в эксперименте. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.* 8 (2): 53–56. 2014. [Cyplenkova V.G., Sutyagin P.V., Suslov V.B., Ettinger A.P. Osobennosti mitoxondrial'nogo apparata kardiomiocitov pri razlichny'x zabolevaniyax serdca i v e'ksperimente. *Mezh dunarodny'j zhurnal prikladny'x i fundamental'ny'x issledovaniy.* 8(2): 53–56. 2014. (In Russ)].
7. Егорова М.В. Роль жирных кислот в адаптивных реакциях кардиомиоцитов при метаболической ишемии. Дисс. докт. наук. Томск. 2014, 205 с. [Egorova M.V. Rol' zhirny'x kislot v adaptivny'x reakciyax kardiomiocitov pri metabolicheskoy ishemii. *Diss. dokt. nauk.* Tomsk. 2014. (In Russ)].
8. Brown D.A., O'Rourke B. Cardiac mitochondria and arrhythmias. *Cardiovasc. Res.* 88: 241–249. 2010. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq231>
9. Лукьянова Л.Д. Дизрегуляция аэробного энергетического обмена — типовой патологический процесс. В кн.: *Дизрегуляционная патология.* М.: Медицина, С. 188–215. 2002. [Lukyanova L.D. Dizregulyaciya a'e'robnogo e'nergeticheskogo obmena — tipovoy patologicheskij process. V kn.: *Dizregulyacionnaya patologiya.* Moscow: Medicina. С. 188–215. 2002. (In Russ)].
10. Giordano F.J. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J. Clin. Invest.* 115:500–508. 2005. <https://doi.org/10.1172/JC1200524408>
11. Guimaraes C.A., Linden R. Programmed cell death: apoptosis and alternative deathstyles. *Eur. J. Biochem.* 217: 1638–1650. 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04084.x>
12. Saris N.E., Carafoli E. A historical review of cellular calcium handling, with emphasis on mitochondria. *Biochemistry.* 70: 187–194. 2005. <https://doi.org/10.1007/s10541-005-0100-9>
13. Лышманов Ю.Б., Нарыжная Н.В., Маслов Л.Н., Прокудина Е.С., Горбунов А.С., Цибульников С.Ю. Функциональное состояние миокардиальных митохондрий при ишемии-реперфузии сердца у крыс, адаптированных к гипоксии. *Бюлл. эксп. биол. и мед.* 15 (11): 589–592. 2013. [Lishmanov Yu.B., Naryzhnaya N.V., Maslov L.N., Prokudina E.S., Gorbunov A.S., Cibulnikov S.Yu. Funkcional'noe sostoyanie miokardial'nykh mitokhondrij pri ishemii-reperfuzii serdca u kryus, adaptiro-

- vannyux k gipoksii. *Byull. eksp. biol. i med.* 156 (11): 589–592. 2013. (In Russ).]
14. *Кирова Ю. И.* Регуляторная роль сукцинат-зависимых сигнальных систем (HIF-1 и GPR91) при адаптации к гипоксии. Автореф. докт. дисс. М., 2016. [*Kirova Yu. I.* Regulyatornaya rol' sukcinat-zavisimyx signal'nyux sistem (HIF-1 i GPR91) pri adaptacii k gipoksii. Avtoref. dokt. diss. Moscow, 2016. (In Russ)].
  15. *Komaromy-Hiller G., Sundquist P.D., Jacobsen L.J., Nuttall K.L.* Serum succinate by capillary zone electrophoresis: marker candidate for hypoxia. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 27: 163–168. 1997.
  16. *Лукьянова Л.Д.* Биоэнергетическая гипоксия: понятие, механизмы, коррекция. *Бюл. эксп. биол. и мед.* 124 (9): 244–254. 1997. [*Luk'yanova L.D.* Bioenergeticheskaya gipoksiya: ponyatie, mexanizmy', korrekciya. *Byull. e'ksp. biol. i med.* 124 (9): 244–254. 1997. (In Russ)].
  17. *Levrat C., Louisot P.* Study of the succinate dehydrogenase activation in permeabilized mitochondria through the Ca<sup>2+</sup>-stimulated phospholipase A2. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 34: 569–578. 1994.
  18. *Дудченко А.М., Лукьянова Л.Д.* Триггерная роль энергетического обмена в каскаде функционально-метаболических нарушений при гипоксии. Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологические и клинические аспекты. Москва: Исток, 2004. С. 51–83. [*Dudchenko A.M., Luk'yanova L.D.* Trigger-naya rol' e'nergeticheskogo obmena v kaskade funktsionalno-metabolicheskix narushenij pri gipoksii. *Problemy' gipoksii: molekulyarny'e, fiziologicheskie i klinicheskie aspekty'*. Moskva.: Istoki, 2004. S. 51–83. (In Russ).]
  19. *Кондрашова М.Н.* Трансаминазный цикл окисления субстратов в клетке как механизм адаптации к гипоксии. Фармакологическая коррекция гипоксических состояний. Москва: ВИНТИ, 1989. С. 51–66. [*Kondrashova M.N.* Transaminazny'j cikl okisleniya substratov v kletke kak mexanizm adaptacii k gipoksii. *Farmakologicheskaya korrekciya gipoksicheskix sostoyanij*. Moskva: VINITI, 1989. S. 51–66. (In Russ)].
  20. *Shemarova I.V., Nesterov V.I. P., Korotkov S.M., Sylkin Yu.A.* Evolutionary Aspects of Cardioprotection. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 54(1): 8–21. 2018. <https://doi.org/10.1134/S0022093018010027>
  21. *Гамалей И.А.* Роль активных форм кислорода в регуляции функций клетки. Дисс. докт. наук. Санкт-Петербург, 1999. 41 с. [*Gamalej I.A.* Rol' aktivny'x form kisloroda v regulyacii funkcij kletki. *Diss. dokt. nauk. Sankt-Peterburg*, 1999. 41 s. (In Russ)].
  22. *Dröge W.* Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82: 47–95. 2002. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>
  23. *Baines C.P.* How and when do myocytes die during ischemia and reperfusion: the late phase. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 16: 239–243. 2011. <https://doi.org/10.1177/1074248411407769>
  24. *Гребенчиков О.А., Лихванцев В.В., Плотников Е.Ю.* Молекулярные механизмы развития и адресная терапия синдромом ишемии-реперфузии. *Анест. и реаним.* 3: 59–67. 2014. [*Grebenchikov O.A., Lixvancev V.V., Plotnikov E.Yu.* Molekulyarnye mexanizmy razvitiya i adresnaya terapiya sindromom ishemii-reperfuzii. *Anest. i reanim.* 3: 59–67. 2014. (In Russ)].
  25. *Herrero A., Baria G.* Localization of the site of oxygen radical generation inside the mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* 32: 609–615. 2000.
  26. *Кулинский В.И., Колесниченко Л.С.* Обмен глутатиона. *Успехи биол. химии.* 31:157–179. 1990. [*Kulinskij V.I., Kolesnichenko L.S.* Obmen glutationa. *Uspexi biol. ximii.* 31:157–179. 1990. (In Russ)].
  27. *Pandolfo M.* Frataxin deficiency and mitochondrial dysfunction. *Mitochondrion* 2: 87–93. 2002. <https://doi.org/10.1023/A:1005626712319>
  28. *Владимиров Ю.А.* Свободные радикалы и антиоксиданты. *Вестник РАМН.* 7: 43–51. 1998. [*Vladimirov Yu.A.* Svobodnyue radikalyu i antioksidantyu. *Vestnik RAMN.* 7: 43–51. 1998. (In Russ)].
  29. *Надеев А.Д., Гончаров Н.В.* Активные формы кислорода в клетках сердечно-сосудистой системы. *Компл. пробл. серд.-сосудист. забол.* 4: 80–94. 2014. [*Nadeev A.D., Goncharov N.V.* Aktivny'e formy' kisloroda v kletkax serdechno-sosudistoj sistemy'. *Kompl. probl. serd.-sosudist. zabol.* 4: 80–94. 2014. (In Russ)].
  30. *Dhalla N.S., Temsah R.M., Netticadan T.* Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J. Hypertens.* 18: 655–673. 2000. <https://doi.org/10.1097/00004872-200018060-00002>
  31. *Malli R., Frieden M., Trenker M., Graier W.F.* The role of mitochondria for Ca<sup>2+</sup> refilling of the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 280: 12114–12122. 2005. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409353200>
  32. *Culic O., Gruwel M.L., Schrader J.* Energy turnover of vascular endothelial cell. *Am. J. Physiol.* 273: C205–C213. 1997. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1997.273.1.C205>
  33. *Pearlstein D.P., Ali M.H., Mungai P.T., Hynes K.L., Gewertz B.L., Schumacker P.T.* Role of mitochondrial oxidant generation in endothelial cell responses to hypoxia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22: 566–573. 2002. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000012262.76205.6A>
  34. *Paltauf-Doburzynska J., Malli R., Graier W.F.* Hyperglycemic conditions affect shape and Ca<sup>2+</sup> homeostasis of mitochondria in endothelial cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 44: 423–436. 2004. <https://doi.org/10.1097/01.fjc.0000139449.64337.1b>
  35. *Jornot L., Maechler P., Wollheim C.B., Junod A.F.* Reactive oxygen metabolites increase mitochondrial calcium in endothelial cells: implication of the Ca<sup>2+</sup>/Na<sup>+</sup> exchanger. *J. Cell Sci.* 112:1013–1022. 1999.
  36. *Hu Q., Ziegelstein R.C.* Hypoxia/reoxygenation stimulates intracellular calcium oscillations in human aortic endothelial cells. *Circulation.* 102(20):2541–2547. 2000. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.102.20.2541>
  37. *Camello-Almaraz C., Gomez-Pinilla P.J., Pozo M.J., Camello P.J.* Mitochondrial reactive oxygen species and Ca<sup>2+</sup> signaling. *Am. J. Physiol.* 291: 1082–1088. 2006. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00217.2006>
  38. *Ichimura H., Parthasarathi K., Quadri S., Issekutz A.C., Bhattacharya J.* Mechano-oxidative coupling by mitochondria induces proinflammatory responses in lung venular capillaries. *J. Clin. Invest.* 111: 691–699. 2003. <https://doi.org/10.1172/JCI17271>

39. *Hecquet C.M., Malik A.B.* Role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-activated TRPM2 calcium channel in oxidant-induced endothelial injury. *Thromb. Haemost.* 101: 619–625. 2009. <https://doi.org/10.1160/TH08-10-0641>
40. *Hu Q., Zheng G., Zweier J.L., Deshpande S., Irani K., Ziegelstein R.C.* NADPH oxidase activation increases the sensitivity of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores to inositol 1,4,5-trisphosphate in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 275: 15749–15757. 2000. <https://doi.org/10.1074/jbc.M000381200>
41. *Poteser M., Graziani A., Rosker C., Eder P., Derler I., Kahr H., Zhu M.X., Romanin C., Groschner K.* TRPC3 and TRPC4 associate to form a redox-sensitive cation channel. Evidence for expression of native TRPC3-TRPC4 heteromeric channels in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 281: 13588–13595. 2006. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512205200>
42. *Stoyanovsky D., Murphy T., Anno P.R., Kim Y.M., Salama G.* Nitric oxide activates skeletal and cardiac ryanodine receptors. *Cell Calcium.* 21: 19–29. 1997. [https://doi.org/10.1016/S0143-4160\(97\)90093-2](https://doi.org/10.1016/S0143-4160(97)90093-2)
43. *Sun L., Yau H.Y., Wong W.Y., Li R.A., Huang Y., Yao X.* Role of TRPM2 in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell apoptosis in endothelial cells. *PLoS One.* 7: 43186. 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043186>
44. *Strom J., Xu B., Tian X., Chen Q. M.* Nrf2 protects mitochondrial decay by oxidative stress. *FASEB J.* 30: 66–80. 2016. <https://doi.org/10.1096/fj.14-268904>
45. *Narasimhan M., Rajasekaran N.S.* Exercise Nrf2 and antioxidant signaling in cardiac aging. *Front Physiol.* 7: 241. 2016. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00241>
46. *Lee J.M., Calkins M.J., Chan K., Kan Y.W., Johnson J.A.* Identification of the NF-E2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis. *J. Biol. Chem.* 278:12029–12038. 2003. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211558200>
47. *Nguyen T., Nioi P., Pickett C.B.* The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 284: 13291–13295. 2009. <https://doi.org/10.1074/jbc.R900010200>
48. *Li W., Kong A.N.* Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response. *Mol. Carcinog.* 48: 91–104. 2009. <https://doi.org/10.1002/mc.20465>
49. *Ma Q.* Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 53: 401–426. 2013. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320>
50. *Kensler T.W., Wakabayashi N., Biswal S.* Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47: 89–116. 2007. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141046>
51. *Piantadosi C.A., Carraway M.S., Babiker A., Suliman H.B.* Heme oxygenase-1 regulates cardiac mitochondrial biogenesis via Nrf2-mediated transcriptional control of nuclear respiratory factor-1. *Circ. Res.* 103: 1232–1240. 2008. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000338597.71702.ad>
52. *Suliman H.B., Carraway M.S., Tatro L.G., Piantadosi C.A.* A new activating role for CO in cardiac mitochondrial biogenesis. *J. Cell Sci.* 120: 299–308. 2007. <https://doi.org/10.1242/jcs.03318>
53. *Dominic E.A., Ramezani A., Anker S.D., Verma M., Mehta N., Rao M.* Mitochondrial cytopathies and cardiovascular disease. *Heart.* 100: 611–618. 2014. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2013-304657>
54. *Muthusamy V.R., Kannan S., Sadhaasivam K., Gounder S.S., Davidson C.J., Boehme C., Hoidal J.R., Wang L., Rajasekaran N.S.* Acute exercise stress activates Nrf2/ARE signaling and promotes antioxidant mechanisms in the myocardium. *Free Radic. Biol. Med.* 52: 366–376. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.10.440>
55. *Erkens R., Kramer C.M., Lückstädt W., Panknin C., Krause L., Weidenbach M., Dirzka J., Krenz T., Mergia E., Suvorava T., Kelm M., Cortese-Krott M.M.* Left ventricular diastolic dysfunction in Nrf2 knock out mice is associated with cardiac hypertrophy, decreased expression of SERCA2a, and preserved endothelial function. *Free Radic. Biol. Med.* 89: 906–917. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.10.409>
56. *Ying Z., Chen M., Xie X., Wang X., Kherada N., Desikan R., Mihai G., Burns P., Sun Q., Rajagopalan S.* Lipoicmethylenedioxyphenol reduces experimental atherosclerosis through activation of Nrf2 signaling. *PLoS One.* 11: e0148305. 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148305>
57. *Dickinson S.E., Lin Y., Dedek M., Morrissy S., Johnson J., Chen Q.M.* Induction of antioxidant and detoxification response by oxidants in cardiomyocytes: evidence from gene expression profiling and activation of Nrf2 transcription factor. *J. Mol. Cell Cardiol.* 42: 159–176. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2006.09.012>
58. *Wang W., Li S., Wang H., Li B., Shao L., Lai Y., Horvath G., Wang Q., Yamamoto M., Janicki J.S., Wang X.L., Tang D., Cui T.* Nrf2 enhances myocardial clearance of toxic ubiquitinated proteins. *J. Mol. Cell Cardiol.* 72: 305–315. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.04.006>
59. *Коршунова А.Ю.* Патогенетические особенности клеточной гибели при альтерации миокарда различного генеза. Дисс. канд. наук, Москва, 141 с. 2016. [*Korshunova A.Yu.* Patogeneticheskie osobennosti kletchoj gibeli pri al'teracii miokarda razlichnogo geneza. Diss. kand. nauk. Moskva, 141 s. 2016. (In Russ)].
60. *Xing Y., Niu T., Wang W., Li J., Li S., Janicki J.S., Ruiz S., Meyer C.J., Wang X.L., Tang D., Zhao Y., Cui T.* Triterpenoid dihydro-CDDO-trifluoroethyl amide protects against maladaptive cardiac remodeling and dysfunction in mice: a critical role of Nrf2. *PLoS One.* 7. 9: 1–8. 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044899>
61. *Suzuki T., Shibata T., Takaya K., Shiraishi K., Kohno T., Kunitoh H., Tsuta K., Furuta K., Goto K., Hosoda F., Sakamoto H., Motohashi H., Yamamoto M.* Regulatory nexus of synthesis and degradation deciphers cellular Nrf2 expression levels. *Mol. Cell Biol.* 33. 2402–2412.

2013.  
<https://doi.org/10.1128/MCB.00065-13>
62. Морозова К.В. Полиморфизм генов ферментов детоксикации, антиоксидантной защиты и репарации ДНК в генезе невынашивания беременности. Автореф. канд. дисс. Москва, 2014 [Morozova K.V. Polimorfizm genov fermentov detoksikacii, antioksidantnoj zashhity i reparacii DNK v geneze nevy'nashivaniya beremennosti. Avtoref. kand. diss. Moskva, 2014. (In Russ)].
63. Demeulder B., Zarrinpashneh E., Ginion A., Viollet B., Hue L., Rider M.H., Vanoverschelde J.L., Beauloye C., Horman S., Bertrand L. Differential regulation of eEF2 and p70S6K by AMPKalpha2 in heart. *Biochim. Biophys. Acta.* 1832: 780–790. 2013.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.02.015>
64. Sciarretta S., Yee D., Ammann P., Nagarajan N., Volpe M., Frati G., Sadoshima J. Role of NADPH oxidase in the regulation of autophagy in cardiomyocytes. *Clin Sci (Lond).* 128: 387–403. 2015.  
<https://doi.org/10.1042/CS20140336>
65. Garlid K.D., Dos Santos P., Xie Z.J., Costa A.D., Paucek P. Mitochondrial potassium transport: the role of the mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in cardiac function and cardioprotection. *Biochim. Biophys. Acta.* 1606: 1–21. 2003.  
[https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(03\)00109-9](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(03)00109-9)
66. Mitchell P., Moyle J. Translocation of some anions cations and acids in rat liver mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 9: 149–155. 1969.  
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1969.tb00588.x>
67. Chaves E., Yung D., Brierley G. Energy-dependent exchange of K<sup>+</sup> in heart mitochondria, K<sup>+</sup> efflux. *Arch. Biochem. Biophys.* 183: 460–470. 1977.  
[https://doi.org/10.1016/0003-9861\(77\)90381-2](https://doi.org/10.1016/0003-9861(77)90381-2)
68. Diwan J.J., Haley T., Sanadi D.R. Reconstitution of K<sup>+</sup> transport with 53 kDa mitochondrial protein. *Biochem Biophys Res Commun.*, 153: 224–230. 1988.  
[https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(88\)81212-9](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(88)81212-9)
69. Murry C.E., Jennings R.B., Reimer K.A. Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 74: 1124–1136. 1986.  
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.74.5.1124>
70. Santillo E., Migale M., Postacchini D., Balestrini F., Incalzi R.A. Cardioprotection by conditioning mimetic drugs. *Antiinflamm. Antiallergy Agents Med. Chem.* 15: 15–30. 2016.  
<https://doi.org/10.2174/1871523015666160719155122>
71. Лихванцев В.В., Мороз В.В., Гребенчиков О.А., Гороховатский Ю.И., Заржецкий Ю.В., Тимошин С.С., Левиков Д.И., Шайбакова В.Л. Ишемическое и фармакологическое preconditionирование. *Общая реаниматология.* 7 (6): 59–65. 2011. [Lixvancev V.V., Moroz V.V., Grebenchikov O.A., Goroxovatskij Yu.I., Zarzheckij Yu.V., Timoshin S.S., Levikov D.I., Shajbakova V.L. Ishemicheskoe i farmakologicheskoe preconditionirovanie. *Obshhaya reanimatologiya.* 7 (6): 59–65. 2011. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.15360/1813-9779-2011-6-59>
72. Downey J.M., Davis A.M., Cohen M.V. Signaling pathways in ischemic preconditioning. *Heart Fail. Rev.* 12: 181–188. 2007.  
<https://doi.org/10.1007/s10741-007-9025-2>
73. Xu W., Liu Y., Wang S., McDonald T., Van Eyk J.E., Sidor A., O'Rourke B. Cytoprotective role of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in the cardiac inner mitochondrial membrane. *Science.* 298: 1029–1033. 2002.  
<https://doi.org/10.1126/science.1074360>
74. Contreras G.F., Castillo K., Enrique N., Carrasquel-Ursulaez W., Castillo J.P., Milesi V., Neely A., Alvarez O., Ferreira G., González C., Latorre R. ABK(Slo1)channel journey from molecule to physiology. *Channels (Austin.)* 7: 442–458. 2013.  
<https://doi.org/10.4161/chan.26242>
75. Gao Y.D., Garcia M.L. Interaction of agitoxin2, charybdoxin, and iberitoxin with potassium channels: selectivity between voltage-gated and maxi-K<sup>+</sup> channels. *Proteins.* 52: 146–154. 2003.  
<https://doi.org/10.1002/prot.10341>
76. Banerjee A., Lee A., Campbell E., MacKinnon R. Structure of apore-blocking toxin in complex with a eukaryotic voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Elife.* 2:e00594. 2013.  
<https://doi.org/10.7554/eLife.00594>
77. Schreiber M., Salkoff L. A novel calcium-sensing domain in the BK-channel. *Biophys. J.* 73: 1355–1363. 1997.  
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78168-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78168-2)
78. Xia X.M., Zeng X., Lingle C.J. Multiple regulatory sites in large-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature.* 418: 880–884. 2002.  
<https://doi.org/10.1038/nature00956>
79. Yang H., Shi J., Zhang G., Yang J., Delaloye K., Cui J. Activation of Slo1BK-channels by Mg<sup>2+</sup> coordinated between the voltage sensor and RCK1 domains. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15: 1152–1159. 2008.  
<https://doi.org/10.1038/nsmb.1507>
80. Balderas E., Zhang J., Stefani E., Toro L. Mitochondrial BKCa channel. *Front. Physiol.* 6: 104. 2015.  
<https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00104>
81. Siemen D., Loupatatzis C., Borecky J., Gulbins E., Lang F. Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel of the BK-type in the inner mitochondrial membrane of a human glioma cell line. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 257: 549–554. 1999.  
<https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0496>
82. Singh H., Lu R., Bopassa J.C., Meredith A.L., Stefani E., Toro L. mitoBK Ca is encoded by the Kcnma1 gene, and a splicing sequence defines its mitochondrial location. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110: 10836–10841. 2013.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1302028110>
83. Gu X.Q., Pamerter M.E., Siemen D., Sun X., Haddad G.G. Mitochondrial but not plasmalemmal BK channels are hypoxia-sensitive in human glioma. *Glia.* 62: 504–513. 2014.  
<https://doi.org/10.1002/glia.22620>
84. Tanaka Y., Meera P., Song M., Knaus H.-G., Toro L. Molecular constituents of maxiKCa channels in human coronary smooth muscle: predominant alpha + beta subunit complexes. *J. Physiol.* 502: 545–557. 1997.  
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1997.545bj.x>

85. Schmitt N., Grunnet M., Olesen S.P. Cardiac potassium channel subtypes: new roles in repolarization and arrhythmia. *Physiol. Rev.* 94: 609–653. 2014. <https://doi.org/10.1152/physrev.00022.2013>
86. Kulawiak B., Kudin A.P., Szewczyk A., Kunz W.S. BK-channel openers inhibit ROS production of isolated rat brain mitochondria. *Exp. Neurol.* 212:543–547. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2008.05.004>
87. Cheng Y., Gulbins E., Siemen D. Activation of the permeability transition pore by Bax via inhibition of the mitochondrial BK-channel. *Cell. Physiol. Biochem.* 27: 191–200. 2011. <https://doi.org/10.1159/000327944>
88. Cheng Y., Gu X.Q., Bednarczyk P., Wiedemann F.R., Haddad G.G., Siemen D. Hypoxia increases activity of the BK-channel in the inner mitochondrial membrane and reduces activity of the permeability transition pore. *Cell. Physiol. Biochem.* 22: 127–136. 2008. <https://doi.org/10.1159/000149790>

## Ca<sup>2+</sup>-DEPENDENT MITOCHONDRIAL MECHANISMS OF CARDIOPROTECTION

I. V. Shemarova<sup>a,#</sup>, S. M. Korotkov<sup>a</sup>, and V. P. Nesterov<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

<sup>#</sup> *e-mail: irina-shemarova@yandex.ru*

The review addresses the Ca<sup>2+</sup>-dependent mitochondrial mechanisms of adaptation of cardiomyocytes to hypoxia and ischemia and analyzes signaling mechanisms responsible for expression of “antioxidant” genes and the formation of tolerance to hypoxia and ischemia. A special attention is paid to the analysis of the role of the transcription factor Nrf2, as well as reactive oxygen species and large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels (BK<sub>Ca</sub>-channels), in the regulation of adaptive responses of cardiomyocytes in myocardial ischemia.

*Keywords:* reactive oxygen species, hypoxia, ischemia, cardioprotection, preconditioning, BK<sub>Ca</sub>-channels, Nrf2