

Трегуб П.П.^{1,2}, Куликов В.П.^{1,2}, Степанова Л.А.¹, Забродина А.С.¹, Нагибаева М.Е.¹

Роль аденозиновых А1-рецепторов и митохондриальных K^+ АТФ-каналов в механизме увеличения резистентности к острой гипоксии при сочетанном воздействии гипоксии и гиперкапнии

¹ — Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России, 656038, Алтайский край, Барнаул, пр. Ленина, 40

² — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, 630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 4

Изучали роль мито K^+ АТФ-каналов и А1-рецепторов к аденозину в механизме увеличения резистентности к острой гипоксии после гипоксического, гиперкапнического и гиперкапнически-гипоксического прекондиционирования. Показано, что митохондриальные АТФ-зависимые калиевые каналы и А1-рецепторы к аденозину, являющиеся важнейшими механизмами прекондиционирования, имеют высокое значение в увеличении резистентности к острой гипоксии/ишемии при сочетанном воздействии гипоксии и гиперкапнии. Однако, в отношении аденозиновых рецепторов, этот механизм реализуется без участия гиперкапнического компонента, который, по всей видимости, запускает нейропротекцию без активации аденозиновых А1-рецепторов.

Ключевые слова: гипоксия, гиперкапния, гиперкапническая гипоксия, резистентность, калиевые каналы, аденозиновые рецепторы

Tregub P.P.^{1,2}, Kulikov V.P.^{1,2}, Stepanova L.A.¹, Zabrodina A.S.¹, Nagibaeva M.E.¹

The role of adenosine A1 receptors and mitochondrial K^+ АТФ channels in the mechanism of increasing the resistance to acute hypoxia in the combined effects of hypoxia and hypercapnia

¹ — Altay state Medical University / Barnaul, Lenin st., 40

² — Scientific-Research Institute of Physiology and Fundamental Medicine / 630117, Novosibirsk, Timakov st., 4

We studied the role of the role of mito K^+ АТФ channels and А1-adenosine receptor in the mechanism of increasing the resistance to acute hypoxia after hypoxic, hypercapnic and hypercapnic-hypoxic preconditioning. It is shown that mitochondrial АТФ-sensitive potassium channels and А1-adenosine receptors, an important mechanism of preconditioning have a high value to increase the resistance to acute hypoxia / ischemia in the combined effect of hypoxia and hypercapnia. However, with regard to the adenosine receptor, this mechanism is realized without the participation hypercapnic component, which apparently starts neuroprotection without activation of the adenosine А1 receptors.

Key words: hypoxia, hypercapnia hypercapnic hypoxia, resistance, potassium channels, adenosine receptors.

Известно, что гипоксические воздействия являются эффективным средством увеличения резистентности органов и тканей к дефициту кислорода [1, 2, 3]. Ранее в нашей лаборатории было показано, что эффективность сочетания гипоксии с гиперкапнией для увеличения толерантности к острой гипоксии/ишемии значительно выше, чем при их изолированном воздействии [4]. При этом протекторная эффективность изолированной гиперкапнии существен-

но превышает эффективность гипоксического воздействия, что свидетельствует о доминирующем влиянии гиперкапнии при их сочетании. Также, было обнаружено, что значительную роль в потенцировании гиперкапнией нейропротекторного эффекта гипоксии играет нейротрофический белок S-100 β , фактор роста эндотелия сосудов VEGF и белок теплового шока HSP-70 [5]. Однако основные механизмы эффективности сочетанного воздействия гипоксии и гиперкапнии остаются малоизученными. Одними из наиболее вероятных механизмов увеличения резистентности к гипоксии/ишемии под влиянием гиперкапнически-гипоксического воздействия

Для корреспонденции: Трегуб Павел Павлович, аспирант каф. патофизиологии, ультразвуковой и функциональной диагностики ГБОУ ВПО «Алтайского государственного медицинского университета» Минздрава России.

может быть активация митохондриальных АТФ-зависимых калиевых каналов (миток⁺_{АТФ}-каналы) [6, 7] и А1-рецепторов к аденозину [8, 9, 10], являющихся важнейшими звеньями в феномене гипоксического прекодиционирования [11].

Цель исследования — оценка роли миток⁺_{АТФ}-каналов и А1-рецепторов к аденозину в механизме потенцирования гиперкапнией протекторного эффекта гипоксии.

Методика

Исследование проведено на 390 белых мышах-самцах линии С57BL/6, средней массой 36 ± 3 г. Животные были рандомизированы с использованием программы SPSS 11.5 и разделены на 2 равные серии:

1-я — для изучения роли миток⁺_{АТФ}-каналов (механизм 1);

2-я — для изучения роли аденозиновых А1-рецепторов (механизм 2).

Каждая серия включала 13 групп мышей по 15 животных в каждой: группа 1 (5-ND и DPCPX) — животные, получавшие блокатор; группа 2 (Diaz и 2-CADO) — животные, получавшие активатор; группа 3 (DMSO) — животные, получавшие растворитель препаратов диметилсульфоксид; группа контроля — интактная группа, получавшая инъекции физиологического раствора; группы животных, подвергавшихся воздействию нормобарической гипоксии (НГ) (O_2 — 13%, CO_2 — 0%; остальное — N_2), пермиссивной гиперкапнии (ПГ) (O_2 — 21%, CO_2 — 7%; остальное — N_2) или гиперкапнической гипоксии (ГГ) (O_2 — 13%, CO_2 — 7%; остальное — N_2), сочетанную с применением блокатора или активатора, либо без них;

В качестве блокатора миток⁺_{АТФ}-каналов использовали 1,2% раствор 5-гидроксидеканоата (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) в дозировке 40 мг/кг (растворитель — 0,9% NaCl), а блокатора аденозиновых А1-рецепторов — 0,1% раствор 1,3-дипропил-8-фенилксантина (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) в дозировке 4,5 мг/кг (растворитель — DMSO).

В качестве активатора миток⁺_{АТФ}-каналов использовали 0,3% раствор диазоксида (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) в дозировке 10 мг/кг (растворитель — DMSO), а активатора аденозиновых А1-рецепторов — 0,1% раствор 2-хлораденозина (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) в дозировке 4 мг/кг (растворитель — DMSO). Инъекции препаратов производились внутривенно.

Животных всех опытных групп через 15 мин после введения препарата подвергали процедуре респираторного прекодиционирования в течение 30 мин

в специальной проточной камере по методике, описанной ранее [4]. Прекодиционирование проводили через 30 мин после введения активатора или блокатора миток⁺_{АТФ}-каналов и через 15 мин после введения активатора или блокатора А1-рецепторов к аденозину. Контрольные и опытные животные помещались в камеру при аналогичных условиях, но вместо газовой смеси, компрессором туда нагнетался атмосферный воздух.

Через 24 ч после процедуры прекодиционирования у всех животных оценивали резистентность к острой нормобарической гипоксии (ОНБГ) по методике Zhang et al. [13]. Для оценки резистентности использовался параметр «время жизни в условиях гипоксии» (ВЖУГ), который включал период от момента установления и поддержания концентрации O_2 ~5% до наступления второго агонального вдоха.

Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью программного пакета Statistics for Windows v11.0. Значимость различий измеряемых параметров оценивали с помощью непараметрического критерия Манна—Уитни для независимых выборок.

Результаты и обсуждение

Известно, что появление агонального дыхания при воздействии острой нормобарической гипоксии свидетельствует о тяжелых нарушениях функций дыхательного центра и истощении компенсаторных возможностей организма [14]. Поэтому, параметр ВЖУГ свидетельствует о максимальной устойчивости организма к тяжелой гипоксии.

В 1-й серии при исследовании роли миток⁺_{АТФ} в механизме потенцирования гиперкапнией протекторного эффекта гипоксии получены следующие результаты (рис. 1): в группе мышей, тренированных ГГ, значимо повысилась толерантность к ОНБГ, при этом, блокатор каналов у группы с аналогичным воздействием снижал эффект до контрольных значений. Активатор каналов при сочетании с ГГ показал наибольшее увеличение параметра ВЖУГ, однако значимых различий с группой изолированного воздействия ГГ не было выявлено. Активатор калиевых каналов повышал толерантность к ОНБГ, но при сочетании с НГ и ПГ не оказывал влияния на резистентность мышей. Это может быть обусловлено невысокой активностью препарата в используемой дозировке, однократности введения и низкой интенсивностью тренировочного воздействия. При введении животным блокатора каналов ни в одной из групп не зафиксировано повышения ВЖУГ.

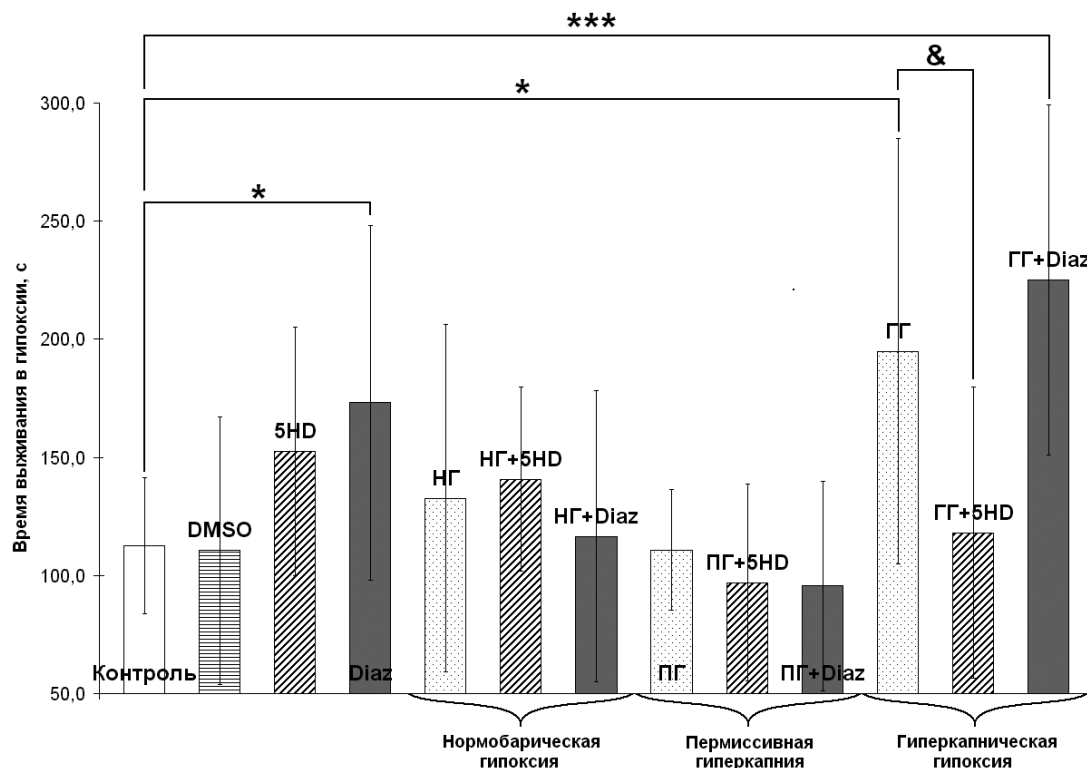


Рис. 1. Результаты 1-й серии исследования по изучению роли митоK⁺_{ATФ}-каналов. Данные представлены в виде среднего значения (M) ± стандартное отклонение (SD). 5-HD – 5-гидроксидеканат; Diaz – диазоксид; DMSO – диметилсульфоксид; НГ – нормобарическая гипоксия; ПГ – перmissive гиперкапния; ГГ – гиперкапническая гипоксия; * – отличия с группами контроля и DMSO (p<0,05); *** – отличия с группами контроля и DMSO (p<0,001); & – отличия с группой ГГ (p<0,05).

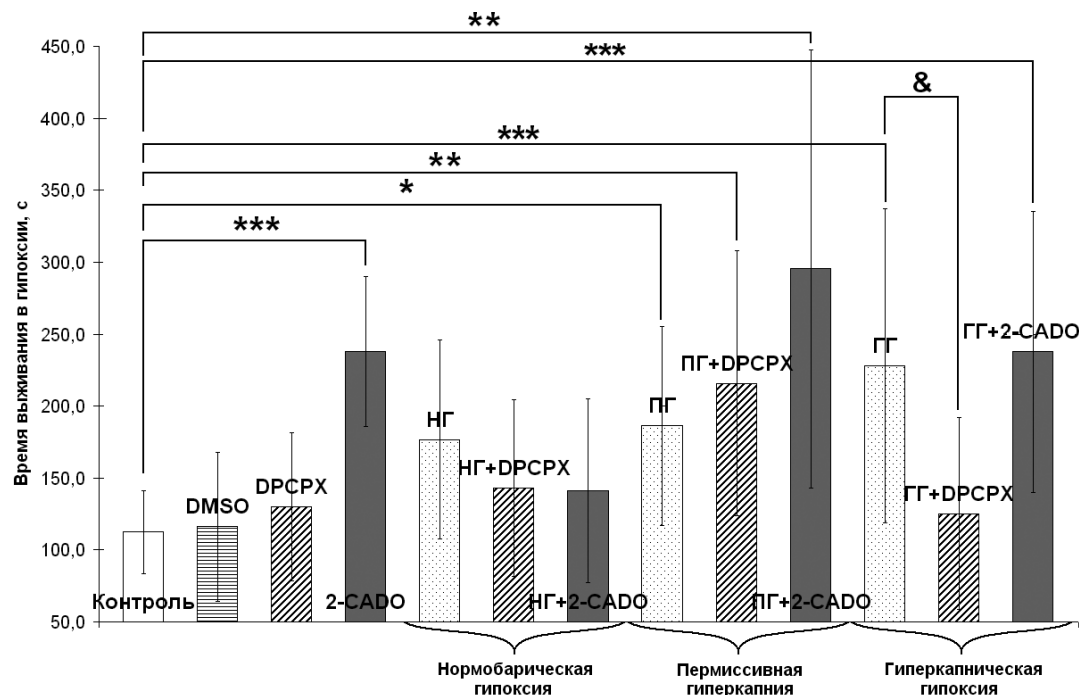


Рис. 2. Результаты 2-й серии исследования по изучению роли A1-аденозиновых рецепторов. Данные представлены в виде среднего значения (M) ± стандартное отклонение (SD). DPCPX – 1,3-дипропил-8-фенилксантин, 2-CADO – 2-хлораденозин, DMSO – диметилсульфоксид, 5-HD – 5-гидроксидеканат, Diaz – диазоксид. * – отличия с группой контроля и DMSO (p<0,05); ** – отличия с группой контроля и DMSO (p<0,01); *** – отличия с группой контроля и DMSO (p<0,001); & – отличия с группой ГГ (p<0,05).

Во 2-й серии при изучении роли аденозиновых А1-рецепторов, получены следующие результаты (рис. 2): у группы животных, подвергнутых воздействию ГГ, толерантность к ОНбГ увеличивалась, при этом, блокатор в сочетании с ГГ нивелировал положительный эффект, а активатор значимо не влиял на эффективность сочетанного воздействия гиперкапнии и гипоксии. В группе НГ не наблюдалось увеличения толерантности к ОНбГ, а сочетание с введением блокатора или активатора не влияло на резистентность животных к гипоксии. В группе, получавшей гиперкапническое воздействие, наблюдалось повышение резистентности к ОНбГ по сравнению с контролем, однако, введение блокатора не устраняло этот эффект, а применение активатора стимулировало прирост ВЖУГ, аналогично сочетанному воздействию гиперкапнии с гипоксией.

Таким образом, показана роль митохондриальных K^+ АТФ-каналов и А1-рецепторов к аденозину в механизмах увеличения резистентности к острой гипоксии после гипоксического, гиперкапнического и гиперкапнически-гипоксического прекондиционирования.

Считается, что защитный эффект прекондиционирования является трехступенчатым и включает в себя последовательные триггерные и эффекторные механизмы [15, 16]. В целом, феномен прекондиционирования определяют три ключевые составляющие: аденозин как основной триггер процесса, протеинкиназа С как ведущий внутриклеточный мессенджер и АТФ-зависимые калиевые каналы как конечный эффекторный белок [17]. Влияние на эти составляющие тем или иным способом может либо угнетать, либо стимулировать прекондиционирование.

Митохондриальные АТФ-зависимые калиевые каналы осуществляют вход калия в митохондрии по электрохимическому потенциалу и имеют большое значение в нормальной физиологии клеток, регулируя объем митохондрий и продукцию активных форм кислорода [12]. Многие авторы сходятся во мнении, что активация митохондриальных K^+ АТФ-каналов играет важную роль в механизме гипоксического и ишемического прекондиционирования, благодаря стабилизации митохондриальных мембран, снижению метаболизма клетки и ингибированию апоптоза [7, 8, 9, 18].

В 1999 г. Li и Roth установили, что для стимуляции прекондиционирования необходима активация аденозиновых А1-рецепторов, а использование их антагониста блокирует формирование ишемической толерантности [10]. При этом аденозиновый путь в механизме прекондиционирования является самым коротким и реже повреждается, что позволяет считать его одним из базисных механизмов в формировании толерантности к ишемии/гипоксии [9, 19, 20].

Таким образом, проведенное исследование позволяет сделать заключение о том, что митохондриальные

АТФ-зависимые калиевые каналы и А1-рецепторы к аденозину, являющиеся важнейшими механизмами прекондиционирования, имеют высокое значение в увеличении резистентности к острой гипоксии/ишемии при сочетанном воздействии гипоксии и гиперкапнии. Однако в отношении аденозиновых рецепторов этот механизм реализуется без участия гиперкапнического компонента, который, по всей видимости, запускает нейропротекцию без активации аденозиновых А1-рецепторов.

Список литературы

1. Прерывистая нормобарическая гипокситерапия. Под редакцией Агаджаняна Н.А., Стрелкова Р.Б., Чижова А.Я.: М.: Медицина; 1997.
2. Лукьянова Л.Д., Германова Э.Л., Копаладзе Р.А. Закономерности формирования резистентности организма при разных режимах гипоксического прекондиционирования: роль гипоксического периода и реоксигенации. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2009; 147(4): 380-4.
3. Shatilo V.B., Korkushko O.V., Ischuk V.A. et al. Effects of intermittent hypoxia training on exercise performance, hemodynamics, and ventilation in healthy senior men. *High Alt. Med. Biol.* 2008; 9: 43-52.
4. Куликов В.П., Трегуб П.П., Беспалов А.Г., Введенский А.Ю. Сравнительная эффективность гипоксии, гиперкапнии и гиперкапнической гипоксии в увеличении резистентности организма к острой гипоксии в эксперименте. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2013; 3: 59-62.
5. Беспалов А.Г., Трегуб П.П., Куликов В.П. и др. Роль VEGF, HSP-70 и белка S-100B в механизмах потенцирования гиперкапнией нейропротекторного эффекта гипоксии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2014; 2: 45-57.
6. Lindauer U., Vogt J., Schuh-Hofer S. et al. Cerebrovascular vasodilation to extraluminal acidosis occurs via combined activation of ATP-sensitive and Ca^{2+} -activated potassium channels. *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* 2003; 10: 1227-38.
7. Murphy E. Primary and secondary signaling pathways in early preconditioning that converge on the mitochondria to produce cardioprotection. *Circulation Research*. 2004; 94: 7-16.
8. Blondeau N., Plamondon H., Richelme C. et al. KATP channel openers, adenosine agonists and epileptic preconditioning are stress signals inducing hippocampal neuroprotection. *Neuroscience*. 2000; 100: 465-74.
9. Heurteaux C., Lauritzen I., Widmann C., Lazdunski M. Essential role of adenosine, adenosine A1 receptors, ATP-sensitive K^+ channels in cerebral ischemic preconditioning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995; 92: 4666-70.
10. Li B., Roth S. Retinal ischemic preconditioning in the rat: requirement for adenosine and repetitive induction. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1999; 6: 1200-16.
11. Obrenovitch T.P. Molecular Physiology of Preconditioning-Induced Brain Tolerance to Ischemia. *Physiol. Rev.* 2008; 88(1): 211-47.
12. Inagaki N., Gonoi T., Clement J.P., et al. A family of sulfonylurea receptor determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K^+ channels. *Neuron*. 1996; 5: 1011-7.
13. Zhang S.X., Miller J.J., Gozal D., Wang Y. Whole-body hypoxic preconditioning protects mice against acute hypoxia by improving lung function. *J. Appl. Physiol.* 2004; 96:392-7.

14. St. John W.M. Medullary regions for neurogenesis of gasping: noeud vital or noeuds vitals. *J. Appl. Physiol.* 1996; 81: 1865-77.

15. Петрищев Н.Н. Сравнительная оценка эффективности локальной и дистантной ишемической адаптации миокарда у крыс. *Кардиология.* 2001; 41(10): 53-6.

16. Yellon D.M., Downey J.M. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev.* 2003; 83: 1113-51.

17. Liu Y., Sato T., O'Rourke B, Marban E. Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection? *Circulation.* 1998; 97: 2463-9.

18. Garlid K.D., Paucek P., Yarov-Yarovoy V. et al. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circ. Res.* 1997; 81: 1072-82.

19. Елисеев В.В., Полтавченко Г.М. Роль аденозина в регуляции физиологических функций организма: СПб: Наука; 2011.

20. Петрищев Н.Н., Шляхто Е.В., Галагудза М.М. Новые способы защиты миокарда от ишемического и реперфузионного повреждения: молекулярные механизмы и перспективы клинического применения. *Кардиология.* 2007; 5: 179-84.

References

1. Intermittent normobaric hypoxic. Edited by Agadzhanjan N.A., Strelkov R. B., Chizhov A. Ja.: Moscow: Medicine; 1997. (in Russian)

2. Luk'janova L.D., Germanova Je.L., Kopaladze R.A. Laws of formation of resistance of the organism under different conditions of hypoxic preconditioning: the role of the hypoxic period and reoxygenation. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2009; 147(4): 380-4. (in Russian)

3. Shatilo V.B., Korkushko O.V., Ischuk V.A. et al. Effects of intermittent hypoxia training on exercise performance, hemodynamics, and ventilation in healthy senior men. *High Alt. Med. Biol.* 2008; 9: 43-52.

4. Kulikov V.P., Tregub P.P., Bepalov A.G., Vvedenskii A.J. Comparative efficacy of hypoxia, hypercapnia, hypoxia and hypercapnia in increasing the body's resistance to acute hypoxia in the experiment. *Patologicheskaja fiziologija i jeksperimental'naja terapija.* 2013; 3: 59-62. (in Russian)

5. Bepalov A.G., Tregub P.P., Kulikov V.P. et al. The role of VEGF, HSP-70 and protein S-100B potentiating mechanisms neuroprotective effect of hypoxia hypercapnia. *Patologicheskaja fiziologija i jeksperimental'naja terapija.* 2014; 2: 45-57. (in Russian)

6. Lindauer U., Vogt J., Schuh-Hofer S. et al. Cerebrovascular vasodilation to extraluminal acidosis occurs via combined

activation of ATP-sensitive and Ca²⁺-activated potassium channels. *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* 2003; 10: 1227-38.

7. Murphy E. Primary and secondary signaling pathways in early preconditioning that converge on the mitochondria to produce cardioprotection. *Circulation Research.* 2004; 94: 7-16.

8. Blondeau N., Plamondon H., Richelme C. et al. KATP channel openers, adenosine agonists and epileptic preconditioning are stress signals inducing hippocampal neuroprotection. *Neuroscience.* 2000; 100: 465-74.

9. Heurteaux C., Lauritzen I., Widmann C., Lazdunski M. Essential role of adenosine, adenosine A1 receptors, ATP-sensitive K⁺ channels in cerebral ischemic preconditioning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995; 92: 4666-70.

10. Li B., Roth S. Retinal ischemic preconditioning in the rat: requirement for adenosine and repetitive induction. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1999; 6: 1200-16.

11. Obrenovitch T.P. Molecular Physiology of Preconditioning-Induced Brain Tolerance to Ischemia. *Physiol. Rev.* 2008; 88(1): 211-47.

12. Inagaki N., Gono T., Clement J.P., et al. A family of sulfonylurea receptor determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K⁺ channels. *Neuron.* 1996; 5: 1011-7.

13. Zhang S.X., Miller J.J., Gozal D., Wang Y. Whole-body hypoxic preconditioning protects mice against acute hypoxia by improving lung function. *J. Appl. Physiol.* 2004; 96: 392-7.

14. St. John W.M. Medullary regions for neurogenesis of gasping: noeud vital or noeuds vitals. *J. Appl. Physiol.* 1996; 81: 1865-77.

15. Petrishhev N.N. Comparative evaluation of the effectiveness of local and distant ischemic myocardial adaptation in rats. *Kardiologija.* 2001; 41(10): 53-6. (in Russian)

16. Yellon D.M., Downey J.M. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev.* 2003; 83: 1113-51.

17. Liu Y., Sato T., O'Rourke B, Marban E. Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection? *Circulation.* 1998; 97: 2463-9.

18. Garlid K.D., Paucek P., Yarov-Yarovoy V. et al. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circ. Res.* 1997; 81: 1072-82.

19. Eliseev V.V., Poltavchenko G.M. The role of adenosine in the regulation of physiological functions: Saint Petersburg: Science; 2011. (in Russian)

20. Petrishhev N.N., Shljahto E.V., Galagudza M.M. New ways to protect the myocardium from ischemic and reperfusion injury: molecular mechanisms and clinical perspectives application. *Kardiologija.* 2007; 5: 179-84. (in Russian)

Поступила 10.09.14

Received 10.09.14

Сведения об авторах:

Куликов Владимир Павлович, д.мед.н., проф., зав. каф. патофизиологии, ультразвуковой и функциональной диагностики ГБОУ ВПО «Алтайского государственного медицинского университета» Минздрава России

Степанова Любовь Александровна, аспирант каф. патофизиологии, ультразвуковой и функциональной диагностики ГБОУ ВПО «Алтайского государственного медицинского университета» Минздрава России

Забродина Алина Сергеевна, студентка 4 курса лечебного факультета ГБОУ ВПО «Алтайского государственного медицинского университета» Минздрава России

Нагибаева Мадина Ермековна, студентка 4 курса лечебного факультета ГБОУ ВПО «Алтайского государственного медицинского университета» Минздрава России