

УДК 615.224:612.12-008.46

# ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ АДЕНОЗИНА, АДФ И АТФ В КРОНОАРНОМ КРОВООБРАЩЕНИИ ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ С ХРОНИЧЕСКИМ ОКИСЛИТЕЛЬНЫМ СТРЕССОМ И СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ

В.И. КОЗЛОВСКИЙ, К.М.Н.

Кафедра фармакологии

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

*Известно, что аденозин играет важную роль для защиты сердца при ряде патологических состояний. Предполагается, что окислительный стресс, являющийся одним из важных факторов патогенеза сердечной недостаточности, способствует активации образования аденозина из адениновых нуклеотидов. С этой целью был сравнен вклад аденозиновых рецепторов в механизмы коронарорасширяющего действия аденозина, АДФ и АТФ в изолированных сердцах у трансгенных мышей с моделью хронического окислительного стресса и сердечной недостаточности. Эксперименты выполнены на изолированных сердцах, перфузируемых по методу Лангендорффа. У трансгенных мышей обнаружен более выраженный, в сравнении с контрольными мышами, вклад аденозиновых рецепторов в механизм коронарной вазодилатации, вызванной АДФ, что может свидетельствовать о повышенной активности энзимов, ответственных за дефосфорилирование адениновых нуклеотидов коронарным эндотелием. Данные изменения предшествуют развитию сердечной недостаточности и могут рассматриваться как механизм компенсации окислительного стресса.*

**Ключевые слова:** аденозин, коронарная вазодилатация, изолированное сердце мыши, окислительный стресс, сердечная недостаточность.

*It is known that adenosine plays significant role in cardioprotection in various pathological states. It was suggested that oxidative stress, which is one of the most important factor of the pathogenesis of the heart failure, contributes to activation of adenosine generation from adenine nucleotides. For this purpose contribution of adenosine receptors to the mechanisms of the coronary vasodilative activity of adenosine, ADF and ATP was compared in isolated hearts of transgenic mice to a model of the chronic oxidative stress and heart failure. Experiments were carried out on isolated hearts perfused by the Langendorff method. More significant, in comparison with control mice, contribution of adenosine to the coronary vasodilation induced by ADP was found in transgenic mice. This indicates to the increased activity of enzymes responsible for dephosphorylation of the adenine nucleotides by the coronary endothelium. These changes precede the development of the heart failure and can be considered as a mechanism of the oxidative stress compensation.*

**Key words:** adenosine, coronary vasodilation, isolated mouse heart, oxidative stress, heart failure.

## Введение

Аденозин играет особо важную роль в механизмах защиты сердца от недостатка кислорода. Известно, что образование аденозина в сердце значительно увеличивается в ситуациях, когда доставка кислорода к сердцу не обеспечивает полностью потребность миокарда в кислороде [2]. С другой стороны, аденозин оказывает выраженное защитное действие не только при ишемическом, но и при реперфузионном повреждении миокарда [12, 13]. Защитный эффект аденозина при данных состояниях может быть связан с его участием в регуляции прооксидантно-антиоксидантного баланса. Показано, что аденозин уменьшает продукцию свободных радикалов кислорода нейтрофилами [4], а также повышает активность антиоксидантных ферментов [11].

Одной из экспериментальных моделей нарушения регуляции прооксидантно-антиоксидантного баланса являются трансгенные мыши линии Tgαq\*44 с повышенной экспрессией в кардиомиоцитах белка G<sub>αq</sub>. Данные белки участвуют в пост-рецепторных сигнальных механизмах активации адренорецепторов, ангиотензиновых АТ<sub>1</sub> рецепто-

ров и эндотелиновых рецепторов. Имеются данные о том, что активация рецепторов, ассоциированных с G<sub>αq</sub> протеинами, ведёт к усилению генерации свободных радикалов кислорода и активации процессов перекисного окисления липидов [7, 8]. Таким образом, модель мышей с повышенной экспрессией белка G<sub>αq</sub> можно считать моделью окислительного стресса в сердце. Подтверждением этого являются данные о повышенном содержании супероксид аниона в сердце мышей линии Tgαq\*44 уже в возрасте 2 месяцев [5]. Характерной чертой мышей линии Tgαq\*44 является развитие дилатационной кардиомиопатии в возрасте 14 – 16 месяцев [10], очевидно, являющейся следствием хронического окислительного стресса.

Принимая во внимание важную роль аденозина в защите сердца как от гипоксии, так и от окислительного стресса, мы предполагаем, что увеличение продукции аденозина может служить одним из важных компенсаторных механизмов, препятствующих развитию сердечной недостаточности, в том числе и у вышеупомянутых мышей линии Tgαq\*44. Основным источником аденозина является дефосфорилирование адениновых нуклеотидов (АТФ,

АДФ) [3]. В связи с этим мы предположили, что у мышей линии Tgαq\*44 будет повышена активность энзимов, ответственных за образование аденозина из АТФ и АДФ. Для проверки данной гипотезы был сравнен вклад пуриновых P<sub>1</sub> (аденозиновых) рецепторов в механизм коронарорасширяющего действия АТФ и АДФ в изолированном сердце мышей линии Tgαq\*44 и контрольных мышей линии FVB.

#### Материал и методы исследования

Эксперименты проводились на изолированных сердцах мышей, которые перфузировались под постоянным давлением по методу Лангендорфа. В экспериментах использовались мыши линий Tgαq\*44 и FVB обоих полов массой 20-25 г. Животные наркотизировались тиопенталом (100-120 мг/кг массы тела). После вскрытия грудной клетки сердца изолировались, промывались в холодном физиологическом растворе, затем коронарное русло изолированного сердца перфузировалось ретроградно через аорту под постоянным перфузионным давлением 100 мм рт. ст. с использованием аппарата Лангендорфа (Hugo Sachs Electronics) раствором Кребса – Ханзеляйта следующего состава (mM): NaCl 118, CaCl<sub>2</sub> 2,52, MgSO<sub>4</sub> 1,64, NaHCO<sub>3</sub> 24,88, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,18, глюкоза 5,55, натрия пируват 2,0. Перфузионный раствор оксигенировался смесью 95 % O<sub>2</sub> + 5 % CO<sub>2</sub> при 37°C. Сердца стимулировались двумя платиновыми электродами, введенными в правое предсердие (частота составляла 400 импульсов в минуту). Объем жидкости, протекавший в единицу времени, соответствовал величине коронарного потока. Коронарный поток измерялся с помощью ультразвукового датчика (Hugo Sachs Electronics). Величина коронарного потока записывалась в течение всего эксперимента, а затем анализировалась с помощью специальной программы (PSCF – IGEL, Польша).

Для оценки вклада пуриновых P<sub>1</sub> рецепторов в механизм коронарорасширяющего действия аденозина, АДФ и АТФ данные соединения вводились в виде болюсов в объеме 10 мкл. Каждое соединение вводилось дважды в ходе эксперимента – без ингибиторов и в присутствии антагониста пуриновых P<sub>1</sub> рецепторов 8-сульфобензилтеофиллина (8-СФТ, 5×10<sup>-5</sup> М). Были сопоставлены эффекты аденозина, АДФ и АТФ у животных трёх возрастов: 2 месяца, 8 месяцев и 14 месяцев.

Статистическая обработка данных проводилась непараметрическими методами с использованием критерия Манна – Уитни. Данные выражались как среднее значение (M) ± стандартная ошибка (m). Статистически достоверным различие между группами считалось при p<0,05.

#### Результаты и их обсуждение

Обнаружено, что аденозин, АТФ и АДФ увеличивали коронарный поток изолированного сердца как у контрольных мышей линии FVB, так и у трансгенных мышей линии Tgαq\*44, что свидетельствует о коронарорасширяющих свойствах этих соединений. Не было обнаружено существенного различия между величиной коронарорасширяющих эффектов аденозина, АДФ и АТФ в серд-

цах мышей линий Tgαq\*44 и FVB 2 и 8 месяцев, в то же время у трансгенных мышей 14 месяцев прирост коронарного потока, вызванный аденозином, статистически достоверно превышал аналогичный показатель у контрольных мышей (таблицы 1, 2, 3). Коронарная вазодилатация, вызванная данными соединениями в присутствии 8-СФТ, а также процент её ингибирования 8-СФТ не отличались у контрольных и трансгенных мышей 2 месяцев. В то же время процент ингибирования коронарорасширяющего эффекта АДФ под влиянием 8-СФТ был статистически достоверно выше, а величина прироста коронарного потока, вызванного АДФ в присутствии 8-СФТ, была статистически достоверно ниже в сердцах мышей линии Tgαq\*44 8 и 14 месяцев в сравнении с аналогичными показателями у контрольных мышей линии FVB. Коронарорасширяющая реакция на АТФ в присутствии 8-СФТ, а также процент ингибирования её данным антагонистом не отличались существенно в сердцах мышей 8 и 14 месяцев, однако отмечалась тенденция к более выраженному ингибированию коронарорасширяющего действия АТФ 8-СФТ в сердцах трансгенных мышей данных возрастов.

Результаты проведённых экспериментов позволяют предположить, что в сердце мышей линии Tgαq\*44, в сравнении с сердцами контрольных мышей линии FVB, более выражены процессы дефосфорилирования адениновых нуклеотидов (прежде всего, АДФ) до аденозина. Интересно, что появление данных изменений у трансгенных мышей предшествует развитию сердечной недостаточности. Очевидно, активация продукции аденозина из адениновых нуклеотидов в коронарных сосудах представляет собой важный компенсаторный механизм, направленный на уменьшение последствий окислительного стресса. Основными энзимами, ответственными за дефосфорилирование адениновых нуклеотидов эндотелиальными клетками, являются АТФ-дифосфоорилаза (CD39), ответственная за превращение АТФ и АДФ до АМФ, и экто-5'-нуклеотидаза, осуществляющая дефосфорилирование АМФ до аденозина [6].

Роль дефосфорилирования адениновых нуклеотидов для защиты сердца от окислительного стресса подтверждается данными, полученными на мышцах с нокаутированным геном, ответственным за CD39. У данных мышей, в сравнении с контрольными животными, было более выражено повреждающее действие ишемии-реперфузии миокарда, ключевое значение в патогенезе которой имеет окислительный стресс [9].

Увеличение вклада аденозина в механизм коронарорасширяющего действия АДФ у трансгенных мышей линии Tgαq\*44 может также объясняться торможением активности аденозинеаминазы, ответственной за метаболизм аденозина до инозина. Asakura с соавт. обнаружили сниженную активность данного энзима в сердце больных с декомпенсированной сердечной недостаточностью [1].

Нельзя также полностью исключить возможность увеличения чувствительности аденозиновых

**Таблица 1** – Влияние 8-СФТ на прирост коронарного потока, вызванный аденозином, АДФ и АТФ (все в дозе  $10^{-9}$  М) в изолированных сердцах трансгенных мышей Tgαq\*44 и контрольных мышей FVB в возрасте 2 месяцев (здесь и ниже как  $M \pm m$ )

Соединение	Контрольные мыши FVB (n=5)			Трансгенные мыши Tgαq*44 (n=4)		
	прирост коронарного потока (мл/мин)		% ингибирования 8-СФТ	прирост коронарного потока (мл/мин)		% ингибирования 8-СФТ
	без 8-СФТ	в присутствии 8-СФТ		без 8-СФТ	в присутствии 8-СФТ	
Аденозин	2,24±0,21	0,36±0,09	82,3±6,6	2,76±0,23	0,29±0,07	89,1±2,6
АДФ	2,14±0,13	0,88±0,08	58,7±4,1	2,19±0,12	0,88±0,10	59,4±5,3
АТФ	2,38±0,14	1,43±0,15	40,7±3,1	1,99±0,34	1,33±0,09	48,0±6,7

**Таблица 2** – Влияние 8-СФТ на прирост коронарного потока, вызванный аденозином, АДФ и АТФ (все в дозе  $10^{-9}$  М) в изолированных сердцах трансгенных мышей Tgαq\*44 и контрольных мышей FVB в возрасте 8 месяцев

Соединение	Контрольные мыши FVB (n=10)			Трансгенные мыши Tgαq*44 (n=16)		
	прирост коронарного потока (мл/мин)		% ингибирования 8-СФТ	прирост коронарного потока (мл/мин)		% ингибирования 8-СФТ
	без 8-СФТ	в присутствии 8-СФТ		без 8-СФТ	в присутствии 8-СФТ	
Аденозин	2,33±0,13	0,43±0,04	81,0±2,5	2,24±0,15	0,46±0,05	79,6±2,3
АДФ	1,81±0,09	0,85±0,04	51,8±3,4	1,88±0,12	0,63±0,06*	66,6±2,7*
АТФ	2,19±0,10	1,34±0,10	37,9±4,7	2,01±0,12	1,15±0,08	41,6±3,4

Примечание: \* - здесь и ниже: статистически достоверно различие аналогичных показателей у мышей Tgαq\*44 и FVB.

**Таблица 3** – Влияние 8-СФТ на прирост коронарного потока, вызванный аденозином, АДФ и АТФ (все в дозе  $10^{-9}$  М) в изолированных сердцах трансгенных мышей Tgαq\*44 и контрольных мышей FVB в возрасте 14 месяцев

Соединение	Контрольные мыши FVB (n=9)			Трансгенные мыши Tgαq*44 (n=17)		
	прирост коронарного потока (мл/мин)		% ингибирования 8-СФТ	прирост коронарного потока (мл/мин)		% ингибирования 8-СФТ
	без 8-СФТ	в присутствии 8-СФТ		без 8-СФТ	в присутствии 8-СФТ	
Аденозин	1,88±0,11	0,35±0,05	81,6±2,3	2,25±0,10*	0,36±0,05	83,1±2,7
АДФ	1,74±0,14	0,89±0,09	48,5±3,5	1,75±0,11	0,64±0,05*	61,3±3,1*
АТФ	1,85±0,11	1,24±0,14	34,3±4,9	2,09±0,09	1,20±0,09	43,6±3,1

рецепторов в качестве компенсаторного механизма у данных мышей. О возможности этого, в частности, свидетельствует повышение коронарорасширяющей реакции на аденозин у мышей линии Tgαq\*44 14 месяцев. С другой стороны, у трансгенных мышей 8 месяцев данная реакция существенно не отличалась от таковой у контрольных животных соответствующего возраста.

Таким образом, в сердце трансгенных мышей линии Tgαq\*44 с хроническим окислительным стрессом и сердечной недостаточностью отмечается более выраженный вклад аденозина в механизм коронарорасширяющего действия АДФ, причём, данный феномен предшествует появлению явных признаков декомпенсированной сердечной недостаточности. Наиболее вероятными причинами обнаруженного феномена могут быть повышенное дефосфорилирование АДФ до аденозина, торможение метаболизма аденозина аденозиндеаминой, а также увеличение чувствительности аденозиновых рецепторов.

### Выводы

1. Аденозин, АДФ и АТФ обладают коронарорасширяющим действием в изолированных сердцах трансгенных мышей линии Tgαq\*44 и контрольных мышей линии FVB.

2. Коронарная вазодилатация, вызванная данными веществами, не отличается существенно в сердцах животных обеих групп в возрасте 2 и 8 месяцев, в то же время, в возрасте 14 месяцев коронарорасширяющая реакция на аденозин выше у трансгенных мышей.

3. Ингибирование коронарной вазодилатации, вызванной АДФ, антагонистом аденозиновых рецепторов 8-сульфофенилтеофиллином более выражено у трансгенных мышей 8- и 14-месячных возрастов в сравнении с контрольными мышами аналогичного возраста.

4. Вероятными причинами обнаруженного феномена могут быть повышение активности энзимов, ответственных за дефосфорилирование АДФ до аденозина, торможение метаболизма аденозина аденозиндеаминой, а также увеличение чувствительности аденозиновых рецепторов

### Литература

- Asakura, M. Impact of adenosine receptor signaling and metabolism on pathophysiology in patients with chronic heart failure / M. Asakura, H. Asanuma, J. Kim et al. // Hypertens. Res. – 2007. – Vol. 30, №9. – P. 781 – 787.
- Bardenheuer, H. Supply-to-demand ratio for oxygen determines formation of adenosine by the heart / H. Bardenheuer, J. Schrader // Am J Physiol. – 1986. – Vol. 250. – P. 173 – 180.
- Borowiec, A. Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases / A. Borowiec, K. Tkacz-Stachowska, A.C. Skladanowski // Acta Biochimica Polonica – 2006. – Vol. 53, №2. – P. 269 – 278.
- Cronstein, B.N. Adenosine: a physiological modulator of superoxide anion generation by human neutrophils / B.N. Cronstein, S.B. Kramer, G. Weissmann R. Hirschhorn // J. Exp. Med. – 1983. – Vol. 158. – P. 1160 – 1177.
- Drelicharz, L. NO and PGI2 in coronary endothelial dysfunction in transgenic mice with dilated cardiomyopathy / L. Drelicharz, V. Kozlovski, T. Skorka et al. // Basic Res. Cardiol. – 2008. – Vol. 103, №5. – P. 417-430.
- Eltzschig, H.K. Coordinated adenine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors / H.K. Eltzschig, J.C. Ibla, G.T. Furuta // J. Exp. Med. – 2003. – Vol. 198, №5. – P. 783 – 796.
- Griendling, K.K. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells / K.K. Griendling, C.A. Minieri, J.D., R.W. Alexander R.W. // Circ. Res. – 1994. – Vol. 74. – P. 1141 – 1148.
- Ishida, K. Endothelin-1 enhances superoxide generation of human neutrophils stimulated by the chemotactic peptide N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine / K. Ishida, K. Takeshige, S. Minakami // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1990. – Vol. 173, №2. – P. 496 – 500.
- Kuhler, D. CD39/ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 provides myocardial protection during cardiac ischemia/reperfusion injury / D. Kuhler, T. Eckle, M. Faigle // Circulation. – 2007. – Vol. 116, №16. – P. 1784 – 1794.
- Mende, U. Dilated cardiomyopathy in two transgenic mouse lines expressing activated G protein alpha(q): lack of correlation between phospholipase C activation and the phenotype / U. Mende, C. Semsarian, D.C. Martins et al. // J. Mol. Cell. Cardiol. – 2001. – Vol. 33. P. 1477 – 1491.
- Ramkumar, V. Adenosine, antioxidant enzymes and cytoprotection / Z. Nie, L.P. Rybak, S.B. Maggiewar // Trends Pharmacol Sci. – 1995. – Vol. 16. – P. 283 – 285.
- Sekili, S. Effect of adenosine on myocardial "stunning" in the dog / S. Sekili, M.O. Jeroudi, X.L. Tang et al. // Circ. Res. – 1995. – Vol. 76. – P. 82 – 94.
- Zhao, Z.Q., Adenosine attenuates reperfusion-induced apoptotic cell death by modulating expression of Bcl-2 and Bax proteins / Z.Q. Zhao, J.M. Budde, C. Morris et al. // J. Mol. Cell. Cardiol. – 2001. – Vol. 33. – P. 57 – 68.

Поступила 24.12.08