Г осударственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«Алтайский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

**Трегуб Павел Павлович**

**НЕЙРОПРОТЕКТОРНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ СОЧЕТАННОГО  
И ИЗОЛИРОВАННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ГИПЕРКАПНИИ**

**ИГИПОКСИИ**

1. - патологическая физиология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор Куликов В.П.

ТОМСК- 2016

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

**Введение** 4

**Глава 1. Обзор литературы** 12

1. Использование гипоксии для повышения

толерантности органов и тканей к ишемии/гипоксии 13

1. Применение гиперкапнических воздействий

в качестве нейропротектора и терапевтического средства

при ишемически-реперфузионном повреждении 17

1. Эффективность гиперкапнической гипоксии

для увеличения толерантности органов и тканей к ишемии/гипоксии 22

1. Основные механизмы формирования

ишемической толерантности головного мозга 25

[**Глава 2. Материалы и методы исследования** 31](#bookmark21)

1. [Материал и объект исследования 31](#bookmark22)
2. Методика сочетанного и изолированного

воздействия гиперкапнии и гипоксии 31

1. Методика моделирования фокальной и субтотальной ишемии

[головного мозга у крыс 33](#bookmark25)

1. [Метод моделирования острой гипобарической гипоксии 34](#bookmark26)
2. [Методика моделирования острой нормобарической гипоксии 36](#bookmark27)
3. [Методика оценки неврологического дефицита и двигательно­координационных нарушений 36](#bookmark28)
4. Методика гистологического исследования

препаратов головного мозга 37

1. Методика определения содержания HSP-70 и S-100P

в сыворотке крови у крыс 38

1. Исследование роли мито-К+АТФ-каналов

и аденозиновых А1-рецепторов методом применения

активатора/блокатора механизма 39

1. [Статистическая обработка экспериментальных данных 39](#bookmark32)
2. Дизайн экспериментального исследования эффективности изолированного и сочетанного воздействия гипоксии

и гиперкапнии в повышении резистентности к острому дефициту кислорода и ишемии головного мозга 40

1. **Дизайн экспериментального исследования механизмов, увеличивающих толерантность головного мозга к ишемии/гипоксии, при сочетанном воздействии гиперкапнии и гипоксии 42**

[**Глава 3. Результаты собственных исследований 45**](#bookmark34)

1. **Эффективность изолированного**

**и сочетанного воздействия гипоксии и гиперкапнии**

**в повышении резистентности к острому дефициту кислорода 45**

1. **Нейропротекторная эффективность изолированного и сочетанного воздействия гипоксии и гиперкапнии**

[**при ишемии головного мозга 50**](#bookmark33)

1. **Участие протекторных белков HSP-70 и S-100P**

[**в механизме формирования ишемической толерантности головного мозга при сочетанном и изолированном воздействии гипоксии и гиперкапнии 59**](#bookmark39)

1. **Роль митохондриальных АТФ-зависимых калиевых каналов и А1-рецепторов к аденозину в механизме нейропротекции**

**при сочетанном и изолированном воздействии гипоксии и гиперкапнии 62 Глава 4. Обсуждение результатов 66**

* 1. **Резистентность к острому дефициту кислорода у крыс после сочетанного и изолированного**

**воздействия гипоксии и гиперкапнии 66**

* 1. **Формирование ишемической толерантности головного**

**мозга крыс после сочетанного и изолированного воздействия гипоксии и гиперкапнии 69**

* 1. **Механизмы формирования толерантности головного мозга крыс**

**к гипоксии/ишемии после сочетанного и изолированного воздействия гипоксии и гиперкапнии 76**

[**Выводы 81**](#bookmark41)

[**Список сокращений 82**](#bookmark42)

[**Список литературы 83**](#bookmark43)

**ВВЕДЕНИЕ  
Актуальность темы**

Г ипоксия является эффективным средством повышения толерантности органов и тканей к острому дефициту кислорода и ишемии [Agadzhanyan N.A. et al., 2009]. Однако недостатком гипоксических воздействий является необходимость длительной экспозиции (1-6 часов) и большого количества сеансов (не менее 7 раз) [Neckar J. et al., 2009; Yang C.C. et al., 2009], что малоперспективно для клинического применения. Поэтому актуальной научной задачей является повышение эффективности использования гипоксии для профилактики и лечения гипоксических и ишемических повреждений.

Имеются данные, свидетельствующие о протекторном потенциале гиперкапнического воздействия на нервную ткань. Доказано, что углекислый газ эффективен для нейропротекции при гипоксическом/ишемическом повреждении головного мозга [Vannucci R.C. et al., 1995]. В 2010 году был показан терапевтический эффект пермиссивной гиперкапнии при экспериментальном ишемически-реперфузионном повреждении головного мозга [Zhou Q. et al., 2010; Tao T. et al., 2013].

Существует ряд работ, демонстрирующих, что протекторная эффективность сочетанного воздействия гиперкапнии и гипоксии значительно больше по сравнению с изолированной гипоксией. Это было показано в отношении кардиопротекторного эффекта [Зверькова Е.Е., 1980; 1982] и формирования ишемической толерантности головного мозга [Беспалов А.Г. и соавт., 2004; Куликов В.П. и соавт., 2009].

В то же время в литературе не представлено исследований, посвященных сравнительному изучению эффективности изолированного и сочетанного воздействия гипоксии и гиперкапнии для увеличения резистентности к острой гипоксии, а также формирования ишемической толерантности головного мозга. Это же касается работ, посвященных изучению механизмов нейропротекции при воздействии гиперкапнической гипоксии.

Одними из вероятных нейропротекторных механизмов сочетанного воздействия гипоксии и гиперкапнии могут быть: активация

митохондриальных АТФ-зависимых калиевых каналов и Аі-рецепторов к аденозину, являющихся важнейшими звеньями в феномене

гипоксического/ишемического прекондиционирования мозга [Heurteaux C. et al., 1995; Blondeau N. et al., 2000], повышение экспрессии шаперона HSP-70, индуцируемое после гипоксического воздействия [Lin H.J. et al., 2011] и белка S-100P - нейротрофического фактора и клинического маркера повреждения нервной ткани [Kleindienst A. Et al., 2004].

**Степень разработанности**

В литературе представлено значительное количество публикаций, посвященных толерантности мозга к действию повреждающих факторов после гипоксического прекондиционирования и тренировок [Miller B. et al., 2001; Архипенко Ю.В. и соавт., 2005; Lukianova L.D. et al., 2011]. При этом доказано, что важнейшими механизмами увеличения ишемической толерантности мозга являются такие, как ингибирование апоптоза [Fremont M. et al., 2006], активация митохондриальных АТФ-зависимых калиевых каналов [Mayanagi K. et al., 2007] и А1-рецепторов к аденозину [Neckar J. et al., 2002], усиление экспрессии редокс-чувствительного белка HIF-1a [Lukianova L.D., 2011] и стимуляция ангиогенеза [Siafakas N.M. et al., 2001].

В последнее время появился ряд работ, демонстрирующих терапевтическую эффективность пермиссивной гиперкапнии и протекторное действие СО2 на головной мозг при гипоксическом/ишемическом повреждении [Vannucci R.C. et al., 1995; Zhou Q. et al., 2010]. Было показано, что важную роль в этом эффекте играет процесс ингибирования апоптоза в

нервных клетках [Zhou Q. et al., 2010], стимулирование ангиогенеза [Chuang

1. C. et al., 2010] и активация митоК+АТФ-каналов [Lindauer U. et al., 2003].

При этом в литературе сравнительно мало публикаций, касающихся исследования сочетанной эффективности гипоксии и гиперкапнии. Было показано, что устойчивость к экстремальному дефициту кислорода повышается более выражено при сочетании гипоксии и гиперкапнии, чем при аналогичных воздействиях изолированной гипоксии [Зверькова Е.Е., 1980; 1982]. Также было установлено, что предварительное курсовое воздействие гиперкапнической гипоксии индуцирует нейропротекцию при тотальной [Беспалов А.Г. и соавт., 2004] и субтотальной [Куликов В.П. и соавт., 2009] ишемии головного мозга.

Таким образом, в рамках изучения феномена ишемической толерантности важной научной задачей является сравнение эффективности изолированной гипоксии и гиперкапнии по отношению к их сочетанному воздействию, а также определение механизмов потенцирования их эффектов.

Всё вышеизложенное предопределило цель настоящего исследования.

**Цель исследования**

Сравнить эффективность изолированного и сочетанного воздействия гипоксии и гиперкапнии для формирования ишемической толерантности головного мозга и установить важные нейропротекторные механизмы сочетания этих факторов.

**Задачи исследования**

1. Сравнить эффективность изолированного и сочетанного воздействия гипоксии и гиперкапнии для повышения резистентности к острому дефициту кислорода и изучить зависимость эффекта от кратности сеансов воздействия.
2. Сравнить нейропротекторную эффективность изолированного и сочетанного воздействия гипоксии и гиперкапнии.
3. Определить роль протекторных белков HSP-70 и S-100P в механизме формирования ишемической толерантности головного мозга после сочетанного и изолированного воздействия гипоксии и гиперкапнии.
4. Установить роль митохондриальных АТФ-зависимых калиевых каналов и А1-рецепторов к аденозину в механизме нейропротекции после сочетанного и изолированного воздействия гипоксии и гиперкапнии.

**Научная новизна**

Установлено, что гиперкапническая гипоксия наиболее эффективно повышает резистентность к острой гипоксии и толерантность мозга к ишемии по сравнению с нормобарической гипоксией и пермиссивной гиперкапнией, а увеличение кратности воздействий сопровождается пропорциональным увеличением резистентности. При этом эффективность пермиссивной гиперкапнии для повышения резистентности к острому дефициту кислорода при любой кратности воздействия значительно выше эффективности нормобарической гипоксии.

Установлено, что повышение экспрессии шаперона HSP-70, увеличение синтеза белка S-100P, активация А1-аденозиновых рецепторов и митохондриальных АТФ-зависимых К+-каналов являются важными механизмами нейропротекторных эффектов при воздействии гиперкапнической гипоксии.

**Теоретическая значимость и практическая значимость**

Результаты проведенного исследования, продемонстрировавшие максимальную нейропротекторную эффективность сочетанного воздействия гипоксии и гиперкапнии по сравнению с их изолированным применением, расширяют представления о влиянии на организм респираторных воздействий, изменяющих газовый гомеостаз и обеспечивающих различные комбинации гипоксии и гиперкапнии. Эксперименты, показавшие активацию АТФ-зависимых калиевых каналов и А^рецепторов к аденозину при гиперкапнически-гипоксическом воздействии, вносят значительный вклад в фундаментальные представления о механизмах нейропротекторной эффективности сочетанного и изолированного воздействия гипоксии и гиперкапнии.

Установленный в диссертационной работе факт максимальной нейропротекторной эффективности сочетанного воздействия гипоксии и гиперкапнии, по сравнению с их изолированным воздействием, создает основу для разработки эффективных методов дыхательных тренировок для повышения неспецифической резистентности организма и формирования ишемической толерантности головного мозга.

Экспериментальные данные об участии АТФ-зависимых калиевых каналов и аденозина в механизме формирования ишемической толерантности мозга при сочетанном воздействии гиперкапнии и гипоксии создают основу для разработки метода фармакологического потенцирования нейропротекторной эффективности гиперкапнической гипоксии путем использования препаратов, воздействующих на митоК+АТФ-каналы и аденозиновые Аі-рецепторьі.

**Методология и методы исследования**

Методологической основой диссертационного исследования послужил диалектический метод, базирующийся на системном подходе в изучении функционирования живого организма. Были использованы теоретико­эмпирические общенаучные методы: анализа и синтеза, индукции и дедукции, моделирования, научной абстракции, а также метод статистической обработки. Из методов естественнонаучных исследований применялись наблюдение, измерение, эксперимент и сравнение. Были использованы специальные методы гистологической обработки нервной ткани, ее окраски и морфометрии, а также специфические лабораторные методы серологической диагностики.

**Положения, выносимые на защиту**

1. Сочетание гипоксии и гиперкапнии в предварительных

респираторных воздействиях обладает максимальной эффективностью для повышения резистентности к острой гипобарической гипоксии и

формирования ишемической толерантности головного мозга, по сравнению с их изолированным воздействием в эквивалентных концентрациях кислорода и углекислого газа.

1. Сочетание умеренной гипоксии и гиперкапнии, в отличие от их

изолированного применения, уже после однократного воздействия увеличивает резистентность к острой гипобарической гипоксии, а

эффективность пермиссивной гиперкапнии при любой кратности использования превосходит эффективность нормобарической гипоксии.

1. Важными механизмами повышения толерантности головного мозга к

ишемии/гипоксии при сочетанном воздействии гиперкапнии и гипоксии являются: повышение синтеза HSP-70 и S-100P, активация

митохондриальных АТФ-зависимых К+-каналов и аденозиновых А1- рецепторов.

**Степень достоверности и апробация результатов**

Материалы диссертации были доложены и обсуждены на VI Всероссийской конференции с международным участием «Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция» (г. Москва, 2011 год); на конференциях, посвященных Дню науки в Алтайском государственном медицинском университете (г. Барнаул, 2012-2015 гг.); на городских научно-практических конференциях молодых ученых «Молодежь - Барнаулу» (г. Барнаул, 2012­2013 гг.); на VII Сибирском физиологическом съезде (г. Красноярск, 25­27.06.2012 г.); на Юбилейной ХХ всероссийской научной конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии» (г. Санкт-Петербург, 7-8.04.2014 г.); на I Международном конгрессе по нейронаукам (г. Красноярск, 10-12.06.2014 г.).

**Внедрение результатов исследования**

Результаты диссертационного исследования, показавшие максимальную эффективность сочетанного воздействия гиперкапнии и гипоксии для увеличения ишемической толерантности мозга, стали основой для разработки методики применения гиперкапнически-гипоксических дыхательных тренировок на базе КГБУЗ «Детская краевая клиническая больница» г. Барнаула у детей с неврологическими нарушениями и используются в учебном процессе в рамках изучения патофизиологии (разделы «Г ипоксия и дискапния» и «Нарушения регионарного кровообращения») на базе кафедры патофизиологии, клинической патофизиологии с курсом ФПК и ППС ГБОУ ВПО АГМУ Минздрава России.

**Публикации**

По теме диссертации опубликовано 12 научных работ, в том числе 4 статьи - в журналах, рекомендованных ВАК РФ, и 2 статьи - в зарубежных научных журналах, индексируемых базами «Web of Science» и «Scopus».

**Объем и структура диссертации**

Диссертационная работа изложена на 106 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 4 разделов собственных исследований, обсуждения результатов, выводов и списка использованной литературы. Диссертация иллюстрирована 17 рисунками. Библиографический указатель включает 214 источников (41 - на русском и 173 - на английском языках).

**Личный вклад автора**

Автором самостоятельно выполнены все экспериментальные исследования, проведены статистическая обработка, анализ и обобщение полученных данных, сформулированы научная новизна, положения и выводы по диссертации

**ВЫВОДЫ**

1. Гиперкапническая гипоксия максимально повышает резистентность

к острой гипобарической гипоксии по сравнению с нормобарической гипоксией и пермиссивной гиперкапнией в эквивалентных концентрациях кислорода и углекислого газа. Причем увеличение кратности предварительных гиперкапнически-гипоксических воздействий

сопровождается пропорциональным возрастанием резистентности, а эффективность пермиссивной гиперкапнии при любой кратности воздействия оказывается выше эффективности нормобарической гипоксии.

1. Сочетанное воздействие гипоксии и гиперкапнии перед моделированием субтотальной ишемии и фокального ишемического повреждения мозга оказывает максимальный нейропротекторный эффект по сравнению с пермиссивной гиперкапнией и нормобарической гипоксией.
2. Нейропротекторные эффекты при воздействии гиперкапнической гипоксии, опосредованные увеличением концентрации белка S-100P, преимущественно обусловлены действием углекислого газа, а не дефицита кислорода. При этом повышение концентрации HSP-70 в основном обусловлено действием гипоксии, однако при ее сочетании с гиперкапнией этот эффект становится более выраженным.
3. Митохондриальные АТФ-зависимые калиевые каналы и А1- рецепторы к аденозину играют важную роль в механизме увеличения резистентности к острой гипоксии/ишемии после сочетанного воздействия гипоксии и гиперкапнии. Однако в отношении аденозиновых рецепторов протекторный эффект сочетания дефицита кислорода и избытка углекислого газа реализуется без участия гиперкапнического компонента.