

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.17:612.53:616.831-005.4

© Коллектив авторов

ВЗАИМОСВЯЗЬ ТОЛЕРАНТНОСТИ К ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА И ТЕМПЕРАТУРЫ ТЕЛА С КОНЦЕНТРАЦИЕЙ ГЛУТАТИОНА

В.И. Кулинский¹, Л.С. Колесниченко², В.Ю. Ковтун¹, Г.В. Сотникова⁴

¹Кафедры биохимии и ²бионеорганической и биоорганической химии Иркутского государственного медицинского университета;
факс: (395)224-0826, эл. почта: kulinsky@pp.irkutsk.ru

³НПЦ "Фармзащита", Москва;

⁴Кафедра физико-химической биологии Иркутского государственного университета

Модифицированы методические подходы для целенаправленного изменения концентрации GSH в головном мозге и печени путем введения деплеторов и метаболических предшественников глутатиона. Два разных деплетора (диэтилмалеат и бутионинсульфоксимин) вызывают выраженные увеличение толерантности к полной глобальной ишемии головного мозга и развитие гипотермии, тесно коррелирующие со снижением концентрации GSH. Пять предшественников GSH (сложные эфиры GSH и оксотиазолидинкарбоксилат) и сам GSH обычно слегка снижают температуру тела, но в большинстве серий не влияют на толерантность к ишемии. Увеличение толерантности к полной глобальной ишемии головного мозга связано не с аккумуляцией, а со снижением концентрации GSH. Очевидно, при разных формах ишемии мозга может преобладать один из двух противоположных эффектов GSH - сенситизирующий или защитный.

Ключевые слова: система глутатиона, деплеторы и предшественники GSH, ишемия мозга, температура тела.

ВВЕДЕНИЕ. В последние годы обнаружено, что кроме ряда ранее известных фундаментальных функций [1, 2], глутатион необходим для редокс-регуляции многих важных процессов [3, 4] и обладает нейромодуляторной и нейротрансмиттерной активностью [2, 5, 6]. Однако совершенно недостаточно изучены функциональные эффекты GSH, в том числе в головном мозге. Значение GSH для терморегуляции почти не исследовалось. Остается спорной гипотеза о важной и исключительно защитной роли системы глутатиона при ишемии головного мозга (ИГМ) [2, 7, 8]. Использование отдельных веществ, селективно влияющих на концентрацию GSH, не дало однозначных результатов [9-12]. Ранее мы кратко описали общебиохимические аспекты воздействия деплеторов GSH [13]. Задача настоящей работы - использование ряда деплеторов и метаболических предшественников GSH как метода комплексного анализа значения концентрации GSH для толерантности к полной глобальной ИГМ и поддержания температуры тела.

МЕТОДИКА. Работа проведена на 270 беспородных мышках обоего пола массой 18-30 г. В качестве деплеторов GSH (веществ, сильно снижающих его

концентрацию) использовали диэтилмалеат (DEM) фирмы "Sigma-Aldrich" (США) и L-бутионин-[S,R]-сульфоксимин (BSO) фирмы "ICN" (США). Как метаболические предшественники GSH применяли L-2-оксотиазолидин-4-карбоксилат (ОТС) и GSH фирмы "Sigma-Aldrich" (США) и синтезированные нами его *n*-пропиловый (GPE), изопрпиловый (GiPE), *n*-бутиловый (GBE) моноэфиры по глициновому карбоксилу и диэтиловый эфир GSH (GDDE) [14]. Оптимальные условия уточняли сравнением путей введения и изучением дозовых кривых и динамики. Все вещества вводили в виде водных растворов: DEM внутривенно (в/в) на 20% 2-гидроксипропил- β -циклодекстрине фирмы "RBI" (США) (растворы на подсолнечном масле и диметилсульфоксиде дали подобные результаты), BSO - в левый латеральный желудочек мозга (в/ж) и в/б, GDDE и ОТС - подкожно (п/к) и в/ж, остальные эфиры - п/к, а GSH - только в/ж. Растворы ОТС и GSH доводили 1 N Na₂CO₃ до pH = 6,5. Контрольным животным вводили соответствующие растворители. Концентрацию GSH, активность ферментов его метаболизма (ФМГ) и температуру тела (t°) определяли, как описано ранее [13]. Толерантность к полной глобальной ИГМ оценивали на декапитационной модели Лоури по продолжительности гаспинга (агонального дыхания) [15]. Данные по GSH и ФМГ анализировали по критериям F и t, t° - по критерию t для связанных выборок, данные по гаспингу (ввиду отклонений от нормального распределения [15]) - по критерию U Манна-Уитни. Взаимосвязь между показателями характеризовали коэффициентами корреляции Спирмена (r_s) и множественной корреляции R, рассчитывали силу связи $B = R^2$ [16]. Расчет и сравнение линий регрессии проводили с использованием дисперсионного анализа по программному пакету "Primer of Biostatistics Version 4.03 by S.A. Glantz".

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Введение 0,54 ммоль/кг BSO в/ж и особенно 4 ммоль/кг DEM в/б вызывает выраженное снижение концентрации GSH - в среднем соответственно на 32 и 61% в головном мозге и на 56 и 70% в печени (табл. 1) при отсутствии изменений всех трех ФМГ: глутатионпероксидазы (ГПО), глутатионредуктазы (ГР) и глутатионтрансферазы (ГТ) (табл. 2). Механизмы действия этих двух деплеторов GSH различны: первый ингибирует ключевой фермент синтеза GSH γ -глутамилцистеинсинтетазу, второй увеличивает расход GSH (ГТ конъюгирует DEM с GSH) [17, 18]. Однако оба вещества резко снижают t° (на 9°) и увеличивают толерантность к ИГМ (в 2,2-2,9 раза). Одинаковая направленность сдвигов четко видна на "лучевой" диаграмме (рис. 1), на которой базальная величина показателей соответствует вершинам правильного многоугольника, увеличение показателей изображено в виде "лучей", выступающих за пределы многоугольника, а их уменьшение - в виде впадин. Совпадение всех эффектов двух веществ с разными механизмами снижения GSH свидетельствует о роли эндогенного трипептида в снижении t° и увеличении толерантности к ИГМ. Введение в/ж меньшей дозы BSO 0,25 ммоль/кг дает близкие эффекты, включая снижение GSH в печени (в среднем на 49%). В то же время 0,54 ммоль/кг BSO в/б намного меньше уменьшает t° и не влияет ни на концентрацию GSH в мозге и печени, ни на толерантность к ИГМ. Очевидно, изученные эффекты BSO, включая снижение уровня GSH в печени, являются не периферическими, а центральными, - они реализуются головным мозгом.

У DEM обнаружен и поздний эффект: через 2 суток после инъекции, когда концентрация GSH почти возвращается к норме, развивается выраженное увеличение активности ГТ и ГР в мозге и печени (табл. 1 и 2). Очевидно, происходит индукция, - индуцибельность этих двух ферментов под влиянием других веществ известна, особенно в печени [17]. На фоне BSO 0,25 ммоль/кг концентрация GSH в головном мозге нормализуется при последующем введении GDDE в мозг, но не подкожно; в обоих случаях сохраняются сниженный уровень GSH в печени и гипотермия, а толерантность к ИГМ остается увеличенной. В обеих сериях увеличивается активность ГПО в мозге и печени и нет изменений ГР и ГТ.

ГЛУТАТИОН И ТОЛЕРАНТНОСТЬ К ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Таблица 1. Влияние деплеторов и предшественников GSH на концентрации глутатиона, температуру тела и толерантность к ишемии головного мозга.

Серии	n	Глутатион (мкмоль/г)		Изменение температуры тела ($\Delta t^{\circ}\text{C}$)	Гаспинг (с)
		Головной мозг	Печень		
Контрольные в/б (ЦД)	7	$2,58 \pm 0,17$	$5,73 \pm 0,45$	$-1,80 \pm 0,72$	15,5(15-17)
в/ж	23	$2,29 \pm 0,05$	$5,85 \pm 0,23$	$-1,48 \pm 0,46$	16,0(14-20)
в/б	5	$2,14 \pm 0,086$	$5,39 \pm 0,31$	$0,16 \pm 0,41$	17,0(16-20)
п/к	21	$2,48 \pm 0,05$	$5,97 \pm 0,23$	$0,24 \pm 0,24$	16,0(15-18)
Опытные					
1. DEM 4 ммоль/кг в/б 3 ч	10	$1,00 \pm 0,073^b$	$1,70 \pm 0,22^b$	$-9,08 \pm 1,23^b$	34,0(17-51) ^б
2. DEM 4 ммоль/кг в/б 48 ч	5	$2,09 \pm 0,067^a$	$4,29 \pm 0,55$	$-1,56 \pm 0,66$	18,0(16-19)
3. BSO 0,54 ммоль/кг в/ж 12 ч	6	$1,54 \pm 0,086^b$	$2,60 \pm 0,46^b$	$-8,73 \pm 1,15^b$	46,0(27-65) ^б
4. BSO 0,54 ммоль/кг в/б 12 ч	5	$2,15 \pm 0,048$	$4,64 \pm 0,84$	$-1,76 \pm 0,44^a$	17,0(16-18)
5. BSO 0,25 ммоль/кг в/ж 12 ч	11	$1,82 \pm 0,052^b$	$3,01 \pm 0,47^b$	$-6,36 \pm 1,26^b$	30,0(20-58) ^б
6. BSO 0,25 ммоль/кг в/ж 12 ч + GDEE 2,5 ммоль/кг п/к 2 ч	9	$1,77 \pm 0,058^b$	$4,11 \pm 0,43^b$	$-7,31 \pm 1,72^b$	23,0(20-74) ^б
7. BSO 0,25 ммоль/кг в/ж 12 ч + GDEE 56 мкмоль/кг в/ж 20 мин	11	$2,21 \pm 0,081$	$3,69 \pm 0,60^b$	$-6,98 \pm 1,15^b$	26,0(20-37) ^б
8. GPE 2,62 ммоль/кг п/к 2 ч	4	$2,72 \pm 0,08$	$7,43 \pm 0,58^a$	$-1,70 \pm 0,61^b$	17,5(16-19)
9. GiPE 2,62 ммоль/кг п/к 2 ч	6	$2,64 \pm 0,07$	$8,23 \pm 0,15^b$	$-1,77 \pm 0,60^b$	16,5(15-18)
10. GBE 2,63 ммоль/кг п/к 2 ч	4	$2,68 \pm 0,08$	$8,35 \pm 0,30^b$	$-1,10 \pm 0,19^a$	16,0(16-16)
11. GDEE 2,5 ммоль/кг п/к 2 ч	10	$2,37 \pm 1,35$	$7,73 \pm 0,36^b$	$-1,26 \pm 0,41^b$	18,5(17-21) ^а
12. GDEE 8,4 ммоль/кг п/к 2 ч	5	$2,77 \pm 0,10^a$	$8,06 \pm 0,17^b$	$-5,00 \pm 0,66^b$	30,0(30-30) ^б
13. OTC 13 ммоль/кг п/к 2 ч	7	$2,81 \pm 0,03^b$	$6,40 \pm 0,30$	$-1,34 \pm 0,23^b$	18,0(17-19) ^а
14. GDEE 56 мкмоль/кг в/ж 20 мин	9	$2,99 \pm 0,14^b$	$6,43 \pm 0,46$	$-3,76 \pm 1,57$	17,0(15-20)
15. GSH 115 мкмоль/кг в/ж 20 мин	5	$2,94 \pm 0,15^b$	$6,17 \pm 0,33$	$-2,64 \pm 0,98$	17,0(16-22)
16. OTC 450 мкмоль/кг в/ж 20 мин	7	$2,73 \pm 0,08^b$	$8,14 \pm 0,44^b$	$-0,69 \pm 0,27$	16,0(13-17)

Примечание: В 3-5-ых колонках приведены $\bar{X} \pm s_x$, в 6-ой - медианы, в скобках - децили (D_1 - D_9). а - $p < 0,05$; б - $p < 0,01$; в - $p < 0,001$ при сравнении с соответствующим контролем. ЦД - 2-гидроксипропил- β -циклодекстрин (солубилизатор DEM). в/б - введение внутривенно, в/ж - в желудочек мозга, п/к - подкожно.

Метаболические предшественники GSH увеличивают его концентрацию в органах, но разными механизмами: эфиры GSH проникают в клетки и в результате гидролиза эстеразами непосредственно освобождают GSH, а OTC при действии фермента γ -глутамилного цикла 5-оксопролиназы превращается в клетках в свободный цистеин, лимитирующий синтез GSH [14, 17]. GPE, GiPE, GBE и GDEE в дозах 2,5-2,6 ммоль/кг п/к увеличивают концентрацию GSH в печени (в среднем на 24-40%), несколько снижают t° (на 1,1-1,8 $^{\circ}$) и в большинстве серий не влияют на уровень GSH в мозге, активность ФМГ и толерантность к ИГМ. Только GiPE несколько повышает активность ГР в мозге и ГТ в печени, а GDEE снижает активность ГТ в мозге и слегка (на 16%) увеличивает толерантность к ИГМ. OTC в дозе 13 ммоль/кг п/к слегка увеличивает GSH и толерантность мозга (в среднем на 12-13%) и уменьшает в нем активность всех трех ФМГ, а ГР - и в печени (на 25-48%), снижает t° . Особняком стоят эффекты высокой дозы GDEE - 8,4 ммоль/кг п/к: она значительно (на 35-93%) активизирует 7 из 8 показателей системы GSH (GSH мозга повышен только на 12%), снижает t° (на 5 $^{\circ}$) и значительно увеличивает толерантность к ИГМ (на 88%). Возможно, увеличение в обоих органах активности всех трех ФМГ связано с их индукцией глутатионом. В свою очередь индукция

Таблица 2. Влияние деплеторов и предшественников GSH на активность ферментов метаболизма глутатиона.

Серия	n	ГПО		ГР		ГТ	
		Мозг	Печень	Мозг	Печень	Мозг	Печень
Контрольные							
в/б (ЦД)	7	30,8 ± 2,31	214 ± 20,8	23,8 ± 1,27	19,0 ± 2,28	67,7 ± 6,78	357 ± 38,7
в/ж	17-20	31,1 ± 2,72	179 ± 17,1	34,2 ± 2,95	30,6 ± 1,85	163 ± 10,2	661 ± 63,9
п/к	11	39,8 ± 4,25	200 ± 24,2	45,6 ± 2,86	43,7 ± 3,05	228 ± 21,0	756 ± 59,3
Опытные							
1 DEM 4 ммоль/кг в/б 3 ч	10	28,8 ± 3,40	263 ± 37,7	26,8 ± 1,89	20,3 ± 1,98	78,0 ± 5,12	445 ± 57,2
2 DEM 4 ммоль/кг в/б 48 ч	5	29,4 ± 1,89	208 ± 31,9	38,5 ± 5,43 ^б	35,8 ± 5,17 ^б	158 ± 23,1 ^б	689 ± 34,5 ^а
3 BSO 0,54 ммоль/кг в/ж 12 ч	6	36,6 ± 5,03	199 ± 24,0	35,5 ± 2,66	27,0 ± 0,83	191 ± 24,0	679 ± 58,1
5 BSO 0,25 ммоль/кг в/ж 12 ч	11	21,6 ± 1,45 ^а	156 ± 19,8	28,5 ± 3,68	28,9 ± 3,91	138 ± 1,38	629 ± 56,8
6 BSO 0,25 ммоль/кг в/ж 12ч+ GDEE 2,5 ммоль/кг п/к 2 ч	9	56,0 ± 9,65 ^б	311 ± 43,0 ^б	31,3 ± 4,22	36,7 ± 4,74	152 ± 24,4	644 ± 96,9
7 BSO 0,25 ммоль/кг в/ж 12ч+ GDEE 56 ммоль/кг в/ж 20 мин	11	44,8 ± 1,71 ^б	291 ± 27,9 ^б	30,7 ± 1,06	36,5 ± 4,27	136 ± 8,20	708 ± 100
8 GPE 2,62 ммоль/кг п/к 2 ч	4	40,5 ± 2,75	237 ± 13,4	48,8 ± 5,52	36,9 ± 2,93	224 ± 10,3	740 ± 61,9
9 GiPE 2,62 ммоль/кг п/к 2 ч	6	37,5 ± 3,01	259 ± 26,2	54,9 ± 2,38 ^а	46,1 ± 2,72	224 ± 17,6	1003 ± 108 ^а
10 GBE 2,63 ммоль/кг п/к 2 ч	4	43,2 ± 2,17	258 ± 26,3	58,6 ± 10,6	33,9 ± 4,45	257 ± 26,2	690 ± 25,2
11 GDEE 2,5 ммоль/кг п/к 2 ч	9	38,0 ± 4,02	281 ± 35,4	38,9 ± 4,63	36,9 ± 3,46	165 ± 16,9 ^а	687 ± 95,6
12 GDEE 8,4 ммоль/кг п/к 2 ч	5	68,8 ± 8,64 ^б	386 ± 32,5 ^а	69,5 ± 5,28 ^а	58,9 ± 4,12 ^а	378 ± 43,4 ^б	1244 ± 120 ^б
13 OTC 13 ммоль/кг п/к 2ч	6	21,1 ± 2,81 ^а	126 ± 18,4	33,9 ± 3,13 ^а	32,6 ± 2,20 ^а	119 ± 12,2 ^б	661 ± 67,3
14 GDEE 56 ммоль/кг в/ж 20 мин	5-9	50,2 ± 4,67 ^б	288 ± 55,0 ^а	39,4 ± 3,34	34,5 ± 3,98	156 ± 15,0	705 ± 80,3
15. GSH 115 ммоль/кг в/ж 20 мин	5	54,9 ± 1,66 ^б	280 ± 29,6 ^а	32,0 ± 2,54	34,9 ± 1,60	165 ± 12,9	796 ± 81,9
16 OTC 450 ммоль/кг в/ж 20 мин	7	23,5 ± 1,51 ^а	123 ± 11,2 ^а	39,5 ± 1,77	36,2 ± 2,92	167 ± 11,2	463 ± 28,4

Примечание: Активность ферментов выражена в нмоль/мин на 1 мг белка. Остальные обозначения - как в таблице 1.

ГПО и ГТ могла ограничить повышение GSH в мозге. Как в опытных сериях, так и в контроле инъекции в/ж снижают t°. Малые дозы GDEE, GSH и OTC увеличивают концентрацию GSH в мозге (на 31-19%), но не изменяют толерантность к ИГМ, снижение t° и активность ГР и ГТ в обоих органах. GDEE и GSH повышают активность ГПО в мозге и печени, а OTC увеличивает GSH в печени.

Аккумуляция GSH в головном мозге при введении метаболических предшественников п/к происходит только в сериях с OTC и большой дозой GDEE, но как правило достигается при введении непосредственно в мозг намного меньших доз (в 29 раз для OTC и в 45 раз для GDEE). Последний вариант оптимален при изучении роли GSH головного мозга. Наоборот, для повышения концентрации GSH в печени целесообразно введение п/к. Введение OTC в мозг вызывает накопление GSH в печени, что не наблюдается через 2 ч после инъекции п/к. Введение в/ж малых доз GDEE и GSH увеличивает активность ГПО в мозге и печени, в то время как при введении п/к это проявляется при дозе GDEE в 150 раз большей. Эти факты подтверждают, что GSH мозга регулирует систему GSH печени. Значимое, но небольшое снижение t° и увеличение толерантности к ИГМ по сравнению с контролем наблюдалось лишь в части опытных серий (соответственно в 6 и 3 из 9). Только при введении большой дозы GDEE эти сдвиги были выраженными, но GSH мозга повышался лишь слегка. В то же время, более выраженное накопление GSH в мозге в сериях с введением предшественников в/ж не приводило к увеличению толерантности к ИГМ.

ГЛУТАТИОН И ТОЛЕРАНТНОСТЬ К ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

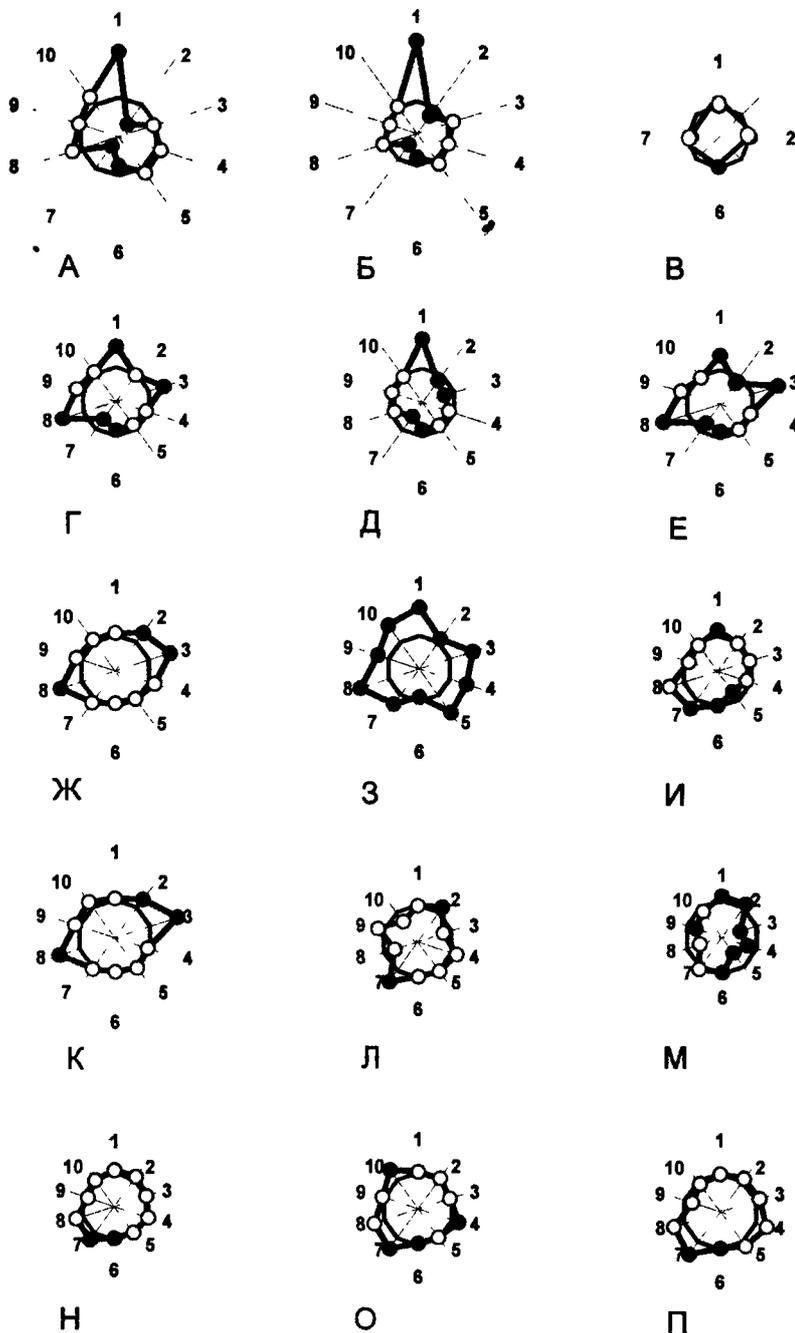


Рисунок 1.

Сдвиги биохимических и функциональных показателей при направленных изменениях концентрации глутатиона. А - диэтилмалеат 4 ммоль/кг в/б за 3 ч; Б - бутионинсульфоксимин (BSO) 0,54 ммоль/кг в/ж за 12 ч; В - BSO 0,54 ммоль/кг в/б за 12 ч; Г - BSO 0,25 ммоль/кг в/ж за 12 ч + диэтиловый эфир GSH (GDEE) 56 мкмоль/кг в/ж за 20 мин; Д - BSO 0,25 ммоль/кг в/ж за 12 ч; Е - BSO 0,25 ммоль/кг в/ж за 12 ч + GDEE 2,5 ммоль/кг п/к за 2 ч; Ж - GDEE 56 мкмоль/кг в/ж за 20 мин; З - GDEE 8,4 ммоль/кг п/к за 2 ч; И - GDEE 2,5 ммоль/кг п/к за 2 ч; К - GSH 115 мкмоль/кг в/ж за 20 мин; Л - L-2-оксотиазолидин-4-карбоксилат (ОТС) 450 мкмоль/кг в/ж за 20 мин; М - ОТС 13 ммоль/кг п/к за 2 ч; Н - *n*-пропиловый эфир GSH 2,62 ммоль/кг п/к за 2 ч; О - изопропиловый эфир GSH 2,62 ммоль/кг п/к за 2 ч; П - *n*-бутиловый эфир GSH 2,63 ммоль/кг п/к за 2 ч. 1 - гаспинг, 2 - 5 - система GSH в головном мозге, 6 - температура тела, 7- 10 - система GSH в печени; 2, 7 - концентрация GSH, 3, 8 - активность глутатионпероксидазы, 4, 9 - активность глутатионредуктазы, 5, 10 - активность глутатионтрансферазы ● - $p < 0,05$, ○ - $p > 0,05$.

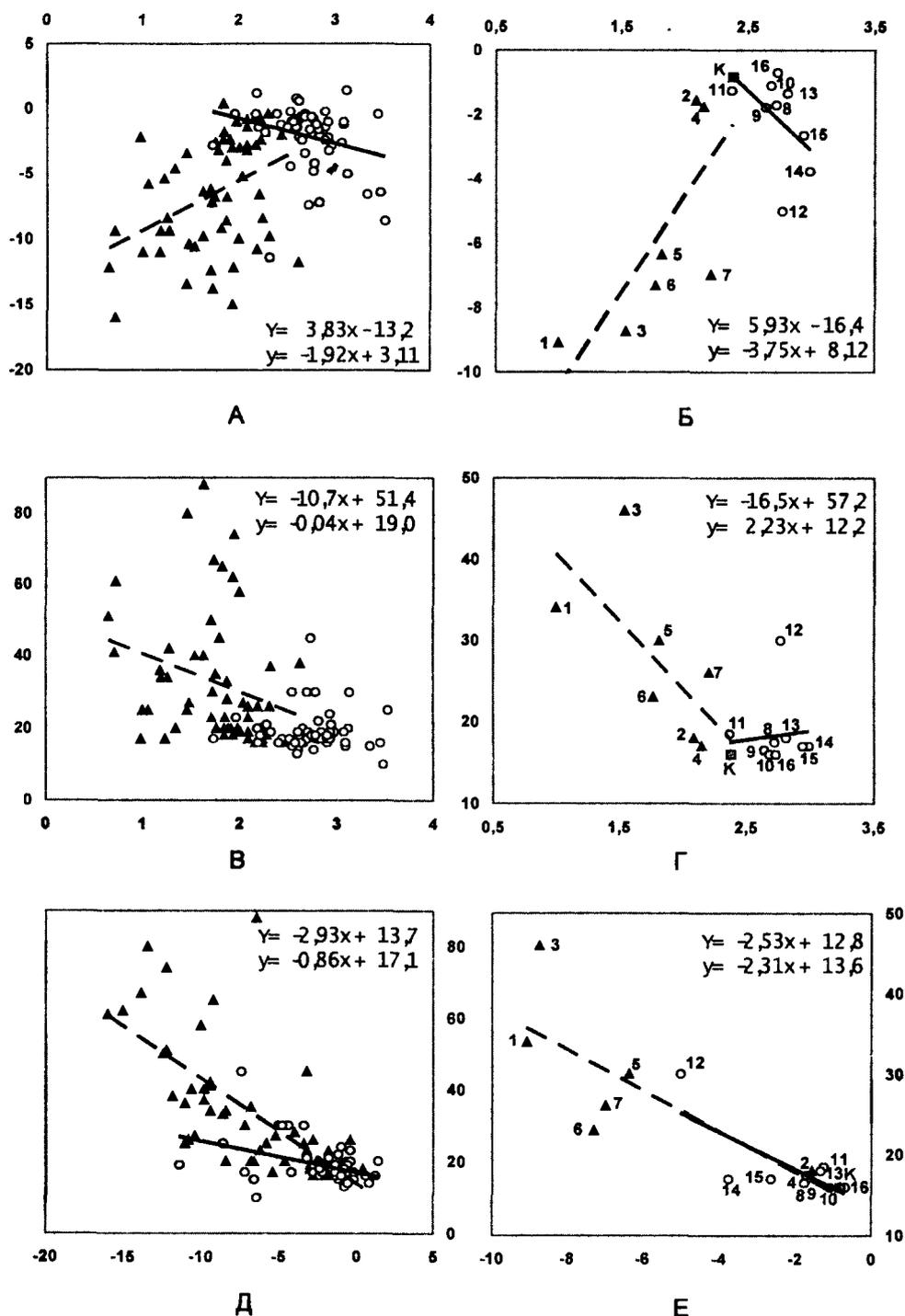


Рисунок 2

Регрессионный анализ концентрации GSH в мозге и печени - t° тела - толерантности к ишемии головного мозга. Здесь и на рисунке 3: А, В и Д - индивидуальные данные, Б, Г и Е - средние серии (числа у точек - №№ опытных серий в табл. 1-2, К - объединенный контроль); --- \blacktriangle --- точки и линия регрессии для деплеторов (верхнее уравнение), - \circ - точки и линия регрессии для предшественников GSH (нижнее уравнение). На А-Б - взаимосвязь изменения t° с концентрацией GSH (по осям - $^{\circ}\text{C}$ и $\mu\text{кмоль/г}$), на В-Г - взаимосвязь продолжительности гаспинга с GSH (по осям - сек. и $\mu\text{кмоль/г}$). На А-Г - по абсциссе - GSH мозга, на Д-Е - взаимосвязь продолжительности гаспинга с изменением t° (по осям - сек. и $^{\circ}\text{C}$).

ГЛУТАТИОН И ТОЛЕРАНТНОСТЬ К ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

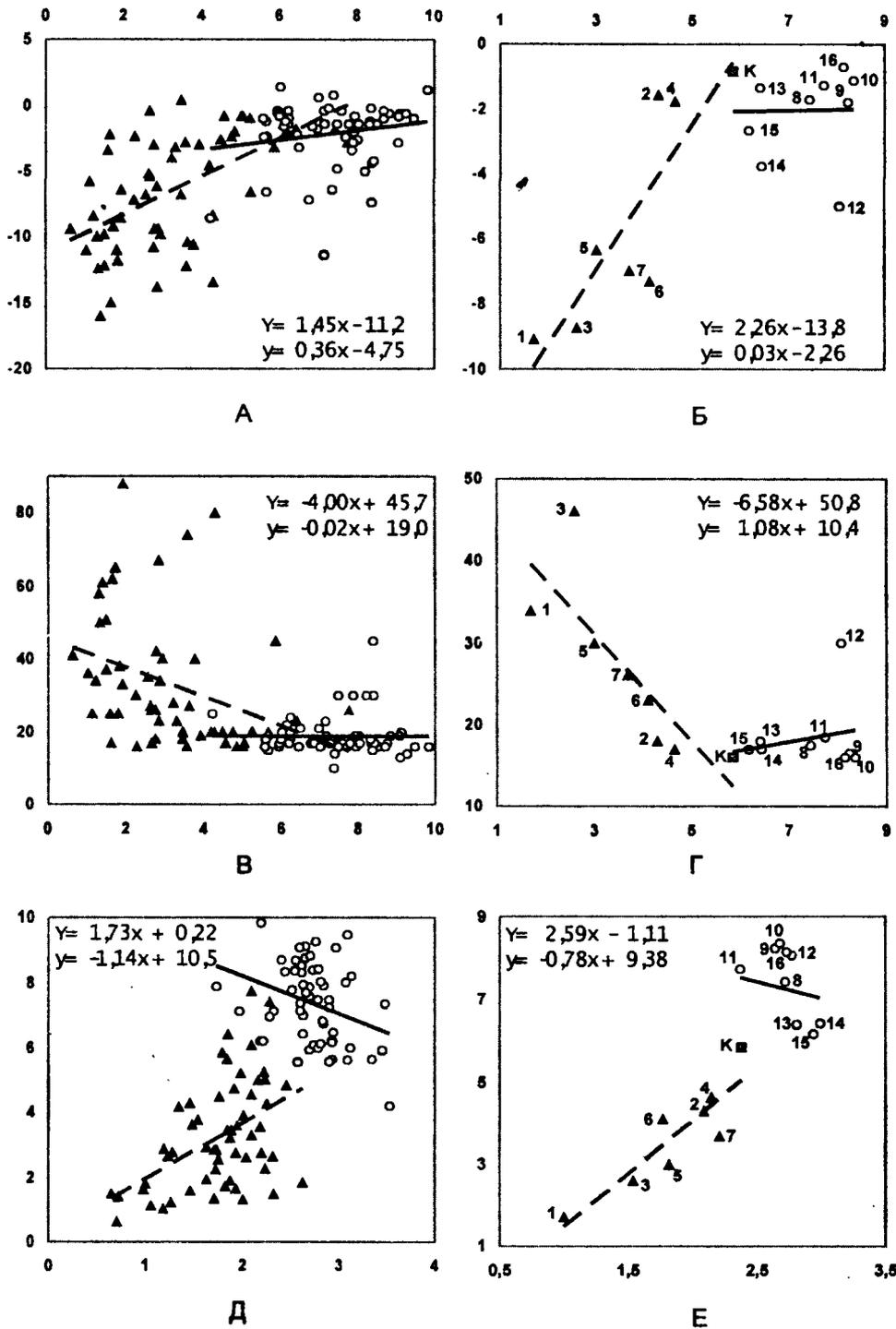


Рисунок 3.

Регрессионный анализ концентрации GSH в мозге и печени - то тела -толерантности к ишемии головного мозга.

На А-Г - по абсциссе - GSH печени, на Д-Е - взаимосвязь концентраций GSH в печени и головном мозге (по осям - мкмоль/г) Остальные примечания как на рисунке 2.

Таблица 3. Корреляция биохимических и функциональных показателей.

Показатели	По индивидуальным данным			
	GSH мозга	GSH печени	Изменение температуры тела (t° C)	Гаспинг
GSH мозга		+ 0,452 ^b - 0,298 ^a	+ 0,419 ^b - 0,300 ^a	- 0,395 ^b + 0,074
GSH печени	+ 0,810 ^a - 0,285		+ 0,556 ^b + 0,131	- 0,463 ^b - 0,118
Δt (C)	+ 0,833 ^a - 0,612	+ 0,881 ^b + 0,018		- 0,788 ^b - 0,330 ^a
Гаспинг	- 0,786 ^a + 0,209	- 0,976 ^b - 0,136	- 0,857 ^b - 0,579	
	По средним			

Примечание: В каждой ячейке в первой строке r_s для деплеторов (7 опытных серий, 56 мышей); во - второй строке - r_s для метаболических предшественников GSH (9 опытных серий, n=57)

Корреляционный анализ (табл. 3) эффектов деплеторов показал наличие тесных взаимосвязей как между средними величинами серий ($p < 0,05-0,01$), так и индивидуальными значениями (в большинстве случаев $p < 0,001$) всех четырех изученных показателей: положительных между концентрациями GSH в мозге и в печени и температурой тела и отрицательных корреляций между этими тремя показателями и толерантностью к ишемии. По индивидуальным данным толерантность к ИГМ наиболее тесно коррелирует с t° . Коэффициент множественной корреляции R, характеризующий зависимость толерантности к ИГМ от совместного влияния концентрации GSH в мозге и t° , по средним серий равен 0,867 (сила влияния $B = 0,752$), по индивидуальным данным - 0,791 ($B = 0,626$). Последний R значимо выше, чем отдельное влияние гипотермии при постоянном уровне GSH и чем влияние GSH при постоянной t° (частные r равны соответственно 0,495 и 0,415, при их сравнении с R $p < 0,05$; при сравнении влияния гипотермии и GSH между собой $p > 0,6$). Это говорит о совместном влиянии указанных показателей на толерантность к ИГМ. В отличие от деплеторов, для эффектов предшественников GSH корреляция была значимой лишь в 3 парах из 12, при этом r_s обычно были малы и часто даже противоположны по знаку r_s для эффектов деплеторов. Значимым ($p < 0,05$), но низким было и значение $R = 0,331$ ($B = 0,110$) по индивидуальным данным. Наглядно это было выявлено при регрессионном анализе (рис. 2-3). Очевидно, что как средние значения 17 серий, так и индивидуальные данные всех мышей могут быть представлены двумя линиями регрессии с разными наклонами и даже направленностью. При этом уравнения регрессии по индивидуальным данным и по средним величинам не отличаются ($p > 0,5-0,9$). Более того, при дисперсионном анализе линии регрессии по деплеторам и по предшественникам в 11 парах из 12 отличаются друг от друга ($p < 0,05 - 0, 0,001$).

В настоящее время популярна гипотеза, что антиоксидантное действие GSH определяет его исключительно защитную роль при ИГМ [2]. В пользу этого в основном говорят данные, полученные на моделях с сочетанием ИГМ с последующей реперфузией. Так, в этом случае трансгенот ГПО с ее сверхэкспрессией дает защитный эффект [19]. Однако установленная нами при полной глобальной ИГМ закономерная связь повышенной толерантности не с аккумуляцией, а со снижением концентрации GSH противоречит этой гипотезе. Прежде всего, отметим, что основная причина накопления активных форм кислорода (АФК) при ИГМ - не сама ишемия, а последующая реперфузия [7, 8, 20], которой нет в нашей модели. С другой стороны, деплеторы GSH защищают мозг, хотя они - выраженные проксиданты, вызывающие значительное накопление

ГЛУТАТИОН И ТОЛЕРАНТНОСТЬ К ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

АФК [4]. Возможны следующие причины нейропротекторного эффекта снижения уровня GSH. Глутатион - потенциальный резерв нейротоксичных аминокислот глутамата и цистеина, которые при ИГМ участвуют в повреждении нейронов [2, 21, 22], а DEM уменьшает освобождение глутамата при ишемии [23]. При ИГМ концентрация внеклеточного GSH возрастает, что увеличивает ишемическое повреждение нейронов и эксайтотоксичность [6]. Последний эффект - частный случай новых функций внеклеточного GSH - нейромодуляторной (изменение активности глутаматных рецепторов) и нейротрансмиттерной, реализуемой через собственные рецепторные сайты [2, 5]. Пока неясно, имеют ли выявленные факты общее значение или особенно характерны именно для полной глобальной ИГМ. Но очевидно, что в действии GSH есть два противоположных эффекта: как уменьшающий, так и увеличивающий ишемическое повреждение головного мозга.

Другой важный эффект снижения концентрации GSH - выраженное снижение t° с тесной корреляцией этих параметров. Хорошо известно, что гипотермия значительно увеличивает толерантность к ишемии [24, 25]. Вероятно, увеличение толерантности при снижении GSH реализуется как прямо, так и вторично по отношению к падению t° . О значении последнего свидетельствует то, что по индивидуальным данным корреляция толерантности к ИГМ с t° является наиболее тесной. Взаимосвязь гипотермии со снижением концентрации GSH представляет и самостоятельный интерес для механизмов терморегуляции.

Таким образом, влияние деплеторов и метаболических предшественников GSH на изученные показатели является совершенно различным: деплеторы закономерно и выражено снижают температуру тела и увеличивают толерантность к ИГМ в тесной корреляции со степенью снижения концентрации GSH в мозге или печени, предшественники же увеличивают уровни GSH, но мало или не влияют на температуру тела и толерантность к ИГМ, а корреляция этих показателей с концентрациями GSH слаба или отсутствует. Очевидно, толерантность к полной глобальной ИГМ связана со снижением концентрации GSH, а не с его аккумуляцией; более того, последняя не оказывает закономерного влияния. Это полностью относится и к t° . Наше заключение подкрепляется тем, что обе группы биохимических анализаторов включают несколько (от 2 до 6) разных по химической структуре и механизмам действия веществ, но их эффекты внутри группы качественно не отличаются. Очевидно, при разных формах ИГМ (с наличием и отсутствием реперфузии и др.) может преобладать один из двух противоположных эффектов GSH - сенситизирующий или защитный. Под влиянием сдвигов GSH изученные функциональные показатели изменяются по-разному, но каждый из них только в одну сторону: температура тела снижается, а толерантность мозга увеличивается, противоположные изменения отсутствуют (однаправленная регуляция).

ЛИТЕРАТУРА

1. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. (1990) Успехи соврем. биологии, **110**, № 1(4), 20-33.
2. Dringen R. (2000) Progress in Neurobiology, **62**, 649-671.
3. Moran L.K., Gutteridge J.M., Quinlan G.J. (2001) Curr. Med. Chem., **8**, 763-772.
4. Casey W., Anderson S., Fox T., Dold K., Colton H., Morgan K. (2002) Physiol. Genomics, **8**, 115-122.
5. Oja S.S., Janaky R., Varga V., Saransaary P. (2000) Neurochem. Int., **37**, 299-306.
6. Regan R.F., Guo Y. (1999) Neuroscience, **91**, 463-470.
7. Болдырев А.А. (1995) Биохимия, **60**, 1536-1542; (2001) Соросовский образовательный журнал, № 4, 21-28.

8. *Park E.M., Choi J.H., Park J.S., Han M.Y., Park J.M.* (2000) *Brain Res. Protoc.*, **6**, 25-32.
9. *Mizui T., Kinouchi H., Chan P.H.* (1992) *Am. J. Physiol.*, **262**, H313- H317.
10. *Vanella A., Di Giacomo C., Sorrenti V., Russo A., Castorina C., Campisi A., Renis M., Perez-Polo J.R.* (1993) *Neurochem. Res.*, **18**, 1337-1340.
11. *Yamamoto M., Sakamoto N., Iwai A., Yatsugi S., Hidaka K., Noguchi K., Yuasa T.* (1993) *Res. Communications in Chem. Pathol. Pharmacol.*, **81**, 221-232.
12. *Panigrashi M., Sadguna Y., Shivakumar B.R., Kolluri S.V., Roy S., Packer L., Ravindranath V.* (1996) *Brain Res.*, **717**, 184-188.
13. *Колесниченко Л.С., Кулинский В.И., Сотникова Г.В., Ковтун В.Ю.* (2003) *Биохимия*, **68**, 656-663.
14. *Anderson M.E.* (1997) *Adv. Pharmacol.*, **38**, 65-78.
15. *Кулинский В.И., Усов Л.А., Суфианова Г.З., Лидак М.Ю., Юркевич А.М.* (1993) *Эксп. клин. фармакол.*, **56**, (6), 3-16.
16. *Закс Л.* (1976) *Статистическое оценивание. Статистика*, М.
17. *Кулинский В.И., Колесниченко Л.С.* (1990) *Успехи биологической химии*, **31**, 157-179.
18. *Griffith O.W.* (1999) *Free Radicals Biol. Med.*, **27**, 922-935.
19. *Ishibashi N., Prokopenko O., Reuhl K.R., Mirochnitchenko O.* (2002) *J. Immunol.*, **168**, 1926-1933.
20. *Ravindranath V.* (1994) *Methods in Enzymology*, **233**, 610-619.
21. *Lipton P.* (1999) *Physiol. Rev.*, **79**, 1431-1568.
22. *Nishezawa Y.* (2001) *Life Science*, **69**, 369-381.
23. *Jang C.S., Lin N.N., Liu L., Tsai P.J., Kuo J.S.* (1995) *Brain Res.*, **698**, 237-240.
24. *Maher J., Hachinski V.* (1993) *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.*, **5**, 277-300.
25. *Кулинский В.И.* (2000) *Вестник РАМН*, № 9, 39-43.

Поступила 15.07.2002

THE CORRELATION OF TOLERANCE TO CEREBRAL ISCHEMIA AND BODY TEMPERATURE WITH GLUTATHIONE CONCENTRATION

V.I. Kulinsky¹, L.S. Kolesnichenko², V.Yu. Kovtun³, G.V. Sotnikova⁴

Departments of ¹Biochemistry and ²Bioinorganic and Bioorganic Chemistry, Irkutsk State Medical University; fax: (395)224-0826, e-mail: kulinsky@pp.irkutsk.ru
³SPC "Pharmprotection", Moscow;

⁴ Department of Physicochemical Biology, Irkutsk State Medical University, Russia;

Methodic approaches for the purposeful changes of glutathione concentration in the brain and liver by administration of glutathione depletors and prodrugs have been modified. Two different depletors (diethylmaleate and buthionine sulfoximine) cause considerable increase of tolerance to the complete global cerebral ischemia and hypothermia development which correlate closely with the decrease of GSH concentration. Five GSH prodrugs (GSH esters and oxothiazolidine carboxilate) and GSH itself usually decrease slightly body temperature but do not influence tolerance to ischemia in the most of series. The increase of tolerance to the complete global cerebral ischemia is connected not with GSH accumulation, but with its decrease. Evidently one of the two opposite GSH effects, sensitizing or protecting one, can predominate in different forms of cerebral ischemia.

Key words: GSH system, GSH depletors and prodrugs, cerebral ischemia, body temperature.