

УДК 577.17:615.21:616.831-005.4  
©Коллектив авторов

## БИОХИМИКО-ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ГИПОКСИЧЕСКОГО ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА МЫШЕЙ

*В.И. Кулинский<sup>1</sup>, Т.В. Гаврилина<sup>1</sup>, Л.Н. Минакина<sup>2</sup>, В.Ю. Ковтун<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>Кафедры биохимии и

<sup>2</sup>фармакологии Иркутского государственного медицинского университета;  
факс: (395) 224-0826, эл. почта: kulinsky@pp.irkutsk.ru

<sup>3</sup>НПЦ “Фармзащита”, Москва

Различные виды гипоксического preconditionирования (гипоксическая, циркуляторная, гемическая и тканевая гипоксии) головного мозга в ранние сроки (часы) увеличивают его толерантность к полной глобальной ишемии. Биохимико-фармакологический анализ с использованием селективных агонистов и антагонистов показал значение аденозиновых A<sub>1</sub>-рецепторов и K<sup>+</sup><sub>АТР</sub>-каналов в механизмах этого нейропротекторного эффекта и естественной толерантности. Предложена схема исследованных механизмов разных видов гипоксического preconditionирования.

**Ключевые слова:** гипоксическое preconditionирование, ишемия мозга, A<sub>1</sub>-рецепторы, K<sup>+</sup><sub>АТР</sub>-каналы.

**ВВЕДЕНИЕ.** Preconditionирование (ПК) – это предварительное умеренное воздействие, увеличивающее толерантность к сильному и опасному фактору. Для повышения толерантности к ишемии применяют разные виды ПК, из которых наиболее изучено ишемическое ПК сердца [1] и в меньшей степени, особенно для головного мозга, гипоксическое ПК (ГПК). Последнее мы определяем как повышение ишемической толерантности разными видами гипоксии [2]. Из его механизмов в раннюю фазу ПК (часы) было показано только значение освобождения эндогенного аденозина и активации его A<sub>1</sub>-рецепторов при гипоксической гипоксии [3, 4]. Пока нет сравнительной характеристики механизмов действия разных форм ГПК. При всех видах ПК обычно отмечают недостаточную ясность включающихся механизмов [1, 5].

Целью работы было исследование биохимико-фармакологических механизмов ранней фазы ПК, вызванного различными типами гипоксии. Для этого мы использовали два независимых метода: а) сравнение нейропротекторного эффекта (НПЭ) ГПК с действием А-агонистов и активаторов K<sup>+</sup><sub>АТР</sub>-каналов, б) блокаторный анализ с помощью антагонистов.

**МЕТОДИКА.** Работа выполнена на 684 мышцах обоего пола в возрасте 2-5 месяцев. Для создания гипоксической гипоксии применяли экспозицию в гермокамере объемом 100 мл. Режим ПК включал 4 повтора длительностью 12 минут с перерывами по 10 минут и без интервала перед полной ишемией [4]. Циркуляторную гипоксию моделировали кровопусканием. У фиксированных мышей при помощи пункции сердца забирали кровь в количестве 1,6% от массы тела. Для всех веществ были подобраны оптимальные условия введения (указаны

## МЕХАНИЗМЫ ГИПОКСИЧЕСКОГО ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ

в таблице и на рисунках). Три варианта гемической гипоксии вызывали подкожным введением  $\text{NaNO}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$  и  $\text{NiCl}_2$ . Ингибитор СДГ малонат использовали в виде синтезированной нами дикалиевой ( $\text{K}_2$ -малонат) соли. С целью фармакологического ПК применяли агонисты аденозиновых рецепторов аденозин и  $\text{A}_1$ -агонист  $\text{N}^6$ -циклопентиладенозин (CPA) и активаторы  $\text{K}^+$ <sub>АТР</sub>-каналов диазоксид, пинацидил и P1075. Для блокаторного анализа использовали антагонисты аденозиновых рецепторов теofilлин и 8-циклопентил-1,3-дипропилксантин (DPCPX) и блокаторы  $\text{K}^+$ <sub>АТР</sub>-каналов глибенкламид и 5-гидроксидеканоат (5-HD). CPA, DPCPX и диазоксид были приобретены у фирмы “Sigma” - RBI (США), глибенкламид, пинацидил и P 1075 – у “Tocris” (Великобритания), 5-HD – у “ICN” (США). Большинство веществ вводили в виде водных растворов. DPCPX растворяли в 0,5 мл 0,1 н раствора NaOH, а затем доводили дистиллированной водой до нужного объема. Плохо растворимые глибенкламид, диазоксид, пинацидил и P1075 суспензировали в Твин 80 (2% от общего объема раствора) и доводили до 100% дистиллированной водой. Контролем служило введение растворителя или экспозиция в камере при свободном доступе воздуха. Ввиду полной идентичности данных и отсутствия значимых различий контрольные группы были объединены.

Использовали декапитационную модель полной глобальной ИГМ по Lowry [6] с измерением продолжительности гаспинга. Адекватность этой модели подтверждается высоким НПЭ ингибиторных нейротрансмиттеров [7], аналогичным данным при других вариантах ишемии [8]. Это наиболее жесткая модель ИГМ, на которой вазодилататоры неэффективны. Данные по гаспингу отличаются от нормального распределения, поэтому они были обработаны при помощи критерия U Манна-Уитни. Качественные показатели (частоты) сравнивали по критерию  $\chi^2$  и точному критерию Фишера. [9]. Описаны только значимые результаты.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Степень выраженности НПЭ изученных воздействий различна (таблица). Он максимален у селективного и мощного  $\text{A}_1$ -агониста CPA и гемической гипоксии, вызванной хлоридами кобальта и никеля (увеличение толерантности в среднем в 4 раза). Менее активны неселективный аденозин и  $\text{K}_2$ -малонат (почти в 2 раза), затем в нисходящем ряду гермокамерное ПК, кровопускание,  $\text{NaNO}_2$ , диазоксид, пинацидил и P1075. Несмотря на количественные различия, все шесть различных моделей гипоксического ПК, два агониста аденозиновых А-рецепторов и три активатора  $\text{K}^+$ <sub>АТР</sub>-каналов обладают качественно однотипным и значимым НПЭ.

*Таблица.* Влияние различных видов preconditionирования в оптимальных условиях на продолжительность гаспинга.

Вид preconditionирования	n	Доза, мг/кг	Длительность интервала перед ИГМ, ч	Продолжительность гаспинга, с		p к контролю
				медианы	D <sub>1</sub> -D <sub>9</sub>	
Контроль	82	-	0,25-24	16,0	15-18	—
Гермокамера	23	-	0	28,0	21-49	<0,002
Кровопускание	6	-	5	25,0	20-48	<0,002
$\text{CoCl}_2$ п/к	8	358	6	67,5	22-86	<<0,002
$\text{NiCl}_2$ п/к	10	236	7	66,5	48-85	<0,002
$\text{NaNO}_2$ п/к	11	2180	1,5	24,0	21-27	<<0,002
$\text{K}_2$ -малонат п/к	8	10000	2	29,5	20-45	<<0,002
Аденозин п/к	6	749	1	31,0	30-40	<0,002
CPA п/к	12	7,2	3	62,0	55-71	<<0,002
Диазоксид в/б	10	434	2	22,0	18-32	<<0,002
Пинацидил в/б	6	39,3	0,25	19,5	19-25	<0,002
P1075 в/б	6	43	0,25-6	18,5	17-20	<0,01

Примечание: п/к - подкожное введение, в/б - внутрибрюшинное.

Высокий НПЭ селективного  $A_1$ -агониста CPA согласуется с аккумуляцией эндогенного аденозина и активацией им  $A_1$ -рецепторов при ишемическом ПК, вызывающем увеличение толерантности к тяжелой ишемии [10]. Действие диазооксида связано с его селективностью к SUR 1 – наиболее распространенной в головном мозге (и в  $\beta$ -клетках поджелудочной железы) и наиболее метаболически активной регуляторной субъединицы  $K^+_{ATP}$ -каналов (SUR – рецептор сульфанилмочевины) [11]. Активация  $K^+_{ATP}$ -каналов ингибирует активность нейронов [1]. Однако диазоксид селективен к каналам митохондрий, и эта “избыточная” селективность, вероятно, ограничивает его активность, так как в полный НПЭ вовлекаются и каналы плазматической мембраны (см. ниже и [1]). Пинацидил действует на SUR 2A, характерный для миокарда и скелетных мышц, и SUR 2B (гладкие мышцы сосудов) [12], у P 1075 наибольшее сродство к SUR 2B [13], а на SUR 1 они оба не действуют или почти не действуют. Последнее объясняет минимальную защиту мозга этими двумя веществами.

Выяснение механизма действия ПК включает не только сравнение его НПЭ с активностью селективных агонистов, но и второй независимый подход – блокаторный анализ. Для этого изучено влияние на эффект ПК антагонистов аденозиновых рецепторов теofilлина и DPCPX и ингибиторов  $K^+_{ATP}$ -каналов глибенкламида и 5-HD.

Теofilлин и DPCPX при подкожном введении сами по себе уменьшают естественную толерантность к ишемии в среднем на 20-30% ( $p < 0,002$ ) и полностью предупреждают или резко (на 60-90%) снижают НПЭ как агонистов аденозиновых  $A$ -рецепторов аденозина и CPA, так и всех видов гипоксического ПК (рис. 1). Это означает, что естественная толерантность к ИГМ частично, а эффект гипоксического ПК целиком ( $NaNO_2$ ) или в основном ( $CoCl_2$ ,  $NiCl_2$ ,  $K_2$ -малонат, гермокамерная гипоксия) реализуется через эндогенный аденозин и аденозиновые рецепторы. Так как при использовании неселективного теofilлина и  $A_1$ -селективного DPCPX степень блокады близка или одинакова, НПЭ обусловлен рецепторами  $A_1$ -типа.

Глибенкламид, ингибитор  $K^+_{ATP}$ -каналов как плазматических мембран, так и митохондрий [1], снижает естественную толерантность к ИГМ на 31% при внутрибрюшинном и на 12% при интрацеребральном введении ( $p < 0,002$ ) (рис. 2). При обоих путях введения глибенкламид значительно уменьшает действие аденозина и CPA и резко или полностью блокирует НПЭ нитрита натрия,  $K_2$ -малоната и гермокамеры. Исключением является  $CoCl_2$ : его высокая активность на фоне глибенкламида совершенно не изменяется. Ингибитор  $K^+_{ATP}$ -каналов митохондрий 5-HD [1], введенный в желудочек мозга (но не подкожно), несколько уменьшает естественную толерантность к ИГМ ( $p < 0,002$ ), интрацеребровентрикулярно предупреждает НПЭ  $NaNO_2$ , подкожно значительно снижает активность гермокамерного ПК, при обоих путях введения слегка снижает или не влияет на эффект CPA. Эти данные показывают, что  $K^+_{ATP}$ -каналы участвуют в естественной толерантности, в НПЭ аденозина и CPA они играют значительную (опыты с глибенкламидом), а для ГПК (гермокамерного,  $NaNO_2$  и  $K_2$ -малоната) – основную роль. Это согласуется с собственным НПЭ диазооксида и его блокадой 5-HD [1]. Только НПЭ  $CoCl_2$  не связан с активацией  $K^+_{ATP}$ -каналов. Сравнение активности глибенкламида и 5-HD свидетельствует, что в естественной толерантности к ИГМ и в НПЭ аденозина и особенно CPA важнее каналы плазматических мембран, для  $NaNO_2$  – каналы митохондрий, а для гермокамерного ПК – скорее оба типа. Сравнение путей введения говорит о включении в НПЭ гипоксического ПК как периферических  $K^+_{ATP}$ -каналов, так и каналов головного мозга. Последние особенно важны для эффектов  $NaNO_2$  и гермокамерного ПК.

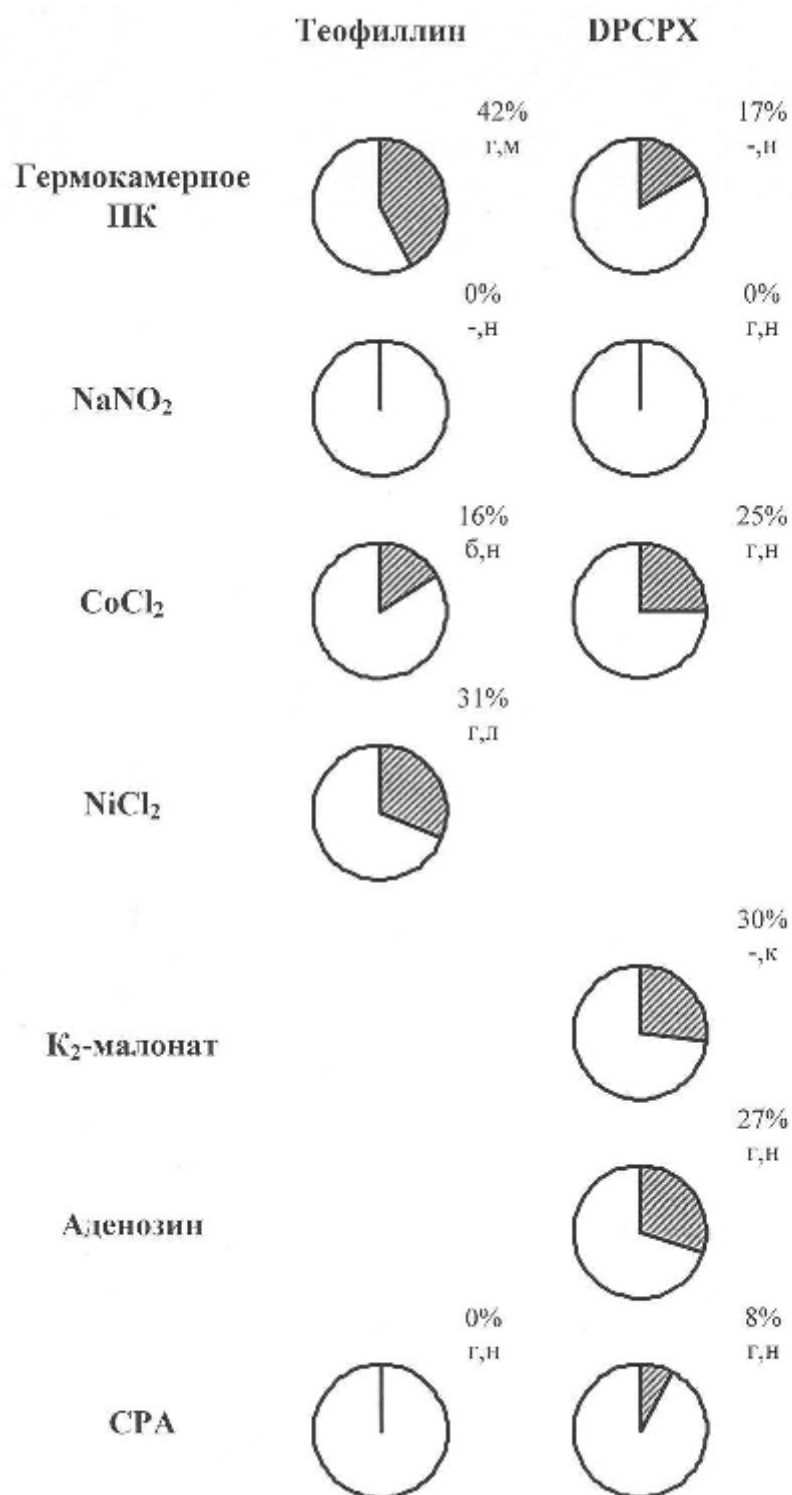


Рисунок 1.

Доля сохранившегося нейропротекторного эффекта preconditionирования в оптимальных условиях на фоне блокады А-рецепторов при парентеральном введении блокаторов. Теофиллин вводили в дозе 100-400 мкмоль/кг за 15 мин, DPCPX - в дозе 3,3 мкмоль/кг за 1 час до preconditionирования. Значимость различий с контролем - а -  $p < 0,1$ , б -  $p < 0,05$ , в -  $p < 0,01$ ; г -  $p < 0,002$ ; с preconditionированием - к -  $p < 0,1$ , л -  $p < 0,05$ , м -  $p < 0,01$ , н -  $p < 0,002$ .

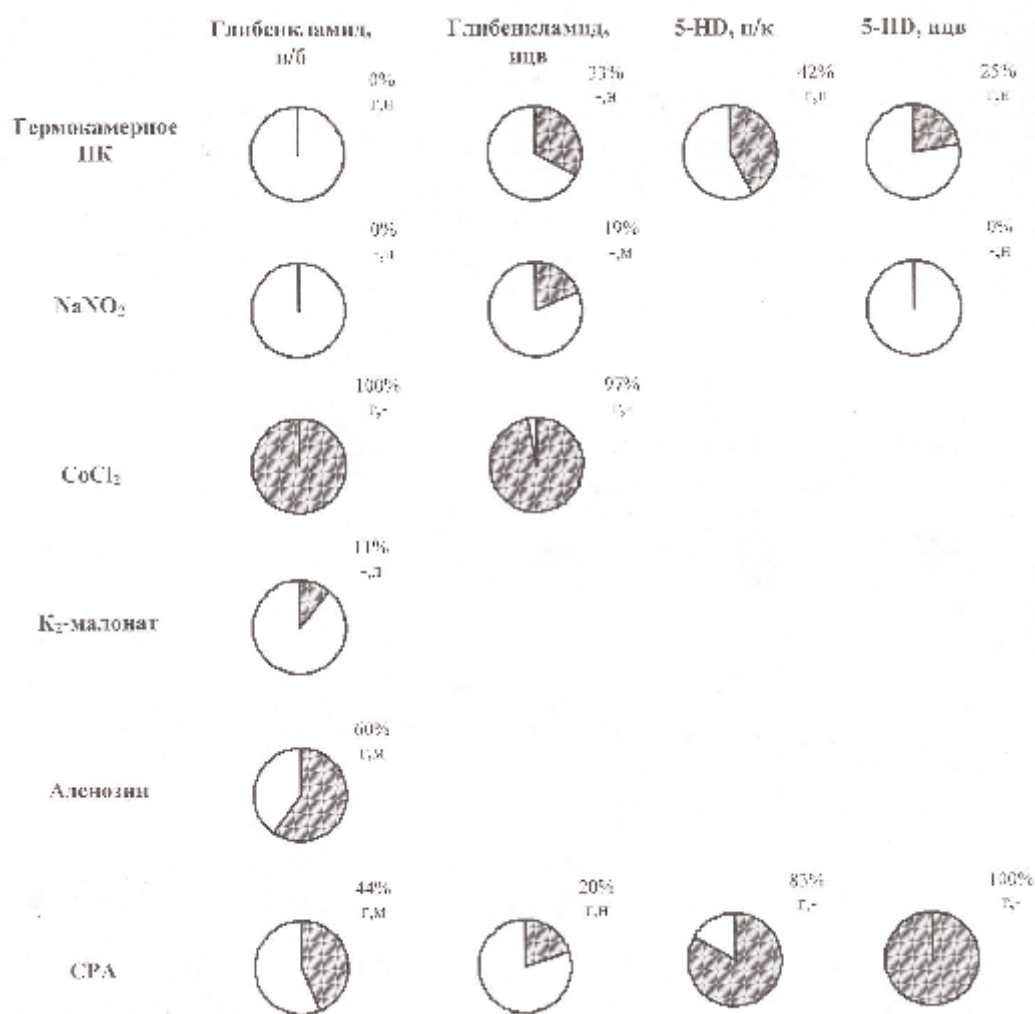


Рисунок 2.

Доля сохранившегося нейропротекторного эффекта preconditionирования в оптимальных условиях на фоне блокады  $K^+_{ATP}$ -каналов при интрацеребровентрикулярном и парентеральном введении блокаторов. Глибенкламид вводили в дозе 116 мкмоль/кг внутривенно (в/б) и 8,1 мкмоль/кг интрацеребровентрикулярно (ицв) за 1 час, 5-HD - в дозе 249 мкмоль/кг подкожно (п/к) за 30 мин и 0,079 мкмоль/кг интрацеребровентрикулярно за 15 мин до preconditionирования.

Значимость различий с контролем - а -  $p < 0,1$ , б -  $p < 0,05$ , в -  $p < 0,01$ ; г -  $p < 0,002$ ;

с preconditionированием - к -  $p < 0,1$ , л -  $p < 0,05$ , м -  $p < 0,01$ , н -  $p < 0,002$ .

В 4 сериях из 26 наблюдалось появление токсичности preconditionирующих воздействий на фоне высоких доз менее селективных антагонистов: NaNO<sub>2</sub> на фоне теофиллина 400 мкмоль/кг вызвал 75% смертность, K<sub>2</sub>-малонат на фоне глибенкламида 116 мкмоль/кг – 40%, гермокамерное ПК – 27% на фоне теофиллина и 13% на фоне глибенкламида. Это явление было значимым (по точному методу Фишера и по  $\chi^2$   $p < 0,05-0,01$ ). Смертность полностью отсутствовала при изолированном воздействии любого одного фактора, при использовании в комбинации меньшей дозы теофиллина – 100 мкмоль/кг и при применении более селективных антагонистов – DPCPX и 5-HD. Очевидно, А-рецепторы и  $K^+_{ATP}$ -каналы принимают участие в толерантности не только к ишемии, но и к гипоксии.

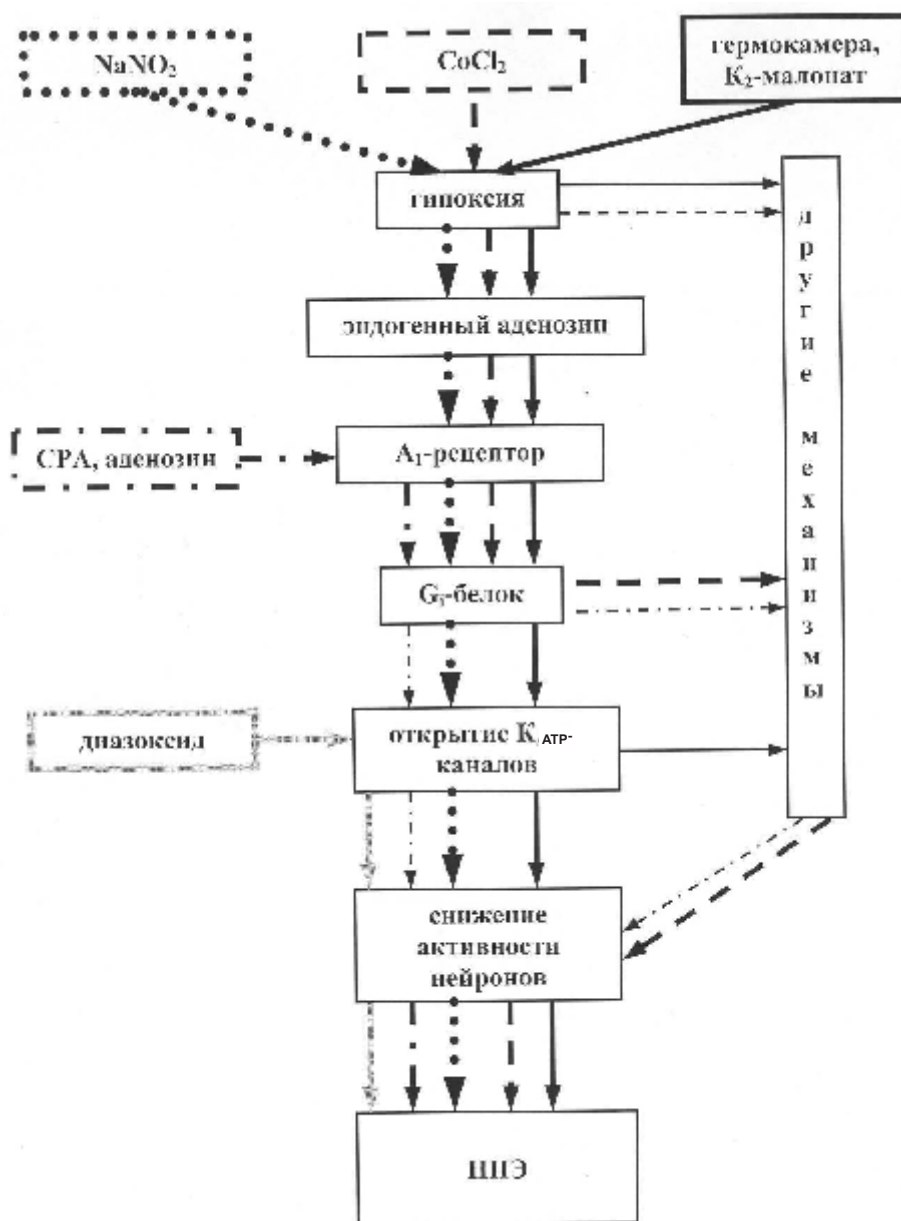


Рисунок 3.

Молекулярные механизмы нейропротекторного эффекта различных видов preconditionирования (обобщающая схема).

Результаты нашего биохимико-фармакологического анализа согласуются с тем, что нокаут  $A_1$ -рецепторов [10] и  $K_{ATP}$ -каналов [1, 11] вызывают перевозбуждение нейронов и снижение толерантности к ишемии и гипоксии, а сверхэкспрессия этих каналов оказывает противоположные эффекты [11].

В то же время очевидно, что эти механизмы не исчерпывают пути реализации НПЭ, которые могут включать промежуточные и/или альтернативные реакции и вещества: активные формы  $O_2$ , гормоны,  $G_i$ -белки,  $NO$ , другие каналы, циклазы, различные протеин- и тирозинкиназы и, особенно для поздней фазы ПК (несколько суток), транскрипционные факторы (HIF – фактор, индуцируемый гипоксией, NF- $\kappa$ B и др.) [1, 5]. Это означает, что развитие ПК вовлекает те же сигнал-трансдукторные системы, которые реализуют действие гормонов и других внеклеточных сигналов [14].



От ранней фазы ПК значительно отличается поздняя, для которой характерны активация транскрипции и синтеза белка [5]. Геночип (GeneChip)-анализ показал индукцию 40 предполагаемых нейропротекторных транскриптов через 3-72 ч после ПК, включая белки теплового шока, гемоксигеназы, металлотионеины, медиаторы сигнал-трансдукции, транскрипционные факторы, ионные каналы и транскрипты, связанные с апоптозом и пластичностью [15].

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ.** Несмотря на различные патогенетические механизмы четырех основных видов гипоксии, все они вызывают ГПК и обладают качественно однотипным НПЭ. Последний характерен и для агонистов аденозиновых  $A_1$ -рецепторов и активаторов  $K^+$ <sub>АТР</sub>-каналов. Блокаторный анализ показал, что НПЭ разных видов гипоксического ПК в значительной мере, а иногда даже полностью ( $NaNO_2$ ) реализуются  $A_1$ -рецепторами и (в меньшей степени)  $K^+$ <sub>АТР</sub>-каналами. Последние не участвуют в ГПК с  $CoCl_2$ . В целом механизмы ГПК близки к механизмам ишемического ПК.

Все это привело нас к общей схеме действия исследованных видов ГПК и вовлеченных в него структур (рис. 3). Она показывает, что механизмы развития НПЭ в ранней фазе ГПК включают одни и те же основные звенья: высвобождение эндогенного аденозина, активация им  $A_1$ -рецепторов, открытие через  $G_i$ -белок  $K^+$ <sub>АТР</sub>-каналов и снижение активности нейронов (последнее – важный компонент толерантной стратегии организма [8]). Для всех описанных нами видов ГПК, кроме  $NaNO_2$ , часть их НПЭ не может быть объяснена за счет вовлечения  $A$ -рецепторов и  $K^+$ <sub>АТР</sub>-каналов (“другие механизмы”, рис. 3). Особенно это относится к высокому НПЭ  $CoCl_2$ .

## ЛИТЕРАТУРА

1. Gross J.I., Peart J.N. (2003) Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., **285**, H921-H930.
2. Kulinsky V.I., Gavrilina T.V., Minakina L.N. (2004) G-Protein Coupled Receptors, London, Brochure, IBC, Life Sci., Informa.
3. Zhang W.I., Lu G.W. (1999) Biol. Signals Recept., **8**, 275-280.
4. Кулинский В.И., Минакина Л.Н., Гаврилина Т.В. (2002) Бюл. эксп. биол. мед., **133**, 202-204.
5. Sharp F.R., Ran R., Lu A., Tang Y., Strauss K.I., Glass T., Ardizzone T., Bernaudin M. (2004) Neurorx, **1**, 26-35.
6. Lowry O.H., Pasoneau J.V., Hasselberger F.X., Schulz D.W. (1964) J. Biol. Chem., **239**, 18-30.
7. Кулинский В.И. (2000) Вестник РАМН, № 9, 39-43.
8. Green A.R., Gross A.J. (Eds) (1997) Neuroprotective agents and cerebral ischemia Int. Rev. Neurobiol., **40**.
9. Закс Л. (1976) Статистическое оценивание, Статистика, М.
10. Pearson T., Currie A.J., Etherington L.-A., Cadalla A.E., Damian K., Llaudet E., Dale N., Frenguelli B.G. (2003) J. Cell Mol. Med., **7**, 362-375.
11. Yamada K., Inagaki N. (2002) News Physiol. Sci., **17**, 127-130.
12. Gribble F.M., Reimann F., Ashfield R., Ashroft F.M. (2000) Mol. Pharmacol., **57**, 1256-1261.
13. Felsch H., Lange U., Hambrock A., Loffler-Walz C., Russ U., Carroli W.A., Gopalakrishnan M., Quast U. (2004) Br. J. Pharmacol., **141**, 1098-1105.
14. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. (2005) Биохимия, **70**, 33-50, 476-492.
15. Dhodda V.K., Sailor K.A., Bowen K.K., Vemuganti R. J. (2004) Neurochem., **89**, 73-89.

Поступила: 11. 03. 2005.

**BIOCHEMICO-PHARMACOLOGICAL MECHANISMS OF DIFFERENT TYPES OF HYPOXIC PRECONDITIONING IN CEREBRAL ISCHEMIA IN MICE**

*V.I. Kulinsky<sup>1</sup>, T.V. Gavrilina<sup>1</sup>, L.N. Minakina<sup>2</sup>, V.Yu. Kovtun<sup>3</sup>*

Departments of Biochemistry<sup>1</sup> and Pharmacology<sup>2</sup>, Irkutsk State Medical University,  
PO Box 2556, Irkutsk, 664047; fax: (395)224-0826, e-mail: kulinsky@pp.irkutsk.ru

<sup>3</sup>SPC Pharmprotection<sup>3</sup>, Moscow

Different types of hypoxic preconditioning (hypoxic, circulatory, hemic and tissue hypoxia) increase the tolerance to complete global cerebral ischemia at early terms (hours). Biochemico-pharmacological analysis with the use of selective agonists and antagonists showed the importance of adenosine A<sub>1</sub>-receptors and K<sup>+</sup><sub>ATP</sub>-channels in the mechanisms of the neuroprotective effect and natural tolerance. The general scheme of the investigated mechanisms of different types of hypoxic preconditioning has been proposed.

**Key words:** hypoxic preconditioning, cerebral ischemia, A<sub>1</sub>-receptor, K<sup>+</sup><sub>ATP</sub>-channel.