

УДК: 615.357:616.133-007.272



ОЦЕНКА ПЕРСПЕКТИВНОСТИ ИНГИБИРОВАНИЯ АВСВ1-БЕЛКА В ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОМ БАРЬЕРЕ КАК МЕТОДА ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФАРМАКОТЕРАПИИ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

И.В. Черных, А.В. Шулькин, М.В. Гацанога, Е.Н. Якушева

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
390026, Россия, г. Рязань, ул. Высоковольтная, д. 9

E-mail: ivchernykh88@mail.ru

Получена 09.11.2021

После рецензирования 20.01.2022

Принята к печати 01.02.2022

Цель. Оценка ингибирования ABCB1-белка в гематоэнцефалическом барьере с целью повышения эффективности нейропротекторной терапии фокальной и глобальной церебральной ишемии.

Материалы и методы. Работа выполнена на 103 крысах-самцах линии Вистар. На 1-й группе (n=33) анализировали нейропротекторную активность субстрата ABCB1-белка – нимодипина (0,4 мг/кг) по снижению площади некроза головного мозга после 1-часовой окклюзии средней мозговой артерии с 24-часовой реперфузией (фокальная ишемия). На 2-й группе (n=60) эффективность нимодипина анализировали по снижению летальности крыс и уровня неврологического дефицита (НД) на фоне билатеральной окклюзии общих сонных артерий (глобальная ишемия). В обеих группах нимодипин использовался отдельно или в сочетании с ингибитором ABCB1-белка – омепразолом (17,6 мг/кг). Препараты вводились внутривенно.

Результаты. Введение нимодипина 1-й группе привело к сокращению очага некроза на 28% по сравнению с серией контроля. Омепразол не вызвал изменения площади некроза. Комбинация препаратов вызвала снижение площади некроза по отношению к контролю на 29%, в сравнении с серией нимодипина различий не было. Нимодипин сокращал летальность крыс 2-й группы на фоне патологии (тенденция). Омепразол не изменял летальность. Комбинация препаратов снижала летальность по сравнению с сериями контроля и нимодипина. Введение омепразола не сокращало балл неврологического дефицита относительно контроля. В серии нимодипина НД был ниже контроля через 24 ч. на 88%. При введении комбинации препаратов данный показатель снижался по отношению к контролю через 4, 12, 24, 48 и 72 ч. на 88%, 80%, 88%, 87% и 86%, а по отношению к серии нимодипина через 4 и 48 ч – на 60% и 67%.

Заключение. Ингибирование ABCB1-белка является перспективным для повышения эффективности нейропротекторной терапии глобальной ишемии, но не фокальной ишемии мозга.

Ключевые слова: ABCB1-белок; окклюзия-реперфузия средней мозговой артерии; билатеральная окклюзия общих сонных артерий; нимодипин; омепразол

Список сокращений: ГЭБ – гематоэнцефалический барьер; ТТХ – трифенилтетразолия хлорид; АТФ – аденозинтрифосфат; CREB – белок, связывающийся с цАМФ-зависимым элементом; АКТ – внутриклеточный фермент протеинкиназа В; IC₅₀ – концентрация полумаксимального ингибирования.

EVALUATION OF ABCB1-PROTEIN INHIBITION PROSPECTIVENESS IN HEMATOENCEPHALIC BARRIER AS METHOD FOR INCREASING EFFICIENCY OF PHARMACOTHERAPY IN CEREBRAL ISCHEMIA

I.V. Chernykh, A.V. Shchulkin, M.V. Gatsanoga, E.N. Yakusheva

Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov
9, Vysokovoltnaya St., Ryazan, Russia, 390026

E-mail: ivchernykh88@mail.ru

Received 09 Nov 2021

After peer review 20 Jan 2022

Accepted 01 Feb 2022

Для цитирования: И.В. Черных, А.В. Шулькин, М.В. Гацанога, Е.Н. Якушева. Оценка перспективности ингибирования ABCB1-белка в гематоэнцефалическом барьере как метода повышения эффективности фармакотерапии церебральной ишемии. *Фармация и фармакология*. 2022;10(1):104-112. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-1-104-112

© И.В. Черных, А.В. Шулькин, М.В. Гацанога, Е.Н. Якушева, 2022

For citation: I.V. Chernykh, A.V. Shchulkin, M.V. Gatsanoga, E.N. Yakusheva. Evaluation of ABCB1-protein inhibition prospectiveness in hematoencephalic barrier as method for increasing efficiency of pharmacotherapy in cerebral ischemia. *Pharmacy & Pharmacology*. 2022;10(1):104-112. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-1-104-112

The aim of the article is to evaluate the ABCB1 protein inhibition in the blood-brain barrier to increase the effectiveness of neuroprotective therapy for focal and global cerebral ischemia.

Materials and methods. The work was performed on 103 male Wistar rats. In the 1st group (n=33), the neuroprotective activity of the ABCB1 protein substrate, nimodipine (0.4 mg/kg), was analyzed in terms of reducing the area of the brain necrosis after a 1-hour occlusion of the middle cerebral artery with a 24-hour reperfusion (focal ischemia). In the 2nd group (n=60), the effectiveness of nimodipine was analyzed by reducing the lethality of rats and the neurological deficit (ND) level against the background of the bilateral occlusion of the common carotid arteries (global ischemia). In both groups, nimodipine was used alone or in the combination with omeprazole, the ABCB1 protein inhibitor (17.6 mg/kg). The drugs were administered intravenously.

Results. The nimodipine administration to the 1st group led to the reduction of the necrosis focus by 28% compared with the control series. Omeprazole did not cause a change in the area of the necrosis. The combination of drugs caused a decrease in the area of the necrosis in relation to the control by 29%; there were no differences in comparison with the nimodipine series. Nimodipine reduced the rats' lethality in the 2nd group against the background of the pathology (a tendency). Omeprazole alone did not change the mortality. The drug combination reduced the mortality compared to the control and nimodipine series. The administration of omeprazole alone did not reduce the neurological deficit score relative to the control. In the nimodipine series, ND was 88% lower than the control, after 24 hours. With the administration of the drugs combination, this indicator decreased in relation to the control by 88%, 80%, 88%, 87% and 86% after 4, 12, 24, 48 and 72 hours, respectively, and in relation to the nimodipine series it decreased by 60% and 67% after 4 and 48 hours.

Conclusion. The ABCB1 protein inhibition is promising for increasing the effectiveness of neuroprotective therapy for global ischemia, but not for focal cerebral ischemia.

Keywords: ABCB1 protein; occlusion-reperfusion of the middle cerebral artery; bilateral occlusion of the common carotid arteries; nimodipine; omeprazole

Abbreviations: BBB – blood-brain barrier; TTC – triphenyltetrazolium chloride; ATP – adenosine triphosphate; creb – cAMP response element-binding; Akt – protein kinase B (intracellular protein kinase B enzyme); IC₅₀ – half-maximal (50%) inhibitory concentration.

ВВЕДЕНИЕ

Гликопротеин-P (ABCB1-белок, Pgp) является продуктом экспрессии гена MDR1, а также мембранным эффлюксным АТФ-зависимым белком-транспортером с широким спектром различных по химической структуре субстратов. В значительных количествах локализованный на билиарной поверхности гепатоцитов, в проксимальных канальцах почечных нефронов, в энтероцитах тонкого кишечника и в эндотелиоцитах гистогематических барьеров. Одна из ведущих функций ABCB1-белка в гематоэнцефалическом барьере (ГЭБ) заключается в препятствовании проникновению из крови в головной мозг липофильных эндогенных и экзогенных веществ-субстратов. Следует отметить, что функциональная активность ABCB1-белка может значительно варьировать на фоне различных воздействий, а именно воспалительный процесс, дефицит кислорода, окислительный стресс, прием пищевых продуктов и многих лекарственных средств [1].

Инсульт на сегодняшний день является лидирующей причиной нетрудоспособности взрослого населения и второй по значимости причиной смертности в мире. В 85% случаев встречается ишемическая разновидность инсульта. При этом применение тканевого активатора плазминогена, являющегося одним из немногих одобренных препаратов для восстановления кровотока, ограничено узким временным «терапевтическим окном» (4,5 ч). Таким образом, преимущественной терапевтической стратегией при инсульте является нейропротекция, т.е. сохранение жизнеспособности нейронов в зоне пенумбры [2].

Среди субстратов ABCB1-белка выделяют ряд лекарственных средств с доказанной или потенциальной нейропротекторной активностью: нимодипин, ингибиторы ацетилхолинэстеразы ривастигмин, донепезил, галантамин, антипсихотический препарат палиперидон и ряд других [3–5]. Неэффективность веществ данной фармакологической группы в клинических исследованиях, продемонстрированная зарубежными исследователями [6], возможно, является следствием их недостаточного транспорта через ГЭБ [7], например, из-за эффлюкса ABCB1-белком. Косвенным доказательством подобной теории является индукция активности и экспрессии транспортера на фоне кислородного дефицита – основного патогенетического звена церебральной ишемии, что выявлено в опытах *in vitro* и *in vivo* [8,9]. В связи с широким распространением ишемического инсульта и хронической церебральной ишемии в мире и, в частности, в России [10] изучение подобных патогенетических механизмов и попытка их преодоления не вызывает сомнений.

Анализ имеющихся научных данных позволил предположить перспективность фармакологического ингибирования ABCB1-белка в ГЭБ на фоне ишемии головного мозга с целью интенсификации доставки нейропротекторов в мозг и усиления их центральных эффектов. Избирательность снижения активности ABCB1-белка локально в барьере позволит минимизировать число фармакокинетических и фармакодинамических осложнений, связанных с важными функциями транспортера в контроле не только проникновения в головной мозг, но и энте-

ральной абсорбции и экскреции лекарственных веществ-субстратов [1].

ЦЕЛЬ. Оценка целесообразности ингибирования функциональной активности ABCB1-белка в ГЭБ с целью повышения эффективности фармакотерапии последствий фокальной и глобальной церебральной ишемии в эксперименте *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Лабораторные животные

Работа выполнена на 103 крысах-самцах линии Вистар массой 200–280 г. Манипуляции с животными проводились в соответствии с правилами лабораторной практики (Приказ Министерства здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 г. №199н. «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики»), а также с международными нормами (Руководство по содержанию и использованию животных, VIII изд.) в условиях операционной конвенционального вивария и одобрены комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных (протокол №7 от 03.04.2018) ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. Оперативные вмешательства осуществлялись на фоне интраперитонеального введения крысам препарата Золетил® 50 (МНН – тилетамин, золазепам; «Virbac», Франция) в дозе 10 мг/кг. Внутривенное введение лекарственных средств осуществляли в хвостовую вену крыс.

Дизайн эксперимента

Экспериментальные животные были разделены на 2 группы.

На первой группе (n=33) анализировалась возможность фармакологического ингибирования ABCB1-белка для повышения эффективности лечения нейропротекторными лекарственными средствами-субстратами транспортера фокальной церебральной ишемии – экспериментального аналога ишемического инсульта у человека [11]. Нейропротекторная активность оценивалась по снижению площади очага некроза на фоне ишемии-реперфузии головного мозга, которая моделировалась путем 60-минутной эндоваскулярной окклюзии средней мозговой артерии полипропиленовой нитью диаметром 4–0 (0,15–0,199 мм) совместно с перманентной перевязкой общей и наружной сонных артерий с последующей реканализацией. В процессе хирургических манипуляций и в течение 2 ч после них животные обогревались лампами для поддержания ректальной температуры на уровне 37°C. Через 24 ч после реперфузии животные выводились из эксперимента передозировкой золетила (30 мг/кг). Аналогичная модель широко используется в научных исследованиях [12, 13]. Крысы с летальным исходом в исследование не включались и в общем количестве не отражены.

Животные первой группы были разделены на 4

серии по 7 особей в каждой: 1-я серия – животные с ишемией-реперфузией с внутривенным введением физиологического раствора (1 мл/кг) в момент реперфузии средней мозговой артерии. Крысы 2-й серии подвергались ишемии-реперфузии с внутривенным введением субстрата ABCB1-белка – церебрального вазодилатора с нейропротекторной активностью – нимодипина («Нимотоп», Россия) в дозе 0,4 мг/кг массы тела животного (раствор 0,4 мг/мл – 1 мл/кг) [14] в момент реперфузии. Нейропротекторная активность нимодипина, независимо от типа клеток, показана в многочисленных исследованиях как *in vitro*, так и *in vivo*. По последним данным основная роль отводится предотвращению стресс-индуцированного апоптоза за счет снижения активности каспазы-3 и 7, а также активации транскрипционного фактора – протеина, связывающегося с цАМФ-ответственным элементом (CREB) и внутриклеточного фермента протеинкиназы В (АКТ) сигнальных путей [15]. Животные 3-й экспериментальной серии – это крысы с ишемией-реперфузией с внутривенным введением ингибитора ABCB1-белка в ГЭБ, омепразола («Омез», Россия) в дозе 17,6 мг/кг массы (раствор 17,6 мг/мл – 1 мл/кг) [16, 17] в момент реперфузии; 4-я серия – животные с ишемией-реперфузией с введением нимодипина в комбинации с внутривенной инъекцией омепразола в момент реканализации (препараты вводились последовательно без перерыва).

Используемые доза и схема введения нейропротектора-субстрата ABCB1-белка (нимодипина) в нашей работе объясняется выявленной эффективностью снижения объема некроза в эксперименте [14]. Типичные нейропротекторные лекарственные средства (пираретам и др.) в работе не были использованы в связи с отсутствием среди них препаратов, являющихся субстратами ABCB1-белка.

В качестве ингибитора транспортера выбран блокатор протонной помпы омепразол. Препараты указанной фармакологической группы, такие как омепразол, пантопразол и лансопразол продемонстрировали ингибирующую активность по отношению к ABCB1-белку на клеточных культурах Caco-2 и L-MDR1 с концентрацией полумаксимального ингибирования (IC_{50}) соответственно 17,7, 17,9 и 62,8 мкМ, что выявлено по степени транслокации субстрата транспортера – дигоксина [17]. При введении крысам внутривенно омепразола в дозе 3,45 мг/кг его максимальная плазменная концентрация составляет порядка 3,5 мкМ [16], чтобы получить 17,7 мкМ (IC_{50} по отношению к ABCB1-белку для данного вещества) необходимо вводить в 5,1 раз больше, т.е. 17,6 мг/кг. Это подтверждается линейностью фармакокинетики омепразола при его однократном назначении [18].

Несмотря на то, что омепразол незначительно снижает активность изоформ 2C9 (K_i 40,1±14,8 мкМ), 3A (K_i 84,4±4,0 мкМ), 2D6 (K_i 240,7±102,0 мкМ) микро-

сомальных ферментов печени *in vitro* [19], его введение крысам в указанной дозе не может повлиять на интенсивность биотрансформации нимодипина, в связи с тем, что в метаболизм последнего вовлечена только изоформа CYP3A [20].

Дополнительно 5 животных подвергались «ложной» операции со вскрытием кожи и мягких тканей шеи без непосредственной окклюзии-реперфузии артерий для подтверждения отсутствия влияния экспериментальных манипуляций на результаты исследования.

Для оценки зоны некроза головного мозга у животных всех серий извлекался головной мозг, промывался в изотоническом растворе натрия хлорида с последующей заморозкой и нарезкой во фронтальной плоскости на срезы толщиной 2 мм. Далее срезы помещали в чашку Петри, добавляли к ним фосфатный буфер с pH=7,4 объемом 10 мл, затем 2 мл 2%-го раствора трифенилтетразолия хлорида (ТТХ) и 2 мл 2%-го раствора сукцината натрия. Выдерживали срезы в указанной смеси в термостате при 38°C в течение 1 ч, затем при комнатной температуре в 10%-м нейтральном формалине также в течение 1 ч. В дальнейшем фотографировали срезы цифровой фотокамерой Canon Power Shot G5. Оценивали процентное соотношение суммы площадей ТТХ-негативных зон к сумме общей площади головного мозга [21].

Дополнительно для объяснения результатов, полученных на первой группе животных, была проанализирована целостность ГЭБ на фоне окклюзии-реперфузии средней мозговой артерии путем анализа степени накопления в ткани мозга красителя синего Эванса (Evans blue, Sigma, США) путем внутривенного введения в момент реперфузии в хвостовую вену 2%-го изотонического раствора в объемной дозе 0,4 мл на 100 г. На фоне глубокой анестезии непосредственно перед декапитацией крысам выполняли транскардиальную перфузию 100 мл изотонического раствора для удаления интраваскулярного красителя. Затем животные выводились из эксперимента с извлечением коры головного мозга (сторона, кровоснабжаемая окклюзированной артерией) и ее измельчения ножницами. Краситель экстрагировался путем гомогенизации ткани в диметилформамиде (1 мл на 100 мг ткани) в течение 1 мин при 26000 об/мин и последующего настаивания при 60°C в течение суток в термостате. Полученную суспензию центрифугировали 5 мин. при 1750 g.

Концентрацию синего Эванса определяли спектрофотометрически (спектрофотометр «Bio-Rad», США) при 620 нм. Количественное определение проводилось методом внешнего стандарта в аналогичном растворителе [22]. Опыт был повторен на 5 крысах, в качестве контроля использовались 5 крыс, которым воспроизводилась «ложная операция».

На второй группе крыс (n=60) оценивалась перспективность фармакологического ингибирования

АВСВ1-белка с целью повышения эффективности лечения нейропротекторными лекарственными средствами-субстратами транспортера глобальной ишемии мозга – экспериментальной патологии, сходной по патогенезу с церебральной гипоперфузией у людей [23]. Нейропротекторный потенциал анализировали по уменьшению процента гибели животных и выраженности неврологического дефицита по шкале (Stroke-index) McGrow в модификации И.В. Ганнушкиной на фоне билатеральной перевязки общих сонных артерий продолжительностью 4, 12, 24, 48 и 72 ч. В каждой серии оценивалось число крыс с неврологическим дефицитом легкой (0,5–2,5 баллов), средней (2,5–5,5 баллов) и тяжелой (5,5–10 баллов) степени. Данная шкала рекомендована для оценки неврологического статуса животных при проведении доклинических исследований¹.

Животные второй группы были разделены на 5 серий: 1-я (n=6) – ложнооперированные животные (контрольная серия), 2-я (n=14) – крысы, которым моделировали ишемию головного мозга путем билатеральной окклюзии общих сонных артерий с внутривенным введением физиологического раствора (1 мл/кг) за 30 мин до патологии (контроль патологии); 3-я (n=13) – животные, которым за 30 мин до перевязки артерий внутривенно вводили нейропротектор нимодипин – субстрат АВСВ1-белка в дозе 0,4 мг/кг; 4-я (n=11) – крысы, которым за 30 мин до патологии внутривенно вводили ингибитор транспортера – омепразол в дозе 17,6 мг/кг массы; 5-я (n=16) – животные с ишемией мозга, которым внутривенно вводили комбинацию нимодипина и омепразола в аналогичных дозах за 30 мин до моделирования патологии.

Статистическая обработка результатов

Результаты исследования обрабатывали с помощью программы Statistica 13.0. Характер распределения данных оценивали по критерию Шапиро-Уилка. Для сравнения величины зоны некроза использовали дисперсионный анализ ANOVA и критерий Ньюмена-Кейлса для попарного сравнения. Сравнение уровня неврологического дефицита животных выполняли с помощью критерия Крускала-Уоллиса (аналога дисперсионного анализа для данных, распределенных отличным от нормального способом), попарные сравнения – критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферрони, позволяющий анализировать выборки разного объема. Выживаемость животных в послеоперационном периоде оценивали методом построения кривых выживаемости Каплана-Майера. Сравнение выживаемости оценивалось по F-тесту Кокса. Различия считали достоверными при вероятности более 95%.

¹ Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / А.Н. Миронов; под ред. А.Н. Миронова. – Москва: Гриф и К, 2012. – 944 с.

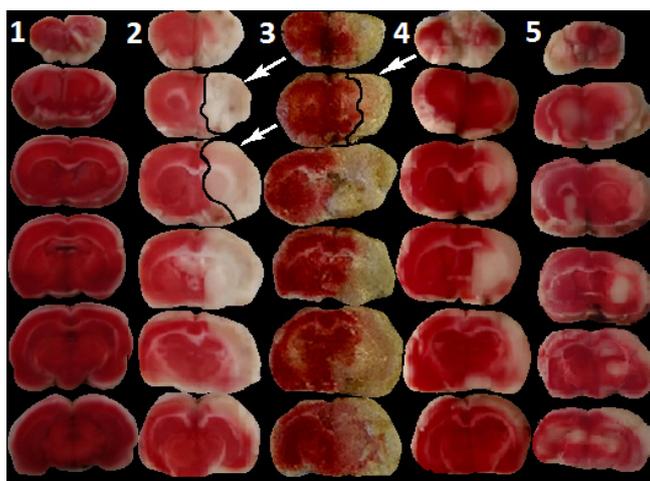


Рисунок 1 – Образцы срезов головного мозга крыс после окклюзии-реперфузии средней мозговой артерии

Примечание: 1 – ложная операция; 2 – контроль патологии; 3 – омепразол; 4 – нимодипин; 5 – комбинация нимодипина и омепразола; стрелками указана зона некроза мозга.

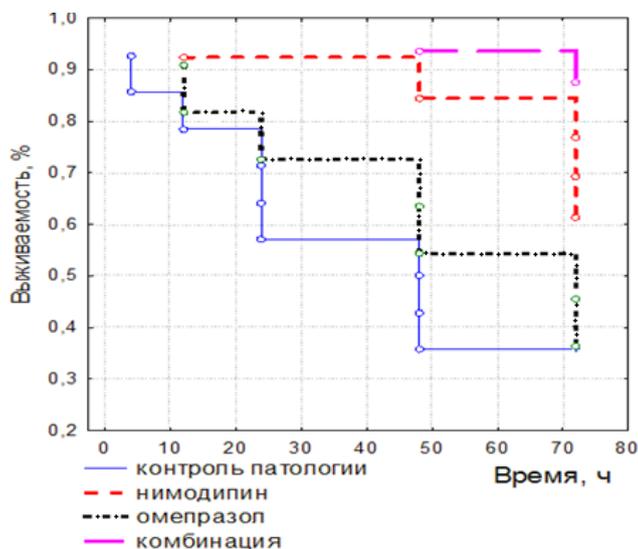


Рисунок 2 – График кумулятивной доли выживших животных по Каплану-Майеру в разных экспериментальных сериях

Таблица 1 – Относительная площадь зоны некроза головного мозга крыс на фоне окклюзии-реперфузии средней мозговой артерии

Серия эксперимента	Относительная площадь некроза, %
Ложная операция	0
Контроль	32,2±7,1
Омепразол	34,4±7,6
Нимодипин	23,3±4,7*#
Нимодипин+омепразол	23,0±2,8*#

Примечание: * – достоверные различия с показателем серии контроля патологии; # – достоверные различия с серией омепразола.

Таблица 2 – Содержание красителя синего Эванса в головном мозге крыс на фоне окклюзии-реперфузии средней мозговой артерии

Серия эксперимента	Уровень красителя, мкг/г мозга
Ложная операция, n=5	2,39±0,85
Окклюзия-реперфузия средней мозговой артерии, n=5	11,55±8,40

Таблица 3 – Степень неврологического дефицита по McGrow в модификации И.В. Ганнушкиной на фоне билатеральной окклюзии общих сонных артерий

Серия	Степень неврологического дефицита, баллы				
	4 ч.	12 ч.	24 ч.	48 ч.	72 ч.
Ложная операция	0,5±0,11	0	0	0	0
Контроль патологии	4,5 (2,0; 5,5)	5,0 (2,0; 10,0)	8,5 (1, 5; 10,0)	7,5 (1,5; 10,0)	7,0 (2,0; 10,0)
Нимодипин	2,5 (2,5; 2,5)	3,0 (1,0; 4,0)	1,0 (1,0; 2,5)*#	3,0 (2,0; 3,0)#	1,5 (1,0; 2,0)#
Омепразол	2,5 (2,5; 3,5)	3,5 (2,0; 5,0)	3,5 (3,0; 10,0)''	10,0 (3,5; 10,0)''	10,0 (4,5; 10,0)''
Комбинация	1,0 (0,0; 1,0)*#''	2,0 (1,0; 5,0)*	1,0 (1,0; 3,0)*#	1,0 (0,0; 3,0)*#»	1,0 (1,0; 3,0)*#

Примечание: * – достоверные различия с группой контроля патологии ($p < 0,05$); # – достоверные различия с группой омепразола ($p < 0,05$); '' – достоверные различия с группой нимодипина ($p < 0,05$). Данные представлены в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Летальность животных первой группы после моделирования окклюзии-реперфузии средней мозговой артерии составила $22,7 \pm 1,1\%$ и в группах не отличалась ($p > 0,05$). В группе ложнооперированных животных смертность отсутствовала.

На рисунке 1 представлены образцы срезов головного мозга экспериментальных животных различных серий.

Размеры очага некроза в процентах во всех экспериментальных сериях отражены в таблице 1 (среднее арифметическое \pm стандартное отклонение).

Проведенная 60-минутная окклюзия средней мозговой артерии с последующей реканализацией в течение 24 ч. привела к формированию очага некроза в головном мозге контрольных крыс относительной площадью $32,2 \pm 7,1\%$. Подобные результаты соответствуют литературным данным [24].

Изолированное введение животным нейропротектора, блокатора кальциевых каналов L-типа, нимодипина в момент реперфузии средней мозговой артерии приводило к достоверному снижению размера некротического очага на $27,7\%$ по сравнению с группой контроля патологии ($p < 0,05$).

Изолированное введение животным ингибитора ABCB1-белка омепразола не вызвало статистически значимого изменения площади очага некроза ($p > 0,05$).

Комбинированное введение крысам нимодипина и омепразола вызвало снижение площади некроза по сравнению с контролем патологии на $28,8\%$ ($p < 0,05$), а по отношению к группе омепразола – на $33,2\%$ ($p < 0,05$). Однако между группами комбинации препаратов и изолированного введения нимодипина статистически значимых изменений выявлено не было ($p > 0,05$).

Окклюзия-реперфузия средней мозговой артерии крыс приводила к нарушению проницаемости ГЭБ, что подтверждалось накоплением в ишемизированной ткани головного мозга животных диазокрасителя синего Эванса, который в норме в мозг не проникает из-за прочных связей с альбуминами плазмы крови [22]. Уровень красителя в мозге на фоне ишемии-реперфузии превышал аналогичный

показатель ложнооперированных животных в $4,83$ раза ($p < 0,05$) (табл. 2).

Появление красителя в неишемизированном мозге ложнооперированных крыс связано, вероятно, с его адсорбцией на стенке сосудов после процедуры перфузии.

На рисунке 2 представлен график кумулятивной доли выживших животных второй группы по Каплану-Майеру. Ни одно из ложнооперированных животных не погибло в течение всего срока наблюдения. Гибель животных группы контроля патологии наблюдалась через 4 часа после операции, к концу первых суток погибло $57,1\%$ крыс.

Инъекция нимодипина до ишемии мозга приводила к снижению количества погибших животных по сравнению с серией контроля патологии на уровне тенденции ($0,05 < p < 0,1$). Введение омепразола до ишемии не вызывало достоверных изменений уровня летальности животных по сравнению с контролем ишемии. Комбинация нимодипина и омепразола приводила к тому, что летальность животных была ниже, чем и в серии контроля патологии, и в серии введения нимодипина ($p < 0,05$).

Анализ тяжести клинических проявлений ишемии проводился путем оценки неврологических отклонений по шкале McGrow в модификации И.В. Ганнушкиной (табл. 3). Ложнооперированные животные не проявили признаков неврологического дефицита (за исключением незначительных изменений через 4 ч, связанных, вероятно, с выходом из наркоза). У выживших после билатеральной окклюзии общих сонных артерий животных наблюдались такие симптомы, как вялость, односторонний и двусторонний блефароптоз, общий тремор, маневные движения, парезы конечностей. Балл неврологического дефицита в группе контроля патологии увеличивался до конца первых суток после оперативного вмешательства, затем снижался, но во все сроки, за исключением 4 ч., относился к тяжелой степени.

Таким образом, перманентная окклюзия общих сонных артерий крыс сопровождалась высокой смертностью животных и развитием тяжелого психо-неврологического дефицита.

Инъекция крысам омепразола за 30 мин. до па-

тологии не привела к достоверному сокращению балла неврологического дефицита по сравнению с контролем патологии ни в один из наблюдаемых сроков ($p > 0,05$). У животных, получавших нимодипин, балл неврологического дефицита после операции был ниже, чем у контрольных животных: через 24 ч. – на 88,2% ($p < 0,05$); через 4 и 72 ч. – на 44,4% и 16,0% соответственно на уровне тенденции ($0,05 < p < 0,1$). Введение нимодипина привело также к снижению уровня неврологического дефицита по сравнению с группой омепразола: через 24 ч. – на 71,4% ($p < 0,05$), через 48 ч. – на 70,0% ($p < 0,05$) и через 72 ч. – на 85,0% ($p < 0,05$).

Введение крысам комбинации субстрата и ингибитора ABCB1-белка приводило к снижению балла неврологического дефицита по сравнению со всеми экспериментальными сериями. По отношению к контролю патологии уровень неврологического дефицита был ниже через 4, 12, 24, 48 и 72 ч. на 87,5% ($p < 0,05$), 80,0% (на уровне выраженной тенденции, $p = 0,05$), 88,2% ($p < 0,05$), 86,7% ($p < 0,05$) и 85,7% ($p < 0,05$) соответственно; в сравнении с группой введения омепразола – через 4, 24, 48 и 72 ч. ниже на 60,0% ($p < 0,05$), 71,4% ($p < 0,05$), 90,0% ($p < 0,05$) и 90,5% ($p < 0,05$) соответственно; а по сравнению с серией нимодипина через 4 ч. – на 60,0% ($p < 0,05$), через 48 ч. – на 66,7% ($p < 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

В проведенном исследовании проанализирована целесообразность фармакологического ингибирования ABCB1-белка локально в ГЭБ как способа повысить эффективность нейропротекторов при церебральной ишемии. Причем выбраны две патологические модели: глобальная ишемия, вызывающая повреждения белого вещества головного мозга, сходные с таковыми при хронической церебральной гипоперфузии у людей [23], а также фокальная ишемия – экспериментальный аналог ишемического инсульта [11]. В качестве тест-системы для анализа функционирования ABCB1-белка на фоне ишемии мозга были выбраны крысы, в связи с продемонстрированным 93%-м сходством спектра субстратов и модуляторов активности транспортера у данных животных и людей [25].

На сегодняшний день попытки снижения активности транспортера ABCB1-белка для интенсификации доставки цитотоксичных агентов в опухолевые клетки и преодоления феномена множественной лекарственной устойчивости (в формировании которого немаловажная роль принадлежит гиперфункции ABCB1-белка) не увенчались успехом в связи со значительным числом фармакокинетических и фармакодинамических ограничений. С другой стороны, стратегия ингибирования ABCB1-белка в ГЭБ в экспериментах для повышения доставки в мозг лекарственных средств, в частности нейропротекторных, успешно развивается. Так, на нечеловеческих прима-

тах выявлена эффективность снижения активности транспортера в ГЭБ инфузией специфического ингибитора элакридара с целью повышения церебрального проникновения субстрата ABCB1-белка эрлотинониба [26]. Также методом позитронной эмиссионной томографии установлено, что проницаемость барьера бабуинов для меченного радиоактивного субстрата ABCB1-белка [(11)C]-N-дезметил-лоперамида на фоне внутривенного введения терапевтической дозы (15 мг/кг/ч) циклоспорина (ингибитора транспортера) достоверно возросла [27].

Результаты нашей работы свидетельствуют о том, что снижение активности ABCB1-белка локально в ГЭБ при фокальной церебральной ишемии не является обоснованным. Снижение же активности транспортера на системном уровне, что на практике более легко достижимо, является опасным в связи с изменением фармакокинетики его субстратов и возможностью их относительной передозировки. Вероятной причиной полученных результатов является повышение проницаемости ГЭБ на фоне окклюзии-реперфузии средней мозговой артерии, что является типичным следствием церебральной ишемии. Кроме того, в предыдущей работе мы обнаружили даже снижение функциональной активности ABCB1-белка в ГЭБ при моделировании окклюзии-реперфузии средней мозговой артерии (что выявлено по степени накопления в головном мозге маркерного субстрата транспортера – фексофенадина) [28], несмотря на возрастание количества ABCB1-белка на фоне фокальной ишемии мозга. В связи с этим неэффективность совместного применения нейропротектора-субстрата ABCB1-белка с ингибитором функциональной активности транспортера является, вероятно, следствием большой зоны повреждения головного мозга при которой структура ГЭБ нарушается, а его проницаемость и так максимальна. Данное предположение подтверждено нами путем анализа накопления в головном мозге красителя синего Эванса на фоне примененной экспериментальной патологии. При этом ABCB1-белок, скорее всего, уже не является препятствием для проникновения нимодипина в ткани мозга, поэтому препарат оказывает свой максимальный терапевтический эффект в такой же степени, как при его изолированном введении.

Другая динамика получена нами при использовании модели глобальной церебральной ишемии при которой, вероятно, столь выраженного нарушения целостности ГЭБ не происходит. Фармакологическое ингибирование ABCB1-белка в барьере приводило к более значительному церебропротекторному эффекту нимодипина, проявляющемся снижением летальности и выраженности неврологического дефицита животных на фоне билатеральной окклюзии их общих сонных артерий. Это, вероятно, связано с интенсификацией проникновения нейропротектора в головной мозг из-за снижения эфлюксной актив-

ности транспортера. Таким образом, можно говорить о целесообразности снижения функциональной активности ABCB1-белка при неврологических заболеваниях, патогенез которых включает глобальную церебральную ишемию.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Комбинирование ингибитора и субстрата ABCB1-белка – омепразола и нимодипина соответственно не усиливает нейротекторный потенциал последнего (зона некроза достоверно не уменьшается), а ингибирование ABCB1-белка нельзя рассматри-

вать в качестве перспективной цели для повышения эффективности фармакотерапии фокального нарушения мозгового кровообращения. Данное явление, вероятно, связано с нарушением целостности ГЭБ, при котором барьерные функции транспортера уже не играют существенной роли в контроле церебрального накопления его субстратов. Однако подобная тактика является обоснованной при глобальной церебральной ишемии, что подтверждается достоверным снижением летальности и уровня неврологического дефицита животных при данной патологии на фоне применения комбинации указанных средств.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Данное исследование поддержано грантом РФФИ №16-44-620292 р_а.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

И.В. Черных – выполнение экспериментов на животных (моделирование патологий), написание статьи; А.В. Шулькин – статистическая обработка полученных результатов; М.В. Гацаного – работа с лабораторными животными (введение препаратов, окраска срезов головного мозга, оценка неврологического дефицита и летальности); Е.Н. Якушева – планирование дизайна исследования, написание статьи.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Черных И.В., Шулькин А.В., Якушева Е.Н., Попова Н.М. Роль гликопротеина-Р в неврологии // Журнал неврологии и психиатрии С.С. Корсакова. – 2017. – Т. 117, № 1. – С. 67–71. DOI: 10.17116/jnevro20171171167-71.
2. Paul S., Candelario-Jalil E. Emerging neuroprotective strategies for the treatment of ischemic stroke: An overview of clinical and preclinical studies // Exp. Neurol. – 2021. – Vol. 335. – Art. No.113518. DOI: 10.1016/j.expneurol.2020.113518.
3. Lee C., Choi J., Choi D. Effects of pravastatin on the pharmacokinetic parameters of nimodipine after oral and intravenous administration in rats: Possible role of CYP3A4 inhibition by pravastatin // Indian J. Pharmacol. – 2012. – Vol. 44, No.5. – P. 624–628. DOI: 10.4103/0253-7613.100395.
4. Mohamed L.A., Keller J.N., Kaddoumi A. Role of P-glycoprotein in mediating rivastigmine effect on amyloid- β brain load and related pathology in Alzheimer's disease mouse model // Biochim. Biophys. Acta. – 2016. – Vol. 1862, No.4. – P. 778–787. DOI: 10.1016/j.bbadis.2016.01.013.
5. Cacabelos R. Pharmacogenomics of Cognitive Dysfunction and Neuropsychiatric Disorders in Dementia // Int. J. Mol. Sci. – 2020. – Vol. 21. – Art. No.3059. DOI: 10.3390/ijms21093059.
6. Powers W.J., Rabinstein A.A., Ackerson T., Adeoye O.M., Bambakidis N.C., Becker K., Biller J., Brown M., Demaerschalk B.M., Hoh B., Jauch E.C., Kidwell C.S., Leslie-Mazwi T.M., Ovbiagele B., Scott P.A., Sheth K.N., Southerland A.M., Summers D.V., Tirschwell D.L. Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: 2019 Update to the 2018 Guidelines for the Early Management of Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association // Stroke. – 2019. – Vol. 50, No.12. – P. e344–e418. DOI: 10.1161/STR.0000000000000211. Epub 2019 Oct 30. Erratum in: Stroke. – 2019. – Vol. 50, No.12. – P. e440–e441.
7. Williams E.I., Betterton R.D., Davis T.P., Ronaldson P.T. Transporter-Mediated Delivery of Small Molecule Drugs to the Brain: A Critical Mechanism That Can Advance Therapeutic Development for Ischemic Stroke // Pharmaceutics. – 2020. – Vol. 154, No.12. – Art. No.154. DOI: 10.3390/pharmaceutics12020154.
8. Cen J., Liu L., Li M.S., He L., Wang L.J., Liu Y.Q., Liu M., Ji B.S. Alteration in P-glycoprotein at the blood–brain barrier in the early period of MCAO in rats // J. Pharm. Pharmacol. – 2013. – Vol. 65. – P. 665–672. DOI: 10.1111/jphp.12033.
9. Черных И.В., Якушева Е.Н., Шулькин А.В., Виноградов И.Ю., Титов Д.С. Экспрессия гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере при двухсторонней окклюзии общих сонных артерий // Научные ведомости Белгородского государственного университета. – 2015. – Т. 29, № 4(201). – С. 91–95.
10. Самородская И.В., Андреев Е.М., Заратьянц О.В. Показатели смертности населения старше 50 лет от цереброваскулярных болезней за 15-летний период в России и США // Неврология, нейропсихиатрия и психосоматика. – 2017. – Т. 9, № 1. – С. 15–24. DOI: 10.14412/2074-2711-2017-2-15-24.
11. Yang S.H., Shetty R.A., Liu R., Sumien N., Heinrich K.R., Rutledge M., Thangthaeng N., Brun-Zinkernagel A.M., Forster M.J. Endovascular middle cerebral artery occlusion in rats as a model for studying vascular dementia // Age (Dordr). – 2006. – Vol. 28, No.3. – P. 297–230. DOI: 10.1007/s11357-006-9026-4.
12. Ye X.L., Lu L.Q., Li W., Lou Q., Guo H.G., Shi Q.J. Oral administration of ampelopsin protects against acute brain injury in rats following focal cerebral ischemia // Exp. Ther. Med. – 2017. – Vol. 13. – P. 1725–1734. DOI: 10.3892/etm.2017.4197.

13. Khaksar S., Bigdeli M.R. Correlation Between Cannabidiol-Induced Reduction of Infarct Volume and Inflammatory Factors Expression in Ischemic Stroke Model. *Basic Clin Neurosci.* – 2017. No.8(2). P. 139–146. DOI: 10.18869/nirp.bcn.8.2.139.
14. Wang X., Wang C., Yang Y., Ni J. New monocyte locomotion inhibitory factor analogs protect against cerebral ischemia-reperfusion injury in rats // *Bosn J Basic Med Sci.* – 2017. – Vol. 17, No.3. – P. 221–227. DOI: 10.17305/bjms.2017.1622.
15. Leisz S., Simmermacher S., Prell J., Strauss C., Scheller C. Nimodipine-Dependent Protection of Schwann Cells, Astrocytes and Neuronal Cells from Osmotic, Oxidative and Heat Stress Is Associated with the Activation of AKT and CREB // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol. 20, No.18. – Art. No.4578. DOI: 10.3390/ijms20184578.
16. Regardh C.J., Gabriellson M., Hoffman K.J., Lofberg I., Skanberg I. Pharmacokinetics and metabolism of omeprazole in animals and man – an overview // *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* – 1985. – Vol. 108. – P. 79–94. DOI: 10.3109/00365528509095821.
17. Shah Y., Iqbal Z., Ahmad L., Khuda F., Khan A., Khan A., Khan M.I., Ismail. Effect of Omeprazole on the Pharmacokinetics of Rosuvastatin in Healthy Male Volunteers // *Am. J. Ther.* – 2016. – Vol. 23, No.6. – P. e1514–e1523. DOI: 10.1097/MJT.0000000000000221.
18. Andersson T., Cederberg C., Heggelund A. et al. The Pharmacokinetics of Single and Repeated Once-Daily Doses of 10, 20 and 40mg Omeprazole as Enteric-Coated Granules // *Drug Invest.* – 1991. – Vol. 3. – P. 45–52. DOI: 10.1007/BF03259540.
19. Khojasteh S.C., Prabhu S., Kenny J.R., Halladay J.S., Lu A.Y. Chemical inhibitors of cytochrome P450 isoforms in human liver microsomes: a re-evaluation of P450 isoform selectivity // *Eur. J. Drug. Metab. Pharmacokinet.* – 2011. – Vol. 36, No.1. – P. 1–16. DOI: 10.1007/s13318-011-0024-2.
20. Liu X.Q., Ren Y.L., Qian Z.Y., Wang G.J. Enzyme kinetics and inhibition of nimodipine metabolism in human liver microsomes // *Acta Pharmacol. Sin.* – 2000. – Vol. 21, No.8. – P. 690–694.
21. Xu L., Fagan S.C., Waller J.L., Edwards D., Borlongan C.V., Zheng J., Hill W.D., Feuerstein G., Hess D.C. Low dose intravenous minocycline is neuroprotective after middle cerebral artery occlusion-reperfusion in rats // *BMC Neurol.* – 2004. – Vol. 4. – Art. No.7. DOI: 10.1186/1471-2377-4-7.
22. Jin Z., Ke J., Guo P., Wang Y., Wu H. Quercetin improves blood-brain barrier dysfunction in rats with cerebral ischemia reperfusion via Wnt signaling pathway // *Am. J. Transl. Res.* – 2019. – Vol. 11, No.8. – P. 4683–4695.
23. Washida K., Hattori Y., Ihara M. Animal Models of Chronic Cerebral Hypoperfusion: From Mouse to Primate. *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol. 20, No.24. – Art. No.6176. DOI: 10.3390/ijms20246176.
24. Li W., Suwanwela N.C., Patumraj S. Curcumin prevents reperfusion injury following ischemic stroke in rats via inhibition of NF- κ B, ICAM-1, MMP-9 and caspase-3 expression // *Mol. Med. Rep.* – 2017. – Vol. 16, No.4. – P. 4710–4720. DOI: 10.3892/mmr.2017.7205.
25. Feng B., Mills J.B., Davidson R.E., Mireles R.J., Janiszewski J.S., Troutman M.D., de Morais S.M. *In vitro* P-glycoprotein assays to predict the *in vivo* interactions of P-glycoprotein with drugs in the central nervous system // *Drug Metab. Dispos.* – 2008. – Vol. 36, No.2. – P. 268–275. DOI: 10.1124/dmd.107.017434.
26. Tournier N., Goutal S., Auvity S., Traxl A., Mairinger S., Wanek T., Helal O.B., Buvat I., Soussan M., Caillé F., Langer O. Strategies to Inhibit ABCB1- and ABCG2-Mediated Efflux Transport of Erlotinib at the Blood-Brain Barrier: A PET Study on Nonhuman Primates // *J. Nucl. Med.* – 2017. – Vol. 58, No.1. – P. 117–122. DOI: 10.2967/jnumed.116.178665.
27. Damont A., Goutal S., Auvity S., Valette H., Kuhnast B., Saba W., Tournier N. Imaging the impact of cyclosporin A and dipyrindamole on P-glycoprotein (ABCB1) function at the blood-brain barrier: A [(11)C]-N-desmethyl-loperamide PET study in nonhuman primates // *Eur. J. Pharm. Sci.* – 2016. – Vol. 91. – P. 98–104. DOI: 10.1016/j.ejps.2016.06.005.
28. Черных И.В., Шулькин А.В., Якушева Е.Н., Есенина А.С., Градинарь М.М., Мильников П.Ю., Гацаного М.В. Функциональная активность гликопротеина-P в гематоэнцефалическом барьере на фоне ишемии-реперфузии головного мозга // *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова.* – 2019. – Т. 105, № 5. – С. 657–664. DOI: 10.1134/S0869813919050133.

АВТОРЫ

Черных Иван Владимирович – кандидат биологических наук, доцент, заведующий кафедрой фармацевтической химии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-5618-7607. E-mail: ivchernykh88@mail.ru

Шулькин Алексей Владимирович – доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры фармакологии с курсом фармации ФДПО ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0003-1688-0017. E-mail: alekseyshulkin@rambler.ru

Гацаного Мария Валериевна – кандидат медицинских наук, ассистент кафедры фармакологии с курсом фармации ФДПО, ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-1116-6271. E-mail: mvgatsanoga@mail.ru

Якушева Елена Николаевна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой фармакологии с курсом фармации ФДПО, ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0001-6887-4888. E-mail: e.yakusheva@rzgmu.ru