

УДК 612.825.015.348:616.831-005.4

DOI: <https://doi.org/10.17816/PAVLOVJ111932>

Регуляция функционирования ABCB1-белка в коре головного мозга на фоне глобальной церебральной ишемии

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

Рязанский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова, Рязань, Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

Введение. ABCB1-белок — мембранный транспортер, осуществляющий эффлюкс из клеток широкого спектра лекарственных веществ. Изучение механизмов регуляции функционирования ABCB1-белка в головном мозге на фоне его ишемии позволит предложить новые подходы к фармакотерапии церебральной ишемической патологии.

Цель. Изучить регуляцию функционирования ABCB1-белка в коре головного мозга крыс при глобальной церебральной ишемии.

Материалы и методы. Эксперимент выполнен на 30 крысах-самцах, которым моделировали глобальную церебральную ишемию путем билатеральной окклюзии общих сонных артерий. В коре головного мозга методом иммуноферментного анализа определяли количество ABCB1-белка и транскрипционных факторов Nrf2 и HIF-1 α . Свободнорадикальный статус коры больших полушарий оценивали по концентрации малонового диальдегида, SH-групп, активности глутатионпероксидазы (G-per).

Результаты. Билатеральная окклюзия общих сонных артерий вызывала увеличение уровня ABCB1-белка в коре головного мозга крыс к четвертому часу ишемии, через 24 ч. его количество оставалось повышенным, а через 72 ч. уменьшалось до значений, не отличающихся от показателей ложнооперированных крыс. Содержание малонового диальдегида в коре больших полушарий увеличивалось через 2 ч. и 4 ч. после окклюзии, далее постепенно снижалось до исходных значений. Активность G-per была снижена по сравнению с контрольными значениями через 30 мин. и 4 ч. после моделирования ишемии. Содержание Nrf2 в коре больших полушарий возрастало через 2 ч. и 4 ч. после проведения окклюзии, при этом через сутки его уровень несколько снижался, а на третий день эксперимента достигал исходных показателей. Количество HIF-1 α повышалось только через 24 ч. и 72 ч. после операции.

Заключение. Количество ABCB1-белка в коре головного мозга крыс при глобальной церебральной ишемии зависит от показателей выраженности окислительного стресса, при этом в его регуляции играют роль транскрипционные факторы Nrf2 и HIF-1 α . Снижение количества транспортера в гематоэнцефалическом барьере за счет влияния на процессы перекисного окисления липидов или синтез изученных транскрипционных факторов расширяет возможности для повышения эффективности фармакотерапии заболеваний центральной нервной системы субстратами ABCB1-белка.

Ключевые слова: ABCB1-белок; глобальная церебральная ишемия; перекисное окисление липидов; Nrf2; HIF-1 α

Для цитирования:

Черных И.В., Шулькин А.В., Попова Н.М., Гацанога М.В., Якушева Е.Н. Регуляция функционирования ABCB1-белка в коре головного мозга на фоне глобальной церебральной ишемии // Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова. 2023. Т. 31, № 4. С. 613–622. DOI: <https://doi.org/10.17816/PAVLOVJ111932>

DOI: <https://doi.org/10.17816/PAVLOVJ111932>

Regulation of ABCB1 Protein Function in the Cerebral Cortex with the Underlying Global Cerebral Ischemia

Ivan V. Chernykh, Aleksey V. Shchul'kin, Natal'ya M. Popova✉, Mariya V. Gatsanoga, Elena N. Yakusheva

Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation

ABSTRACT

INTRODUCTION: ABCB1 is a membrane transporter protein responsible for efflux of a wide range of drugs from cells. The study of the mechanisms of regulation of the functioning of ABCB1 protein in the brain in its ischemia will permit to propose new approaches to pharmacotherapy of cerebral ischemic pathology.

AIM: To study the regulation of ABCB1 protein function in the cerebral cortex of rats with global cerebral ischemia.

MATERIALS AND METHODS: The experiment was performed on 30 male rats with global cerebral ischemia modeled by bilateral occlusion of the common carotid arteries. The amount of ABCB1 protein and Nrf2 and HIF-1 α transcription factors in the cerebral cortex was determined by enzyme immunoassay. The free radical status of the cerebral cortex was assessed by the concentration of malondialdehyde, SH groups, and by glutathione peroxidase (G-per) activity.

RESULTS: Bilateral occlusion of the common carotid arteries caused an increase in the level of ABCB1 protein in the cerebral cortex of rats by the 4th hour of ischemia; in 24 hours it remained elevated, and in 72 hours decreased to values that did not differ from those of falsely operated rats. The content of malondialdehyde in the cerebral cortex increased in 2 and 4 hours after occlusion and then gradually decreased to the initial values. In 30 minutes and 4 hours after ischemia modeling, G-per activity decreased compared to the control values. The content of Nrf2 in the cerebral cortex increased in 2 and 4 hours after occlusion, then slightly decreased on the next day, and reached the initial values on the 3rd day of the experiment. The amount of HIF-1 α increased only in 24 and 72 hours after the surgery.

CONCLUSION: The amount of ABCB1 protein in the cerebral cortex of rats with global cerebral ischemia depends on the severity of oxidative stress, with Nrf2 and HIF-1 α transcription factors playing a role in its regulation. Reduction of the amount of the transporter in the blood-brain barrier through the influence on the lipid peroxidation processes or synthesis of the studied transcription factors expands the possibilities of using ABCB1 protein substrates for improving the effectiveness of pharmacotherapy of diseases of the central nervous system.

Keywords: ABCB1 protein; global cerebral ischemia; lipid peroxidation; Nrf2; HIF-1 α

For citation:

Chernykh IV, Shchul'kin AV, Popova NM, Gatsanoga MV, Yakusheva EN. Regulation of ABCB1 Protein Function in the Cerebral Cortex with the Underlying Global Cerebral Ischemia. *I. P. Pavlov Russian Medical Biological Herald*. 2023;31(4):613–622. DOI: <https://doi.org/10.17816/PAVLOVJ111932>

Received: 17.10.2022

Accepted: 19.12.2022

Published: 31.12.2023

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

НАДФН₂ — восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат

G-per — glutathione peroxidase (глутатионпероксидаза)

HIF-1 α — hypoxia inducible factor 1 α (индуцируемый гипоксией фактор 1 α)

Nrf2 — nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (редокс-чувствительный транскрипционный фактор 2)

ВВЕДЕНИЕ

ABCB1-белок (син.: гликопротеин-P, Pgp) — мембранный белок-транспортер, осуществляющий эффлюкс из клеток широкого спектра субстратов липофильной природы, в т. ч. лекарственных веществ. Локализуясь в слизистой оболочке тонкого кишечника, на билиарной мембране гепатоцитов, в эпителиоцитах канальцев нефронов, в гистогематических барьерах транспортер препятствует всасыванию субстратов в желудочно-кишечном тракте, выводит их в мочу и желчь и предотвращает проникновение в забарьерные органы (головной мозг, яичники, внутреннюю среду глаза, к плоду) [1, 2].

Функционирование ABCB1-белка определяется генетическими особенностями организма, наличием патологических состояний, приемом ряда пищевых продуктов и лекарственных препаратов. Изменение активности транспортера может привести к межлекарственным взаимодействиям, в результате которых вследствие активации белка-переносчика снижается эффективность фармакотерапии, а на фоне его ингибирования повышается риск относительной лекарственной передозировки [1, 2].

Изменение функциональной активности ABCB1-белка в гематоэнцефалическом барьере является причиной развития множественной лекарственной устойчивости опухолей головного мозга, неэффективности применения нейропротекторов при нарушениях мозгового кровообращения, возникновения эпилепсии, резистентной к лекарственному лечению [3]. Следует отметить, что направленная фармакологическая регуляция ABCB1-белка может повысить эффективность фармакотерапии указанных патологий за счет повышения проникновения субстратов транспортера в ткань головного мозга.

Ишемическо-гипоксическое поражение головного мозга занимает ведущую роль в патогенезе ряда заболеваний и патологических состояний: инсультов, ишемическо-гипоксической энцефалопатии, дисциркуляторной энцефалопатии, метаболических и токсических поражений центральной нервной системы.

Большинство исследований ABCB1-белка *in vitro* показало увеличение его функциональной активности и синтеза, а также экспрессии гена MDR1, кодирующего

транспортер, в результате воздействия гипоксической гипоксии [4]. При этом функционирование ABCB1-белка при циркуляторной гипоксии изучено недостаточно, а результаты влияния церебральной ишемии и ишемии-реперфузии на транспортер *in vivo* весьма противоречивы [3].

Следует отметить, что регуляция функционирования ABCB1-белка в научной литературе оценивалась преимущественно *in vitro* на культурах клеток, гиперэкспрессирующих данный белок-транспортер. Результаты, полученные на животных, немногочисленны и противоречивы. Совместное участие редокс-чувствительного транскрипционного фактора 2 (англ.: *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*, Nrf2) и индуцируемого гипоксией фактора 1 α (англ.: *hypoxia inducible factor 1 α* , HIF-1 α) в контроле работы ABCB1-белка также не было рассмотрено ранее.

Учитывая вышеизложенное, установление механизмов регуляции ABCB1-белка на фоне ишемическо-гипоксических поражений головного мозга позволит расширить подход к направленному изменению его активности, что может повысить эффективность фармакотерапии указанных патологий с применением субстратов данного транспортера.

Цель — изучение регуляции функционирования ABCB1-белка в коре головного мозга крыс на фоне глобальной церебральной ишемии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент выполнен на 30 половозрелых крысах-самцах сток вистар массой 250–360 г, полученных из питомника «Столбовая» (Московская область, Россия) в соответствии с правилами лабораторной практики, регламентированными Приложением к приказу Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н, затем — на основании Приказа Министерства здравоохранения Российской Федерации от 1 апреля 2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики». Исследование было одобрено комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных Рязанского государственного

медицинского университета имени академика И. П. Павлова (Протокол № 7 от 03.04.2018). Все оперативные вмешательства проводились в условиях операционной вивария Рязанского государственного медицинского университета имени академика И. П. Павлова под наркозом, который осуществляли внутрибрюшинным введением препарата Золетил 50® (Virbac, Франция) в дозе 10 мг/кг [3]. Эвтаназия животных осуществлялась путем забора крови из брюшной аорты под глубоким наркозом (внутрибрюшинное введение Золетила 50® в дозе 30 мг/кг), после чего у животных извлекали образцы коры головного мозга [3].

Серии эксперимента. Крысы были разделены на 6 серий:

- 1 серия — «ложная операция» (контроль),
- 2–6 серии — животные через 30 мин., 2 ч., 4 ч., 24 ч. и 72 ч. после глобальной церебральной ишемии, которую моделировали за счет билатеральной окклюзии общих сонных артерий крыс.

При этом проводили вскрытие мягких тканей шеи животных, выделяли общие сонные артерии и накладывали на них лигатуры Surgipro II 4.0 (Covidien, Швейцария) с последующим ушиванием раны.

Подготовка биологического материала. У каждого животного проводили забор лобной доли коры головного мозга, образцы измельчали ножницами и гомогенизировали на холоде в фосфатном буфере с pH 7,4 (1:10 по массе) с последующей трехкратной заморозкой–разморозкой для лизиса клеток, как указано в инструкции к набору для иммуноферментного анализа, и центрифугированием при 1750 g. Замороженный супернатант хранили до анализа при -80°C не более трех недель.

Определение количества ABCB1-белка в коре головного мозга. Для оценки абсолютного количества ABCB1-белка в коре головного мозга применяли метод гетерогенного иммуноферментного анализа с использованием готового диагностического набора ElisaKits BlueGene (КНР), предназначенного для работы с тканями крыс.

Исследование свободнорадикального статуса в гомогенате коры головного мозга крыс. Определение концентрации малонового диальдегида (тиобарбитуровая кислота — реактивных продуктов). Для анализа содержания малонового диальдегида применяли набор ТБК-АГАТ (АГАТ-МЕД, Россия). Метод основан на способности малонового альдегида реагировать с 2-тиобарбитуровой кислотой с образованием эквимольного количества окрашенного комплекса с максимумами поглощения при 535 нм и 570 нм. В пробирку вносили 0,25 мл супернатанта, 3,0 мл 1,4%-ной ортофосфорной кислоты, 1,0 мл раствора 2-тиобарбитуровой кислоты (150 мг — 31 мл дистиллированной воды), после чего пробирку инкубировали 45 мин. на водяной бане при 100°C и охлаждали

холодной водой в течение 3 мин. Далее добавляли 4,0 мл н-бутанола, встряхивали пробирки до образования однородной белой суспензии с розовым оттенком, центрифугировали при 1750 g 10 мин., и в 3 мл органической фазы определяли оптическую плотность на спектрофотометре UV-150-02 (Shimadzu, Япония) при двух длинах волн против холостой пробы (0,25 мл дистиллированной воды вместо гомогената мозга). Полученные результаты выражали в нмоль/мг белка.

Определение содержания общих сульфгидрильных (SH) групп. Применяемый метод основан на способности сульфгидрильных групп восстанавливать растворенный в этаноле дисульфид 5,5-дитиобис-2-нитробензоат (реактив Элмана) с образованием эквивалентного количества окрашенных в желтый цвет анионов 2-нитро-5-тиобензоата, которые определяли по приросту светопоглощения раствора на спектрофотометре UV-150-02 (Shimadzu, Япония) при длине волны 412 нм. В пробирку вносили 100 мкл супернатанта и добавляли 100 мкл 0,2 М раствора этилендиамина-тетраацетата в реактиве Элмана. Полученную смесь спектрофотометрировали через 30 мин. инкубации при температуре 22–25°C.

Расчет содержания общих сульфгидрильных групп осуществляли с использованием коэффициента молярной экстинкции $0,0136 \text{ см}^{-1} \times \text{нмоль}^{-1}$, результаты выражали в мкмоль/мг белка.

Определение активности глутатионпероксидазы (G-per). Спектрофотометрическое определение активности G-per основано на регистрации уменьшения оптической плотности опытного образца при 340 нм и температуре 37°C в результате реакции окисления восстановленного никотинамидадениндинуклеотид-фосфата (НАДФН₂), который является донором редуцирующих эквивалентов для реакции ферментативного восстановления глутатиона, который предварительно окисляется гидроперекисью трет-бутила. Интенсивность окисления НАДФН₂ тем выше, чем выше активность G-per, и тем более выражено уменьшение интенсивности поглощения света.

Реакционная смесь содержала 1,2 мл 0,05 М изотонического фосфатного буфера с pH 7,4, 0,1 мл 1 мМ этилендиамина-тетраацетата, 0,1 мл 0,12 мМ НАДФН₂, 0,2 мл 1,85 мМ раствора восстановленного глутатиона, 0,5 ЕД глутатионредуктазы, 0,2 мл 0,2 мМ гидроперекиси трет-бутила и 0,1 мл тестируемого образца. Реакцию инициировали добавлением гидроперекиси трет-бутила, после чего пробирку инкубировали при температуре 37°C в течение 3 мин. Оптическую плотность регистрировали на биохимическом анализаторе Humalizer 2000 (Германия) при длине волны 340 нм. За единицу активности принимали количество фермента, необходимое для окисления 1 мкМ восстановленного глутатиона в минуту в условиях определения. Результаты активности выражали в нмоль НАДФН₂/мин х мг белка.

Определение уровня транскрипционных факторов. Для оценки содержания транскрипционных факторов Nrf2 и HIF-1 α образец коры головного мозга гомогенизировали в фосфатном буфере с pH 7,4 (1:1 по массе) на холоде с последующей трехкратной заморозкой-разморозкой для лизиса клеток, как указано в инструкции к набору для иммуноферментного анализа, и центрифугированием при 1750 g. Абсолютное количество факторов определяли методом гетерогенного иммуноферментного анализа с применением наборов ElisaKits Cloud-Clone (КНП) и ElisaKits BlueGene (КНП) соответственно, предназначенных для работы с тканями крыс.

Именно рост количества указанных факторов за счет их стабилизации в условиях дефицита кислорода (HIF-1 α) или накопления продуктов перекисного окисления липидов (Nrf2) является свидетельством их активации [5].

Абсолютное количество ABCB1-белка и транскрипционных факторов, а также показателей интенсивности перекисного окисления липидов в ткани мозга соотносили с общим количеством белка, определяемым по методу Бредфорда.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета Microsoft Office XP (США) и программы Statistica 7.0 (США). Характер распределения данных оценивали по критериям Шапиро–Уилка, Колмогорова–Смирнова и Лиллиефорса. Равенство дисперсий доказывали с использованием критерия Левена. Межгрупповые различия определяли по критерию Ньюмена–Кейлса. Зависимость содержания ABCB1-белка в ткани головного мозга от показателей

свободнорадикального статуса и уровня транскрипционных факторов оценивали по коэффициенту корреляции Пирсона (r). Достаточным уровнем статистической значимости считали $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Установлено, что билатеральная окклюзия общих сонных артерий вызывала недостоверное снижение количества ABCB1-белка в коре головного мозга крыс через 2 ч. после дебюта патологии, после чего его уровень возрастал, и к четвертому часу ишемии превышал показатели ложноперирированных животных в 3,55 раза ($p < 0,05$). Через 24 ч после выполнения окклюзии содержание транспортера было достоверно выше значения серии ложной операции в 3,27 раза ($p < 0,05$), а через 72 ч. его количество уменьшалось до значений, не отличающихся от уровня ложноперирированных крыс ($p > 0,05$).

При исследовании свободнорадикального статуса коры головного мозга крыс нами были получены следующие результаты (табл. 1).

Содержание малонового диальдегида в коре больших полушарий статистически значимо увеличивалось через 2 ч. и 4 ч. после проведения окклюзии в 2,78 ($p < 0,05$) и в 1,84 раза ($p < 0,05$) соответственно, после чего постепенно уменьшалось до исходных значений. Концентрация общих SH-групп достоверно не отличалась от показателей ложноперирированных крыс, а активность G-перг снижалась через 30 мин. на 21,5% ($p < 0,05$) и через 4 ч. — на 24,9% ($p < 0,05$) по сравнению с контрольными значениями.

Таблица 1. Содержание ABCB1-белка и показатели выраженности окислительного стресса в коре головного мозга крыс при билатеральной окклюзии общих сонных артерий

Параметры	Серии эксперимента					
	Ложная операция	Билатеральная окклюзия общих сонных артерий				
		30 мин.	2 ч.	4 ч.	24 ч.	72 ч.
n	5	5	5	5	5	5
Уровень ABCB1-белка, нг/мг белка	0,22 (0,16; 0,25)	0,14 (0,064; 0,15)	0,38 (0,21; 0,42)	0,78 (0,40; 0,82)*	0,72 (0,62; 2,08)*	0,22 (0,11; 0,22)
Уровень малонового диальдегида, нмоль/мг белка	24,69 (11,21; 33,12)	31,36 (29,41; 40,17)*	68,61 (59,12; 82,54)*	45,46 (24,17; 79,72)*	47,22 (18,48; 69,09)	34,31 (31,10; 38,71)
SH-группы, мкмоль/мг белка	48,92 (41,41; 64,01)	24,77 (20,04; 43,31)	55,55 (44,96; 72,67)	42,11 (40,07; 53,31)	31,93 (17,28; 68,08)	40,37 (30,38; 41,49)
Активность глутатионпероксидазы, нмоль НАДФН/мг белка × мин	20,48 (18,6; 22,76)	16,1 (12,7; 19,3)*	20,9 (19,2; 27,4)	15,4 (14,3; 18,0)*	17,04 (16,83; 17,14)	20,71 (19,77; 20,98)

Примечания: * — статистически значимые различия по сравнению с показателями ложноперирированных животных ($p < 0,05$); результаты представлены в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей — при распределении данных, отличном от нормального; НАДФ — никотинамидадениндинуклеотидфосфат

Установлено, что повышение количества ABCB1-белка в коре головного мозга крыс на фоне глобальной церебральной ишемии коррелирует с показателями липопероксидации, что показывает выявленная прямая корреляционная зависимость ($r = 0,33$, уровень тенденции, $p = 0,066$) между уровнем белка-транспортера в коре головного мозга и количеством малонового диальдегида — основного показателя, характеризующего интенсификацию липопероксидации ткани.

Для выявления зависимости количества ABCB1-белка от интенсивности окислительного стресса при глобальной церебральной ишемии и оценки механизмов регуляции транспортера изучено абсолютное количество транскрипционных факторов Nrf2 и HIF-1 α в коре больших полушарий головного мозга крыс.

Оценка динамики уровня транскрипционных факторов в коре больших полушарий крыс

показала, что содержание Nrf2 возрастало через 2 ч. после моделирования двусторонней окклюзии общих сонных артерий в 3,83 раза ($p < 0,05$), а через 4 ч. ишемии — в 4,05 раза ($p < 0,05$). При этом через сутки уровень данного фактора снижался, но оставался выше значений ложнооперированных крыс в 1,29 раза на уровне тенденции ($p = 0,076$). На третий день эксперимента содержание Nrf2 достигало исходных значений (табл. 2).

Установлено, что билатеральная окклюзия общих сонных артерий приводила к увеличению содержания HIF-1 α на уровне тенденции в 32,12 раза ($p = 0,083$) через 24 ч. после операции, и к достоверному повышению в 17,21 раза ($p < 0,05$) через 72 ч. после экспериментального влияния. При этом в остальные временные точки, различия с показателями ложнооперированных крыс были недостоверны ($p > 0,05$) (табл. 2).

Таблица 2. Содержание транскрипционных факторов Nrf2 и HIF-1 α в коре головного мозга крыс при билатеральной окклюзии общих сонных артерий

Параметры	Серии эксперимента					
	Ложная операция	Билатеральная окклюзия общих сонных артерий				
		30 мин.	2 ч.	4 ч.	24 ч.	72 ч.
n	5	5	5	5	5	5
Количество Nrf2, нг/мг белка	0,021 (0,013; 0,031)	0,011 (0,0052; 0,014)	0,038* (0,028; 0,044)	0,085* (0,015; 0,122)	0,027** (0,023; 0,031)	0,003 (0,0021; 0,0062)

Примечания: * — статистически значимые различия по сравнению с показателями ложнооперированных животных ($p < 0,05$); ** — различия по сравнению с показателями ложнооперированных животных на уровне тенденции ($0,05 < p < 0,1$); HIF-1 α — *hypoxia inducible factor 1 α* (индуцируемый гипоксией фактор 1 α), Nrf2 — *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (редокс-чувствительный транскрипционный фактор 2)

При проведении корреляционного анализа была выявлена прямая зависимость между количеством ABCB1-белка и содержанием Nrf2 в коре головного мозга крыс при билатеральной окклюзии общих сонных артерий ($r = 0,33$, $p = 0,047$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения функционирования ABCB1-белка в коре больших полушарий головного мозга нами была выбрана модель, представляющая собой билатеральную окклюзию общих сонных артерий крыс-самцов, которая является адекватной моделью хронической церебральной гипоперфузии [6].

Установлено, что на фоне билатеральной окклюзии общих сонных артерий уровень ABCB1-белка в коре головного мозга крыс начинал увеличиваться, начиная с 4 ч. после дебюта патологии, и сохранялся повышенным до суток эксперимента. Следует отметить,

что ишемия продолжительностью более 3 сут. не изучалась из-за низкой выживаемости животных, что согласуется с литературными данными [7], а также вследствие частичного восстановления кровообращения в мозге из-за неоангиогенеза у выживших крыс [8], что повлекло бы неверную интерпретацию данных.

В научной литературе продемонстрирована прямая корреляционная зависимость между количеством ABCB1-белка и его функциональной эффлюксной активностью [9]. Соответственно повышение количества ABCB1-белка в коре головного мозга при глобальной церебральной ишемии приведет к усилению его функционирования, что проявится снижением проникновения субстратов белка-транспортера, в т. ч. лекарственных веществ, в ткань головного мозга.

Результаты подобных исследований в научной литературе немногочисленны и противоречивы. Так установлено, что 20-минутная окклюзия вертебральных и сонных артерий вызывала повышение

концентрации в головном мозге крыс доксорубицина — субстрата ABCB1-белка, что, по мнению авторов, связано с истощением уровня аденозинтрифосфата в ткани мозга и уменьшением активности транспортера [10]. Отличия наших результатов от данных других экспериментов могут быть обусловлены разным объемом ишемии головного мозга, длительностью и способом моделирования патологии, выраженностью окислительного стресса, областью взятия образца ткани, различными методами анализа.

Активация перекисного окисления липидов является признаком ряда заболеваний центральной нервной системы, в том числе ишемической этиологии [11]. При исследовании свободнорадикального статуса коры головного мозга крыс нами было обнаружено, что повышение количества ABCB1-белка в коре головного мозга крыс на фоне глобальной церебральной ишемии коррелирует с показателями липопероксидации, что показывает выявленная прямая корреляционная зависимость между уровнем транспортера в мозге и количеством малонового диальдегида — основного показателя, характеризующего интенсификацию перекисного окисления липидов. Полученная зависимость согласуется с результатами других научных трудов, где выявлено, что при ишемии наблюдается активация экспрессии и функциональной активности ABCB1-белка, коррелирующая с интенсификацией перекисного окисления липидов.

Так в эксперименте *in vitro* показано, что влияние перекиси водорода (200 мкМ) приводило к окислительному стрессу и увеличению количества ABCB1-белка и транскриптов *mdr1a* и *mdr1b* в культуре эндотелиальных клеток сосудов головного мозга крыс [12].

При инкубации культур клеток опухолей KB31, KBV1, A549 и DMS-53 на гипо- и гипергликемических средах установлено развитие окислительного стресса за счет НАДФН₂-зависимой оксидазы 4 и дестабилизации мембран митохондрий, увеличение экспрессии и активация транскрипционного фактора HIF-1 и выраженное повышение функциональной активности ABCB1-белка, приводящее к резистентности к его субстрату — доксорубину [13].

Следует отметить, что в научной литературе также представлены данные об ингибировании ABCB1-белка на фоне активации перекисного окисления липидов.

Так на фоне ишемии-реперфузии кишечника отмечалось снижение экскреции печенью субстрата ABCB1-белка — родамина-123, которое может быть обусловлено уменьшением экспрессии транспортера, вследствие увеличения уровня перекисного окисления липидов и повышения содержания информационной рибонуклеиновой кислоты индуцибельной NO-синтазы [14].

В эксперименте *in vitro* установлено, что низкие дозы перекиси водорода (0,1–1,0 мкМ) при инкубации с клетками, гиперэкспрессирующими ABCB1-белок,

приводили к увеличению количества транспортера, но его активность оставалась неизменной. При повышении концентрации прооксиданта до 10 мкМ функциональная активность транспортера снижалась, а при концентрациях 50–100 мкМ происходило снижение его количества и активности [15].

Ингибирование ABCB1-белка на фоне активации перекисного окисления липидов в описанных выше экспериментах, вероятно, обусловлено развитием более выраженного, некомпенсированного окислительного стресса.

Для выявления зависимости количества ABCB1-белка от интенсивности окислительного стресса при глобальной церебральной ишемии и оценки механизмов регуляции транспортера изучено абсолютное количество транскрипционных факторов Nrf2 и HIF-1 α в коре больших полушарий головного мозга крыс. Nrf2 является внутриклеточным сенсором активных форм кислорода и прооксидантов и активатором ряда ферментов детоксикации и эффлюксных транспортеров ксенобиотиков и токсичных продуктов метаболизма, в т. ч. ABCB1-белка [16], а HIF-1 — детектор тканевого дефицита кислорода [17].

Оценка динамики уровня транскрипционных факторов в коре больших полушарий крыс показала, что содержание Nrf2 возрастало через 2 ч., 4 ч. и 24 ч. после моделирования двусторонней окклюзии общих сонных артерий. На третий день эксперимента содержание Nrf2 снижалось до исходных значений. Количество HIF-1 α увеличивалось только через 24 ч. и 72 ч. после операции. При этом при проведении корреляционного анализа была выявлена прямая зависимость между количеством ABCB1-белка и содержанием Nrf2 в коре головного мозга, которая демонстрирует роль данного фактора в регуляции уровня белка-транспортера. Это подтверждается в экспериментах *in vitro*, где показано предотвращение роста количества ABCB1-белка на фоне гипоксии в результате нокадауна гена, кодирующего Nrf2 [18].

В другом исследовании *in vitro* установлено, что ингибирование транскрипционного фактора HIF-1 предотвращает увеличение содержания ABCB1-белка при гипоксии [19]. Следует отметить, что отсутствие достоверных изменений HIF-1 α в первые часы ишемии в нашем эксперименте, вероятно, связано с межиндивидуальными различиями животных. Также известно, что синтезированный Nrf2 быстро разрушается посредством 26S протеосомы в цитоплазме клеток, а образование HIF-1 α характеризуется длительным латентным периодом и большей продолжительностью функционирования из-за сохранения дефицита кислорода [20]. Учитывая приведенные данные *in vitro* и наши результаты, можно предположить, что на ранних этапах ишемии основная роль в регулировании количества ABCB1-белка принадлежит Nrf2, а на поздних — кислородчувствительному фактору.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, количество ABCB1-белка в коре головного мозга крыс при глобальной церебральной ишемии зависит от показателей выраженности окислительного стресса, при этом в его регуляции играют роль транскрипционные факторы Nrf2 и HIF-1 α . Снижение количества транспортера в гематоэнцефалическом барьере за счет влияния на процессы перекисного окисления липидов или синтез изученных транскрипционных факторов расширяет возможности для увеличения проникновения субстратов ABCB1-белка в головной мозг с целью повышения эффективности фармакотерапии различных заболеваний центральной нервной системы, при которых продемонстрирована интенсификация работы транспортера.

ДОПОЛНИТЕЛЬНО

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Вклад авторов: Черных И. В. — концепция исследования, проведение исследования; Шулькин А. В. — анализ и курирование данных; Попова Н. М. — анализ и курирование данных, написание текста; Гацанова М. В. — проведение исследования, разработка методологии; Якушева Е. Н. — руководство научно-исследовательской работой. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

Funding. This study was not supported by any external sources of funding.

Conflict of interests. The authors declare no conflicts of interests.

Contribution of the authors: I. V. Chernykh — concept of study, execution of study; A. V. Shchul'kin — analysis and processing of data; N. M. Popova — analysis and processing of data, writing the text; M. V. Gatsanoga — execution of study, methodology development; E. N. Yakusheva — research management. The authors confirm the correspondence of their authorship to the ICMJE International Criteria. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Ерохина П.Д., Абаленихина Ю.В., Шулькин А.В., и др. Изучение влияния прогестерона на активность гликопротеина-P *in vitro* // Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова. 2020. Т. 28, № 2. С. 135–142. doi: [10.23888/PAVLOVJ2020282135-142](https://doi.org/10.23888/PAVLOVJ2020282135-142)
- Ерохина П.Д., Абаленихина Ю.В., Шулькин А.В., и др. Изучение влияния эстрадиола на активность гликопротеина-P *in vitro* // Наука молодых (Eruditio Juvenium). 2020. Т. 8, № 3. С. 329–336. doi: [10.23888/HMJ202083329-336](https://doi.org/10.23888/HMJ202083329-336)
- Черных И.В., Шулькин А.В., Правкин С.К., и др. Ингибирование активности ABCB1 белка при нарушении мозгового кровообращения может повысить эффективность фармакотерапии // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2021. Т. 15, № 1. С. 65–70. doi: [10.25692/ACEN.2021.1.8](https://doi.org/10.25692/ACEN.2021.1.8)
- Дума С.Н., Рагино Ю.И. Роль антиоксидантов в коррекции психо-вегетативных, астенических и когнитивных нарушений // Трудный пациент. 2011. Т. 9, № 4. С. 28–35.
- Yang C., Zhong Z.-F., Wang S.-P., et al. HIF-1: structure, biology and natural modulators // Chin. J. Nat. Med. 2021. Vol. 19, No. 7. P. 521–527. doi: [10.1016/S1875-5364\(21\)60051-1](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(21)60051-1)
- Zhang T., Gu J., Wu L., et al. Neuroprotective and axonal outgrowth-promoting effects of tetramethylpyrazine nitron in chronic cerebral hypoperfusion rats and primary hippocampal neurons exposed to hypoxia // Neuropharmacology. 2017. Vol. 118. P. 137–147. doi: [10.1016/j.neuropharm.2017.03.022](https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.03.022)
- Мазина Н.В., Волотова Е.В., Куркин Д.В. Нейропротекторное действие нового производного ГАМК-РГПУ-195 при ишемии головного мозга // Фундаментальные исследования. 2013. № 6, Ч. 6. С. 1473–1476.
- Cao D., Bai Y., Li L. Common carotid arteries occlusion surgery in adult rats as a model of chronic cerebral hypoperfusion // Bio Protoc. 2018. Vol. 8, No. 2. P. e2704. doi: [10.21769/BioProtoc.2704](https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2704)
- Leith C.P., Chen I.M., Kopecky K.J., et al. Correlation of multidrug resistance (MDR1) protein expression with functional dye/drug efflux in acute myeloid leukemia by multiparameter flow cytometry: identification of discordant MDR-/efflux+ and MDR+/efflux- cases // Blood. 1995. Vol. 86, No. 6. P. 2329–2342.
- Ohnishi T., Tamai I., Sakanaka K., et al. *In vivo* and *in vitro* evidence for ATP-dependency of P-glycoprotein-mediated efflux of doxorubicin at the blood-brain barrier // Biochem. Pharmacol. 1995. Vol. 49, No. 10. P. 1541–1544. doi: [10.1016/0006-2952\(95\)00082-b](https://doi.org/10.1016/0006-2952(95)00082-b)
- Sita G., Hrelia P., Tarozzi A., et al. P-glycoprotein (ABCB1) and oxidative stress: focus on Alzheimer's disease // Oxid. Med. Cell. Longev. 2017. Vol. 2017. P. 7905486 doi: [10.1155/2017/7905486](https://doi.org/10.1155/2017/7905486)
- Robertson S.J., Kania K.D., Hladky S.B., et al. P-glycoprotein expression in immortalised rat brain endothelial cells: comparisons following exogenously applied hydrogen peroxide and after hypoxia-reoxygenation // J. Neurochem. 2009. Vol. 111, No. 1. P. 132–141. doi: [10.1111/j.1471-4159.2009.06306.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06306.x)
- Seebacher N.A., Richardson D.R., Jansson P.J. Glucose modulation induces reactive oxygen species and increases P-glycoprotein-mediated multidrug resistance to chemotherapeutics // Brit. J. Pharm. 2015. Vol. 172, No. 10. P. 2557–2572. doi: [10.1111/bph.13079](https://doi.org/10.1111/bph.13079)
- Tomita M., Kishimoto H., Takizawa Y., et al. Effects of intestinal ischemia/reperfusion on P-glycoprotein mediated biliary and renal excretion of rhodamine123 in rat // Drug Metab. Pharmacokinet. 2009. Vol. 24, No. 5. P. 428–437. doi: [10.2133/dmpk.24.428](https://doi.org/10.2133/dmpk.24.428)

15. Шулькин А.В., Абаленихина Ю.В., Сеидкулиева А.А., и др. Влияние окислительного стресса на транспорт субстрата Р-гликопротеина через клеточный монослой // Биологические мембраны. 2021. Т. 38, № 4. С. 292–305. doi: [10.31857/S0233475521040101](https://doi.org/10.31857/S0233475521040101)

16. Jeddi F., Soozangar N., Sadeghi M.R., et al. Nrf2 overexpression is associated with P-glycoprotein upregulation in gastric cancer // Biomed. Pharmacother. 2018. Vol. 97. P. 286–292. doi: [10.1016/j.biopha.2017.10.129](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.129)

17. Comerford K.M., Wallace T.J., Karhausen J., et al. Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene // Cancer Res. 2002. Vol. 62, No. 12. P. 3387–3394.

18. Trošelj K.G., Tomljanović M., Jaganjac M., et al. Oxidative Stress and Cancer Heterogeneity Orchestrate NRF2 Roles Relevant for Therapy Response // Molecules. 2022. Vol. 27, No. 5. P. 1468. doi: [10.3390/molecules27051468](https://doi.org/10.3390/molecules27051468)

19. Parmakhtiar B., Burger R.A., Kim J.-H., et al. HIF Inactivation of p53 in Ovarian Cancer Can Be Reversed by Topotecan, Restoring Cisplatin and Paclitaxel Sensitivity // Mol. Cancer Res. 2019. Vol. 17, No. 8. P. 1675–1686. doi: [10.1158/1541-7786.MCR-18-1109](https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-18-1109)

20. He J.-L., Zhou Z.-W., Yin J.-J., et al. Schisandra chinensis regulates drug metabolizing enzymes and drug transporters via activation of Nrf2-mediated signaling pathway // Drug Des. Devel. Ther. 2014. Vol. 9. P. 127–146. doi: [10.2147/DDDT.S68501](https://doi.org/10.2147/DDDT.S68501)

REFERENCES

1. Erokhina PD, Abalenikhina YV, Shchulkin AV, et al. A study of influence of progesterone on activity of Glycoprotein-P *in vitro*. *I. P. Pavlov Russian Medical Biological Herald*. 2020;28(2):135–42. (In Russ). doi: [10.23888/PAVLOVJ2020282135-142](https://doi.org/10.23888/PAVLOVJ2020282135-142)

2. Erokhina PD, Abalenikhina YuV, Shchulkin AV, et al. Study of influence of estradiol on the activity of P-glycoprotein *in vitro*. *Nauka Molodykh (Eruditio Juvenium)*. 2020;8(3):329–36. (In Russ). doi: [10.23888/HMJ202083329-336](https://doi.org/10.23888/HMJ202083329-336)

3. Chernykh IV, Shchulkin AV, Pravkin SK, et al. Inhibition of ABCB1 activity in cerebrovascular disease may increase pharmacotherapy effectiveness. *Annals of Clinical and Experimental Neurology*. 2021;15(1):65–70. (In Russ). doi: [10.25692/ACEN.2021.1.8](https://doi.org/10.25692/ACEN.2021.1.8)

4. Duma SN, Ragino Yul. Rol' antioksidantov v korrektsii psiko-vegetativnykh, astenicheskikh i kognitivnykh narusheniy. *Trudnyy Patsiyent*. 2011;9(4):28–35. (In Russ).

5. Yang C, Zhong Z-F, Wang S-P, et al. HIF-1: structure, biology and natural modulators. *Chin J Nat Med*. 2021;19(7):521–7. doi: [10.1016/S1875-5364\(21\)60051-1](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(21)60051-1)

6. Zhang T, Gu J, Wu L, et al. Neuroprotective and axonal outgrowth-promoting effects of tetramethylpyrazine nitron in chronic cerebral hypoperfusion rats and primary hippocampal neurons exposed to hypoxia. *Neuropharmacology*. 2017;118:137–47. doi: [10.1016/j.neuropharm.2017.03.022](https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.03.022)

7. Mazina NV, Volotova EV, Kurkin DV. Neuroprotective action of a new derivative of GABA-RGPU-195 in cerebral ischemia. *Fundamental Research*. 2013;(6, Pt 6):1473–6. (In Russ).

8. Cao D, Bai Y, Li L. Common carotid arteries occlusion surgery in adult rats as a model of chronic cerebral hypoperfusion. *Bio Protocol*. 2018;8(2):e2704. doi: [10.21769/BioProtoc.2704](https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2704)

9. Leith CP, Chen IM, Kopecky KJ, et al. Correlation of multidrug resistance (MDR1) protein expression with functional dye/drug efflux in acute myeloid leukemia by multiparameter flow cytometry: identification of discordant MDR-/efflux+ and MDR+/efflux- cases. *Blood*. 1995;86(6):2329–42.

10. Ohnishi T, Tamai I, Sakanaka K, et al. *In vivo* and *in vitro* evidence for ATP-dependency of P-glycoprotein-mediated efflux of doxorubicin at the blood-brain barrier. *Biochem Pharmacol*. 1995;49(10):1541–4. doi: [10.1016/0006-2952\(95\)00082-b](https://doi.org/10.1016/0006-2952(95)00082-b)

11. Sita G, Hrelia P, Tarozzi A, et al. P-glycoprotein (ABCB1) and oxidative stress: focus on Alzheimer's disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:7905486 doi: [10.1155/2017/7905486](https://doi.org/10.1155/2017/7905486)

12. Robertson SJ, Kania KD, Hladky SB, Barrand MA. P-glycoprotein expression in immortalised rat brain endothelial cells: comparisons following exogenously applied hydrogen peroxide and after hypoxia-reoxygenation. *J Neurochem*. 2009;111(1):132–41. doi: [10.1111/j.1471-4159.2009.06306.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06306.x)

13. Seebacher NA, Richardson DR, Jansson PJ. Glucose modulation induces reactive oxygen species and increases P-glycoprotein-mediated multidrug resistance to chemotherapeutics. *Brit J Pharm*. 2015;172(10):2557–72. doi: [10.1111/bph.13079](https://doi.org/10.1111/bph.13079)

14. Tomita M, Kishimoto H, Takizawa Y, et al. Effects of intestinal ischemia/reperfusion on P-glycoprotein mediated biliary and renal excretion of rhodamine123 in rat. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2009;24(5):428–37. doi: [10.2133/dmpk.24.428](https://doi.org/10.2133/dmpk.24.428)

15. Shchulkin AV, Abalenikhina YuV, Seidkulieva AA, et al. Effect of Oxidative Stress on the Transport of P-Glycoprotein Substrate through the Cell Monolayer. *Biologicheskiye Membrany*. 2021;38(4):292–305. (In Russ). doi: [10.31857/S0233475521040101](https://doi.org/10.31857/S0233475521040101)

16. Jeddi F, Soozangar N, Sadeghi MR, et al. Nrf2 overexpression is associated with P-glycoprotein upregulation in gastric cancer. *Biomed Pharmacother*. 2018;97:286–92. doi: [10.1016/j.biopha.2017.10.129](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.129)

17. Comerford KM, Wallace TJ, Karhausen J, et al. Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. *Cancer Res*. 2002;62(12):3387–94.

18. Trošelj KG, Tomljanović M, Jaganjac M, et al. Oxidative Stress and Cancer Heterogeneity Orchestrate NRF2 Roles Relevant for Therapy Response. *Molecules*. 2022;27(5):1468. doi: [10.3390/molecules27051468](https://doi.org/10.3390/molecules27051468)

19. Parmakhtiar B, Burger RA, Kim J-H, et al. HIF Inactivation of p53 in Ovarian Cancer Can Be Reversed by Topotecan, Restoring Cisplatin and Paclitaxel Sensitivity. *Mol Cancer Res*. 2019;17(8):1675–86. doi: [10.1158/1541-7786.MCR-18-1109](https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-18-1109)

20. He J-L, Zhou Z-W, Yin J-J, et al. Schisandra chinensis regulates drug metabolizing enzymes and drug transporters via activation of Nrf2-mediated signaling pathway. *Drug Des Devel Ther*. 2015;9:127–46. doi: [10.2147/DDDT.S68501](https://doi.org/10.2147/DDDT.S68501)

ОБ АВТОРАХ

Черных Иван Владимирович, д.б.н., доцент;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5618-7607>;
eLibrary SPIN: 5238-6165; e-mail: ivchernykh88@mail.ru

Щулькин Алексей Владимирович, д.м.н., доцент;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1688-0017>;
eLibrary SPIN: 2754-1702; e-mail: alekseyshulkin@rambler.ru

***Попова Наталья Михайловна**, к.м.н., доцент;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5166-8372>;
eLibrary SPIN: 7553-9852; e-mail: p34-66@yandex.ru

Гацаного Мария Валерьевна, к.м.н.;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1116-6271>;
eLibrary SPIN: 9645-5079; e-mail: mvgatsanoga@mail.ru

Якушева Елена Николаевна, д.м.н., профессор;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6887-4888>;
eLibrary SPIN: 2865-3080; e-mail: enya.rzn@yandex.ru

AUTHOR'S INFO

Ivan V. Chernykh, Dr. Sci. (Biol.), Associate Professor;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5618-7607>;
eLibrary SPIN: 5238-6165; e-mail: ivchernykh88@mail.ru

Aleksey V. Shchul'kin, MD, Dr. Sci. (Med.), Associate Professor;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1688-0017>;
eLibrary SPIN: 2754-1702; e-mail: alekseyshulkin@rambler.ru

***Natal'ya M. Popova**, MD, Cand. Sci. (Med.); Associate Professor;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5166-8372>;
eLibrary SPIN: 7553-9852; e-mail: p34-66@yandex.ru

Mariya V. Gatsanoga, MD, Cand. Sci. (Med.);
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1116-6271>;
eLibrary SPIN: 9645-5079; e-mail: mvgatsanoga@mail.ru

Elena N. Yakusheva — MD, Dr. Sci. (Med.), Professor;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6887-4888>;
eLibrary SPIN: 2865-3080; e-mail: enya.rzn@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author