

© Коллектив авторов, 2015
УДК 615.357:616.133-007.272

ЭКСПРЕССИЯ ГЛИКОПРОТЕИНА-P В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС ПРИ ОККЛЮЗИИ-РЕПЕРFUЗИИ ОБЩЕЙ СОННОЙ АРТЕРИИ

Е.Н. Якушева, И.В. Черных, А.В. Шулькин, И.Ю. Виноградов

Рязанский государственный медицинский университет
им. акад. И.П. Павлова, г. Рязань

На крысах wistar изучено влияние окклюзии-реперфузии общей сонной артерии на экспрессию белка-транспортёра гликопротеина-P в головном мозге и оценена ее взаимосвязь с уровнем окислительного стресса ткани коры больших полушарий мозга. Ишемию мозга моделировали под эфирным наркозом пережатием общей сонной артерии сосудистым зажимом в течение 180 минут с последующей реканализацией и ушиванием раны. Образцы коры больших полушарий мозга забирали через 60 мин, 4 ч, 24 ч, 5 суток и 14 суток после восстановления кровотока и подвергали стандартной иммуногистохимической обработке, а также оценке окислительно-восстановительного статуса.

Выявлено, что 180-минутная односторонняя окклюзия общей сонной артерии с последующей реперфузией вызывает снижение экспрессии гликопротеина-P через 60 мин и 4 ч после восстановления кровотока на 52,5% и 63,1% ($p < 0,05$) соответственно. Динамика экспрессии гликопротеина-P находится в обратной корреляционной зависимости от концентрации ТБК-реактивных продуктов в ткани головного мозга.

Ключевые слова: гликопротеин-P, ABCB1-белок, экспрессия, окклюзия общей сонной артерии, реперфузия, редокс-статус.

Говоря о неврологии, нельзя не упомянуть того, что более 98% фармацевтических субстанций-кандидатов в препараты для терапии заболеваний центральной нервной системы никогда не достигают стадии клинических исследований [15]. Причиной этому зачастую является их недостаточное проникновение через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) для достижения минимальной эффективной концентрации в тканях мозга. В процессе транспорта лекарственных веществ через ГЭБ важную роль отводят функционированию гликопротеина-P (Pgp).

Гликопротеин-P (Pgp) – АТФ-зависимый мембранный белок-транспортёр с широкой субстратной специфичностью [4]. Различные факторы внутренней и внешней среды, такие как генетические особенности, гормональный статус, гипоксия, прием ряда

пищевых продуктов и лекарственных веществ способны влиять на активность Pgp и, как следствие, изменять проницаемость ГЭБ для субстратов белка-транспортёра и приводить к неэффективности фармакотерапии или развитию нежелательных центральных эффектов [2, 5].

Доказано наличие Pgp в гематоэнцефалическом барьере, глиальных клетках и нейронах головного мозга, где он совместно с другими защитными механизмами обеспечивает проникновение в ткани мозга лишь ряда низкомолекулярных веществ [17].

Инсульт встречается в среднем с частотой 200 случаев на 100000 населения [26]. Современные американские рекомендации по лечению ишемического инсульта не включают применение нейротекторов для коррекции его послед-

ствий, вследствие недоказанности их клинической эффективности [11]. Одной из вероятных причин этого является недостаточное проникновение данной группы препаратов в головной мозг за счет эффлюкса Pgp.

В ряде исследований как *in vitro*, так и *in vivo* показано, что экзогенная гипоксическая гипоксия является индуктором функциональной активности и экспрессии Pgp [5, 12, 23].

Оценка экспрессии Pgp *in vivo* на фоне циркуляторной гипоксии выполнялась лишь в отдельных работах [6, 20]. Влияние на функционирование транспортера метаболитических сдвигов при ишемии-реперфузии детально не изучалось, а полученные результаты носят противоречивый характер. Кроме того, разнонаправленные изменения функциональной активности и экспрессии Pgp на фоне окислительного стресса, продемонстрированные в ряде работ [23, 25], требуют проведения дополнительных исследований.

В связи с вышеизложенным, целью настоящего исследования явилась оценка экспрессии Pgp в головном мозге при его ишемии-реперфузии, а также анализ корреляции между экспрессией транспортера и редокс-статусом ткани мозга.

Материалы и методы

Исследование выполнено на 38 крысах wistar массой 250–300 г. Манипуляции с животными осуществлялись в соответствии с правилами лабораторной практики (Приложение к приказу Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 года 708н).

Животные были разделены на 2 серии. 1-я серия – интактные животные ($n=8$), которым моделировали «ложную операцию» путем вскрытия кожи и мягких тканей шеи животного, выделения общей сонной артерии и ушивания раны. 2-я серия – это животные, которым моделировали ишемию головного мозга в течении 180 минут с последующей реперфузией.

Животные 2-й серии были разделены на следующие группы: 60 мин, 4 ч, 24 ч, 5

суток и 14 суток после восстановления кровотока ($n=6$ на каждый срок опыта).

Окклюзию общей сонной артерии моделировали под эфирным наркозом после вскрытия мягких тканей шеи животных, выделения правой общей сонной артерии и ее пережатия сосудистым зажимом в течение 180 минут. Все манипуляции выполнялись в условиях операционной вивария РязГМУ.

По окончании исследования животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом. Для анализа забирали ткань правой лобной доли коры больших полушарий, часть которой фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина, а часть замораживали при -29°C для проведения биохимических исследований.

Гистологический материал подвергался стандартной обработке, включающей обезвоживание в растворах этанола возрастающей концентрации, просветление ксилолом и помещение в парафин. Перед реакцией иммунного окрашивания проводили демаскировку антигенов тканей нагреванием на водяной бане в 10 мМ цитратном буфере (pH 6,0), блокировали эндогенную пероксидазу 3%-м раствором H_2O_2 . Затем инкубировали срезы с первичными антителами к Pgp (Mdr-1 3H2833: sc-71557 «SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC», США) в разведении 1:50. Для иммунного окрашивания использовали полимерную систему детекции с пероксидазной меткой («ДАКО», Дания). Ядра клеток докрашивали гематоксилином.

Микропрепарат фотографировали цифровой камерой Canon Power Shot G5 с 400-кратным увеличением. В каждом гистологическом препарате оценивали 10 репрезентативных участков с помощью медицинской программы анализа и обработки цифровых изображений ImageJ. В связи с преимущественной локализацией Pgp в гематоэнцефалическом барьере головного мозга рассчитывали относительную площадь данной ткани, экспрессирующей Pgp как: площадь гематоэнцефалического барьера, экспрессирующего Pgp, (pix^2) / общая площадь поля зрения (pix^2).

В гомогенате коры больших полушарий определяли содержание ТБК-реактивных продуктов по реакции с тиобарбитуровой кислотой [1], свободных сульфгидрильных (SH) групп по реакции с дисульфид 5,5-дитиобис-2-нитробензоатом [9], активность глутатионпероксидазы (G-per) по реакции окисления восстановленного глутатитона с гидроперекисью третбутила и сопряженной с ней реакцией восстановления образовавшегося окисленного глутатиона НАДФН2 [3] и активность глутатион-S-трансферазы (G-tr) по реакции конъюгации глутатиона с 1-хлор-2,4-динитробензолом, катализируемой данным ферментом [13].

Полученные результаты подвергали статистической обработке программой «StatSoft Statistica 7.0» и «БИОСТАТ». Тип распределения данных оценивали по критерию Шапиро-Уилка. При нормальном распределении данных использовали тест ANOVA, при распределении данных отличным от нормального – критерий Крускала-Уоллиса. Межгрупповые раз-

личия определяли по критерию Ньюмена-Кейсла. Зависимость экспрессии Pgr в гематоэнцефалическом барьере от изучаемых биохимических показателей оценивали по коэффициенту корреляции Пирсона (r) или Спирмена (Rs). Данные в таблицах представлены в виде среднего арифметического ± стандартное отклонение (M±SD) – при нормальном распределении данных, или в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей (Med, lq, uq) – при распределении данных, отличным от нормального.

Результаты и их обсуждение

180-минутная односторонняя окклюзия общей сонной артерии крыс с последующей реперфузией в течение 60 мин, 4 ч, 24 ч, 5 суток и 14 суток приводила к снижению экспрессии Pgr в головном мозге через 60 мин и 4 после реперфузии на 52,5% и 63,1% (p<0,05) соответственно (рис. 1, табл. 1). В остальные сроки наблюдения изучаемый показатель достоверно от значений интактных животных не отличался (p>0,05).

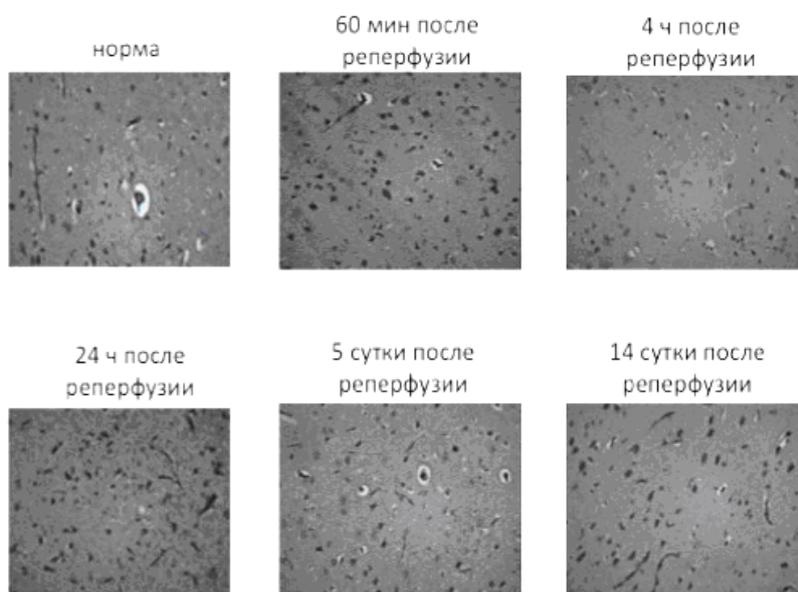


Рис. 1. Срезы коры лобной доли больших полушарий головного мозга крыс, окрашенные иммуногистохимически (x400 раз)

Окклюзия-реперфузия приводила к развитию выраженного окислительного стресса в ткани коры головного мозга (табл. 1). Уровень ТБК-реактивных про-

дуктов увеличивался через 60 мин после реперфузии на 68,2% ($p < 0,05$) по сравнению с показателями нормы.

Таблица 1

Выраженность окислительного стресса в коре больших полушарий и экспрессия гликопротеина-P в гематоэнцефалическом барьере при односторонней окклюзии общей сонной артерии в течение 180 мин и последующей реперфузии

Изучаемый показатель	Серии эксперимента					
	Интактные животные	Ишемия-реперфузия				
		60 мин	4 ч	24 ч	5 дней	14 дней
Экспрессия Pgp	1,42 (1,13; 1,596)	0,674 (0,598; 0,743)*	0,524 (0,43; 0,70)*	0,98 (0,94; 1,24)	0,89 (0,71; 1,17)	0,89 (0,75; 0,99)
ТБК-реактивные продукты, нмоль/мг белка	8,98 (7,55; 9,8)	15,1 (11,4; 15,5)*	11,87 (10,78; 12,59)	11,65 (8,65; 13,6)	9,46 (7,7; 10,47)	11,79 (10,1; 12,55)
SH-группы, мкмоль/мг белка	4,88 (4,2; 5,4)	3,5 (2,85; 4,07)	3,6 (3,4; 3,7)	2,77 (2,34; 3,33)*	2,78 (2,21; 3,48)*	3,3 (2,87; 3,53)*
Активность G-tr, нмоль ХДНБ/мг белка*мин	80,8 (73,3; 87,97)	81,6 (66,62; 87,37)	72,12 (69,73; 87,20)	82,06 (69,7; 95,07)	84,95 (79,18; 90,18)	89,15 (78,24; 103,57)
Активность G-рег, нмоль НАДФН/мг белка*мин	19,68 (16,65; 22,16)	23,01 (17,53; 29,06)	16,4 (14,3; 18,04)	20,89 (15,95; 26,63)	19,46 (14,27; 22,96)	23,7 (20,38; 25,54)

* – $p < 0,05$ – достоверные различия по сравнению с показателями интактных животных

Концентрация SH-групп снижалась через 24 ч после реперфузии на 43,2% ($p < 0,05$), через 5 дней – на 43,0%, через 14 дней – на 32,4% ($p < 0,05$).

Активность G-tr и G-рег достоверно от показателей интактных животных не отличались, хотя и имелась отчетливая тенденция к ее снижению на 4 час реперфузии.

При проведении корреляционного анализа была выявлена обратная пропорциональная зависимость между экспрессией Pgp в гематоэнцефалическом барьере и концентрацией ТБК-реактивных продуктов в гомогенате мозга $R_s = -0,425$ ($p < 0,009$). Экспрессия транспортера в мозге не коррелировала с остальными изучаемыми биохимическими показателями уровня окислительного стресса.

В настоящем исследовании изучалась экспрессия Pgp в лобной доле коры головного мозга крыс при ишемии-реперфузии общей сонной артерии и ее корреляция с выраженностью окислительного стресса в ткани мозга.

Установлено, что при окклюзии общей сонной артерии в течение 90 мин и последующей реперфузии выявляется снижение экспрессии Pgp в ГЭБ через 1 и 4 ч после реперфузии. В ткани мозга при этом наблюдается активация свободно-радикального окисления, что подтверждается повышением уровня ТБК-реактивных продуктов, снижением концентрации сульфгидрильных групп и тенденцией к снижению активности антиоксидантных ферментов.

В подавляющем большинстве исследований на культурах эндотелиальных клеток гематоэнцефалического барьера установлено, что гипоксическая гипоксия повышает экспрессию и функциональную активность Pgp, причем ведущая роль в регуляции данного процесса принадлежит ряду транскрипционных факторов, таких как NIF1, Sp1, Nrf2 [16, 18], а также редокс-статусу [18, 21]. С другой стороны, эксперименты *in vivo* демонстрируют неоднозначные результаты.

Исследование экспрессии Pgp у 3-месячных крыс со спонтанной гипертензией (3-month-old stroke-prone spontaneously hypertensive rats) показало более интенсивную экспрессию белка-транспортера и его иРНК в сосудах гиппокампа, чем у контрольных животных, а также по сравнению с сосудами коры [27].

Часовая ишемия печени крыс с последующей реперфузией в течение 4, 24, 48 часов и 1 недели привела к ингибированию экспрессии Pgp, а также возрастанию внутриклеточной концентрации флуоресцентного красителя родамина 123 – субстрата транспортера, что свидетельствует о снижении его функциональной активности [8]. Аналогично снижение печеночной экскреции родамина 123 на 26% было выявлено в другом исследовании при печеночной ишемии с последующей реперфузией в течение 24 часов, что может быть связано со сниженным поступлением в печень флуоресцентного красителя и угнетением синтеза АТФ. При этом экспрессия Pgp в мембране печеночных канальцев возрастала вдвое. В гематоэнцефалическом барьере мозга крыс изменения были аналогичны: 24%-е возрастание экспрессии транспортера при 30%-м снижении эффлюкса его субстрата [7].

Различия в представленных результатах могут быть связаны с рядом причин, например, разными объемом ишемизированного мозга, продолжительностью ишемии, областью головного мозга, которая забиралась для анализа.

Анализ литературных данных свидетельствует также о разнонаправленном регуляторном влиянии редокс-статуса на функциональную активность и экспрессию Pgp. Вероятно, это связано с различной глубиной окислительного стресса, смоделированного в экспериментах [10, 19].

В ряде исследований показана большая уязвимость к оксидативному стрессу клеток, гиперэкспрессирующих Pgp, по сравнению с нормальными клетками [14, 24]. Поэтому возможной причиной ингибирования экспрессии Pgp в нашем эксперименте является выраженный окислительный стресс, вызывающий био-

деградацию белка-транспортера. Кроме того, установлено наличие белка, индуцируемого ишемией-реперфузией (ischemia-reperfusion-inducible protein – hIRIP), оказывающего ингибирующее влияние на эффлюксные транспортеры, в том числе Pgp. Выявлено, что экспрессия данного протеина повышается при окклюзии-реперфузии, а также эндотоксемии. hIRIP не изменяет биосинтез Pgp, однако оказывает негативное воздействие на его процессинг и способствует биодеградации белка-транспортера [22].

Выводы

1. Односторонняя окклюзия общей сонной артерии у крыс с последующей реперфузией приводит к развитию окислительного стресса в ткани лобной доли коры пораженного полушария головного мозга, и снижению экспрессии гликопротеина-P в головном мозге через 1 и 4 ч от момента реканализации.

2. Выявлена обратнопропорциональная зависимость между экспрессией гликопротеина-P и уровнем ТБК-реактивных продуктов в ткани головного мозга.

Литература

1. Гаврилова В.Б. Анализ методов определения продуктов ПОЛ / В.Б. Гаврилова, А.Р. Гаврилова, Л.М. Мазул // *Вопр. мед. химии.* – 1987. – Т. 1. – С. 118-120.
2. Кукес В.Г. Метаболизм лекарственных средств. Научные основы персонализированной медицины: руководство для врачей / В.Г. Кукес. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 304 с.
3. Ланкин В.З. Ингибирование перекисления липидов и детоксикация липоперекисей защитными ферментативными системами (супероксиддисмутаза, глутатион-пероксидаза, глутатион-редуктаза) при экспериментальном злокачественном росте / В.З. Ланкин, С.М. Гуревич // *ДАН СССР.* – 1976. – Т. 226, №3. – Р. 705-708.
4. Якушева Е.Н. Характеристика гликопротеина-P как белка-транспортера лекарственных веществ / Е.Н. Якушева, И.В. Черных, А.С. Бирюкова // *Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова.* – 2011. – №3. – С. 142-148.

5. Якушева Е.Н. Влияние экспериментальной подострой гипобарической гипоксической гипоксии на функциональную активность гликопротеина-P / Е.Н. Якушева, И.В. Черных // Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова. – 2013. – №1. – С. 60-64.
6. Alteration in P-glycoprotein at the blood-brain barrier in the early period of MCAO in rats / J. Cen [et al.] // J. Pharm. Pharmacol. – 2013. – Vol. 65. – P. 665-672.
7. Effects of hepatic ischemia-reperfusion injury on the P-glycoprotein activity at the liver canalicular membrane and blood-brain barrier determined by in vivo administration of rhodamine 123 in rats / M.K. Miah [et al.] // Pharm. Res. – 2014. – Vol. 31, №4. – P. 861-873.
8. Effects of long-term hepatic ischemia-reperfusion injury on the function of P-glycoprotein in vivo in rats / C.A. Thorling [et al.] // J. Pharm. Pharm. Sci. – 2014. – Vol. 17, №1. – P. 121-135.
9. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups / G.L. Ellman // Archives of biochemistry and biophysics. – 1959. – Vol. 82, №1. – P. 70-77.
10. Evaluation of oxidative stress in placenta of fetal cardiac dysfunction rat model and antioxidant defenses of maternal vitamin C supplementation with the impacts on P-glycoprotein / Y. Li [et al.] // J. Obstet. Gynaecol. Res. – 2014. – Vol. 40, №6. – P. 1632-1642.
11. Experimental treatments in acute stroke / V.E. O'Collins [et al.] // Ann. Neurol. – 2006. – Vol. 59. – P. 467-477.
12. Expression and significance of hypoxia-inducible factor-1 alpha and MDR1/P-glycoprotein in human colon carcinoma tissue and cells / Z. Ding [et al.] // Cancer Res. Clin. Oncol. – 2010. – Vol. 136, №11. – P. 1697-1707.
13. Keen J.N. Glutathione transferases catalysis of nucleophilic reactions of glutathione / J.N. Keen, W.B. Iakoby // Biol. Chem. – 1978. – Vol. 253, №16. – P. 5654-5657.
14. Lower antioxidative capacity of multi-drug-resistant cancer cells confers collateral sensitivity to protoflavone derivatives / T. Stankovic [et al.] // Cancer Chemother. Pharmacol. – 2015. – Jul 22. [Epub ahead of print].
15. Miller D.S. Modulation of P-glycoprotein at the blood-brain barrier: opportunities to improve central nervous system pharmacotherapy / D.S. Miller, B. Bauer, A.M.S. Hartz // Pharmacological reviews. – 2008. – Vol. 60, №2. – P. 196-209.
16. Modulation of P-glycoprotein in rat brain microvessel endothelial cells under oxygen glucose deprivation / B.S. Ji [et al.] // J. Pharm. Pharmacol. – 2013. – Vol. 65, №10. – P. 1508-1517.
17. Neuronal expression of the drug efflux transporter P-glycoprotein in the rat hippocampus after limbic seizures / H.A. Volka [et al.] // Neurosci. – 2004. – Vol. 123, №3. – P. 751-759.
18. Nitric oxide contributes to hypoxia-reoxygenation-induced P-glycoprotein expression in rat brain endothelial cells / S.J. Robertson [et al.] // Cell Mol. Neurobiol. – 2011. – Vol. 31, №7. – P. 1103-1111.
19. Nrf2 Upregulates ATP Binding Cassette Transporter Expression and Activity at the Blood-Brain and Blood-Spinal Cord Barriers / X. Wang [et al.] // J. Neurosci. – 2014. – Vol. 34, №25. – P. 8585-8593.
20. P-glycoprotein expression in brain capillary endothelial cells after focal ischemia in rat / K. Samoto [et al.] // Neurol. Res. – 1994. – Vol. 60. – P. 257-260.
21. P-glycoprotein expression in immortalised rat brain endothelial cells: comparisons following exogenously applied hydrogen peroxide and after hypoxia-reoxygenation / S.J. Robertson [et al.] // J. Neurochem. – 2009. – Vol. 111, №1. – P. 132-141.
22. Prokopenko O. Ischemia-reperfusion-inducibile protein modulates cell sensitivity to anticancer drugs by regulating activity of efflux transporter / O. Prokopenko, O. Mirochnitchenko // Am. J. Physiol. – 2009. – Vol. 296, №5. – P. 1086-1097.
23. Regulation of hypoxia inducible factor-1α expression by the alteration of redox status in HepG2 cells / W.S. Jin [et al.] //

- J. Exp. Clin. Cancer. – 2011. – Vol. 30, №1. – P. 21130-21139.
24. Salvianolic acid A shows selective cytotoxicity against multidrug-resistant MCF-7 breast cancer cells / X. Wang [et al.] // Anticancer Drugs. – 2015. – Vol. 26, №2. – P. 210-223.
25. Seebacher N.A. Glucose modulation induces reactive oxygen species and increases P-glycoprotein-mediated multidrug resistance to chemotherapeutics / N.A. Seebacher, D.R. Richardson, P.J. Jansson // Br. J. Pharmacol. – 2015. – Vol. 172, №10. – P. 2557-2572.
26. Soler E.P. Epidemiology and Risk Factors of Cerebral Ischemia and Ischemic Heart Diseases: Similarities and Differences / E.P. Soler, V.C. Ruiz // Curr. Cardiol. Rev. – 2010. – Vol. 6, №3. – P. 138-149.
27. The expression of P-glycoprotein is increased in vessels with blood-brain barrier impairment in a stroke-prone hypertensive model / M. Ueno [et al.] // Neurobiol. Appl. Neurobiol. – 2009. – Vol. 35, №2. – P. 147-155.

Исследование поддержано грантом РФФИ №14-04-97522 о_центр_a

P-GLYCOPROTEIN EXPRESSION IN BRAIN DURING ISCHEMIA-REPERFUSION

E.N. Yakusheva, I.V. Chernykh, A.V. Shchulkin, I.Yu. Vinogradov

On wistar rats expression of P-glycoprotein in the brain after unilateral occlusion-reperfusion of the common carotid artery was studied. Correlation between the expression of the transporter and redox status of the brain cerebral cortex was assessed. Occlusion was simulated under ether anesthesia by common carotid artery clamping using vascular clamp for 180 minutes followed by recanalization. Samples of cerebral cortex were taken after 60 min, 4 h, 24 h, 5 days and 14 days after reperfusion and subjected to standard immunohistochemical processing, as well as evaluating the redox status.

It was revealed that the 180-minute occlusion of unilateral common carotid artery followed by reperfusion causes a decrease in the expression of P-glycoprotein after 60 min and 4 hours after reperfusion by 52,5% и 63,1% ($p<0,05$) respectively. P-glycoprotein expression is conversely related with the level of TBA-reactive species.

Keywords: *P-glycoprotein, ABCB1-protein, expression, common carotid artery occlusion, reperfusion, blood-brain barrier, redox-status.*

Якушева Е.Н. – д.м.н., проф., зав. кафедрой фармакологии с курсом фармации ФДПО ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России.
E-mail: e.yakusheva@rzgmu.ru

Черных И.В. – к.б.н., ассист. кафедры общей химии с курсом биоорганической и органической химии ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России.
E-mail: Ivchernykh88@mail.ru

Щулькин А.В. – к.м.н., ассист. каф кафедры фармакологии с курсом фармации ФДПО ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России.
E-mail: alekseyshulkin@rambler.ru

Виноградов И.Ю. – к.м.н., ст. науч. сотрудник ЦНИЛ ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России.
E-mail: vinogradovnc@yandex.ru