



УДК 615.033:616.133-007.272-008.9

ЭКСПРЕССИЯ ГЛИКОПРОТЕИНА-P В ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОМ БАРЬЕРЕ ПРИ ДВУХСТОРОННЕЙ ОККЛЮЗИИ ОБЩИХ СОННЫХ АРТЕРИЙ

**И.В. ЧЕРНЫХ
Е.Н. ЯКУШЕВА
А.В. ЩУЛЬКИН
И.Ю. ВИНОГРАДОВ
Д.С. ТИТОВ**

*Рязанский
государственный
медицинский университет*

e-mail: enya.rzn@yandex.ru

В исследовании на 24 крысах Wistar изучено влияние двухсторонней окклюзии общих сонных артерий на экспрессию белка-транспортера гликопротеина-P (Pgp) в гематоэнцефалическом барьере лобных долей больших полушарий мозга. Экспрессию Pgp оценивали методом иммуногистохимического окрашивания с использованием моноклональных антител. Дополнительно анализировали зависимость интенсивности экспрессии транспортера от уровня окислительного стресса в ткани мозга. Выявлена индукция экспрессии Pgp через 4 часа после начала окклюзии, которая находилась в обратнопропорциональной зависимости от концентрации SH-групп в ткани коры головного мозга.

Ключевые слова: гликопротеин-P, ABCB1-белок, ишемия, инсульт, перекисное окисление липидов, общие сонные артерии.

Гликопротеин-P (Pgp) или ABCB1-белок – это энергозависимый белок-транспортер, участвующий в эффлюксе большого числа различных по химической структуре веществ. Считается, что, локализуясь в мембране эндотелиальных клеток гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), Pgp обеспечивает защиту головного мозга от ксенобиотиков и ряда биобиотиков, препятствуя их проникновению в ткань мозга [14].

Установлено, что функциональная активность Pgp вариабельна и может различаться у представителей одного вида в результате гендерных различий [4], генетических особенностей (полиморфизм гена MDR1, кодирующего транспортер, и транскрипционных факторов, регулирующих его экспрессию, различия в посттранскрипционных процессах и пр.), а также изменяться под действием широкого спектра лекарственных средств и факторов внешней и внутренней среды [2, 3, 5, 9]. При этом, повышение функциональной активности Pgp может привести к неэффективности фармакотерапии в связи с интенсивным выведением веществ из клеток и препятствованием их всасыванию в желудочно-кишечном тракте, а снижение – к развитию относительной передозировки и нежелательным лекарственным реакциям [7].

В ряде исследований показано, что экзогенная гипоксическая гипоксия является сильным индуктором функциональной активности Pgp [6, 9, 11, 15]. Предполагается, что развитие гипоксии при различных заболеваниях может существенно изменить фармакокинетику веществ-субстратов Pgp, поэтому способно оказать влияние на эффективность фармакотерапии. Однако влияние других типов гипоксии на экспрессию и функциональную активность данного белка-транспортера и механизмы его реализации изучены недостаточно.

Цель настоящего экспериментального исследования – изучить экспрессию Pgp в гематоэнцефалическом барьере при ишемии головного мозга и ее зависимость от выраженности окислительного стресса.

Материалы и методы. Исследование выполнено на 24 крысах Wistar массой 250-300 г. Работа с животными проводилась в соответствии с правилами лабораторной практики (Приложение к приказу Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 года 708н).

Все животные были разделены на 4 серии: 1 серия – интактные животные, которым выполняли ложную операцию со вскрытием кожных покровов, но без перевязки сонных артерий; 2, 3 и 4 серии – животные, которым моделировали ишемию головного мозга продолжительностью 30 минут, 2 и 4 часа соответственно. Каждая серия включала по 6 крыс. Ишемию головного мозга моделировали двухсторонней перевязкой общих сонных артерий под эфирным наркозом. Все манипуляции выполняли в условиях операционной вивария РязГМУ.

В конце исследования животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом. Для исследования забирали кору лобных долей больших полушарий, часть которой фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина, а часть замораживали при -29°C для проведения биохимических исследований.

Гистологический материал подвергали стандартной обработке: проводили обезвоживание в растворах этилового спирта возрастающей концентрации, просветляли ксилолом и заключали в парафин. Перед реакцией иммунного окрашивания производили демаскировку антигенов тканей посредством нагревания на водяной бане в 10 мМ цитратном буфере (pH 6,0),



блокировали эндогенную пероксидазу 3%-ным раствором пероксида водорода. Затем инкубировали срезы с первичными антителами к Pgp (Mdr-1 3H2833: sc-71557 «SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC», США) в разведении 1:50 по стандартной методике. Для иммунного окрашивания использовали полимерную систему детекции с пероксидазной меткой («DAKO», Дания). Ядра клеток докрашивали гематоксилином.

Микропрепарат фотографировали с помощью цифровой камеры Canon Power Shot G5 при увеличении в 400 раз. В каждом гистологическом препарате оценивали 10 репрезентативных участков (10 фотографий). В дальнейшем изображении анализировали с помощью медицинской программы для анализа и обработки цифровых изображений ImageJ. Оценивали относительную площадь гематоэнцефалического барьера, экспрессирующего Pgp, которую рассчитывали автоматически как: площадь гематоэнцефалического барьера, экспрессирующего Pgp, (pix²) / общая площадь поля зрения (pix²).

В гомогенате коры больших полушарий определяли содержание ТБК-реактивных продуктов – по реакции с тиобарбитуровой кислотой по методу Гавриловой В.Б. и соавт. (1987), свободных сульфгидрильных (SH) групп по методу Ellman G.L. (1959), активность глутатионпероксидазы (G-per) по методу Paglia D.E., Valentine W.N. в модификации Ланкина В.З. (1976) и глутатион-S-трансферазы (G-tr) по методу Keen J.N., Iakoby W.B. (1978).

Полученные результаты обрабатывали с помощью программы «StatSoft Statistica 7.0». Тип распределения данных оценивали по критерию Шапиро-Уилка. Полученные данные обрабатывали тестом ANOVA (при нормальном распределении данных) или Крускала-Уоллиса (при распределении данных, отличном от нормального). Межгрупповые различия определяли по критерию Ньюмена-Кейсла. Зависимость экспрессии Pgp в гематоэнцефалическом барьере от изучаемых биохимических показателей оценивали по коэффициенту корреляции Пирсона (r). 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, Iq, uq) – при распределении данных, отличном от нормального.

Результаты. Двухсторонняя перевязка общих сонных артерий приводила к активации продукции свободных радикалов и развитию окислительного стресса (таблица). Так, концентрация ТБК-реактивных продуктов повысилась через 30 минут ишемии на 76,9% (p<0,05), через 2 часа – на 135,2% (p<0,01), а через 4 часа – на 79,1% (p<0,05) по сравнению с показателями интактных животных.

Уровень SH-групп уменьшился через 30 минут, 2 часа и 4 часа после окклюзии на 30,6% (p<0,05), 42,9% (p<0,01) и 38,8% (p<0,01) соответственно по сравнению с показателями нормы.

После моделирования ишемии активность G-tr повысилась через 2 и 4 часа на 63,9% (p<0,01) и 56,4% (p<0,05) соответственно, активность G-per снизилась через 30 мин на 21,5% (p<0,05), через 4 часа – на 24,9% (p<0,05) по сравнению с уровнем нормы.

Таблица

Выраженность окислительного стресса в коре больших полушарий и экспрессия гликопротеина-P в гематоэнцефалическом барьере

Серия эксперимента	Изучаемый биохимический показатель				Экспрессия Pgp в ГЭБ
	ТБК-реактивные продукты, нмоль/мг белка	SH-группы, мкмоль/мг белка	Активность G-tr, нмоль ХДНБ/мг белка*мин	Активность G-per, нмоль НАДФН/мг белка*мин	Относительная площадь ГЭБ, %
Интактные животные (n=6)	9,1 (7,7; 10,7)	4,9 (4,3; 5,3)	81,6±12,9	20,5 (18,6; 22,8)	1,58±1,04
Ишемия 30 минут (n=6)	16,1 (14,2; 17,3)*	3,4 (3,1; 3,6)*	105,6±16,6	16,1 (12,7; 19,3)*	2,19±0,83
Ишемия 2 часа (n=6)	21,4 (19,3; 24,1)**	2,8 (2,6; 3,3)**	133,8±38,5**	20,9 (19,2; 27,4)	2,56±1,29
Ишемия 4 часа (n=6)	16,3 (14,7; 16,8)*	3,0 (2,5; 3,2)**	127,6±13,7*	15,4 (14,3; 18,0)*	3,71±1,04**

Примечание: * – p<0,05 – достоверные различия по сравнению с показателями интактных животных;

** – p<0,01 – достоверные различия по сравнению с показателями интактных животных.

Установлено, что при перевязке сонных артерий экспрессия Pgp в гематоэнцефалическом барьере постепенно увеличивается, возрастая к 4-му часу ишемии на 134,8% (p<0,01) (рис. 1, табл. 1.).

При проведении корреляционного анализа выявлена обратно- пропорциональная зависимость экспрессии Pgp в гематоэнцефалическом барьере от концентрации сульфгидрильных (SH) групп в ткани коры больших полушарий головного мозга крыс $r=-0,612$ (p=0,002) (рис. 2).

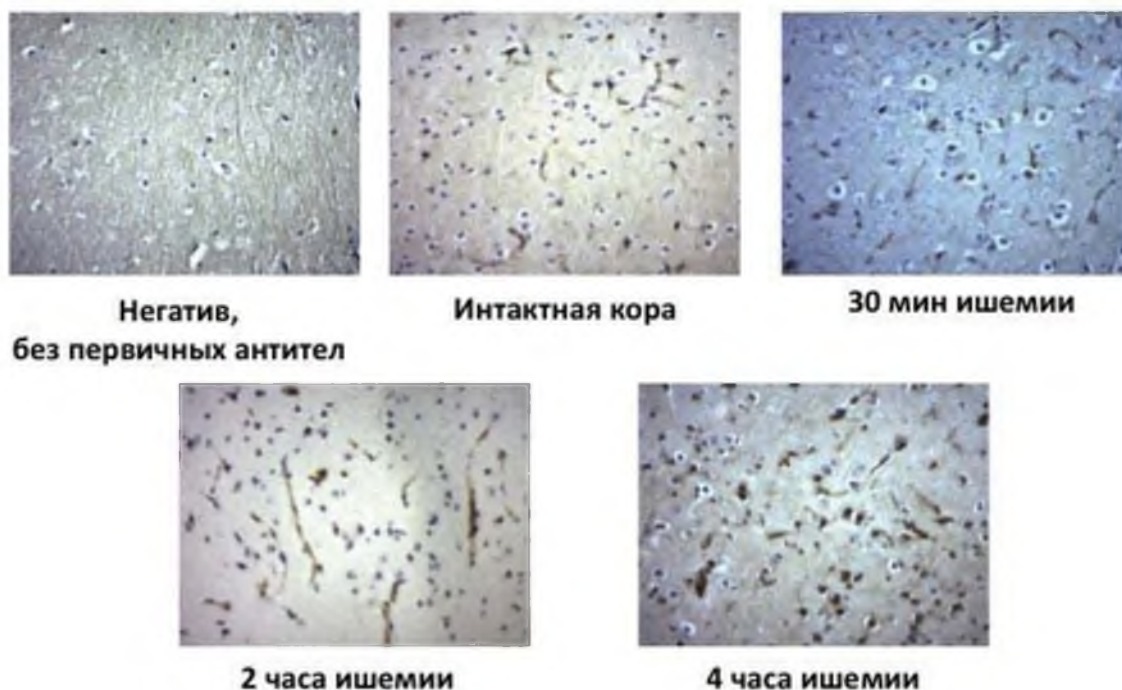


Рис. 1. Срезы коры больших полушарий головного мозга крыс, окрашенные иммуногистохимически. Увеличение 400 раз.

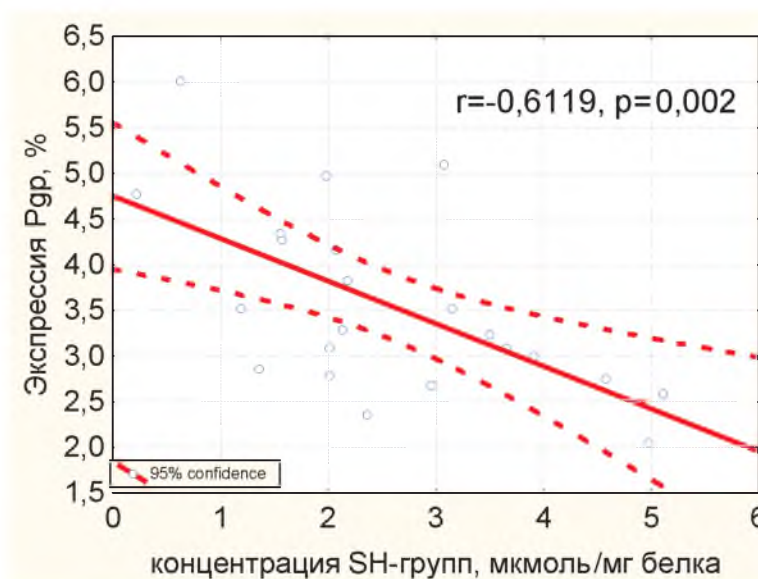


Рис. 2. Зависимость экспрессии гликопротеина-P от концентрации SH-групп

Обсуждение результатов. В настоящей работе выявлено, что развитие острой тотальной ишемии головного мозга приводит к постепенному повышению экспрессии Pgp в гематоэнцефалическом барьере начиная с 30 минуты эксперимента и достигая достоверных различий к 4 часу наблюдения.



Полученные результаты согласуются с данными литературы. Ранее методом Western blotting установлено, что перманентная окклюзия средней мозговой артерии у крыс-самцов в течение 4 часов приводила к стимуляции экспрессии Pgp в гематоэнцефалическом барьере и нейронах головного мозга, а также росту функциональной активности данного белка-транспортера и снижению внутриклеточного содержания его субстратов (родамина-123, флюоресцеина натрия и нимодипина) [12]. В другом исследовании показано, что при моделировании 2-часовой ишемии головного мозга у крыс проницаемость гематоэнцефалического барьера существенно не изменялась через 2-3 часа от начала патологии, однако уже через 4 часа после ишемического воздействия экстравазация красителя была повышена на 179% по сравнению с серией интактных крыс [10].

Указанные изменения могут быть связаны с нарушением структуры и увеличением проницаемости гематоэнцефалического барьера, вызванными гипоксией [12, 13].

Видимо, усиливающаяся экспрессия Pgp в ранние сроки ишемии оказывает протекторное действие, сдерживая растущую проницаемость гематоэнцефалического барьера. Через 4 часа после ишемии повреждение гематоэнцефалического барьера оказывается настолько выраженным, что повышенной экспрессии Pgp оказывается недостаточно для эффлюкса проникающих субстратов.

Механизмы регуляции экспрессии Pgp в условиях гипоксии в настоящее время активно изучаются.

Считается, что важную роль в данном процессе играют транскрипционные факторы HIF-1 α (Hypoxia-inducible factor 1) и Sp1 (Specificity protein 1), повышенный уровень которых усиливает синтез белка-транспортера [8].

В настоящем исследовании также показано, что двухсторонняя перевязка общих сонных артерий приводит к развитию окислительного стресса в коре больших полушарий, что проявляется повышением концентрации ТБК-реактивных продуктов (конечных продуктов пероксидации), снижением уровня сульфгидрильных (SH-групп) и уменьшением активности антиоксидантного фермента – глутатионпероксидазы. Активность другого антиоксидантного фермента глутатион-S-трансферазы повышается, что, скорее всего, является компенсаторной реакцией.

При изучении зависимости экспрессии Pgp в гематоэнцефалическом барьере от показателей, характеризующих выраженность окислительного стресса в ткани мозга нами установлена обратнопропорциональная связь между экспрессией изучаемого белка-транспортера и концентрацией сульфгидрильных (SH) групп.

Глутатион, как основной источник SH-групп в клетке, играет важную роль в поддержании внутриклеточного редокс-гомеостаза. Нарушение баланса между его окисленной и восстановленной формами может приводить к изменению экспрессии ряда транскрипционных факторов [1]. Таким образом, видимо, важную роль в механизмах экспрессии Pgp в условия острой ишемии головного мозга играет редокс-гомеостаз.

Выводы:

- Развитие острой ишемии головного мозга через 4 часа после двухсторонней окклюзии общих сонных артерий приводит к повышению экспрессии гликопротеина-P в гематоэнцефалическом барьере и развитию окислительного стресса в ткани коры больших полушарий головного мозга;
- Выявлена зависимость экспрессии гликопротеина-P в гематоэнцефалическом барьере от концентрации SH-групп в ткани коры больших полушарий головного мозга крыс.

Работа поддержана грантом РФФИ 14-04-97522 р центра.

Литература

1. Калинина, Е. В. Участие тио-, перокси- и глутаредоксинов в клеточных редокс-зависимых процессах / Е. В. Калинина, Н. Н. Чернов, А. Н. Сапрын // Успехи биологической химии. – Т. 48. – 2008. – С. 319-358.
2. Метаболизм лекарственных средств. Научные основы персонализированной медицины: руководство для врачей / Кукес В. Г. [и др.]. – М.: ГЭОТАР – Медиа. – 2008. – 304 с.
3. Якушева, Е. Н. Влияние экспериментальной подострой гипобарической гипоксии на функциональную активность гликопротеина-P / Е. Н. Якушева, И. В. Черных // Рос. медико-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. – 2013. – № 1. – С. 60-64.
4. Половые различия функциональной активности и экспрессии гликопротеина-P у кроликов / Е.Н. Якушева [и др.] // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2014. – Т. 100. – № 8. – С. 944-952.
5. Activation of P-glycoprotein (Pgp)-mediated drug efflux by extracellular acidosis: in vivo imaging with (68)Ga-labelled PET tracer / O. Thews [et al.] // Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. – 2010. – Vol. 37. – № 10. – P. 1935-1942.



6. Animal models of acute moderate hypoxia are associated with a down-regulation of CYP1A1, 1A2, 2B4, 2C5, and 2C16 and up-regulation of CYP3A6 and P-glycoprotein in liver / C. Fradette [et al.] // *Drug Metab. Dispos.* – 2007. – Vol. 35. – № 5. – P. 765-771.
7. Cell-Free Microfluidic Determination of P-glycoprotein Interactions with Substrates and Inhibitors / K. Eyer [et al.] // *Pharm. Res.* – 2014 [Epub ahead of print].
8. Hypoxia-inducible Factor-1-dependent Regulation of the Multidrug Resistance (MDR1) Gene / K.M. Comerford [et al.] // *Cancer Res.* – 2002. – Vol. 62. – P. 3387.
9. Influence of intermittent hypoxia on myocardial and hepatic P-glycoprotein expression in a rodent model / J.M. Dopp [et al.] // *Pharmacotherapy.* – 2009. – Vol. 29. – № 4. – P. 365-372.
10. Quantitative evaluation of blood-brain barrier permeability following middle cerebral artery occlusion in rats / L. Belayev [et al.] // *Brain Research.* – 1996. – Vol. 739. – № 1-2. – P. 88-96.
11. Role of the tumor microenvironment in the activity and expression of the p-glycoprotein in human colon carcinoma cells / C. Lotz [et al.] // *Oncol. Rep.* – 2007. – Vol. 17. – № 1. – P. 239-244.
12. Alteration in P-glycoprotein at the blood-brain barrier in the early period of MCAO in rats / J. Cen [et al.] // *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* – 2013. – Vol. 65. – P. 665-672.
13. Penetration of verapamil across blood brain barrier follow in cerebral ischemia depending on both paracellular pathway and P-glycoprotein transportation / W. Fang [et al.] // *Neurochem. Int.* – 2013. – Vol. 62. – № 1. – P. 23-30.
14. A proposed role for efflux transporters in the pathogenesis of hydrocephalus / S. Krishnamurthy [et al.] // *Croat Med. J.* – 2014. – Vol. 55. – № 4. – P. 366-376.
15. Effect of hypoxia on acquired drug resistance and response to epidermal growth factor in Chinese hamster lung fibroblasts and human breast-cancer cells in vitro / R. Kalra [et al.] // *Int. J. Cancer.* – 1993. – Vol. 54. – № 4. – P. 650-655.

P-GLYCOPROTEIN EXPRESSION IN BLOOD-BRAIN BARRIER IN BILATERAL OCCLUSION OF THE COMMON CAROTID ARTERY

I.V. CHERNYKH
E.N. YAKUSHEVA
A.V. SHCHULKIN
I.YU. VINOGRADOV
D.S. TITOV

Ryazan State Medical University

e-mail: enya.rzn@yandex.ru

On 24 Wistar rats the impact of bilateral occlusion of the common carotid artery on the expression of P-glycoprotein (Pgp) in the blood-brain barrier of the frontal lobes of the cerebral hemispheres was studied. Pgp expression through immunohistochemical staining using monoclonal antibodies was evaluated. Moreover the correlation between expression of P-glycoprotein and the level of oxidative stress in brain tissue was assessed. The induction of Pgp expression was revealed in 4 hours after start of the occlusion, which was inversely proportional to the concentration of SH-groups in the cerebral cortex tissue.

Key words: P-glycoprotein, ABCB1-protein, ischemia, stroke, lipid peroxidation, common carotid artery.