

© Коллектив авторов, 2021

УДК 616-092:612.273.2:612.223.11-092.4

Куликов В.П.,¹ Каланова Л.А.,¹ Трегуб П.П.^{1,2}

Потенцирование гиперкапнической гипоксии при комбинации с фармакологическими нейропротекторами

¹ООО «Алтайский медицинский институт последипломного образования»,
656043, Барнаул, Россия, ул. Ползунова, д. 34а;

²ФГБНУ «Научный центр неврологии»,
125367, Москва, Россия, Волоколамское шоссе, д. 80

Цель исследования – изучение возможности потенцирования нейропротекторного эффекта гиперкапнической гипоксии при помощи комбинации с фармакологическими активаторами основных механизмов, увеличивающих толерантность головного мозга к ишемии/гипоксии.

Методика. Исследования проводились на 140 крысах-самцах Wistar, которые подвергались курсам респираторных воздействий гиперкапнической гипоксии (P_{O_2} – 90 мм рт. ст.; P_{CO_2} – 50 мм рт. ст.) в течении 5 сут по 30 мин ежедневно. После завершения курса тренировок крысам вводили фармакологические препараты (активатор аденозиновых рецепторов, блокатор карбоангидразы, активатор опиоидных рецепторов, блокатор ангиотензин-превращающего фермента) и через 24 ч производилась билатеральная окклюзия общих сонных артерий, а через 72 ч производился подсчет поврежденных/целевых клеток в СА1 регионе гиппокампа.

Результаты. Морфологическая оценка выживаемости нейронов показала, что применение эналаприла усиливало нейропротекторный эффект гиперкапнической гипоксии, применение АТФ и даларгина не показало значимого прироста эффективности, а блокатор карбоангидразы ацетазоламид полностью устранял нейропротекторный эффект респираторных тренировок.

Заключение. Выраженным потенцирующим эффектом на нейропротекцию, обусловленную респираторными тренировками с гиперкапнической гипоксией, обладает ее комбинация с ингибитором АПФ (эналаприлом).

Ключевые слова: потенцирование; нейропротекция; гипоксия; гиперкапния; эналаприл

Для цитирования: Куликов В.П., Каланова Л.А., Трегуб П.П. Потенцирование защитного эффекта гиперкапнической гипоксии при комбинации с фармакологическими нейропротекторами. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2021; 65(3): 21-25.

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.03.21-25

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Куликов В.П., Каланова Л.А., Трегуб П.П.; сбор и обработка материала – Каланова Л.А., Трегуб П.П.; написание текста – Куликов В.П., Трегуб П.П.; редактирование – Трегуб П.П. Утверждение окончательного варианта статьи – все авторы.

Для корреспонденции: Трегуб Павел Павлович, e-mail: pfiza_asmu@mail.ru

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 18-75-00016).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 05.10.2020

Принята к печати 30.06.2021

Опубликована 30.09.2021

Kulikov V.P.¹, Kalanova L.A.¹, Tregub P.P.^{1,2},

Potential of the protective effect of hypercapnic hypoxia in combination with pharmacological neuroprotective agents

¹ООО «Altai Medical Institute of Postgraduate Education»,
Polzunova St. 34a, Barnaul 656043, Russian Federation;

²Scientific Center of Neurology,
Volokolamskoe Shosse 80, Moscow 125367, Russian Federation

Aim. We studied the possibility of potentiating the neuroprotective effect of hypercapnic hypoxia using a combination with pharmacological activators of major mechanisms that increase the brain tolerance to ischemia/hypoxia.

Methods. Studies were carried out on 140 male Wistar rats conditioned with respiratory hypercapnic hypoxia (P_{O_2} – 90 mm Hg; P_{CO_2} – 50 mm Hg) for 5 days, 30 min daily. After this exposure, the rats were injected with a drug (adenosine receptor activator (ATP), carbonic anhydrase blocker (acetazolamide), opioid receptor activator (dalargin), angiotensin converting enzyme (ACE) blocker

(enalapril). 24 hrs later, the common carotid arteries were occluded bilaterally. 72 hrs after drug injection, the damaged/surviving cells in the CA1 region of the hippocampus were counted.

Results. Morphological evaluation of neuronal survival showed that enalapril enhanced the neuroprotective effect of hypercapnic hypoxia. ATP and dalargin did not significantly increase this effect, and acetazolamide completely eliminated this neuroprotective effect.

Conclusion. Thus, the neuroprotective effect of hypercapnic hypoxia conditioning was potentiated by its combination with an ACE inhibitor.

Keywords: potentiation; neuroprotection; hypoxia; hypercapnia; enalapril

For citation: Kulikov V.P., Kalanova L.A., Tregub P.P. Potentiation of the protective effect of hypercapnic hypoxia in combination with pharmacological neuroprotective agents. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2021; 65(3): 21-25. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.03.21-25

Contribution: research concept and design – Kulikov V.P., Kalanova L.A., Tregub P.P.; material collecting – Kalanova L.A., Tregub P.P.; writing text – Kulikov V.P., G.P., Tregub P.P.; text editing – Tregub P.P.

For correspondence: Pavel P. Tregub, PhD, Principal Reseacher, Laboratory of Experimental Neurocytology, Scientific Center of Neurology; Volokolamskoe Shosse, 80, 125367, Moscow, Russian Federation, e-mail: pfiza_asmu@mail.ru

Acknowledgments. The study was carried out with a grant from the Russian Science Foundation (project No. 18-75-00016).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Information about the authors:

Kulikov V.P., <https://orcid.org/0000-0003-4869-5465>

Tregub P.P., <https://orcid.org/0000-0002-3650-6121>

Received: 05.10.2020

Accepted: 30.06.2021

Published: 30.09.2021

Введение

Известно, что интермиттирующие гипоксические воздействия являются эффективным средством увеличения толерантности головного мозга к ишемии [1–3]. Ранее было показано, что эффективность сочетанного воздействия гипоксии и гиперкапнии для увеличения толерантности головного мозга к гипоксии/ишемии значительно выше, чем при их изолированном воздействии [4]. Однако, для формирования устойчивой ишемической толерантности необходимо проводить не менее 3-7 сеансов гиперкапнически-гипоксических респираторных воздействий [4], что ограничивает варианты их клинического применения. Поэтому актуальной научной задачей является поиск и разработка способов потенцирования эффектов гиперкапнической гипоксии.

Перспективным вариантом для потенцирования защитной эффективности респираторных тренировок представляется комбинация гиперкапнически-гипоксических воздействий с фармакологическими активаторами базовых нейропротекторных механизмов. На основании данных о нейропротекторных механизмах гиперкапнической гипоксии (ГГ) можно выделить сигнальные пути, дополнительная стимуляция которых имеет потенциал для усиления защитных эффектов при сочетании с респираторными воздействиями [5]. К таким механизмам относятся, например, акти-

вация аденозиновых рецепторов и АТФ-зависимых калиевых каналов [5]. Эффективное потенцирование может также вызывать пролонгация эффекта гиперкапнии при блокировании карбоангидразы [6]. Кроме того, базовые механизмы представлены сигнальными путями, которые остаются не вовлеченными в нейропротекцию при воздействии интермиттирующей гиперкапнической гипоксии [7]. В их числе, например, активация $\delta 2$ -опиодных рецепторов [8] и блокирование ангиотензин-превращающего фермента [9]. Фармакологическое модулирование этих сигнальных путей в комбинации с респираторными воздействиями может вызывать суммирование их протекторных эффектов.

Цель исследования – оценка возможности потенцирования нейропротекторного эффекта гиперкапнической гипоксии при помощи комбинации с фармакологическими активаторами основных механизмов, увеличивающих толерантность головного мозга к ишемии/гипоксии.

Методика

Исследования осуществлялись на 140 крысах-самцах Wistar (Институт Цитологии и Генетики СО РАН, Новосибирск, Россия), средней массой 250–300 г. Эксперименты были одобрены биоэтической комиссией Локального этического комитета КрасГМУ и прово-

дились в соответствии с принципами Хельсинкской декларации. Крысы находились в клетках при контролируемой комнатной температуре (~23 °C) и естественном освещении. У крыс был свободный доступ к еде и воде. До и после экспериментов животные взвешивались.

Животные были рандомизированы на 7 равных групп по 20 животных в каждой: ложно-оперированная контрольная группа (Con-Sham/O); контроль с ишемическим повреждением (Con-Ischemia); группа воздействий гиперкапнической гипоксии (HyperH) и 4 группы воздействия гиперкапнической гипоксии в сочетании с разными фармакологическими препаратами:

группа HyperH+ATP с активатором аденозиновых рецепторов (Аденозин трифосфата динатриевая соль, 2 мг [10];

группа HyperH+AcA с блокатором карбоангидразы – ацетазоламидом (30 мг/кг) [6];

группа HyperH+Dal с активатором опиоидных рецепторов – даларгином (0,5 мг/кг) [11];

группа HyperH+Enap с блокатором ангиотензин-превращающего фермента эналаприлом (0,1 мг/кг) [9]. Респираторные воздействия у крыс проводились в специальной камере, описанной ранее [4], в течение 5 сут по 30 мин ежедневно. Через 24 ч после завершения курсов респираторных воздействий животным внутривенно вводились фармакологические препараты или физиологический раствор, соответственно назначению группы, а еще через 24 ч у животных всех групп производилась билатеральная окклюзия общих сонных артерий на 20 мин, кроме ложно-оперированной группы, где во время хирургического вмешательства окклюзия не выполнялась [12]. Спустя 72 ч после моделирования транзиторной ишемии, животные были декапитированы с последующим извлечением головного мозга для морфологической оценки выживаемости нейронов в CA1 регионе гиппокампа. Использовали световой микроскоп Микмед 6, вар.7 (ЛОМО, Россия).

После декапитации и извлечения мозга из последнего секционировался участок больших полушарий между 2,5-8,5 мм от края затылочных долей и проводилась гистологическая обработка с окраской по Нисслю. Далее исследовался участок гиппокампа в промежутке между 4,8-5,8 мм interaural – 3.3 – 3.4 мм, от Bregma во фронтальном разрезе (что соответствует участку больших полушарий мозга на расстоянии 5,5 мм от края затылочных долей). В окрашенных по Нисслю препаратах выполнялся подсчет поврежденных и сохранившихся клеток в CA1 регионе гиппокампа [13].

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с применением пакетов программ

«StatPlus 2010 10.0.1011.0» (AnalystSoft Inc., США). Количественные данные при несоответствии закону нормального распределения представлены в виде медианы (Me), нижнего квартиля (25%) и верхнего квартиля (75%), максимального и минимального значений. Для оценки распределения показателей на соответствие закону нормального распределения использовался критерий Колмогорова-Смирнова. В случаях несоблюдения условий нормальности распределения использовались методы непараметрической статистики. Сравнения трех или более групп осуществлялось с использованием критерия Крускала-Уоллиса с последующими множественными сравнениями. Различия принимали как статистически значимые при вероятности ошибки $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Сравнительный анализ эффективности защиты при комбинировании гиперкапнически-гипоксических воздействий и фармакологических препаратов разных нейропротекторных групп показал, что потенцирующим эффектом обладает комбинация с ингибитором АПФ (эналаприлом) (рисунки). Применение эналаприла усиливало нейропротекторный эффект гиперкапнической гипоксии, вероятно, вследствие его дополнительных антигипоксических и антиишемических свойств, которые реализуются посредством независимых от воздействия гиперкапнической гипоксии путей [7, 14]. Применение АТФ и даларгина не показало значимого прироста нейропротекторной эффективности гиперкапнической гипоксии.

Важно отметить, что сочетание блокатора карбоангидразы ацетазоламида с воздействиями гиперкапнической гипоксии полностью устраняло нейропротекторный эффект респираторных тренировок, что может быть связано с избыточным внутриклеточным ацидозом, вызванным накоплением CO_2 после введения ацетазоламида [15]. Следовательно, фармакологическое потенцирование накопления CO_2 в организме на фоне гиперкапнической гипоксии не эффективно и даже снижает нейропротекторный эффект респираторных воздействий.

Таким образом, фармакологическое потенцирование может значимо повышать нейропротекторную эффективность респираторных тренировок с интермиттирующей гиперкапнической гипоксией. Комбинация с фармакологическими препаратами, модулирующими сигнальные пути, не вовлеченные в механизм формирования ишемической толерантности при респираторных воздействиях, является перспективной стратегией повышения нейропротекторной эффективности

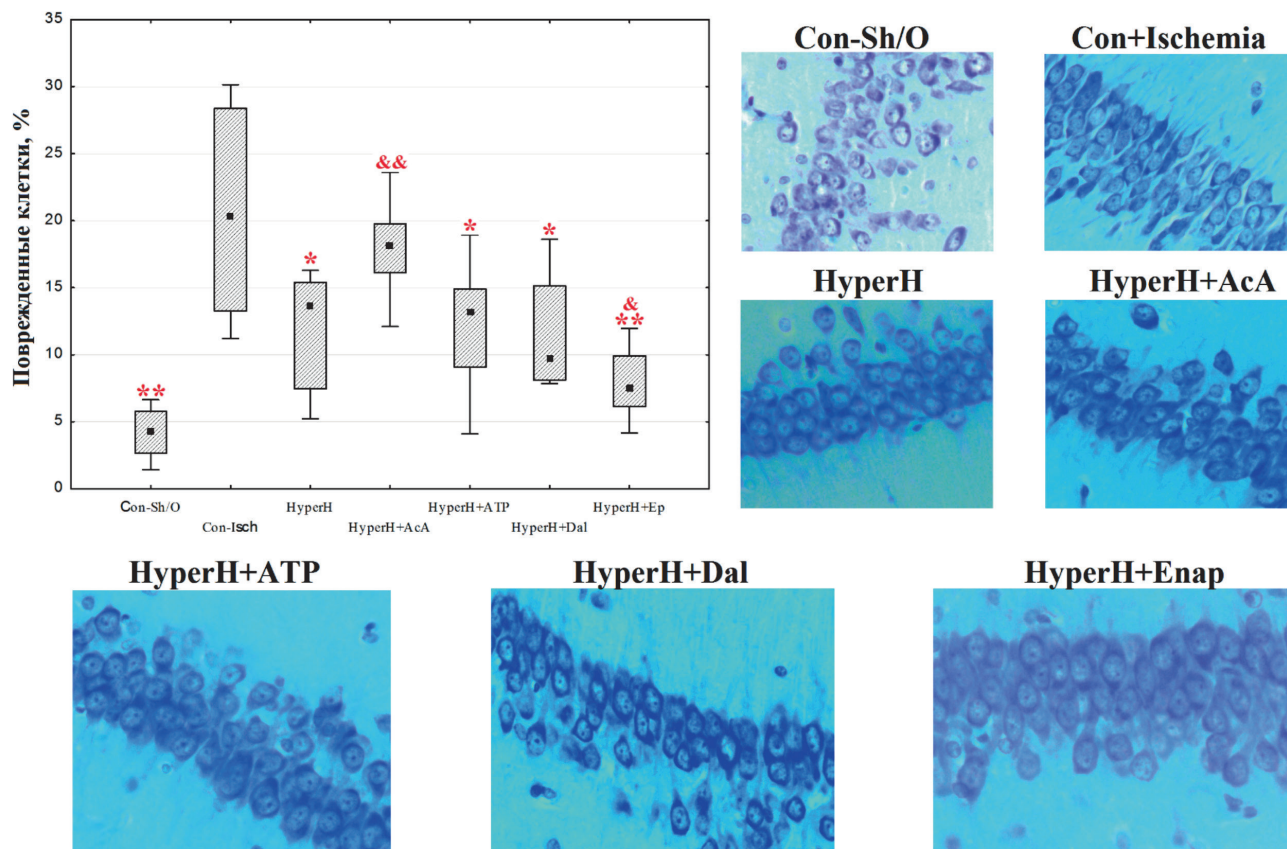


Рисунок. Содержание нейронов с ишемическим повреждением в CA1 регионе гиппокампа после транзиторной ишемии. * $p < 0,05$ – различия по сравнению с группой Con+Ischemia. ** $p < 0,001$ – различия по сравнению с группой Con+Ischemia; & $p < 0,05$ – различия по сравнению с группой HyperH; && $p < 0,01$ – различия по сравнению с группой HyperH. Con-Sh/O = ложно-оперированный контроль; Con-Ischemia = контрольная группа с ишемией; HyperH = гиперкапническая гипоксия; HyperH+AcA = гиперкапническая гипоксия + ацетазоламид; HyperH+ATP = гиперкапническая гипоксия + АТФ-динатриевая соль; HyperH+Dal = гиперкапническая гипоксия + даларгин; HyperH+Enap = гиперкапническая гипоксия + эналаприл.

Figure. Content of neurons with ischemic damage in the hippocampal CA1 region after transient ischemic. * $p < 0,05$, significant differences from the Con+Ischemia group; ** $p < 0,001$, significant differences from the Con+Ischemia group; & $p < 0,05$, significant differences from the HyperH group; && $p < 0,01$, significant differences from the HyperH group. Con-Sh/O, sham-operated control; Con-Ischemia, control group with ischemia; HyperH, hypercapnic hypoxia; HyperH+AcA, hypercapnic hypoxia + acetazolamide; HyperH+ATP, hypercapnic hypoxia + ATP disodium salt; HyperH+Dal, hypercapnic hypoxia + dalargin; HyperH+Enap, hypercapnic hypoxia + enalapril.

гиперкапнической гипоксии. Выраженным потенцирующим эффектом на нейропротекцию, обусловленную респираторными тренировками с гиперкапнической гипоксией, обладает ее комбинация с ингибитором АПФ (эналаприлом).

Литература

(п.п. 1-4; 6-8; 10; 12; 13; 15 см. References)

- Трегуб П.П., Куликов В.П., Малиновская Н.А., Механизмы нейропротекторного эффекта сочетанного воздействия гипоксии и гиперкапнии. *Сибирское медицинское обозрение*. 2018; 3: 5-13. <https://doi.org/10.20333/2500136-2018-3-5-13>
- Гацура С.В., Зинчук В.В. Влияние эналаприла малеата и лозартана на размеры экспериментального инфаркта миокарда, сродство гемоглобина к кислороду и некоторые показатели перекисного окисления липидов. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2004; 1:19-21.
- Лишманов Ю.Б., Маслов Л.Н., Райс К. Проницаемость гематоэнцефалического барьера для лигандов опиоидных рецепторов. *Экспериментальная и клиническая кардиология*. 2002; 65(4): 71-7.
- Сафронова Е.С., Юнцев С.В., Белозерцев Ю.А. Нейропротекторное и мнотропное действие ингибиторов АПФ при травматическом диффузном аксональном повреждении мозга. *Вестник Бурятского государственного университета. Медицина и фармация*. 2013; 12: 160-6.

References

1. Yang C.C., Lin L.C., Wu M.S., Chien C.T., Lai M.K. Repetitive hypoxic preconditioning attenuates renal ischemia/reperfusion induced oxidative injury via upregulating HIF-1 alpha-dependent bcl-2 signaling. *Transplantation*. 2009; 88: 1251-60.
2. Lukyanova L.D., Germanova E.L., Kopaladze R.A. Development of resistance of an organism under various conditions of hypoxic preconditioning: role of the hypoxic period and reoxygenation. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2009; 147: 400-4.
3. Glazychev O.S. Optimization of clinical application of interval hypoxic training. *Med Tekh.* 2013; 3: 21-4.
4. Tregub P., Kulikov V., Motin Y., Bespalov A., Osipov I. Combined exposure to hypercapnia and hypoxia provides its maximum neuroprotective effect during focal ischemic injury in the brain. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 2015; 24(2): 381-7.
5. Tregub P.P., Kulikov V.P., Malinovskaya N.A., Mechanisms of the neuroprotective effect of the combined effects of hypoxia and hypercapnia. *Sibirskoye meditsinskoye obozreniye*. 2018; 3:5-13. (in Russian) <https://doi.org/10.20333/2500136-2018-3-5-13>
6. Bejaoui M., Pantazi E., De Luca V., Panisello A., Folch-Puy E., Serafin A., Capasso C., C T. S., Rosselló-Catafau J. Acetazolamide protects steatotic liver grafts against cold ischemia reperfusion injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2015; 355(2): 191-8.
7. Obrenovitch T.P. Molecular Physiology of Preconditioning-Induced Brain Tolerance to Ischemia. *Physiol Rev.* 2008; 88: 211-47.
8. Lassoukova T.V., Maslov L.N. Opioid receptors and resistance of the heart to pathogenetic influences. *CurrDrug Targets.* 2012; 13(2): 230-46.
9. Gatsura S.V., Zinchuk V.V. Effect of enalapril maleate and losartan on the size of experimental myocardial infarction, the affinity of hemoglobin for oxygen and some indicators of lipid peroxidation. *Ekspierimental'naya i klinicheskaya farmakologiya.* 2004; 1: 19-21. (in Russian)
10. Ertan C., Atar I., Gulmez O., Atar A., Ozgul A., Aydinalp A., et al. Adenosine-induced ventricular arrhythmias in patients with supraventricular tachycardias. *Ann. Noninvasive Electrocardiol.* 2008; 13(4): 386-90.
11. Lishmanov Yu.B., Maslov L.N., Rice K. Permeability of the blood-brain barrier for ligands of opioid receptors. *Ekspierimental'naya i klinicheskaya farmakologiya.* 2002; 65(4): 71-7. (in Russian)
12. Sharifi Z.N., Abolhassani F., Zarrindast M.R., Movassaghi S., Rahimian N., Hassanzadeh G. Effects of FK506 on Hippocampal CA1 Cells Following Transient Global Ischemia/Reperfusion in Wistar Rat. *Stroke Res. Treat.* 2012:809417.
13. Zhan L., Wang T., Li W., Xu Z.C., Sun W., Xu E. Activation of Akt/FoxO signaling pathway contributes to induction of neuroprotection against transient global cerebral ischemia by hypoxic pre-conditioning in adult rats. *J. Neurochem.* 2010; 114(3): 897-908.
14. Safronova E.S., Yuntsev S.V., Belozertsev Yu.A. Neuroprotective and mnemotropic action of ACE inhibitors in traumatic diffuse axonal brain injury. *Vestnik Buryatskogo gosudartvennogo universiteta. Meditsina i farmatsiya.* 2013; 12: 160-6. (in Russian)
15. Xu J., Peng Z., Li R., Dou T., Xu W., Gu G., et al. Normoxic induction of cerebral HIF-1by acetazolamide in rats: Role of acidosis. *Neurosci. Lett.* 2009. 451: 274-8.

Сведения об авторах:

Куликов Владимир Павлович, доктор мед. наук, проф., директор ООО «Алтайский медицинский институт последипломного образования», e-mail: kulikov57@mail.ru;

Каланова Любовь Александровна, преподаватель ООО «Алтайский медицинский институт последипломного образования», e-mail: nsp.brn@gmail.com;

Трегуб Павел Павлович, канд. мед. наук, науч. сотр. лаб. экспериментальной нейрцитологии ФГБНУ «Научный центр неврологии», e-mail: pfiza_asmu@mail.ru