

Л.Н. Маслов^{1,2}

Сигнальный механизм нейропротекторного эффекта ишемического preconditionирования мозга

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение Научно-исследовательский институт кардиологии Сибирского отделения РАМН, 634012, Томск, ул. Киевская, 111

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Томский государственный педагогический университет, 634061, Томск, ул. Киевская, 60

Анализ опубликованных данных свидетельствует о том, что в сигнальном механизме отсроченного ишемического preconditionирования важную роль играет белок Ras и киназы: PI3K, Akt, MEK1/2, ERK1/2, PKC, CaMKII. Кроме того, установлено, что в позднем preconditionировании принимают участие циклооксигеназа-2, NO-синтаза, митК_{АТФ}-канал. Сигнальный механизм раннего ишемического preconditionирования остаётся неизученным.

Ключевые слова: мозг, ишемия, реперфузия, preconditionирование, сигнальный механизм

L.N. Maslov^{1,2}

Signaling mechanism of neuroprotective effect of ischemic preconditioning of brain

¹ Scientific Research Institute of Cardiology of SB of RAMS, 111a, Kievskaja str., Tomsk, 634012, Russia

² Tomsk State Pedagogical University, 60, Kievskaya str., Tomsk, 634061, Russia

Analysis of published data indicates that Ras-protein and kinases PI3K, Akt, MEK1/2, ERK1/2, PKC, CaMKII are involved in the signaling mechanism of ischemic preconditioning. In addition, it is established that cyclooxygenase-2, NO-synthase and mitK_{АТФ}-channel are involved in delayed preconditioning. Signaling mechanism of early ischemic preconditioning of brain is remained unstudied.

Key words: brain, ischemia, reperfusion, preconditioning, signaling mechanism

Известно, что раннее и позднее ишемическое preconditionирование (ИП) мозга оказывает нейропротекторный эффект, механизм которого остаётся недостаточно изученным [7, 18, 26, 28, 29]. Установлено, что эндогенными триггерными факторами ИП мозга являются: аденозин [26], опиоиды [41], глутамат [15], активные формы кислорода [24], эритропоэтин [4].

Общеизвестно, что в передаче сигнала в клетке важную роль играют протеинкиназы, поэтому не удивительно, что исследователи, занимающиеся проблемой preconditionирования мозга, в своих работах большое внимание уделяют этим ферментам. Принято считать [5, 33], что выживаемость клеток увеличивается при активации киназных тандемов: PI3K-Akt и MEK1/2-ERK1/2, где PI3K — phosphatidylinositol-3-kinase, Akt — киназа, выделенная из AKR Thymoma cell line, MEK1/2 — mitogen-activated pro-

tein kinase kinase, ERK1/2 — extracellular signal-regulated kinase. Активация большинства киназ происходит за счёт фосфорилирования [5].

Тандем PI3K-Akt

В 2000 г. S. Namura и соавт. [25] попытались оценить роль Akt в нейропротекторном эффекте preconditionирования у монгольских песчанок, у которых отсутствует Виллизиев круг. Preconditionирование моделировали с помощью билатеральной окклюзии (3,5 мин) обеих сонных артерий с последующей реперфузией. Оказалось, что ИП снижало количество фосфорилированной Akt через 1 мин от момента начала реперфузии [25]. Через 10 мин и 1 ч, напротив, было зафиксировано повышение количества фосфорилированной Akt. Кроме того, авторы воспроизводили ИП с помощью двух сеансов 2-мин перерывки обеих сонных артерий. Через 24 ч после ИП общее количество белка Akt в мозге оставалось неизменным, количество фосфорилированной Akt (Ф-Akt) снижалось [25]. Авторы заключили, что Akt не участвует в preconditionировании мозга. На

Для корреспонденции: Маслов Леонид Николаевич, д-р мед. наук, проф., рук. лаб. экспериментальной кардиологии ФГБУ «НИИ кардиологии» СО РАМН. E-mail: maslov@cardio.tsu.ru

наш взгляд, подобный вывод слишком категоричен, потому что через 10 и 60 мин после прекондиционирования отмечалась активация Akt [25]. Возможно, что Akt принимает участие в раннем ИП, которое фиксируется в первые часы после транзиторной ишемии [6], но не участвует в позднем ишемическом прекондиционировании, когда повышение толерантности мозга к ишемии отмечается через 24 ч после прекондиционирования [18]. В 2001 г. S. Yano и соавт. [38] получили данные о том, что Akt участвует в ИП мозга у монгольских песчанок. Ишемическое прекондиционирование моделировали с помощью 2-минутной окклюзии обеих сонных артерий с последующей реперфузией в течение 3 сут., после чего осуществляли 5-минутную перевязку каротидных артерий (летальная ишемия). После декапитации подсчитывали количество жизнеспособных CA1-нейронов гиппокампа. Через 7 сут. после 5-мин окклюзии выживало 15% CA1-нейронов, у прекондиционированных особей — 92% CA1-нейронов. В группе контроля (ишемия без ИП) через 5 мин ишемии количество фосфорилированной Akt снижалось в 6 раз, а через 12 ч реперфузии количество Ф-Akt увеличивалось в 2 раза по сравнению с ложнооперированными особями. У прекондиционированных особей после летальной ишемии и реперфузии не наблюдалось изменения количества Ф-Akt по сравнению с уровнем до 5-минутной окклюзии. Кроме того, авторы оценивали количество Ф-Akt в динамике после ИП. Оказалось, что сразу после ИП уровень Ф-Akt снижается, но затем постепенно увеличивается и достигает максимума через 3 сут. после 2-мин ишемии. Активность Akt возрастала в 2 раза через 3 сут. после ИП, то есть максимум фосфорилирования фермента сопровождался его активацией [38]. Вортманнин (ингибитор PI3-киназы, фосфорилирующей Akt) устранял цитопротекторный эффект ИП и препятствовал увеличению количества Ф-Akt после прекондиционирования. Авторы заключили, что Akt играет важную роль в нейропротекторном эффекте ИП. В 2004 г. группа исследователей опубликовала результаты своих экспериментов по влиянию ИП на фосфорилирование Akt [12]. Прекондиционирование они моделировали с помощью 5-мин окклюзии обеих сонных артерий, через 2 сут. коагулировали обе позвоночные артерии и перекрывали кровоток по каротидным артериям с последующей реперфузией. После 30-мин реперфузии в контроле (ишемия без ИП) количество Ф-Akt в гиппокампе увеличивалось в 4 раза, а у прекондиционированных особей после реперфузии мозга подобного подъема уровня Ф-Akt не наблюдалось [12]. К сожалению, авторы не оценивали уровень Ф-Akt в динамике после ИП и не использовали ингибиторы PI3-киназы, поэтому осталось не ясным, участвует

ли Akt в прекондиционировании. Японские физиологи [27] прекондиционирование мозга у крыс индуцировали с помощью двух сеансов ишемии (10 мин) и реперфузии (10 мин). Ишемию воспроизводили с помощью окклюзии средней мозговой артерии (СМА) и обеих каротидных артерий. Три дня спустя после этой процедуры в течение 1 ч осуществляли окклюзию СМА и сонных артерий (летальная ишемия). Авторам не удалось обнаружить изменения количества Ф-Akt через 3 дня после прекондиционирования. Через 3 ч после летальной ишемии как в группе контроля (ишемия без ИП), так и в группе ИП отмечалось увеличение уровня Ф-Akt, через сутки после ишемии повышенное количество Ф-Akt было зафиксировано только у прекондиционированных особей. Китайским исследователям [23] удалось подтвердить участие Akt в прекондиционировании мозга крысы. Они коагулировали позвоночные артерии, на 3 мин накладывали окклюдеры на обе сонные артерии, через 3 сут. осуществляли 6-мин глобальную ишемию мозга (летальная ишемия). Уровень Ф-Akt в гиппокампе определяли через 10 мин после летальной ишемии. В группе контроля (ишемия без ИП) повышенное количество Ф-Akt обнаружить не удалось, в то время как у прекондиционированных особей был зафиксирован подъем уровня Ф-Akt. Ингибитор PI3-киназы LY294002 устранял нейропротекторный эффект ИП и препятствовал реперфузионному увеличению количества Ф-Akt [23, 40]. PI3-киназа фосфорилирует Akt, поэтому представленные данные можно рассматривать как доказательство участия Akt в прекондиционировании. Эти результаты были подтверждены в более поздней работе того же коллектива [42]. Таким образом, большинство публикаций свидетельствует, что нейропротекторный эффект позднего (через сутки и более после ИП) ишемического прекондиционирования связан с активацией Akt. Исследователи из США предполагают [43], что события в клетке после ИП развиваются следующим образом: факторы роста → RTK → PI3K → PIP3 → PDK1 → Akt → BAD, GSK3β → MPT-пора, где RTK — receptor tyrosine kinase, PIP3 — phosphatidylinositol-3-phosphate, PDK1 — phosphoinositol dependent kinase, GSK3β — glycogen synthase kinase 3β, BAD — Bcl-xL/Bcl-2-associated death promoter protein, MPT-пора — mitochondrial permeability transition pore. Названная пора играет важную роль в индукции апоптоза [19]. Открытие этой поры блокирует белок Bcl-2 (B-cell lymphoma protein-2), а способствует её открытию белок BAD [19]. Открытие этой поры сопровождается выходом из митохондрий в цитоплазму цитохрома C и AIF (apoptosis inducing factor), которые индуцируют апоптоз [19]. Фосфорилирование BAD ведёт к его инактивации и, соответст-

венно, к снижению интенсивности апоптоза. Киназа $GSK\beta$ также участвует в индукции программируемой гибели клетки, ее фосфорилирование ведет к инактивации $GSK\beta$ и угнетению процесса апоптоза. Следует отметить, что участие в прекондиционировании RTK является пока только гипотезой Н. Zhao и соавт. [43]. Вместе с тем, есть данные, что стимуляция РІЗК во время прекондиционирования происходит за счёт активации NMDA-рецепторов глутаматом [23], где NMDA-рецептор — рецептор N-метил-D-аспартата. Следует отметить, что М. и соавт. [13] в экспериментах на культуре нейронов не удалось подтвердить факт участия РІЗК в ИП. Причина подобного противоречия этих результатов с вышеприведенными данными о важной роли РІЗК в ИП остаётся не ясной.

Тандем MEK1/2-ERK1/2

Как известно, важную роль в подавлении апоптоза и некроза клеток играет киназный тандем MEK1/2-ERK1/2 [33]. Китайские физиологи индуцировали ИП у крыс с помощью коагуляции позвоночных артерий и 3-мин окклюзии обеих сонных артерий [22]. Через 5 мин реперфузии уровень фосфорилированной ERK1/2 (Ф-ERK1/2) в гиппокампе возрастал в 2 раза по сравнению с интактными особями (контроль). Через 1 сутки количество Ф-ERK1/2 было увеличено в 3 раза, а через 5 сут. — в 2,5 раза. В указанные сроки количество белка ERK1/2 оставалось неизменным. Предварительная инъекция ингибитора NO-синтазы L-NAME (N^G -Nitro-L-Arginine methyl ester) достоверно снижала подъём уровня Ф-ERK1/2, но не устраняла его полностью. Авторы сделали вывод о том, что прекондиционирование индуцирует фосфорилирование ERK1/2 без усиления синтеза названного фермента, а триггером фосфорилирования ERK1/2 является радикал оксида азота (NO) [22]. Сходные данные получили корейские исследователи [9]. Прекондиционирование они воспроизводили с помощью 3-мин глобальной ишемии мозга крыс. Через 10 мин реперфузии в гиппокампе было обнаружено увеличение уровня Ф-ERK1/2 с последующим снижением до «интактного» уровня через 30 мин реперфузии. Через 3 сут. после ИП авторы обнаружили повторный подъём уровня Ф-ERK1/2 в гиппокампе. Китайские физиологи [37] попытались выяснить, какие эндогенные факторы, наряду с NO, обеспечивают усиление фосфорилирования ERK1/2. Прекондиционирование они моделировали с помощью 3-мин глобальной ишемии мозга крыс, а через 3 сут. воспроизводили 6-мин летальную ишемию. Через 30 мин после летальной ишемии в гиппокампе прекондиционированных особей был зафиксирован достоверный подъём уровня

Ф-ERK1/2, который достигал максимума на 3-е сут. реперфузии и сохранялся на 5-е сут. после возобновления мозгового кровотока. У контрольных особей повышения количества Ф-ERK1/2 после летальной ишемии и реперфузии обнаружить не удалось. К сожалению, авторы не определяли уровень Ф-ERK1/2 после ИП до моделирования летальной ишемии, поэтому не вполне понятна роль названной киназы в механизме прекондиционирования. Исследователи не обнаружили изменения количества белка ERK1/2 после летальной ишемии и реперфузии у контрольных и прекондиционированных животных [37]. Интрацеребровентрикулярная инфузия ингибитора NMDA-рецепторов МК-801 и хелатора ионов кальция EGTA за 20 мин до ИП устраняла подъём Ф-ERK1/2 после 6-минутной окклюзии каротидных артерий. Указанные соединения не только блокировали фосфорилирование ERK1/2, но и устраняли нейропротекторный эффект ИП. Авторы полагают, что триггером ИП является глутамат, который активирует NMDA-рецепторы, что ведет к усилению поступления в клетку Ca^{2+} , который способствует фосфорилированию ERK1/2: глутамат \rightarrow NMDA-рецепторы \rightarrow Ca^{2+} \rightarrow Ф-ERK1/2 [37]. Остаётся неясным, почему от момента включения триггерного механизма до появления Ф-ERK1/2 потребовалось 3-е сут. Эти данные были подтверждены в 2007 г. J. Jia и соавт. В экспериментах *in vitro* на срезах гиппокампа [14]. Прекондиционирование моделировали, удаляя из среды инкубации кислород и глюкозу на 10 мин, а ишемические повреждения индуцировали, удаляя из среды инкубации кислород и глюкозу на 45 мин. Кроме того, нейропротекторный эффект ИП имитировали, добавляя в среду инкубации NMDA. Присутствие в среде инкубации ингибитора MEK1/2 PD-98059 полностью устраняло цитопротекторный эффект как ИП, так NMDA. Поскольку MEK1/2 обеспечивает фосфорилирование ERK1/2 [33], то можно полагать, что цепочка событий выстраивается следующим образом: глутамат \rightarrow NMDA-рецепторы \rightarrow MEK1/2 \rightarrow Ф-ERK1/2. Американские исследователи опубликовали результаты своих экспериментов со смешанной культурой нейронов и астроцитов. Прекондиционирование они воспроизводили, удаляя из среды инкубации глюкозу и кислород на 1 ч, а ишемическое повреждение индуцировали, инкубируя клетки в среде без кислорода и глюкозы в течение 4 ч. Ишемическое повреждение моделировали через 48 ч после ИП. Оказалось, что блокада MEK1/2 с помощью PD-98059 устраняет цитопротекторный эффект ИП [16]. Впрочем, по данным исследователей, выполнявших эксперименты на культуре нейронов коры, нейропротекторный эффект ИП сохранялся в условиях применения PD-98059 [35].

Этот факт говорит о том, что MEK1/2 не является единственной киназой, которая участвует в прекондиционировании.

Белок Ras и NO-синтаза

Ras-ГТФ-связывающий белок, впервые выделенный из саркомы мышей и крыс (**Rat sarcoma**) в 1979 г. [34]. Первая работа об участии Ras в ишемическом прекондиционировании была опубликована в 2000 г. М. и соавт. [13]. Исследования проводили на культуре нейронов коры. Прекондиционирование осуществляли, удаляя из среды инкубации кислород и глюкозу на 5 мин, через 24 ч воспроизводили летальную аноксию, удаляя из среды инкубации O_2 и глюкозу на 60 мин, что приводило к гибели 60% нейронов в контроле (аноксия без ИП) после 24-часовой реоксигенации. Если нейроны были прекондиционированы, то гибель клеток при летальной аноксии выявить не удалось [13]. Фармакологические агенты добавляли в среду инкубации за 15 мин до ИП. Блокада NMDA-рецепторов с помощью антагониста МК-801 или антагониста AP-5 приводила к полному исчезновению цитопротекторного эффекта ИП. Блокада AMPA-рецепторов (α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазол пропионат) с помощью антагониста DNQX обеспечивала ослабление нейропротекторного эффекта ИП, но не устраняла его полностью. Хелатор ионов Ca^{2+} EGTA устранял цитопротекторный эффект ИП, блокатор Ca^{2+} -каналов L-типа нифедипин ослаблял нейропротекторный эффект ИП, но не устранял его полностью. Доноры NO имитировали цитопротекторный эффект прекондиционирования, а ингибитор NO-синтазы (NOS) нитро-L-аргинин устранял защитный эффект ИП. Кроме того, эти авторы обнаружили, что прекондиционирование ведёт к активации Ras. Активация Ras не проявлялась в условиях блокады NMDA-рецепторов или ингибирования NO-синтазы, но сохранялась после блокады гуанилатциклазы ингибитором ODQ [13]. Этот факт говорит о том, что цГМФ не может быть медиатором ИП. Нейропротекторный эффект ИП не проявлялся после добавления в среду инкубации Ras-ингибитора FPT Inh III. Через 10 мин после прекондиционирования авторы зафиксировали увеличение уровня Ф-ERK1 и Ф-ERK2 [13]. Внесение в среду инкубации МК-801 или ингибитора NO-синтазы L-NAME полностью устраняло ИП-индуцированное фосфорилирование ERK1/2. Так же действовал FPT Inh III. Ингибитор MEK1/2 PD 98059 полностью устранял подъём уровня Ф-ERK1/2 после ИП [13]. Кроме того, исследователи получили косвенные данные об участии в ИП Raf-киназы, киназы, которая была впервые охарактеризована в 1983 г. [30], как retrovirus antigen factor (Raf). Известно,

что нейрональная NO-синтаза является Ca^{2+} -зависимым ферментом [1], поэтому можно предположить, что после ИП развивается следующая цепочка событий: глутамат \rightarrow NMDA-рецептор и AMPA-рецептор \rightarrow увеличение $[Ca^{2+}]_i \rightarrow$ NOS \rightarrow Ras \rightarrow Raf \rightarrow MEK1/2 \rightarrow Ф-ERK1/2. Есть мнение [33], что события в клетке после ИП развиваются следующим образом: цитокины \rightarrow RTK \rightarrow Ras \rightarrow Raf \rightarrow MEK1/2 \rightarrow Ф-ERK1/2 \rightarrow MSKs \rightarrow Bad \rightarrow MPT-пора, где MSKs — mitogen- and stress-activated kinases. Следует отметить, что участие рецепторных тирозинкиназ в ИП пока не доказано. Кроме того, необходимо отметить, что в выше приведенных работах речь идёт о позднем ИП. Неясно, как развиваются события при раннем ИП мозга.

Протеинкиназа С и циклооксигеназа-2

Общеизвестно, что в ИП сердца важную роль играет протеинкиназа С (ПКС) [3], поэтому исследователи попытались выяснить, какова роль ПКС в ИП мозга. Признаком активации ПКС является транслокация в клеточные мембраны [3]. Первая работа об участии ПКС в ИП была опубликована в 1999 г. [33]. Исследования проводили на культуре нейронов коры мозга. Прекондиционирование моделировали, удаляя из среды инкубации кислород и глюкозу на 90 мин за 24 ч до летальной аноксии, которую воспроизводили с помощью 3-часовой аноксии без глюкозы. Оказалось, что блокада ПКС с помощью хелеритрина или стауроспорина не влияет на цитопротекторный эффект ИП [35]. Этот факт говорит о том, что ПКС не участвует в ИП нейронов. К иному заключению пришли исследователи, которые воспроизводили прекондиционирование у крыс с помощью 2-минутной глобальной ишемии мозга [20]. Через 30 мин и 4 ч после ишемии происходила транслокация в клеточные мембраны изоэнзимов ПКС α и ПКС δ , а уровень связанной с мембраной ПКС ϵ и ПКС ζ , напротив, снижался. К сожалению, авторы не использовали ингибиторы ПКС, поэтому осталось неясным, участвуют или изоформы ПКС в ИП. В 2003 г. были получены данные в пользу участия ПКС ϵ в прекондиционировании [31]. Эксперименты они проводили *in vitro* на срезах гиппокампа. Прекондиционирование они индуцировали, удаляя из среды инкубации кислород и глюкозу на 15 мин, а летальную аноксию воспроизводили, удаляя эти субстраты на 45 мин. После ИП срезы инкубировали в течение 48 ч при нормальном содержании глюкозы и кислорода. Кроме того, ИП имитировали, добавляя в среду инкубации NMDA на 1 ч за 48 ч до летальной аноксии. Блокада NMDA-рецепторов во время прекондиционирования устраняла нейропротекторный эффект ИП [31]. Прекондиционирование и NMDA

индуцировали транслокацию ПКС ϵ в клеточные мембраны. Хелатор ионов Ca^{2+} EGTA устранял нейропротекторный эффект ИП и NMDA, так же действовал ингибитор ПКС хелеритрин. Активатор всех изоформ ПКС форбол-миристан ацетат не повышал устойчивость клеток к аноксии. Этот факт говорит о том, что роль изоформ ПКС в регуляции толерантности клеток к аноксии может быть прямо противоположной. Так, полагают, что активация ПКС ϵ способствует повышению резистентности нейронов к гипоксии, а стимуляция ПКС δ способствует гибели клеток в условиях нехватки кислорода [28]. Вместе с тем, аналог диацилглицерола (ДАГ) олеилацетилглицерол имитировал нейропротекторный эффект ИП. Авторы полагают, что сигнальный механизм ИП представлен следующим образом: ИП \rightarrow глутамат \rightarrow NMDA-рецептор \rightarrow $[\text{Ca}^{2+}]_i$ \rightarrow ФЛС \rightarrow ДАГ \rightarrow ПКС ϵ \rightarrow нейропротекция [31]. Более наглядные данные были получены исследователями из Калифорнии, которые ИП воспроизводили *in vitro* на срезах гиппокампа, удаляя на 15 мин из среды инкубации глюкозу и O_2 , а летальную аноксию индуцировали, удаляя кислород из среды инкубации на 40 мин, а через 24 ч реперфузии оценивали гибель нейронов [21]. В данном случае речь идёт об отсроченном ИП, поскольку летальную аноксию моделировали через 24 ч после прекондиционирования. Оказалось, что селективная блокада ПКС ϵ с помощью пептида $\epsilon\text{V1-2}$ устраняет нейропротекторный эффект ИП [21], также действовал ингибитор фосфолипазы С (ФЛС) U-73122. Селективный пептидный ПКС ϵ -активатор $\psi\epsilon\text{RACK}$ имитировал цитопротекторный эффект ИП. Блокада аденозиновых A_1 рецепторов приводила к исчезновению цитопротекторного эффекта ИП. Цитопротекторный эффект ИП имитировал агонист A_1 рецепторов. Ингибитор MEK1/2 PD-98059 устранял защитный эффект ИП [21]. Эти факты говорят о том, что в отсроченном ИП участвует следующая цепочка событий: ИП \rightarrow аденозин \rightarrow A_1 рецептор \rightarrow ФЛС \rightarrow ДАГ \rightarrow ПКС ϵ \rightarrow MEK1/2 \rightarrow ERK1/2 \rightarrow повышение толерантности к ишемии-реперфузии [28]. Некоторые авторы полагают [28], что события могут развиваться и по другому сценарию: ИП \rightarrow глутамат \rightarrow NMDA-рецептор \rightarrow $[\text{Ca}^{2+}]_i$ \rightarrow ФЛС \rightarrow ДАГ \rightarrow ПКС ϵ \rightarrow MEK1/2 \rightarrow ERK1/2 \rightarrow нейропротекция или ИП \rightarrow глутамат \rightarrow NMDA-рецептор \rightarrow $[\text{Ca}^{2+}]_i$ \rightarrow митохондрии \rightarrow АФК \rightarrow ПКС ϵ \rightarrow MEK1/2 \rightarrow ERK1/2 \rightarrow нейропротекция, где АФК — активные формы кислорода. Важная роль ПКС в ИП была подтверждена в работе китайских физиологов [14], которые проводили эксперименты на срезах гиппокампа. Прекондиционирование моделировали, удаляя из среды инкуба-

ции кислород и глюкозу, а после 30 мин реоксигенации воспроизводили летальное повреждение, удаляя кислород и глюкозу на 45 мин. Следовательно, в данном случае речь идёт о раннем ИП. Прекондиционирование имитировали, добавляя в среду инкубации на 30 мин NMDA, с последующей «отмывкой» клеток за 30 мин до летальной аноксии [14]. Прекондиционирование и NMDA индуцировали транслокацию ПКС ϵ в мембраны клеток. Селективный ингибитор названной киназы $\epsilon\text{V1-2}$ и селективный MEK1/2-ингибитор PD-98059 устраняли нейропротекторный эффект ИП и NMDA. Антагонист NMDA-рецепторов MK-801 блокировал ИП-индуцированную транслокацию ПКС ϵ [14]. Следовательно, события развиваются в следующем порядке: ИП \rightarrow глутамат \rightarrow NMDA-рецептор \rightarrow ПКС ϵ \rightarrow MEK1/2 \rightarrow ERK1/2 \rightarrow нейропротекция, что согласуется с выше приведенными данными. Участие ПКС ϵ в отсроченном ИП подтвердили физиологи из Майами [16], которые эксперименты *in vitro* проводили на культуре нейронов и астроцитов, а также на срезах гиппокампа. Прекондиционирование индуцировали, удаляя из среды инкубации кислород и глюкозу на 1 ч в опытах с клетками и на 15 мин в экспериментах со срезами. Через 48 ч воспроизводили летальную аноксию. Прекондиционирование обеспечивало усиление экспрессии СОХ-2 (cyclooxygenase-2), которое достигало максимума через 24 ч после ИП. Ингибитор СОХ-2 NS-398 устранял цитопротекторный эффект ИП на обеих *in vitro* моделях. Селективные ингибиторы ПКС ϵ или MEK1/2 устраняли нейропротекторный эффект ИП. Активатор ПКС ϵ $\psi\epsilon\text{RACK}$ имитировал защитный эффект ИП как *in vitro* [16], так и *in vivo* [11]. Эти данные были подтверждены в более поздней работе того же авторского коллектива из Майами [17]. Они обнаружили, что ИП ведёт к транслокации в ядро клетки р65- и р53-субъединиц транскрипционного фактора NF κ B (nuclear factor κ B). Ингибитор NF κ B дитиокарбамат устранял нейропротекцию, индуцированную ИП или $\psi\epsilon\text{RACK}$. Ингибирование NF κ B устраняло ИП-индуцированное усиление экспрессии СОХ-2. Блокада ПКС ϵ или ингибирование MEK1/2 предупреждали появление в ядре клетки р65 и р53 субъединиц. Авторы полагают [17], что ИП «включает» следующий сигнальный механизм: ИП \rightarrow ПКС ϵ \rightarrow MEK1/2 \rightarrow ERK1/2 \rightarrow NF κ B \rightarrow СОХ-2 \rightarrow нейропротекция.

Одним из наиболее интригующих вопросов, связанных с ИП, является вопрос о природе конечного эффектора ИП. Мы предполагаем, что конечным эффектором прекондиционирования может быть АТФ-чувствительный K^+ -канал (K_{ATP} -канал) [2],

поэтому работа авторов, которые попытались оценить взаимодействие ПКСε и K_{ATP} -каналов в механизме преколонирования, показала нам особо интересной [32]. Для индукции ИП срезы гиппокампа подвергали воздействию 15-минутной аноксии без глюкозы, а через 48 воспроизводили летальную аноксию, удаляя из среды инкубации кислород и глюкозу на 40 мин. В группе контроля были срезы, которые подвергали действию летальной аноксии без преколонирования. Блокада митохондриальных K_{ATP} -каналов (мит K_{ATP} -каналов) с помощью 5-гидроксидеканоата устраняла цитопротекторный эффект ИП. Так же действовал селективный ПКСε-ингибитор $\epsilon V1-2$. Активатор ПКСε $\psi ERACK$ повышал толерантность клеток к аноксии, такой же эффект оказывал «открыватель» мит K_{ATP} -каналов диазоксид. Блокада мит K_{ATP} -каналов устраняла нейропротекторный эффект $\psi ERACK$. Преколонирование и $\psi ERACK$ вызывали фосфорилирование Kir6.2-субъединицы K_{ATP} -каналов в митохондриях. ПКСε-ингибитор $\epsilon V1-2$ устранял ИП-индуцированное фосфорилирование Kir6.2. Эти авторы полагают, что мит K_{ATP} -каналы являются мишенью для ПКСε, а события в клетке развиваются следующим образом: ИП → ПКСε → мит K_{ATP} -канал → нейропротекция [32]. Важную роль митохондрий в качестве мишени для ПКСε во время преколонирования подтверждают и другие авторы [10]. Преколонирование они индуцировали с помощью 2-минутной окклюзии сонных артерий на фоне гипотензии. Через 48 ч после ИП выделяли синапсомы и проводили исследования. Оказалось, что ИП обеспечивает увеличение белка и мРНК ПКСε. Применение ПКСε-активатора $\psi ERACK$ обеспечивало усиление дыхания синапсомальных митохондрий и индуцировало фосфорилирование белков дыхательной цепи. Эти эффекты были зафиксированы только в экспериментах с синапсомы, выделенными из мозга преколонированных особей. Авторы заключили, что фосфорилирование дыхательной цепи ПКСε может иметь прямое отношение к нейропротекторному эффекту ИП [10].

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о том, что ПКСε и COX-2 играют важную роль в ИП мозга, а мит K_{ATP} -канал может быть конечным фактором отсроченного преколонирования.

Киназа CaMK

Киназа CaMK — Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase. Как известно, ишемия ведёт к увеличению концентрации внутриклеточного кальция $[Ca^{2+}]_i$, который играет роль внутриклеточного мес-

сенджера [39]. В частности Ca^{2+} активирует CaMK [39]. В 2000 г. T.J. Blanck и соавт. [8] обнаружили, что изофлуран имитирует феномен ИП. Нейропротекторный эффект изофлурана зависел от активации CaMKII [8]. В 2003 г. канадские физиологи [36] получили данные в пользу участия CaMK в ИП. Эксперименты они проводили на культуре кортикальных нейронов крысы. Преколонирование индуцировали, удаляя из среды инкубации кислород и глюкозу на 60 мин, через 24 ч индуцировали летальную аноксию, удаляя глюкозу и O_2 на 90 мин. Кроме того, через 24 ч оценивали нейротоксический эффект NMDA. Исследователи показали [36], что нейропротекторный эффект ИП не проявляется в условиях селективной блокады CaMKII с помощью ингибитора KN-62. Китайские исследователи [23] ИП моделировали с помощью 3-минутной глобальной ишемии мозга. Через 3 дня воспроизводили 6-минутную ишемию мозга, которая вызывала гибель CA1-нейронов гиппокампа. Оказалось, что цитопротекторный ИП не проявлялся, если крысам интрацеребровентрикулярно вводили KN-62. Следовательно, можно утверждать, что CaMKII играет важную роль в отсроченном ИП. Полагают [../sites/entrez39], что после ИП формируется следующий сигнальный каскад: ИП → глутамат → NMDA-рецептор → увеличение $[Ca^{2+}]_i$ → CaMKII → Akt → Bad → нейропротекция.

Заключение

Анализ опубликованных данных свидетельствует о том, что в сигнальном механизме отсроченного ишемического преколонирования важную роль играют белок Ras и следующие киназы: PI3K, Akt, MEK1/2, ERK1/2, ПКС, CaMKII. Кроме того, в позднем преколонировании принимают участие циклооксигеназа-2, NO-синтаза, мит K_{ATP} -канал. Сигнальный механизм раннего ишемического преколонирования остаётся неизученным.

Автор выражает признательность за техническую помощь в подготовке статьи Данильченко Н.А., Бадзиунасу Г., Ключарёву В., Хохловой И.С., Томашевскому А. и Сидорову Р.А.

Список литературы

1. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс: Биохимический и патофизиологический аспекты. — М.: МАИК «Наука/Интерпериодика», 2001. — 343 с.
2. Лишманов Ю.Б., Маслов Л.Н., Круг Т., Халиулин И.Г. Проблема конечного эффектора позднего ишемического преколонирования сердца // Росс. Физиол. Жур. — 2010. — Т. 96, №4. — С. 337-352.

3. **Маслов Л.Н., Лишманов Ю.Б., Соленкова Н.В.** Адаптация миокарда к ишемии. Первая фаза ишемического preconditionирования // Успехи физиол. наук. — 2006. — Т. 37, №3. — С. 25-41.
4. **Маслов Л.Н.** Роль эритропоэтина в ишемическом preconditionировании, постconditionировании и регенерации мозга после ишемии // Росс. Физиол. Жур. — 2010. — Т. 96, №1. — С. 26-41.
5. **Саватеев А.В., Саватеева-Любимова Т.Н.** Апоптоз — универсальный механизм гибели и выживания при ишемии и реперфузии. Пути фармакологического контроля // Экспер. Клин. Фармакол. — 2010. — Т. 73, №12. — С. 44-49.
6. **Atochin D.N., Clark J., Demchenko I.T.** et al. Rapid cerebral ischemic preconditioning in mice deficient in endothelial and neuronal nitric oxide synthases // Stroke. — 2003. — Vol. 34, №5. — P. 1299-1303.
7. **Barone F.C., White R.F., Spera P.A.** et al. Ischemic preconditioning and brain tolerance: temporal histological and functional outcomes, protein synthesis requirement, and interleukin-1 receptor antagonist and early gene expression // Stroke. — 1998. — Vol. 29, №9. — P. 1937-1950.
8. **Blanck T.J., Haile M., Xu F.** et al. Isoflurane pretreatment ameliorates posts ischemic neurologic dysfunction and preserves hippocampal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in a canine cardiac arrest model // Anesthesiology. — 2000. — Vol. 93, №5. — P. 1285-1293.
9. **Choi J.S., Kim H.Y., Cha J.H., Lee M.Y.** Ischemic preconditioning-induced activation of ERK1/2 in the rat hippocampus // Neurosci. Lett. — 2006. — Vol. 409, №3. — P. 187-191.
10. **Dave K.R., DeFazio R.A., Raval A.P.** et al. Ischemic preconditioning targets the respiration of synaptic mitochondria via protein kinase C ϵ // J. Neurosci. — 2008. — Vol. 28, №16. — P. 4172-4182.
11. **Della-Morte D., Raval A.P., Dave K.R.** et al. Post-ischemic activation of protein kinase C epsilon protects the hippocampus from cerebral ischemic injury via alterations in cerebral blood flow // Neurosci. Lett. — 2011. — Vol. 487, №2. — P. 158-162.
12. **Garcia L., Burda J., Hrehorovska M.** et al. Ischaemic preconditioning in the rat brain: effect on the activity of several initiation factors, Akt and extracellular signal-regulated protein kinase phosphorylation, and GRP78 and GADD34 expression // J. Neurochem. — 2004. — Vol. 88, №1. — P. 136-147.
13. **Gonzalez-Zulueta M., Feldman A.B., Klesse L.J.** et al. Requirement for nitric oxide activation of p21(ras)/extracellular regulated kinase in neuronal ischemic preconditioning // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2000. — Vol. 97, №1. — P. 436-441.
14. **Jia J., Wang X., Li H.** et al. Activations of nPKC ϵ and ERK1/2 were involved in oxygen-glucose deprivation-induced neuroprotection via NMDA receptors in hippocampal slices of mice // J. Neurosurg. Anesthesiol. — 2007. — Vol. 19, №1. — P. 18-24.
15. **Kato H., Liu Y., Araki T., Kogure K.** MK-801, but not anisomycin, inhibits the induction of tolerance to ischemia in the gerbil hippocampus // Neurosci. Lett. — 1992. — Vol. 139, №1. — P. 118-121.
16. **Kim E., Raval A.P., Defazio R.A., Perez-Pinzon M.A.** Ischemic preconditioning via epsilon protein kinase C activation requires cyclooxygenase-2 activation *in vitro* // Neuroscience. — 2007. — Vol. 145, №3. — P. 931-941.
17. **Kim E.J., Raval A.P., Hirsch N., Perez-Pinzon M.A.** Ischemic preconditioning mediates cyclooxygenase-2 expression via nuclear factor-kappa B activation in mixed cortical neuronal cultures // Transl. Stroke Res. — 2010. — Vol. 1, №1. — P. 40-47.
18. **Kitagawa K., Matsumoto M., Tagaya M.** et al. 'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain // Brain Res. — 1990. — Vol. 528, №1. — P. 21-24.
19. **Kroemer G., Galluzzi L., Brenner C.** Mitochondrial membrane permeabilization in cell death // Physiol. Rev. — 2007. — Vol. 87, №1. — P. 99-163.
20. **Kurkinen K., Busto R., Goldsteins G.** et al. Isoform-specific membrane translocation of protein kinase C after ischemic preconditioning // Neurochem. Res. — 2001. — Vol. 26, №10. — P. 1139-1144.
21. **Lange-Asschenfeldt C., Raval A.P., Dave K.R.** et al. Epsilon protein kinase C mediated ischemic tolerance requires activation of the extracellular regulated kinase pathway in the organotypic hippocampal slice // J. Cereb. Blood Flow Metab. — 2004. — Vol. 24, №6. — P. 636-645.
22. **Liu H.Q., Li W.B., Li Q.J.** et al. Nitric oxide participates in the induction of brain ischemic tolerance via activating ERK1/2 signaling pathways // Neurochem. Res. — 2006. — Vol. 31, №7. — P. 967-974.
23. **Miao B., Yin X.H., Pei D.S.** et al. Neuroprotective effects of preconditioning ischemia on ischemic brain injury through down-regulating activation of JNK1/2 via N-methyl-D-aspartate receptor-mediated Akt1 activation // J. Biol. Chem. — 2005. — Vol. 280, №23. — P. 21693-21699.
24. **Mori T., Muramatsu H., Matsui T.** et al. Possible role of the superoxide anion in the development of neuronal tolerance following ischaemic preconditioning in rats // Neuro-pathol. Appl. Neurobiol. — 2000. — Vol. 26, №1. — P. 31-40.
25. **Namura S., Nagata I., Kikuchi H.** et al. Serine-threonine protein kinase Akt does not mediate ischemic tolerance after global ischemia in the gerbil // J. Cereb. Blood Flow Metab. — 2000. — Vol. 20, №9. — P. 1301-1305.
26. **Nakamura M., Nakakimura K., Matsumoto M., Sakabe T.** Rapid tolerance to focal cerebral ischemia in rats is attenuated by adenosine A₁ receptor antagonist // J. Cereb. Blood Flow Metab. — 2002. — Vol. 22, №2. — P. 161-170.
27. **Nakajima T., Iwabuchi S., Miyazaki H.** et al. Preconditioning prevents ischemia-induced neuronal death through persistent Akt activation in the penumbra region of the rat brain // J. Vet. Med. Sci. — 2004. — Vol. 66, №5. — P. 521-527.
28. **Perez-Pinzon M.A., Xu G.P., Dietrich W.D.** et al. Rapid preconditioning protects rats against ischemic neuronal damage after 3 but not 7 days of reperfusion following global cerebral ischemia // J. Cereb. Blood Flow Metab. — 1997. — Vol. 17, №2. — P. 175-182.
29. **Perez-Pinzon M.A., Dave K.R., Raval A.P.** Role of reactive oxygen species and protein kinase C in ischemic tolerance in the brain // Antioxid. Redox Signal. — 2005. — Vol. 7, №9-10. — P. 1150-1157.
30. **Rapp U.R., Goldsborough M.D., Mark G.E.** et al. Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1983. — Vol. 80, №14. — P. 4218-4222.
31. **Raval A.P., Dave K.R., Mochly-Rosen D.** et al. ϵ PKC is required for the induction of tolerance by ischemic and NMDA-mediated preconditioning in the organotypic hippocampal slice // J. Neurosci. — 2003. — Vol. 23, №2. — P. 384-391.
32. **Raval A.P., Dave K.R., DeFazio R.A., Perez-Pinzon M.A.** ϵ PKC phosphorylates the mitochondrial K⁺ATP channel during induction of ischemic preconditioning in the rat hippocampus // Brain Res. — 2007. — Vol. 1184. — P. 345-353.

33. **Sawe N., Steinberg G., Zhao H.** Dual roles of the MAPK/ERK1/2 cell signaling pathway after stroke // *J. Neurosci. Res.* — 2008. — Vol. 86, №8. — P. 1659-1669.
34. **Shih T.Y., Weeks M.O., Young H.A., Scolnick E.M.** p21 of Kirsten murine sarcoma virus is thermolabile in a viral mutant temperature sensitive for the maintenance of transformation // *J. Virol.* — 1979. — Vol. 31, №2. — P. 546-546.
35. **Tauskela J.S., Chakravarthy B.R., Murray C.L.** et al. Evidence from cultured rat cortical neurons of differences in the mechanism of ischemic preconditioning of brain and heart // *Brain Res.* — 1999. — Vol. 827, №1-2. — P. 143-151.
36. **Tauskela J.S., Brunette E., Monette R.** et al. Preconditioning of cortical neurons by oxygen-glucose deprivation: tolerance induction through abbreviated neurotoxic signaling // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* — 2003. — Vol. 285, №4. — P. C899-C911.
37. **Wang R.M., Yang F., Zhang Y.X.** Preconditioning-induced activation of ERK5 is dependent on moderate Ca^{2+} influx via NMDA receptors and contributes to ischemic tolerance in the hippocampal CA1 region of rats // *Life Sci.* — 2006. — Vol. 79, №19. — P. 1839-1846.
38. **Yano S., Morioka M., Fukunaga K.** et al. Activation of Akt/protein kinase B contributes to induction of ischemic tolerance in the CA1 subfield of gerbil hippocampus // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* — 2001. — Vol. 21, №4. — P. 351-360.
39. **Yano S., Morioka M., Kuratsu J., Fukunaga K.** Functional proteins involved in regulation of intracellular Ca^{2+} for drug development: role of calcium/calmodulin-dependent protein kinases in ischemic neuronal death // *J. Pharmacol. Sci.* — 2005. — Vol. 97, №3. — P. 351-354.
40. **Yin X.H., Zhang Q.G., Miao B., Zhang G.Y.** Neuroprotective effects of preconditioning ischaemia on ischaemic brain injury through inhibition of mixed-lineage kinase 3 via NMDA receptor-mediated Akt1 activation // *J. Neurochem.* 2005. — Vol. 93, №4. — P. 1021-1029.
41. **Zhang J., Qian H., Zhao P.** et al. Rapid hypoxia preconditioning protects cortical neurons from glutamate toxicity through δ -opioid receptor // *Stroke.* — 2006. — Vol. 37, №4. — P. 1094-1099.
42. **Zhang Q.G., Han D., Xu J.** et al. Zhang G.Y. Ischemic preconditioning negatively regulates plenty of SH3s-mixed lineage kinase 3-Rac1 complex and c-Jun N-terminal kinase 3 signaling via activation of Akt // *Neuroscience.* — 2006. — Vol. 143, №2. — P. 431-444.
43. **Zhao H., Sapolsky R.M., Steinberg G.K.** Phosphoinositide-3-kinase/akt survival signal pathways are implicated in neuronal survival after stroke // *Mol. Neurobiol.* — 2006. — Vol. 34, №3. — P. 249-270.

Поступила 03.03.11