

# ФАРМАКОЛОГИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ

## ЗНАЧЕНИЕ ГИПОТЕРМИИ ДЛЯ ЗАЩИТЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА АГОНИСТАМИ АДЕНОЗИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Л. Н. Минакина, В. И. Кулинский, Л. А. Усов<sup>1</sup>

Агонисты А<sub>1</sub>-аденозиновых рецепторов индуцируют глубокую гипотермию, тесно коррелирующую с резким увеличением толерантности к глобальной ишемии головного мозга. Тепловое облучение головы значительно снижает, а термонейтральная температура полностью предупреждает как развитие гипотермии тела и особенно коры большого мозга, так и нейропротекцию; корреляция этих двух эффектов исчезает. Индукция гипотермии — наиболее важный, но не единственный механизм нейропротекторного эффекта агонистов А<sub>1</sub>-рецепторов. Другие А-агонисты менее активны.

**Ключевые слова:** аденозиновые рецепторы, гипотермия, ишемия головного мозга, нейропротекторный эффект

### ВВЕДЕНИЕ

Аденозин — ингибиторный нейромедиатор [7, 15] и тканевой гормон большинства тканей организма, защищающий их от гипоксии, ишемии [7, 9, 15], модулирующий воспаление [9, 11] и способствующий регенерации тканей [11]. Различают 4 подтипа аденозиновых рецепторов: А<sub>1</sub>, А<sub>2А</sub>, А<sub>2В</sub> и А<sub>3</sub>, в большинстве случаев реализующих различные физиологические и фармакологические эффекты. А-агонисты, особенно А<sub>1</sub>-подтипа, обладают высоким нейропротекторным эффектом (НПЭ) [7, 9, 15], в том числе при самой тяжелой форме ишемии головного мозга (ИГМ) — глобальной [3, 4, 10]. По предварительным данным это в значительной мере связано с развитием гипотермии [4]. Цель настоящей работы — исследование взаимосвязи НПЭ и гипотермического действия (ГТД) агонистов А-рецепторов с использованием нового объекта (коры большого мозга) и подходов (тепловое облучение головы и термонейтральные условия).

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на 1334 беспородных мышках обоего пола в возрасте 2 – 5 месяцев. Агонисты аденозиновых рецепторов аденозин, N<sup>6</sup>-циклопентиладенозин (СРА), ADAC (аминовый аналог аденозина), 5'-N-этилкарбоксамидоаденозин (NECA), CGS 21680 (2-пара-(2-карбоксиил)фенетиламино-NECA), “Sigma”, N<sup>6</sup>-циклогексиладенозин (СНА), 2-хлоро-СРА (ССРА), DPMA (N<sup>6</sup>-[2-(3,5-диметоксифенил)-2-(2-метилфенил)этил]аденозин), N<sup>6</sup>-бензил-NECA ICN, N<sup>6</sup>-(3-йодобензил)аденозин-5'-N-метилурунамид

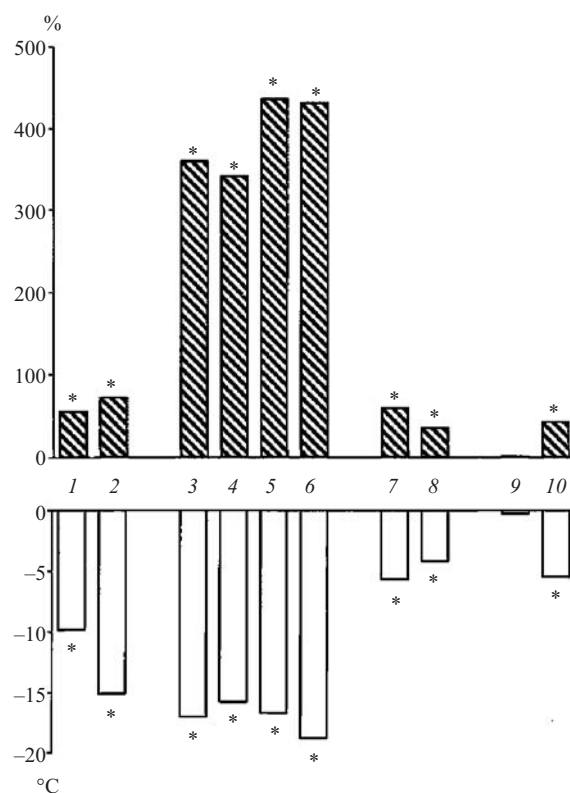
(IB-MECA), “Tocris” вводили подкожно в объеме 10 мл/кг. ADAC и N<sup>6</sup>-бензил-NECA растворяли в 45 % водном 2-гидрокси-пропил-бета-циклодекстрине, “Sigma”, IB-MECA — в диметилсульфоксиде (1 мг/0,125 мл), затем доводили дистиллированной водой до нужного объема; остальные вещества применяли в виде водных растворов. Агонисты аденозиновых А<sub>1</sub>-рецепторов обладают выраженным и длительным центральным анальгетическим эффектом [12]. Дополнительное обезболивание фторотаном немного увеличивает толерантность к ишемии как в контроле (на 20 %), так и в опыте (на 35 %). Контрольным животным вводили соответствующие растворители. Температуру ядра тела измеряли электротермометром ТПЭМ-1 в кишке на глубине 3,5 см. Термонейтральные условия создавали помещением мышей в термостат при 32,5 °С. Локальное согревание головы осуществляли лампой 100 Вт, соединенной с понижающим трансформатором, с фокусированием теплового потока на голову конусным зеркальным тубусом. Для измерения температуры коры мозга мышей использовали электротермометр, собранный на кафедре медицинской биофизики ИГМУ. Датчик вводили через трепанационное отверстие диаметром 2 мм, сделанное минибормашиной под фторотановым наркозом за трое суток до опыта. Использовали модель глобальной ишемии головного мозга по О. Н. Lowry [13] с измерением продолжительности газпинга (спазматического дыхания) [5]. Для всех веществ были подобраны оптимальные условия введения. Для статистического анализа данных по газпингу применяли критерий U Манна-Уитни; температуры — критерии F (сравнение дисперсий) и t (сравнение средних); рассчитывали ранговый коэффициент корреляции Спирмена ( $r_s$ ), уравнение регрессии и силу влияния ( $r^2$ ). Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

<sup>1</sup> Кафедры фармакологии (зав. — проф. Л. А. Усов) и биохимии (зав. — проф. В. И. Кулинский) Иркутского государственного медицинского университета, Иркутск, 664003, ул. Красного восстания, 1, E-mail: kulinsky@pp.irkutsk.ru

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Все обладающие НПЭ агонисты аденозиновых рецепторов при подкожном введении и оптимальных дозах и времени снижают температуру тела мышей в среднем по А<sub>1</sub>-агонистам (CPA, ADAC, CCPA, CHA) на 17 °С (терморегуляция сохранялась), неселективным А-агонистам (аденозин, NECA) на 12,5 °С, А<sub>2</sub>-агонистам (CGS 21680, DMPA) на 5 °С, неселективный А<sub>3</sub>-агонист N<sup>6</sup>-бензил-NECA на 5,5 °С. Селективный А<sub>3</sub>-агонист IB-MECA не влиял на оба показателя (рис. 1). Следовательно, ГТД и НПЭ максимальны у А<sub>1</sub>-агонистов и падают в указанном ряду. ГТД и НПЭ тесно и высоко значимо коррелируют (рис. 2): на материале всех 1223 исследованных мышей, опытов со всеми А-агонистами, с А<sub>1</sub>-агонистами и А-агонистами на фоне А-антагонистов  $r_s$  находятся в диапазоне 0,881 – 0,920; в опытах с А<sub>2А</sub>-агонистами  $r_s$  = – 0,648 (таблица). Соответственно сила влияния ( $r^2$ ) гипотермии на НПЭ равна 0,78 – 0,85 и 0,42. Это означает, что в указанных четырех сериях НПЭ в основном (на 78 – 85 %) определяется гипотермией, а в опытах с А<sub>2А</sub>-агонистами — намного меньше (42 %). Более того, как по средним величинам, так и по данным для всех мышей при ИГМ установлена высоко значимая и тесная корреляция дозовых кривых и динамики обоих эффектов. Таким образом, полученные результаты показывают ведущую роль гипотермии в НПЭ А<sub>1</sub>-агонистов и меньшее ее значение для других групп А-агонистов.

Мы исследовали также влияние оптимальных нейропротекторных доз А<sub>1</sub>-агонистов CPA и ADAC на устойчивость мышей к ишемии путем прямого снижения гипотермии. Локальное тепловое облучение голо-



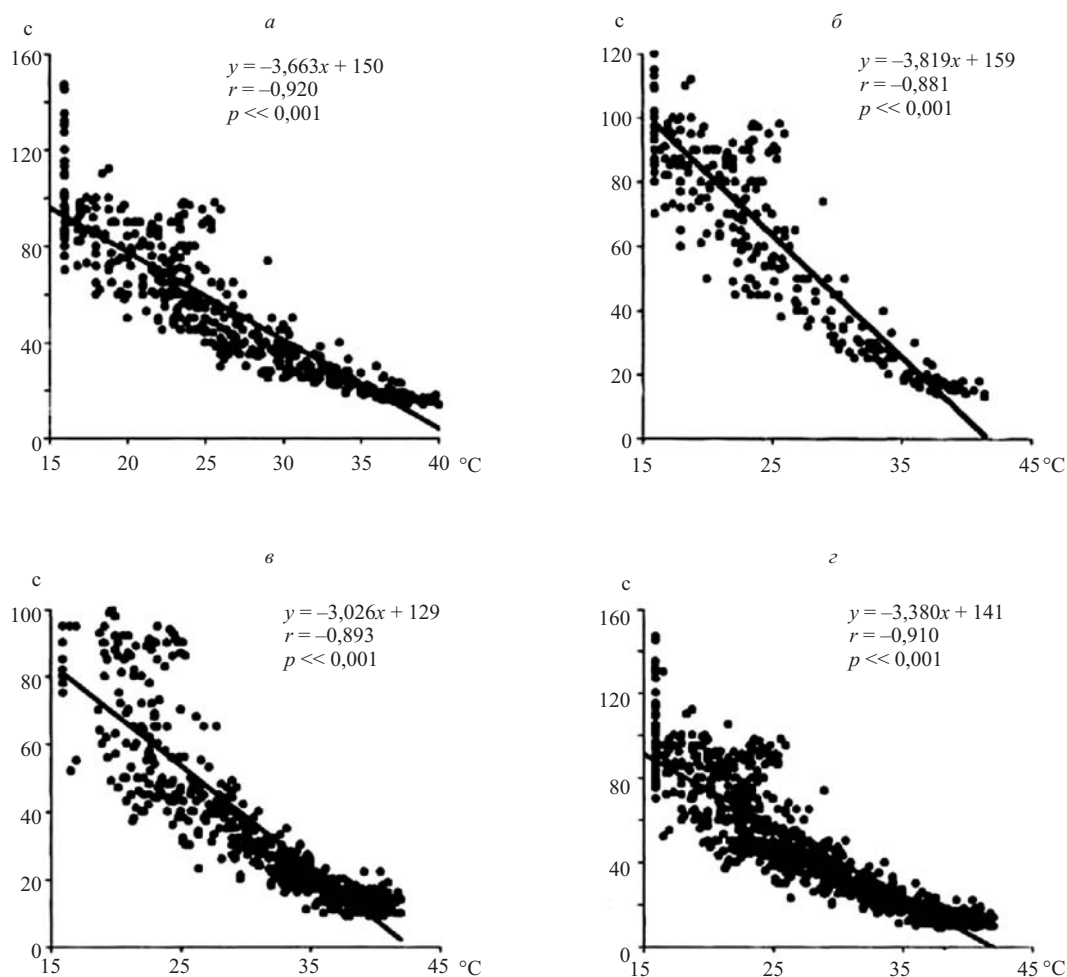
**Рис. 1.** Влияние агонистов А-рецепторов на толерантность головного мозга к ишемии и температуру тела мышей.

По оси ординат вверх – увеличение толерантности к ишемии (прирост гаспинга в процентах к контролю), вниз – гипотермия ядра тела (Δt °С). 1 – аденозин (749 мкмоль/кг за 3 ч), 2 – NECA (0,32 мкмоль/кг за 3 ч), 3 – CHA (7,2 мкмоль/кг за 3 ч), 4 – CCPA (7,2 мкмоль/кг за 3 ч), 5 – CPA (7,2 мкмоль/кг за 3 ч), 6 – ADAC (7,2 мкмоль/кг за 3 ч), 7 – CGS 21680 (1,8 мкмоль/кг за 3 ч), 8 – DMPA (3,8 мкмоль/кг за 1 ч), 9 – IB-MECA (1,9 мкмоль/кг за 0,25 – 6 ч), 10 – N<sup>6</sup>-бензил-NECA (1,9 мкмоль за 2 ч). Звездочка – различия с контролем статистически значимы при  $p < 0,001$ .

### Корреляция нейропротекторного эффекта и гипотермического действия аденозинергических веществ

Вещество	Доза, мкмоль/кг	Время, ч	Корреляция по средним величинам		Корреляция по данным для всех животных	
			$r_s$	$P$	$r_s$	$P$
CPA	0,3 – 7,2	1 – 12	– 0,965 (15)	«0,001	– 0,899 (126)	«0,001
ADAC	0,15 – 7,2	1 – 12	– 0,915 (18)	«0,001	– 0,912 (92)	«0,001
CCPA	7,2	1 – 12	– 0,925 (5)	< 0,05	– 0,857 (30)	«0,001
CHA	7,2	1 – 12	– 0,991 (11)	«0,001	– 0,897 (58)	«0,001
А <sub>1</sub> -агонисты	–	–	– 0,959 (49)	«0,001	– 0,881 (306)	«0,001
CGS 21680	1,8	1	–	–	– 0,524 (40)	«0,001
DPMA	1,9 – 3,8	1	–	–	– 0,563 (14)	0,037
А <sub>2А</sub> -агонисты	–	–	–	–	– 0,648 (54)	«0,001
IB-MECA	0,19 – 1,9	0,25 – 6	–	–	– 0,502 (19)	0,03
N <sup>6</sup> -бензил-NECA	0,25 – 2,5	0,25 – 6	–	–	– 0,878 (21)	«0,001
Аденозин	562 – 1124	1	–	–	– 0,627 (61)	«0,001
NECA	0,32	1 – 6	–	–	– 0,764 (67)	«0,001
Аденозин + NECA	–	–	– 0,829 (6)	0,1	– 0,845 (128)	«0,001
Весь материал по А-агонистам	–	–	– 0,954 (63)	«0,001	– 0,920 (528)	«0,001
А-агонисты на фоне антагонистов	–	–	– 0,953 (133)	«0,001	– 0,893 (695)	«0,001
Весь материал	–	–	– 0,935 (196)	«0,001	– 0,910 (1223)	«0,001

**Примечание.** В скобках – количество серий (колонка 5) или животных (колонка 7).



**Рис. 2.** Корреляция и регрессия нейропротекторного эффекта и гипотермического действия лигандов А-рецепторов. Приведены данные по всем мышам.

По оси абсцисс – температура ядра тела ( $t$  °C), по оси ординат – продолжительность гаспинга, сек. *а* – все А-агонисты, *б* – А<sub>1</sub>-агонисты, *в* – А-агонисты на фоне А-антагонистов, *г* – весь материал.

вы вызывает двукратное уменьшение вызванной обоими агонистами гипотермии тела и намного большее снижение гипотермии в коре большого мозга — в 8,6 раза для CPA и в 3,8 раза для ADAC. Это приводит к снижению НПЭ — соответственно в 2,8 и 7,4 раза. При этом корреляция ГТД и НПЭ для CPA и ADAC исчезает (соответственно  $r_s = -0,262$  и  $-0,385$ ,  $p > 0,26 - 0,5$ ). Обращает на себя внимание различие между этими двумя агонистами: в опытах с CPA резче уменьшается гипотермия, в опытах с ADAC — НПЭ. Это показывает, что не только НПЭ [4], но и гипотермия включает как центральный (более сильный у ADAC), так и периферический (более выраженный у CPA) компоненты. Если в обычных условиях комнатной температуры введение CPA и ADAC вызывает глубокую гипотермию ( $-17$  °C), то в термонеutralных для мышей условиях оба А<sub>1</sub>-агониста не снижают температуру ни ядра тела, ни коры большого мозга (рис. 3). Соответственно, вместо обычного очень резкого увеличения толерантности головного мозга

(3,7 – 4,3 раза) в термонеutralных условиях НПЭ исчезает.

Таким образом, как ГТД, так и НПЭ нарастают в ряду: А<sub>3</sub> < А<sub>2А</sub> < аденозин < NECA < А<sub>1</sub>-агонисты аденозиновых рецепторов. Рецептор-опосредованная гипотермия максимально глубока при воздействии селективных А<sub>1</sub>-агонистов. Ранее роль А<sub>1</sub> и в меньшей степени А<sub>2</sub>-рецепторов в развитии как гипотермии, так и НПЭ доказана блокатормым анализом с использованием высоко селективных антагонистов [4]. Очевидно, аденозин и агонисты его рецепторов важны для терморегуляции и их можно использовать для фармакологической коррекции.

Интересно выявление двух важных фактов. Тепловое облучение головы значительно уменьшает А<sub>1</sub>-рецепторную индукцию гипотермии, при этом в коре большого мозга значительно больше, чем в ядре тела. Термонеutralные условия полностью предупреждают развитие гипотермии ядра тела, что связано с согреванием всего организма. Следовательно, оба раз-

личных метода выявили принципиально одинаковый результат — ведущую роль активации  $A_1$ -рецепторов в НПЭ и ее реализацию в основном через развитие гипотермии. При этом гипотермия включает как центральный, так и периферический компоненты. Вклад гипотермии в НПЭ всех исследованных агонистов аденозиновых рецепторов очень важен.

Развитие гипотермии означает, что реализуется толерантная стратегия адаптации. Эти результаты согласуются с описанными ранее влияниями ряда ингибиторных нейромедиаторов [3, 4, 10] и разных видов гипоксического preconditionирования [1, 3, 14]. Повышение толерантности к ишемии головного мозга при разных видах гипотермии хорошо известно. Оно связано со снижением как метаболизма, так и освобождения возбуждающих аминокислот и катехоламинов [14]. В последние годы НПЭ “мягкой” гипотермии доказан в клинике при остановке сердца, вызывающей глобальную ишемию головного мозга [6], и при гипоксически-ишемической энцефалопатии новорожденных [8]. Однако гипотермия, внося важный вклад в НПЭ  $A_1$ -агонистов, не определяет его полностью — даже для  $A_1$ -агонистов.

Аденозин и синтетические  $A_1$ -агонисты — ингибиторные нейромедиаторы головного мозга и их аналоги. Они уменьшают потребность в кислороде, ингибируют аэробные процессы, энергозатраты и метаболизм в целом и поэтому снижают функциональную активность головного мозга [2]. Эти нейрохимические сдвиги могут быть как первичными реакциями на ингибиторные нейропротекторы, так и вторичными — опосредованными вызываемой ими гипотермией. В обоих случаях в результате они могут увеличивать толерантность к ИГМ. Толерантная стратегия — более широкое явление, не сводимое к гипотермии.

Важное достоинство  $A_1$ -агонистов — наличие очень высокого (5–7-кратного) НПЭ при самой тяжелой форме ИГМ — полной глобальной. Они намного превосходят эффективность других исследованных нами ингибиторных нейромедиаторов (в 3–7 раз) [3, 4]. В настоящей работе для  $A_1$ -агонистов мы выявили не только индукцию наиболее глубокой гипотермии, но и самую высокую силу влияния гипотермии на НПЭ ( $r^2 = 0,82$ ) по сравнению с агонистами  $\alpha_2$ -адреноцепторов ( $r^2 = 0,65$ ), ГАМК<sub>A</sub> и ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов ( $r^2 = 0,49$ ) [3] и гипоксическим preconditionированием ( $r^2 = 0,53$ ) [1, 3]. Это означает, что суммарный вклад в НПЭ других — негипотермических — механизмов (и случайных факторов) равен 18, 35, 51 и 47 % соответственно, то есть для  $A_1$ -агонистов он в 2–3 раза ниже. Замедление под влиянием  $A_1$ -агонистов развития необратимых поражений может увеличить “терапевтическое окно” и позволить рационально использовать его для проведения диагностических и лечебных мероприятий с целью восстановления гемодинамики.  $A_1$ -агонисты — потенциальные средства при ишемии головного мозга, а различные  $A_1$ -агонисты и антагани-

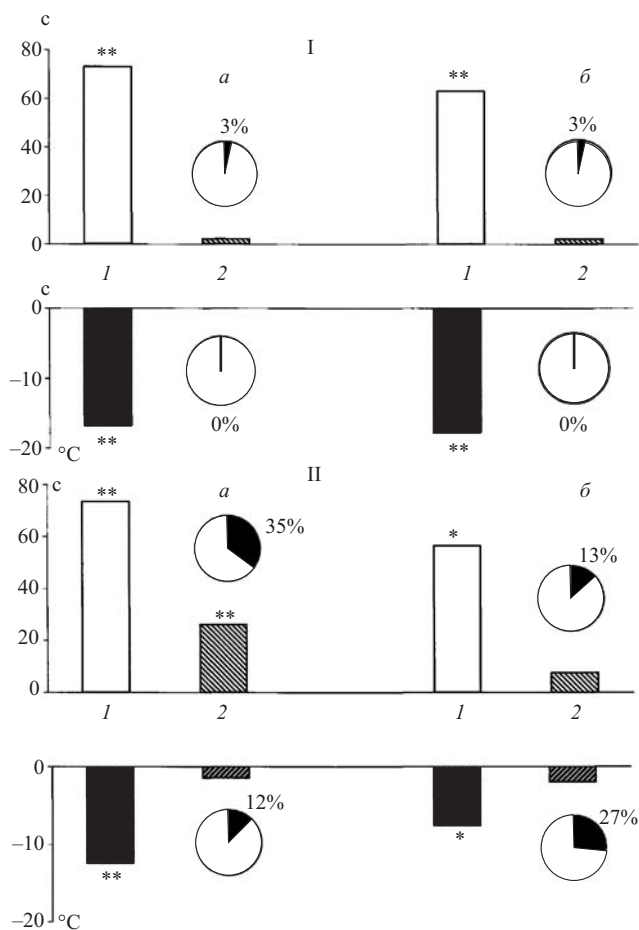


Рис. 3. Нейропротекторный эффект и гипотермическое действие за 3 ч CPA (7,2 мкмоль/кг) — а и ADAC (1,7 мкмоль/кг) — б в обычных условиях (I) и при тепловых воздействиях (2).

По оси ординат: вверх — прирост гаспинга, сек, вниз — гипотермия ( $\Delta T$  °C) ядра тела (I) и коры большого мозга (II). Темный сектор — доля сохранения эффектов, %. \* —  $p < 0,05$ , \*\* —  $p < 0,001$ .

сты могут использоваться как фармакологические модуляторы терморегуляции.

## ВЫВОДЫ

1. Агонисты  $A_1$ -аденозиновых рецепторов индуцируют глубокую гипотермию, коррелирующую с резким увеличением толерантности к глобальной ишемии головного мозга.
2. Тепловое облучение головы значительно снижает, а термонеутральная температура полностью предупреждает как развитие гипотермии тела и особенно коры большого мозга, так и нейропротекцию; корреляция этих двух эффектов исчезает. Индукция гипотермии — важный механизм нейропротекторного эффекта агонистов  $A_1$ -рецепторов.

Выражаем благодарность проф. Е. В. Шевченко за изготовление электротермометра для измерения температуры коры большого мозга.

## ЛИТЕРАТУРА

1. В. И. Кулинский, Т. В. Гаврилина, Л. Н. Минакина, В. Ю. Ковтун, *Рос. физиол. ж.*, **92**(5), 607 – 614 (2006).
2. В. И. Кулинский, Л. С. Колесниченко, *Биохимия*, **70**(1), 33 – 50 (2005).
3. В. И. Кулинский, Л. Н. Минакина, С. С. Гаврилов, Т. В. Гаврилина, *Ж. неврол. психиатр.*, № 17, 77 – 86 (2005).
4. В. И. Кулинский, Л. Н. Минакина, Л. А. Усов, *Экспер. и клин. фармакол.*, **64**(5), 19 – 22 (2001).
5. H. Araki, I. Karasava, M. Nojiri, and H. Aiyara, *Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, **10**(6), 349 – 356 (1988).
6. S. Bernard, *Neurol. Clin.*, **24**(1), 61 – 71 (2006).
7. B. B. Fredholm, J.-F. Chen, R. A. Gunha, et al., *Int. Rev. Neurobiol.*, **63**, 191 – 270. (2005).
8. A. J. Gunn and M. Thoresen, *Neuro Rx.*, **3**(2), 154 – 169 (2006).
9. K. A. Jacobson and Z. G. Gao, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **5**(3), 247 – 264. 2006.
10. V. I. Kulinsky, L. N. Minakina, T. V. Gavrilina, et al., *Hypothermia for acute brain damage. Pathomechanism and practical aspects*, N. Hayashi, R. Bullock, D. W. Dietrich, et al. (ed.), Springer-Verlag, Tokyo, 41 – 46 (2004).
11. J. Linden, *Mol. Pharmacol.*, **67**(5), 1385 – 1387 (2005).
12. M. Hayashida, K. Fukuda, and A. Fukunaga, *Anesth. Analg.*, **103**(4), 1004 – 1010 (2006).
13. O. H. Lowry, J. V. Passoneau, F. X. Hasselberger, and D. W. Schulz, *J. Biol. Chem.*, **239**(1), 18 – 30 (1964).
14. B. Schaller and R. Graf, *Pathophysiology*, **10**(1), 7 – 35 (2003).
15. T. W. Stone, *Neurol. Res.*, **27**(2), 161 – 168 (2005).

Поступила 18.12.06

## THE ROLE OF HYPOTHERMIA IN BRAIN PROTECTION BY ADENOSINE RECEPTOR AGONISTS

L. N. Minakina, V. I. Kulinskii, and L. A. Usov

Irkutsk State Medical University, Irkutsk, 664003, Russia  
E-mail: kulinsky@pp.irkutsk.ru

Agonists of A1 adenosine receptors induce a profound hypothermia that is correlated with a considerable increase in tolerance with respect to the global cerebral ischemia. Thermal irradiation of the head considerably decreases and the thermoneutral temperature completely prevents (i) the development of hypothermia in the body and, especially, in the cortex and (ii) the neuroprotection, so that a correlation of these two effects disappears. The induction of hypothermia is the most important but not single mechanism of neuroprotective action of A1-receptor agonists. Other A-agonists are much less active.