

І.С. Магура

Мозкова ішемія-гіпоксія та біофізичні механізми нейродегенеративних і нейропротекторних впливів

Нейрональные ответы на ишемию-гипоксию могут быть острыми и хроническими. На ранних стадиях они зависят от модуляции ионных каналов. Острые ответы обусловлены в основном кислородрегулируемыми ионными каналами, которые обеспечивают адаптивные изменения возбудимости нейронов. Ранним результатом ишемии-гипоксии является недостаточное энергоснабжение нейронов, приводящее к нарушению ионного гомеостаза и внеклеточному накоплению нейромедиаторов. Особо важную роль играет накопление возбуждающего нейромедиатора глутамата, приводящее к избыточной активации НМДА- и АМПА-каинатных рецепторов. Это вызывает увеличение притока кальция в клетки, активацию каскада ферментных систем, приводящую к развитию феномена эксцитотоксичности и гибели нейронов. В проявлениях эксцитотоксичности значительную роль играет накопление кислородных свободных радикалов, окисляющих внутриклеточные макромолекулы, а также мембранные липиды, что вызывает в частности нарушение рецепторной и транспортной функции плазматической мембраны. На экспериментальных моделях было показано, что антагонисты возбуждающих аминокислот и блокаторы L-типа кальциевых каналов оказывают нейропротекторное действие, однако при этом возможно нарушение функций мозга. В этой связи особого внимания заслуживает нейропротекторное действие потенциалзависимых блокаторов натриевых каналов. Они снижают возбудимость, подавляют приток Na^+ и его накопление в клетке, а также последствия перегрузки нейрона внутриклеточным Ca^{2+} . Эти препараты избирательно действуют на поврежденные нейроны и оказывают минимальный побочный эффект.

Ішемічні ураження мозку являють собою третю за розповсюдженням причину смертності у розвинених країнах і можуть бути наслідком як фокальних порушень кровообігу, так і транзиторної ішемії всього мозку, викликані тимчасовим припиненням насосної функції серця. Фокальна ішемія може супроводжувати крововилив у мозок і черепно-мозкові травми. Було з'ясовано, що пошкодження тканини мозку, викликане ішемією, є наслідком низки взаємозв'язаних процесів, які мають розвиток у часі та просторі [5]. Розробка ефективних методів лікування цієї патології пов'язана з вивченням молекулярних і клітинних механізмів процесів, зумовлених порушенням мозкового кровообігу. Переважно на почат-

кових стадіях розвитку вони значною мірою пов'язані зі змінами біофізичних характеристик механізмів, що забезпечують інтегративну функцію нервових клітин: синаптичної передачі та функціонування іонних каналів, зокрема тих, що забезпечують електричну збудливість [5, 15]. Ця обставина відіграє важливу роль як у природних, так і штучних нейропротекторних впливах.

Патологічні процеси, що зумовлюють ушкодження мозку при ішемії-гіпоксії. Мозку властива більш висока чутливість до порушень кровообігу. Його зменшення або припинення відразу викликає нестачу кисню (гіпоксію), зниження вмісту глюкози у мозковій тканині (гіпоглікемію) та таке зменшення вмісту АТФ, при якому порушується

© І.С. Магура

ся іонний гомеостаз [6, 15]. Ішемія-гіпоксія може викликати некроз з паралельним розвитком апоптозу [5]. Гіпоксія можлива і без порушень кровообігу, зокрема, при отруєнні оксидом вуглецю. Гіпоглікемія викликає ураження мозку, якому властиві деякі ознаки ушкоджень під час ішемії-гіпоксії [6].

Ішемічне ушкодження ділянки мозку виявляється у вибірковій загибелі популяції найбільш чутливих нейронів або всіх клітин і утворенні зони інфаркту, обсяг якої залежить від тривалості та ступеня оклюзії судин і можливостей колатерального кровообігу [5,6]. Вогнище найбільшого ураження – ішемічне ядро (ischemic core) оточене менш ушкодженою зоною (penumbra), де якоюсь мірою зберігається колатеральний кровообіг.

Декілька хвилин глобальної ішемії може викликати вибіркочу дегенерацію певних груп нейронів: пірамідних нейронів у СА1-ділянці гіпокампа, деяких нейронів смугастого тіла, нейронів неокортекса у шарах 3,5,6, нейронів Пуркін'є мозочка [2, 3, 5]. Нейрони більш вразливіші, до ішемії, гіпоксії та гіпоглікемії, ніж гліальні клітини. Філогенетично більш молоді ділянки мозку включаючи кору та мозочок, більш чутливі, ніж його стовбур [11].

Значна частина енергії, що використовується клітинами мозку, витрачається на транспорт іонів через плазматичну мембрану. Зменшення вмісту АТФ пригнічує функцію іонних насосів плазматичної мембрани, зокрема Na^+ , K^+ -АТФази, найбільш важливого транспортера, що підтримує високу концентрацію калію і низьку концентрацію натрію всередині клітини. На його роботу витрачається близько 40 % енергії, що використовується клітиною [22]. Під час гострої фази церебральної ішемії внутрішньоклітинна концентрація натрію збільшується внаслідок пригнічення активності Na^+ , K^+ -АТФази та нестачі АТФ. На початкових стадіях ішемії-гіпоксії відповіді нейронів залежать від модуляції іонних каналів.

Киснерегульовані іонні канали знаходяться в різних клітинах, включаючи нейрони. Хоча більшість киснечутливих каналів є калієвими, натрієві та кальцієві канали також регулюються O_2 (слід зауважити, що чутливість до кисню не є універсальною характеристикою іонних каналів) [12,15,16]. Хоча відбувається інтенсивне вивчення киснечутливих іонних каналів, механізми взаємодії O_2 з каналами залишаються майже невідомими. Вплив нестачі O_2 може полягати у підвищенні відповідної іонної провідності, або у її пригніченні [16]. Киснерегульовані іонні канали забезпечують адаптивні зміни нейрональної збудливості. Для більшості кіркових і гіпокампальних нейронів протягом перших секунд ішемії (або гіпоксії) характерна гіперполяризація, що пригнічує їх електричну активність. Гіперполяризація зумовлена активацією певних типів калієвих каналів у відповідь на зміну локальних внутрішньоклітинних концентрацій АТФ і Ca^{2+} , а також і рН або пов'язана з реакцією металопротеїну, що не містить гему, і здійснює регуляцію певного різновиду калієвих каналів [12, 15]. Така гіперполяризація може бути адаптивним процесом, зумовленим стратегією виживання [5,22]. Деякі нейрони реагують на гіпоксію зменшенням амплітуди натрієвих струмів, що знижує їх збудливість [10]. Це може бути наслідком зміщення інактивувальної характеристики натрієвого струму у негативному напрямку. Механізми такої модуляції залишаються мало вивченими. Певна роль у цих подіях належить протеїнкіназі С. Її активація спричинює фосфорилування натрієвих каналів, що призводить до пригнічення транзитного натрієвого струму і до зниження збудливості нейронів гіпокампа та кори. Це певною мірою призводить до енергозбереження та захищає їх від наслідків гіпоксії [10]. Існує думка, що модуляція білків цитоскелета під час гіпоксії також відіграє певну роль у модуляції транзитного натрієвого струму [10].

Активация протеїнкінази С збільшує натрієвий струм, що неінактивується та сприяє входу в нейрони Na^+ [10]. У CA1 нейронах гіпокампа він складає 1% максимуму транзитного натрієвого струму. Було показано, що пригнічення неінактивуючого натрієвого струму місцевим анестетиком QX-314 має нейропротекторний вплив. Натрієвий струм, що не інактивується, і натрійзалежні транспортери відіграють певну роль у підвищенні внутрішньоклітинної концентрації натрію і в порушенні життєдіяльності нервових клітин. [10].

Пригнічення електричної активності не може зберегти на більш менш тривалий час вміст макроергічних фосфатів (АТФ, фосфокреатину) в тканині, який за кілька хвилин від початку ішемії значно зменшується [6]. Зниження PO_2 під час ішемії призводить до активації гліколізу та до збільшення продукції молочної кислоти. Це в свою чергу знижує рН у ділянці ішемії від нормального 7,3 до 6,8 – 6,2 залежно від вмісту глюкози в тканині до початку ішемії [6]. Тканинний ацидоз є важливим фактором у розвитку індукованих ішемією порушень. У цитозолі рН є регулятором багатьох клітинних процесів [22].

Пригнічення функції іонних насосів знижує трансмембранні іонні градієнти та призводить до деполяризації плазматичної мембрани нейронів і клітин глії. Вихід K^+ з деполяризованих нейронів збільшує його концентрацію у навколклітинному (примембранному) просторі, що також сприяє подальшій деполяризації. Швидка інактивація киснечувливих калієвих каналів, викликана зниженням PO_2 , призупиняє вихід K^+ з клітин [12].

Деполяризація призводить, зокрема, до активації потенціалкерованих кальцієвих каналів в сомато-дендритній і пресинаптичній мембранах і секреції у позаклітинний простір нейромедіаторів, включаючи основний збуджувальний нейромедіатор глутамат. Позаклітинна концентрація глутама-

ту за умов норми у спокої становить 1-2 мкмоль/л, а при ішемії мозку щура вона може сягати мілімолярних концентрацій. Це зумовлено тим, що натрійзалежне захоплення деяких нейромедіаторів, включаючи глутамат, порушується внаслідок недостатнього енергопостачання. При гіпоксії-ішемії знижені клітинні енергетичні резерви і, зокрема, натрієвий електрохімічний градієнт, який є джерелом енергії для $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ і $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ обміну і транспортера глутамату. Накопичення всередині клітини Na^+ і деполяризація мембрани призводить до реверсії $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ обміну, що зумовлює додатковий вхід у клітину Ca^{2+} . Значне збільшення внутрішньоклітинного Na^+ може викликати пригнічення і навіть реверсію дії глутаматного транспортера, а також масивне вивільнення глутамату у позаклітинний простір [19]. Таким чином, порушення захоплення глутамату і збільшення його секреції забезпечує стійке підвищення його позаклітинної концентрації при ішемії мозку [5]. Це призводить до надмірної (токсичної) активації глутаматних рецепторів і лежить в основі екситотоксичності, яка є головною причиною загибелі нейронів під час ішемії-гіпоксії [3–5]. Особливо значна роль при цьому належить збільшенню внутрішньоклітинного вмісту Na^+ і Ca^{2+} . Екситотоксичні механізми можуть викликати швидку загибель нейронів (некроз), а також більш повільний процес апоптозу [8]. Апоптоз являє собою “запрограмовану” загибель клітини і для його здійснення необхідний синтез певних білків [23].

НМДА- й АМПА-каїнатні рецептори, що є іонотропними, беруть безпосередню участь у екситотоксичній дегенерації нейронів. Їхня роль нерівнозначна. Надмірна активація НМДА-рецепторів призводить до інтенсивного входження в клітину Ca^{2+} , що викликає події, які спричиняють смерть нейрона. Надлишкова активація АМПА-каїнатних рецепторів менш значуща, але вона також може викликати токсичне підвищен-

ня концентрації внутрішньоклітинного Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) і нейродегенерацію. Екситотоксичність підсилюється в разі зниження енергетичних ресурсів клітини. Стійке підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ викликає появу “токсичних каскадів”, здатних викликати смерть клітини. В каскади включені такі катаболічні ферменти, як протеази, фосфоліпази й ендонуклеази [2,5,6]. Підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ призводить також до активування протеїнкіназного і ліпідкіназного каскадів, що викликає порушення метаболізму та появу реактивних кисневих сполук (кисневих вільних радикалів) [5,7]. Багато з цих подій викликають швидку загибель нейронів, тоді як порушення енергетики та реактивні кисневі сполуки зумовлюють більш повільний процес, що спричинює їхню смерть.

Пов'язані з G-білками метаботропні глутаматні рецептори безпосередньо не викликають екситотоксичності, але деякі їх типи можуть підсилювати її, а інші пригнічувати [5].

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ -залежна активація цистеїнової протеази калпаїну відбувається в ранньому періоді ішемії та може викликати руйнування цитоскелета [5]. Активація ендонуклеаз відбувається внаслідок притоку великої кількості Ca^{2+} при гіпоксії-ішемії і може викликати розщеплення ДНК [4]. Збільшення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ активує також різні протеїнкінази. Це Ca^{2+} -кальмодулінзалежна кіназа і кальційзалежні ізоформи протеїнкінази C. Вони модифікують функцію багатьох іонних каналів, включаючи НМДА і АМПА-каїнатні рецептор-каналні комплекси [5, 6]. Ca^{2+} викликає транскрипцію “генів клітинної смерті” й індукує експресію таких генів ранньої відповіді, як C-fos і zif/268 [18].

Особливо важливим пошкоджуючим наслідком надмірного навантаження нейронів Ca^{2+} , зумовленим екситотоксичною активацією глутаматних рецепторів, є формування реактивних кисневих сполук (кисневих вільних радикалів). Їх утворення певною мірою пов'язано з кальційзалежною активацією фосфоліпази A_2 з вивільненням

арахідонової кислоти та наступного її метаболізму, що призводить до утворення вільних радикалів. Екситотоксичність може бути важливим фактором, що викликає збільшення утворення вільних радикалів у мітохондріях під час ішемічних і реперфузійних пошкоджень нейронів внаслідок роз'єднання мітохондріального електронного транспорту. Реперфузія збільшує продукцію вільних радикалів [7,13,16]. На моделях було виявлено, що ішемія-реперфузія призводить до зменшення концентрації в мозку таких антиоксидантів, як аскорбінова кислота, вітамін Е та глутатіон. Стимуляція НМДА-рецепторів викликає активацію NO-синтази і утворення оксиду азоту (NO). Його взаємодія з реактивними кисневими сполуками призводить до утворення високореактивного і токсичного пероксинітриду [1].

Вільні радикали зумовлюють переокиснення мембранних ліпідів і порушення функції клітинних мембран. Переокиснення мембранних ліпідів може викликати модуляцію вивільнення і захоплення нейромедіаторів, активності іонних каналів, функції іонтранспортуючих АТФаз, транспортерів глюкози та зв'язку рецепторів клітинної поверхні з ГТФ-зв'язувальними білками. Кисневі вільні радикали є важливими сигнальними молекулами, що ініціюють запалення й апоптоз. Фактори, що видаляють вільні радикали з внутрішньоклітинного середовища, здійснюють нейропротекторну дію [5 – 8].

Роль глутамату в гіпоксичній-ішемічній нейродегенерації підтверджується тим, що антагоністи НМДА- і АМПА-каїнатних рецепторів зменшують обсяг зони інфаркту в експериментальних моделях фокальної ішемії мозку [3]. Разом з тим блокування глутаматних рецепторів викликає такі небажані ефекти, як порушення психіки, регуляції серцево-судинної системи, респіраторну депресію. Це перешкоджає використанню відповідних блокаторів у клініці. Блокатори L-типу кальцієвих каналів та-

кож є нейропротекторами, що викликають значний побічний ефект [5,20].

Ішемія-гіпоксія зумовлює підвищення внутрішньоклітинних концентрацій Na^+ і Ca^{2+} , зниження внутрішньоклітинної концентрації Mg^{2+} . Підвищення внутрішньоклітинної концентрації Na^+ вликає пасивне надходження у клітину іонів Cl^- і води, що призводить до збільшення її об'єму (набрякання клітини) і є вкрай несприятливим фактором [5].

Хронічні відповіді на ішемію-гіпоксію мозку внаслідок активації факторів транскрипції зумовлюють експресію низки генів, що кодують ензими, транспортери та фактори росту.

Терапевтичні впливи на наслідки ішемії-гіпоксії мозку. Екситотоксичність є головною мішенню для терапевтичних впливів при ішемії-гіпоксії мозку. Найбільш поширеними нейропротекторними терапевтичними впливами є використання препаратів, що запобігають виникненню вільних радикалів і екситотоксичності, усувають причини неконтрольованого збільшення внутрішньоклітинної концентрації іонізованого кальцію, поліпшують мозковий кровообіг [22]. Проблема розробки нейропротекторних засобів залишається актуальною. Численні експериментальні дослідження встановили, що блокування потенціалкерованих натрієвих каналів зменшує ушкодження нейронів у відповідь на ішемію-гіпоксію [9,19,20,22]. Це підтверджує гіпотезу відносно значної ролі потенціалкерованих натрієвих каналів у розвитку екситотоксичності. Натрієвий струм, що не інактивується, і натрійзалежні транспортери відіграють певну роль у збільшенні внутрішньоклітинної концентрації Na^+ і в порушенні життєдіяльності нервових клітин. Блокатори натрієвих каналів сприяють збереженню внутрішньоклітинних енергетичних ресурсів. Механізм нейропротекторної дії блокування натрієвих каналів залишається мало вивченим [10].

Нині значно підвищилась увага до класу нейропротекторних засобів, що здійснюють модулюючий вплив на потенціалкеровані натрієві канали [19,21]. Це потенціалзалежні блокатори натрієвих каналів. Вони складають велику групу різних за будовою сполук. Їх використовують як місцеві анестетики, протисудомні й антиаритмічні препарати. Це, зокрема, фенітоїн, карбамазепін, велика родина сполук, схожих за фармакологічною дією з лідокаїном. Експериментальними дослідженнями встановлено, що ефективність дії сполук цього класу залежить від стану натрієвих каналів, який певною мірою визначається рівнем підтримуваного мембранного потенціалу, частотою та типом стимулювання досліджуваних клітин. Значну увагу як нейропротектор привертає протисудомний агент ламотриджин і близький за будовою сипатриджин (BW619C89), що є ефективним нейропротекторним агентом. Вибіркове пригнічення активності потенціалкерованих натрієвих каналів уражених клітин ефективно захищає тканину мозку при порушеннях мозкового кровообігу [19,21].

I. S. Magura

CEREBRAL ISHEMIA-HYPOXIA: BIOPHYSICS OF NEURODEGENERATION AND NEUROPROTECTION

Neuronal responses to hypoxia-ischemia can be acute or chronic. In the early stages neuronal responses to ischemia-hypoxia are dependent on the modulation of ion channels. Acute responses relay mainly on O_2 -regulated ion channels which mediate adaptive changes in neuron excitability. Energy failure, an early consequence of hypoxia-ischemia, causes disruption of ionic homeostasis and accumulation of extracellular neurotransmitters. NMDA and AMPA/kainate receptors and Ca^{2+} channels contribute to excitotoxic neuronal degeneration. Excitotoxicity leads to increased Ca^{2+} influx, which can activate cytotoxic intracellular pathways. Reactive oxygen species (oxygen free radicals) generated during ischemia-reperfusion contribute to the injury. Oxygen free-radicals serve as important signalling molecules that trigger inflammation and apoptosis. Excitatory amino acid-receptor antagonists and Ca^{2+} channels blockers can provide neuroprotection in experimental models of hypoxia-ischemia but disrupt normal brain function. Because of their relative lack of behavioral side-

effects, voltage-dependent Na⁺ channels blockers may have advantage over other neuroprotective mechanisms. The blockade of voltage-gated Na⁺ channels reduces the excitability of neurons, Na⁺ influx and the accumulation of intracellular Na⁺. These improve the ionic homeostasis and cellular energy levels and prevent ischemia-hypoxia induced neuronal injury and neuronal damage mediated by Ca²⁺ overload.

A. A. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Beckman J. S., Koppenol W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: The good, the bad, and ugly // *Amer. J. Physiol.* – 1996. – **271**. – P. C1424 – C1437.
2. Choi D.V. Calcium still center stage in-hypoxic-ischemic neuronal death // *Trends Neurosci.* – 1995. – **18**. – P. 58 – 60.
3. Choi D. W., Rothman S.M. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death // *Annu. Rev. Neurosci.* – 1990. – **13**. – P.171 – 182.
4. Chopp M., Chan P. H., Hsu C. Y. et al. DNA damage and repair in central nervous system injury: National Institute of Neurological Disorders and Stroke Workshop Summary // *Stroke.* – 1996. – **27**. – P. 363 – 369.
5. Dirnagl U., Iadecola C., Moskowitz M.A. Pathobiology of ischemic stroke: an integrated view // *Trends Neurosci.* – 1999. – **22**. – P. 391 – 397.
6. Dugan L.L., Choi D.W. Hypoxic-Ischemic Brain Injury and Oxidative Stress. – In: *Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects. Sixth Edition.* – 1999.
7. Dykens J. A. Isolated cerebral and cerebellar mitochondria produce free radicals when exposed to elevated Ca²⁺ and Na⁺. Implications for neurodegeneration // *J. Neurochem.* – 1994. – **63**. – P.584 – 591.
8. Fraser A., McCarthy N., Evan G. I. Biochemistry of cell death // *Curr. Opin. Neurobiol.* – 1996. – **6**. – P.71 – 80.
9. Fried E., Amorim P., Chambers G. et al. The importance of sodium for anoxic transmission damage in rat hippocampal slices: mechanisms of protection by lidocaine // *J.Physiol.* – 1995. – **489**. – P.557 – 565.
10. Fung M.-L. Role of voltage gated Na⁺ channels in hypoxia-induced neuronal injuries // *Clin. and Exp. Pharmacol. and Physiol.* – 2000. – **27**. – P.569 – 574.
11. Graham D. I., Brierly J. B. Vascular disorders of the central nervous system. - In: *Greenfield's Neuropathology.* – New York: John Wiley and Sons, 1984. – P. 157 – 207.
12. Haddad G. G., Jiang C. O₂-sensing mechanisms in excitable cells: Role of plasma membrane K⁺ channels // *Annu. Rev. Physiol.* – 1997. – **59**. – P.23 – 43.
13. Hall E. D., Andrus P. K., Smith S. L. et al. Neuroprotective efficacy of microvascularly-localized versus brain-penetrating antioxidants // *Acta Neurochir. Suppl. (Wien).* – 1996. – **66**. – P.107 – 113.
14. Hondeghem L.M., Katzung B.G. Time- and voltage-dependent interactions of antiarrhythmic drugs with cardiac sodium channels // *Biochim. and Biophys. Acta.* – 1977. – **472**. – P. 373 – 398.
15. Kristian T., Siesjo B. K. Changes in ionic fluxes during cerebral ischaemia. // *Int. Rev. Neurobiol.* – 1997. – **40**. – P. 27 – 45.
16. Lopez-Barneo J., Pardo R., Ortega-Saenz P. Cellular mechanisms of oxygen sensing // *Annu.Rev. Physiol.* – 2001. – **63**. – P. 259 – 287.
17. Nicholls D., Attwell D. The release and uptake of excitatory amino acids // *Trends Pharmacol. Sci.* – 1990. – **11**. – P.462 – 468.
18. Schreiber S.S., Baudry M. Selective neuronal vulnerability in the hippocampus – a role for gene expression? // *Trends Neurosci.* – 1995. – **18**. – P. 446 – 451.
19. Tanaka K., Ito D., Suzuki S. et al. A novel voltage-sensitive Na⁺ and Ca²⁺ channels blocker, NS-7, prevent suppression of cyclic AMP-dependent protein kinase and reduces infarct area in the acute phase of cerebral ischemia in rat // *Brain Res.* – 2002. – **924**. – P.98 – 108.
20. Taylor C.P., Meldrum B.S. Na⁺ channels as targets for neuroprotective drugs // *Trends Pharmacol.Sci.* – 1995. – **16**. – P.309 – 316.
21. Trotti D., Rizzini B. L., Rossi D. et al. Neuronal and glial glutamate transporters possess an SH-based redox regulatory mechanism // *Europ. J. Neurosci.* – 1997. – **9**. – P.1236 – 1243.
22. Urenjak J., Obrenovitch T.P. Pharmacological modulation of voltage-gated Na⁺ channels: a rational and effective strategy against ischemic brain damage // *Pharmacol. Revs.* – 1996. – **48**. – P. 21 – 67.
23. Wyllie A. H., Kerr J. F., Currie A. R. Cell death: The significance of apoptosis // *Int. Rev. Cytol.* – 1980. – **68**. – P.251 – 306.

Ін-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ