

**ВАЗОАКТИВНОЕ И НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ
ИНГИБИТОРА c-Jun-N-ТЕРМИНАЛЬНЫХ КИНАЗ У КРЫС
С ХРОНИЧЕСКОЙ ГИПОПЕРФУЗИЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА**

© 2023 г. С. Ю. Жилиев¹, Т. Ф. Платонова¹, А. И. Хлебников², И. А. Щепёткин^{2, 3},
И. Т. Демченко¹, Д. Н. Аточин^{2, 4, *}

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук,
Санкт-Петербург, Россия

²Томский Политехнический Университет, Томск, Россия

³Отдел микробиологии и клеточной биологии, университет штата Монтана,
Бозман, США

⁴Центр сердечно-сосудистых исследований и Отдел кардиологии,
Главный госпиталь Массачусетса, Гарвардская медицинская школа,
Чарльзтаун, Массачусетс, США

*E-mail: atochin@cvrc.mgh.harvard.edu

Поступила в редакцию 02.04.2023 г.

После доработки 08.05.2023 г.

Принята к публикации 08.05.2023 г.

Целью работы явилось изучение вазоактивного и нейропротекторного действия ингибитора c-Jun-N-терминальных киназ (JNK), IQ-1 (11*H*-индено[1,2-*b*]хиноксалин-11-он оксим), при хронической гипоперфузии головного мозга, вызванной невозвратной билатеральной перевязкой сонных артерий. Мозговой кровотока измерялся количественно (метод клиренса водорода) одновременно в теменной коре, гиппокампе, черной субстанции и стриатуме головного мозга бодрствующих крыс. Перевязка сонных артерий вызывала понижение кровотока в исследуемых мозговых структурах с более выраженным снижением в коре (на 48% от исходного уровня) и с наименьшим падением в черной субстанции (на 25% от исходного уровня). Пониженный уровень кровотока в этих мозговых структурах сохранялся на протяжении 14 дней измерений. Реакции мозговых сосудов на гиперкапнический стимул (5% CO₂) утрачивались в период 2-недельной гипоперфузии, а неврологический статус животных не улучшался. Введение препарата IQ-1 (50 мг/кг, интраперитонеально, каждые 48 ч в течение 14 сут) сопровождалось увеличением кровотока во всех структурах мозга. Максимальное увеличение кровотока наблюдалось в стриатуме, а минимальное – в черной субстанции. После введения IQ-1 восстанавливалась чувствительность мозговых сосудов к гиперкапническому стимулу и существенно улучшалось неврологическое состояние животных к концу 2-й нед. гипоперфузии головного мозга. Результаты показывают, что использование ингибитора JNK позволяет уменьшить цереброваскулярные нарушения и связанные с ними неврологические расстройства при гипоперфузионном повреждении головного мозга.

Ключевые слова: ингибитор c-Jun-N-терминальных киназ, хроническая гипоперфузия мозга, мозговой кровотока, нейропротекция, гиперкапнический стимул, стриатум, черная субстанция

DOI: 10.31857/S0869813923060079, **EDN:** WHDHNT

ВВЕДЕНИЕ

c-Jun-N-терминальные киназы (JNK) принадлежат к семейству митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК), которые активируются в ответ на действие разнообразных стрессорных и повреждающих факторов. JNK включают 10 изоформ, кодируемых тремя генами: JNK1 (4 изоформы), JNK2 (4 изоформы) и JNK3 (2 изоформы) [1, 2]. JNK1 и JNK2 представлены во всех клетках организма, в то время как JNK3 экспрессируется преимущественно в сердце и в головном мозге [3]. Фактор транскрипции c-Jun является субстратом для JNK и после фосфорилирования может запускать процессы апоптоза в нейрональных клетках [4]. JNK вовлечены в регуляцию воспаления, играют важную роль в сигнальных путях, ведущих к апоптозу и некрозу, регулируют некоторые транскрипционные, равно как и не связанные с транскрипцией клеточные процессы, от которых зависит повреждение нейронов головного мозга и кардиомиоцитов при ишемии и реперфузии [5, 6]. JNK вовлечены в патогенез диабета, атеросклероза, инсульта, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона [7, 2], опухолевого роста [3], воспалительных заболеваний, инфаркта миокарда, сердечной недостаточности и гипертрофии миокарда [5]. Ингибиторы JNK привлекают к себе широкое внимание как потенциальные терапевтические средства для профилактики и лечения ишемических повреждений [8, 9].

Нами был синтезирован новый ингибитор JNK – IQ-1 (11*H*-индено[1,2-*b*]-хиноксалин-11-он оксим), который обладает повышенным аффинитетом в отношении изоформы JNK3 [10], выраженным нейропротекторным эффектом и способностью проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) [11]. С помощью filamentной модели локальной ишемии/реперфузии средней мозговой артерии нами показано, что размеры зоны некроза мозга у мышей достоверно уменьшались при введении IQ-1 по сравнению с контрольными значениями [11]. Выраженная нейропротекция с использованием IQ-1 была выявлена также при тотальной ишемии/реперфузии мозга крыс [12]. Одним из возможных механизмов нейропротекторного действия ингибитора может быть увеличение мозгового кровотока в связи с выделением оксида азота (NO) при биотрансформации молекулы IQ-1 [11]. Целью настоящей работы явилось изучение вазоактивного и нейропротекторного действия ингибитора IQ-1 у животных с хронической гипоперфузией головного мозга, вызванной невозвратной окклюзией 2 сонных артерий (модель 2VO [13]). Из клинической практики известно, что такое хроническое ограничение кровоснабжения мозга может развиваться в результате сердечной недостаточности, системной артериальной гипотензии, при патологии сосудов головного мозга (мальформация, атеросклероз) или действия других патогенетических факторов [13, 14]. Кроме того, при хронической гипоперфузии мозга отчетливо проявляется утрата когнитивных функций у животных [15, 16], что открывает возможность количественной оценки неврологического дефицита. В основе гипоперфузионного повреждения мозга лежит медленная, прогрессирующая гибель нервных клеток мозга, приводящая к таким клиническим проявлениям, как потеря памяти, деменция, нарушения движений, болезнь Альцгеймера и другим неврологическим заболеваниям [13].

Задачами исследований являлись: (а) – изучение действия ингибитора IQ-1 на мозговой кровоток и реактивность церебральных сосудов у животных на фоне хронической гипоперфузии мозга, вызванной невозвратной окклюзией общих сонных артерий, (б) – оценка влияния IQ-1 на неврологический статус крыс с хронической гипоперфузией головного мозга, (в) – сравнение вазомоторного действия IQ-1 с эффектом NO-донора S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для выполнения работы использовались следующие химические препараты: соединение IQ-1 (1*H*-индено[1,2-*b*]хиноксалин-11-он оксим) было синтезировано в научно-образовательном центре Н.М. Кижнера Томского Политехнического Университета (Россия), золетил (Zoletil Virbac, Франция), ксиланит (ЗАО Нита-фарм, Россия), атропина сульфат (ОАО Дальхимфарм, Россия), изофлуран (Лабораторное Каризоо, СА, Барселона, Испания), SNAP (Sigma-Aldrich, США), Tween-80 (Sigma-Aldrich, США).

Исследования выполнены на крысах-самцах линии Wistar массой 287 ± 19 г, закупленных в питомнике животных “Рапполово” (Ленинградская область, Россия). Протокол опытов утвержден биоэтической комиссией ИЭФБ РАН по использованию животных в экспериментах в соответствии с международными рекомендациями (этический кодекс) по проведению медико-биологических исследований на животных (CIOMS, Geneva, 1985). При подготовке животных к опытам проводили две хирургические операции. На первом этапе животным имплантировали в мозг платиновые электроды для измерений мозгового кровотока. На втором этапе у животных с вживленными электродами проводилась перевязка 2 общих сонных артерий для создания модели хронической гипоперфузии головного мозга. Каждой крысе за неделю до опытов под наркозом в асептических условиях вводили платиновые игольчатые электроды диаметром 0.15 мм в мозговые структуры (теменная кора, гиппокамп, черная субстанция и стриатум) согласно атласу стереотаксических координат [17]. Вживление электродов в головной мозг крыс проводилось с использованием золетил-ксилазинового наркоза (из расчета на 100 г массы тела животного): золетил – 0.3 мг внутримышечно, ксиланит – 0.8 мг внутримышечно, атропина сульфат 0.1%-ный раствор – 0.01 мл подкожно. Хирургическую стадию наркоза верифицировали по исчезновению реакций на болевые раздражители (укол лапы) и угнетению роговичного рефлекса.

Каждый платиновый электрод изолировался стеклом за исключением кончика длиной 1.5 мм, который 3-кратно покрывался раствором нафiona (Nafion, Sigma-Aldrich) с последующим высушиванием. При таких размерах активной поверхности электрода объем участка мозга, в котором измеряется кровоток, составляет около 8 мм³. Для крепления электродов в височную кость черепа билатерально ввертывали два винта из нержавеющей стали. Электроды и винты фиксировались на кости зубопротезным цементом. Животных возвращали в виварий, в индивидуальные клетки и обеспечивали соответствующий послеоперационный уход.

Через 5–7 дней у животных с вживленными в мозг электродами под наркозом осуществлялась перевязка 2 общих сонных артерий (модель 2VO [18]). Для этого крыс помещали в индукционную камеру, подключенную к испарителю для изофлурана (Dvaro Испаритель, Дельфин, КНР). Для индукции применяли 4 об. % изофлурана при самостоятельном дыхании в потоке кислорода (2 л/мин). После потери двигательной активности крысу перемещали на подогреваемый операционный столик и анестезия продолжалась изофлураном (1.5 об. % в потоке кислорода, 1 л/мин) через намордную маску. После выделения левой и правой общих сонных артерий их необратимо перевязывали нейлоновой нитью (Ethilon 2/0, Ethicon, США). Рану ушивали, операционное поле обрабатывали антисептиком (5%-ный раствор йода). Животных на 5–7 ч помещали в бокс под согревающую лампу.

Абсолютные величины локального мозгового кровотока измерялись с помощью метода водородного клиренса [19]. Метод основан на определении скорости вымывания (клиренса) из мозговой ткани водорода, предварительно введенного в нее путем дыхания водородсодержащей смеси (2.5% H₂ в воздухе). Продолжительность ингаляции водородсодержащей смеси составляла 10–15 с. При непрерывном изме-

рении напряжения водорода в мозговой ткани скорость его вымывания прямо зависит от интенсивности кровотока, что положено в основу расчета абсолютных величин церебральной гемодинамики. Напряжение водорода в мозге измерялось полярографически с помощью ранее имплантируемых внутримозговых платиновых электродов и референтного (хлорсеребряного) электрода в виде клипсы, закрепленной на основании хвоста. Кривые клиренса водорода регистрировались с помощью приборов (Физиоблок-Пuls, Санкт-Петербург) и использовались для вычисления абсолютных значений мозгового кровотока (мл/мин/100 г ткани мозга) с помощью программно-аппаратного комплекса WINDAQ (DC-200, DATA, OH, США). Метод водородного клиренса позволяет последовательно измерять мозговой кровоток с интервалом не менее 5 мин. Неврологический дефицит, возникающий при гипоперфузии мозга, оценивали при помощи шкалы McGraw в модификации Ганнушкиной [20, 21], определяющей степень неврологических нарушений легкого (1–3), среднего (3–6) и сильного (6–10) уровней тяжести.

В работе было использовано 47 крыс с вживленными платиновыми электродами, разделенных на 3 группы. В группе 1 ($n = 12$) у крыс с интактными сонными артериями оценивались реакции кровотока в стриатуме при разовом внутривентральном введении IQ-1 в дозе 25, 50 и 100 мг/кг. Целью этих опытов являлось определение вазоактивной дозы препарата IQ-1 для ее использования в последующих опытах. У части крыс этой группы измерялся кровоток в стриатуме при внутривентральном введении донора NO SNAP в дозе 2 мкг/кг. У оставшихся 35 животных с вживленными электродами проводилась билатеральная невозвратная окклюзия сонных артерий. В результате операции погибло 7 крыс. У выживших животных (группа 2, $n = 14$) измерения кровотока выполнялись одновременно в теменной коре, гиппокампе, стриатуме и черной субстанции. Кровоток измерялся в течение 2 нед. через каждые 2 сут. У части животных группы 2 ($n = 7$) тестировалась реактивность церебральных сосудов посредством оценки изменений локального мозгового кровотока в ответ на 30-секундную ингаляцию 5% CO₂ в воздухе (гиперкапническая проба). У всех животных группы 2 оценивался неврологический статус на фоне развития гипоперфузии мозга.

У животных группы 3 ($n = 14$) кровотока в 4 структурах мозга измерялся после внутривентрального введения IQ-1 в дозе 50 мг/кг. Такая доза препарата была выбрана на основании результатов предварительных исследований на группе 1 животных. Препарат (порошок) тщательно размешивали в растворе (вода + Tween-80), после чего заданное количество препарата в объеме раствора 2 мл вводилось внутривентрально после перевязки сонных артерий. В каждом опыте кровоток измерялся до и после введения препарата в течение 2 ч. Измерения мозгового кровотока по такой схеме с курсовым введением IQ-1 (т.е. повторяющимся введением препарата каждые 48 ч в течение 14 дней) проводились на каждом животном. У части крыс группы 3 ($n = 6$) измерялся мозговой кровоток после внутривентрального введения NO-донора SNAP (2 мкг/кг). У всех животных в процессе 2-недельной гипоперфузии мозга оценивался неврологический статус на фоне курсового введения IQ-1. После завершения опытов проводили эвтаназию животных с использованием инъекции золетила (3 мг) в хвостовую вену.

Для статистического анализа использовались абсолютные величины локального мозгового кровотока. Данные анализировали с помощью пакета программ Sigma-Plot 13.0 (Systat Software, Inc., San Jose, CA). Рассчитывали среднее значение и стандартную ошибку. Дисперсионный анализ (ANOVA) использовали для сравнения величин кровотока, измеренных в разные временные интервалы мозговой гипоперфузии у контрольных животных и у крыс после введения IQ-1. Для выявления достоверности ($p < 0.05$) использовали парный t -критерий с точным тестом Фишера. Все данные представлены как $M \pm SEM$.

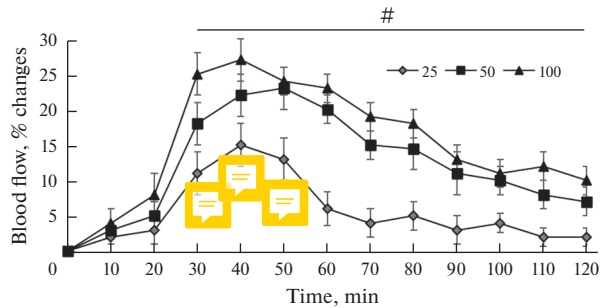


Рис. 1. Дозозависимые изменения кровотока в стриатуме крыс с интактными сонными артериями при внутрибрюшинном введении IQ-1 в дозах 25, 50 и 100 мг/кг.

* – $p < 0.05$ по сравнению с базовым значением для 25 мг/кг, # – $p < 0.05$ по сравнению с базовыми значениями для 50 и 100 мг/кг. Препарат вводился в момент времени “0”.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Усредненное значение кровотока в стриатуме крыс (группа 1, $n = 12$) с интактными сонными артериями составляло 69.0 ± 5.8 мл/мин/100 г ткани. Внутрибрюшинное введение IQ-1 в дозах 25, 50 и 100 мг/кг вызывало повышение кровотока в стриатуме, величина и продолжительность которого зависела от дозы (рис. 1). Достоверное повышение кровотока выявилось через 30 мин после введения препарата и сохранялось на протяжении 2 ч измерений. Внутрибрюшинное введение донора NO – SNAP в дозе 2 мкг/кг увеличивало кровоток в стриатуме на такую же величину, как и при введении IQ-1 в дозе 50 мг/кг. Указанная доза IQ-1 была выбрана нами в последующих исследованиях вазоактивного и нейропротекторного действия этого препарата у крыс с хронической гипоперфузией головного мозга.

У крыс группы 2 ($n = 14$) кровоток измерялся в 4 областях мозга в течение 2 нед. после невозвратной перевязки сонных артерий. Полученные данные демонстрируют наличие гетерогенности в кровоснабжении головного мозга до перевязки сонных артерий с наибольшим уровнем кровотока в черной субстанции и теменной коре (табл. 1).

Через 30 мин после перевязки сонных артерий кровоток достоверно снижился во всех исследуемых структурах головного мозга и сохранялся на достоверно низком уровне в течение 2 нед. по отношению к его значениям до начала гипоперфу-

Таблица 1. Динамика кровотока в 4-х структурах мозга у крыс после билатеральной перевязки сонных артерий (2VO)

Структура мозга	Кровоток (мл/мин/100 г ткани)								
	время измерений								
	до 2VO	30 мин 2VO	2 сут	4 сут	6 сут	8 сут	10 сут	12 сут	14 сут
Кора теменная	82 ± 6	43 ± 4 (–48%)*	$42 \pm 4^*$	$42 \pm 4^*$	$43 \pm 5^*$	$45 \pm 5^*$	$46 \pm 5^*$	$46 \pm 5^*$	$47 \pm 5^*$
Гиппокамп	59 ± 5	32 ± 4 (–46%)*	$32 \pm 4^*$	$33 \pm 4^*$	$32 \pm 3^*$	$36 \pm 4^*$	$37 \pm 3^*$	$38 \pm 4^*$	$39 \pm 5^*$
Черная субстанция	89 ± 8	67 ± 6 (–25%)*	$61 \pm 7^*$	$65 \pm 4^*$	$70 \pm 4^*$	$71 \pm 4^*$	$72 \pm 7^*$	$71 \pm 6^*$	73 ± 7
Стриатум	67 ± 6	38 ± 4 (–43%)*	$35 \pm 3^*$	$31 \pm 5^*$	$32 \pm 4^*$	$35 \pm 4^*$	$40 \pm 4^*$	$39 \pm 5^*$	$42 \pm 5^*$

* – $p < 0.05$ для всех значений уровня кровотока по сравнению с уровнем до 2VO.

Таблица 2. Кровоснабжение мозга крыс при курсовом введении препарата IQ-1 на фоне церебральной гипоперфузии

Структура мозга	Кровоток (мл/мин/100 г ткани)								
	время измерений								
	до 2VO	30 мин 2VO	2 сут	4 сут	6 сут	8 сут	10 сут	12 сут	14 сут
Кора теменная	84 ± 6	46 ± 4 (-45%)*	42 ± 4	45 ± 4	46 ± 5	47 ± 3	50 ± 5	53 ± 4	55 ± 4 [#]
Гиппокамп	61 ± 5	35 ± 4 (-43%)*	34 ± 4	36 ± 4	38 ± 3	39 ± 4	40 ± 3	41 ± 5	45 ± 4 [#]
Черная субстанция	90 ± 7	69 ± 5 (-33%)*	70 ± 6	71 ± 4	72 ± 4	75 ± 4	73 ± 5	74 ± 5	82 ± 6 [#]
Стриатум	72 ± 6	41 ± 4 (-41%)*	43 ± 4	46 ± 5	45 ± 4	49 ± 4	46 ± 4	51 ± 5 [#]	57 ± 5 [#]

Представленные данные являются величинами кровотока, измеренными каждый раз перед введением IQ-1. * – $p < 0.05$ для всех значений уровня кровотока по сравнению с уровнем до 2VO, [#] – $p < 0.05$ для всех значений уровня кровотока по сравнению с уровнем значений 30 мин 2VO.

зии. Незначительное повышение кровотока выявилось к концу наблюдений, однако величины этих изменений были статистически недостоверными по отношению к значениям церебральной гемодинамики первого дня гипоперфузии.

У крыс группы 3 ($n = 14$) после перевязки обеих сонных артерий уровень гипоперфузии оценивался путем измерений кровотока в 4 структурах мозга в течение 14 дней на фоне курсового введения препарата IQ-1 (50 мг/кг, внутривенно) через каждые 48 ч (табл. 2).

Анализ данных табл. 2 показал, что кровоснабжение 4 структур мозга через 30 мин после окклюзии сонных артерий достоверно снижалось: максимально в коре и минимально в черной субстанции. При введении IQ-1 каждые 2 сут проявилась общая для всех используемых мозговых структур тенденция постепенного повышения мозгового кровотока. Однако статистически достоверное увеличение локального кровоснабжения головного мозга выявилось только через 2 нед. после начала церебральной гипоперфузии. При сравнении значений локального кровотока у крыс групп 2 и 3 через 2 нед. гипоперфузии выявлен достоверно более высокий уровень кровотока животных с введением IQ-1 (рис. 2).

При оценке реактивности мозговых сосудов на гиперкапнический стимул (вдыхание 5% CO₂) кровоток в исследуемых структурах мозга крыс с интактными сонными артериями достоверно повышался на 19–37% ($p < 0.05$). После перевязки сонных артерий мозговой кровоток в ответ на гиперкапнический стимул достоверно не изменялся. При разовом введении IQ-1 на фоне гипоперфузии мозга дилаторные реакции церебральных сосудов на вдыхание 5% CO₂ прогрессивно усиливались и достигали достоверных значений 14–26% ($p < 0.05$) через 14 дней после ограничения мозгового кровотока.

Для оценки вазоактивной потенции IQ-1 изменения кровотока в стриатуме крыс после введения препарата сравнивались с цереброваскулярными реакциями в ответ на введение донора NO (SNAP). Выявлены однонаправленные и равноценные вазомоторные эффекты, и эффекты SNAP в дозе 2 мг/кг при разных уровнях перфузии мозга, однако IQ-1 в дозе 50 мг/кг вызывал большие цереброваскулярные реакции в условиях гипоперфузии мозга (рис. 3).

У животных после двухсторонней окклюзии сонных артерий, не получавших ингибитор IQ-1, степень выраженности неврологических нарушений на 8-е сут гипоперфузии составляла 6.93 ± 0.18 баллов по шкале McGraw, что проявлялось в вялости, замедленности и маневности движений, одно- и двусторонних птозах век, парезах конечностей и параличе задних конечностей у 2 из 12 наблюдаемых животных. Через 14 дней гипоперфузии мозга степень неврологического дефицита

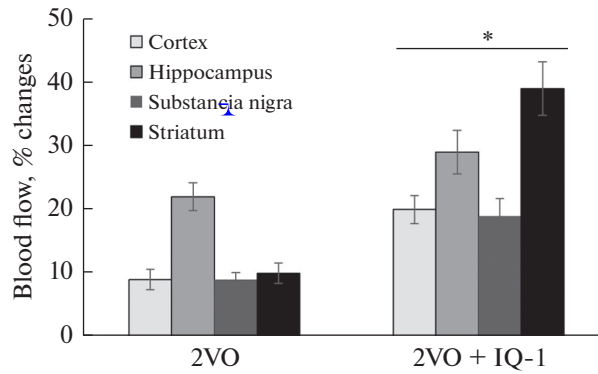


Рис. 2. Изменения мозгового кровотока через 2 нед. гипоперфузии у крыс без фармакологической поддержки (2VO) и при курсовом введении IQ-1 (2VO + IQ-1). По оси ординат: изменения кровотока в % (отношение 14 дней/30 мин 2VO по данным табл. 1 и 2). * – $p < 0.05$ по сравнению с 2VO.

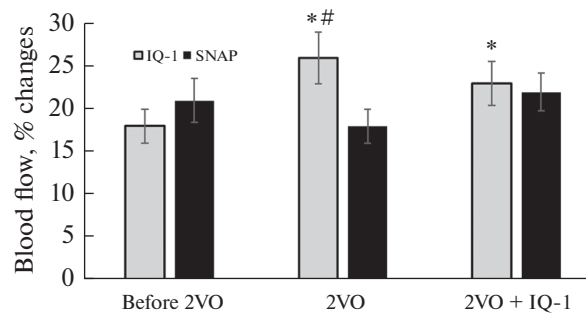


Рис. 3. Изменения кровотока в стриатуме крыс в ответ на введение IQ-1 и донора NO (SNAP). Before 2VO: до перевязки сонных артерий; 2VO: через 14 дней гипоперфузии мозга без курсового введения IQ-1; 2VO + IQ-1: через 14 дней гипоперфузии с курсовым введением IQ-1; * – $p < 0.05$ по сравнению с Before 2VO. # – $p < 0.05$ IQ по сравнению со SNAP.

уменьшилась до 5.73 ± 0.11 баллов. На фоне курсового введения IQ-1 животным неврологический дефицит на 8-е сут ишемии составил 4.06 ± 0.08 баллов, а через 14 дней – 2.13 ± 0.18 баллов, что достоверно отличается от аналогичного показателя первой группы крыс, не получавших фармакологическую поддержку ($p < 0.01$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Новыми результатами настоящей работы являются: (1) IQ-1 (ингибитор JNK) обладает вазоактивными свойствами и вызывает дозозависимое увеличение мозгового кровотока, (2) вазодилататорное действие IQ-1 усиливается в условиях хронической гипоперфузии мозга, (3) курсовое введение IQ-1 восстанавливает реактивность церебральных сосудов к гиперкапнии в условиях мозговой гипоперфузии, (4) IQ-1 улучшает неврологический статус у крыс в условиях хронической гипоперфузии мозга.

В проведенных исследованиях вазоактивное и нейропротекторное действие IQ-1 изучалось на модели билатеральной окклюзии сонных артерий, используемой для оценки эффективности коррекции гипоперфузионных нарушений в головном мозге фармакологическими препаратами [13]. Невозвратная 2-сторонняя окклюзия сонных артерий в наших опытах вызывала острое понижение кровотока в теменной коре, гиппокампе, черной субстанции и стриатуме, с более выраженным снижением в коре и с наименьшим падением в черной субстанции. Разница в степени снижения кровотока в изучаемых структурах объясняется тем, что при билатеральной окклюзии сонных артерий нарушение кровоснабжения более выражено в переднем мозге, меньше в продолговатом мозге и в базальных ганглиях, где кровообращение осуществляется двумя позвоночными артериями [22, 23]. Пониженный уровень кровотока, утрата реактивности мозговых сосудов на гиперкапнический стимул и неврологические нарушения оставались стабильными в течение 14 дней, что свидетельствует об отсутствии или низкой эффективности естественных процессов восстановления на протяжении указанного периода. Курсовое введение препарата IQ-1 в период 2-недельной гипоперфузии прогрессивно повышало кровотоки во всех структурах мозга. Максимальное повышение кровотока по отношению к началу гипоперфузии выявилось в стриатуме, а минимальное – в черной субстанции. Использование препарата IQ-1 восстанавливало чувствительность мозговых сосудов к гиперкапнии и существенно улучшало неврологическое состояние животных. Эти данные свидетельствуют о выраженном вазомоторном эффекте IQ-1 при хронической ишемии мозга, проявляющимся в прогрессивном увеличении кровоснабжения мозговых структур.

Нейропротекторная активность IQ-1 подтверждена при оценке неврологического статуса животных в гипоперфузионном периоде. При курсовом введении IQ-1 у животных наблюдался менее выраженный неврологический дефицит уже через 5–7 дней гипоперфузии, и сроки его восстановления заметно сокращались. Наблюдалось достоверное снижение среднего балла неврологического дефицита по сравнению с группой животных, которым IQ-1 не вводился. Уже в первые 3–5 дней после операции было зафиксировано снижение числа животных с тяжелыми неврологическими нарушениями и соответственно увеличение числа животных с умеренной степенью неврологического дефицита. Показатели смертности были ниже у крыс, получавших IQ-1 с первого дня после перевязки сонных артерий.

Выявленные в данных исследованиях вазоактивные свойства IQ-1 ставят вопрос о механизме его дилататорного действия в отношении церебральных сосудов. Наши предыдущие исследования показали, что IQ-1 подвергается ферментативному метаболизму в микросомах печени с выделением NO [11]. Эти данные допускают возможность рассматривать IQ-1 в качестве потенциального донора NO для церебральных сосудов. Косвенным подтверждением этому является сравнительная оценка вазоактивных свойств IQ-1 и SNAP, выполненная в данном исследовании. Сосудорасширяющее действие SNAP, основанное на выделении NO, хорошо известно в отношении церебральных сосудов [24]. В настоящей работе введение SNAP увеличивало кровотоки в разных структурах мозга на 17–27%. Равный по величине вазодилататорный эффект вызывал IQ-1 у животных с гипоперфузией мозга, тогда как у интактных животных вазомоторный эффект изучаемого препарата был менее выражен. Одной из возможных причин разного по величине вазомоторного эффекта IQ-1 может быть состояние ГЭБ у животных с интактными и легированными сонными артериями. Известно, что ишемия мозга вызывает нарушения ГЭБ [1], что может облегчить проницаемость IQ-1 через барьер и повысить его биодоступность для вазомоторного действия. Полученные результаты предполагают, что эффективность IQ-1 усиливается на фоне возможной повышенной актив-

ности JNK, что позволяет скорректировать цереброваскулярные нарушения и связанные с ними неврологические расстройства [12].

IQ-1 продемонстрировал выраженные вазоактивные и нейропротекторные свойства на модели хронической гипоперфузии головного мозга у крыс, вызванной невозвратным легированием сонных артерий. Мы предполагаем, что благотворное влияние IQ-1 на исход хронической гипоперфузии мозга может быть комбинированным результатом как ингибирования ферментативной активности JNK в ткани головного мозга, так и образования NO, способствующего повышению микроциркуляции в тканях головного мозга, снижению вязкости крови и улучшению эндотелиальной функции. Полученные результаты предполагают, что IQ-1 можно рассматривать как нейропротектор многоцелевого действия.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные на животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденными правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссии по контролю над содержанием и использованием лабораторных животных при Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (протокол № 9/2021 от 23.09.2021 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 17-15-01111) и частично в рамках государственного задания Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (№ 075-00408-21-00).

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (С.Ю.Ж., И.Т.Д., Д.Н.А.); синтез соединения IQ-1 (А.И.Х.); сбор данных (С.Ю.Ж., И.Т.Д., Т.Ф.П.); обработка данных (С.Ю.Ж., И.Т.Д.); написание и редактирование манускрипта (С.Ю.Ж., И.Т.Д., А.И.Х. И.А.Щ., Д.Н.А.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Dérijard B, Davis RJ (1996) Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J* 15(11): 2760–2770.
2. Waetzig V, Herdegen T (2005) Context-specific inhibition of JNKs: overcoming the dilemma of protection and damage. *Trends Pharmacol Sci* 26(9): 455–461. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2005.07.006>
3. Bode AM, Dong Z (2007) The functional contrariety of JNK. *Mol Carcinog* 46(8): 591–598. <https://doi.org/10.1002/mc.20348>
4. Shvedova M, Anfinogenova Y, Atochina-Vasserman EN, Schepetkin IA, Atochin DN (2018) c-Jun-N-terminal kinases (JNKs) in myocardial and cerebral ischemia/reperfusion injury. *Front Pharmacol* 9: 715. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00715>
5. Javadov S, Jang S, Agostini B (2014) Crosstalk between mitogen-activated protein kinases and mitochondria in cardiac diseases: therapeutic perspectives. *Pharmacol Ther* 144(2): 202–225. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.05.013>
6. Nijboer CH, van der Kooij MA, van Bel F, Ohl F, Heijnen CJ, Kavelaars A (2010) Inhibition of the JNK/AP-1 pathway reduces neuronal death and improves behavioral outcome after neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Behav Immun* 24(5): 812–821. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2009.09.008>

7. Johnson GL, Nakamura K (2006) The kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease. *Biochim Biophys Acta* 1773(8): 1341–1348.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.12.009>
8. Irving EA, Bamford M (2002) Role of mitogen- and stress-activated kinases in ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 22(6): 631–647.
<https://doi.org/10.1097/00004647-200206000-00001>
9. Schepetkin IA, Khlebnikov AI, Potapov AS, Kovrizhina AR, Matveevskaya VV, Belyanin ML, Atochin DN, Zanoza SO, Gaidarzhly NM, Lyakhov SA, Kirpotina LN, Quinn MT (2019) Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of 11H-indeno[1,2-b]quinoxalin-11-one derivatives and tryptanthrin-6-oxime as c-Jun N-terminal kinase inhibitors. *Eur J Med Chem* 161: 179–191.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.10.023>
10. Schepetkin IA, Kirpotina LN, Khlebnikov AI, Hanks TS, Kochetkova I, Pascual DW, Jutila MA, Quinn MT (2012) Identification and characterization of a novel class of c-Jun N-terminal kinase inhibitors. *Mol Pharmacol* 81(6): 832–845.
<https://doi.org/10.1124/mol.111.077446>
11. Atochin DN, Schepetkin IA, Khlebnikov AI, Seledtsov VI, Swanson H, Quinn MT, Huang PL (2016) A novel dual NO-donating oxime and c-Jun N-terminal kinase inhibitor protects against cerebral ischemia-reperfusion injury in mice. *Neurosci Lett* 618: 45–49.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.02.033>
12. Plotnikov MB, Chernysheva GA, Aliiev OI, Smol'iakova VI, Fomina TI, Osipenko AN, Rydchenko VS, Anfinogenova YJ, Khlebnikov AI, Schepetkin IA, Atochin DN (2019) Protective Effects of a New C-Jun N-terminal Kinase Inhibitor in the Model of Global Cerebral Ischemia in Rats. *Molecules* 24(9): 1722–1746.
<https://doi.org/10.3390/molecules24091722>
13. Farkas E, Luiten PG, Bari F (2007) Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev* 54(1): 162–180.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.01.003>
14. Nussmeier NA (2002) A review of risk factors for adverse neurologic outcome after cardiac surgery. *J Extra Corpor Technol* 34(1): 4–10.
15. Cechetti F, Worm PV, Pereira LO, Siqueira IR, A Netto C (2010) The modified 2VO ischemia protocol causes cognitive impairment similar to that induced by the standard method, but with a better survival rate. *Braz J Med Biol Res* 43(12): 1178–1183.
<https://doi.org/10.1590/s0100-879x2010007500124>
16. Ni J, Ohta H, Matsumoto K, Watanabe H (1994) Progressive cognitive impairment following chronic cerebral hypoperfusion induced by permanent occlusion of bilateral carotid arteries in rats. *Brain Res* 653(1–2): 231–236.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)90394-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)90394-8)
17. Paxinos G, Watson C, Pennisi M, Topple A (1985) Bregma, lambda and the interaural midpoint in stereotaxic surgery with rats of different sex, strain and weight. *J Neurosci Methods* 13(2): 139–143.
[https://doi.org/10.1016/0165-0270\(85\)90026-3](https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90026-3)
18. Eklöf B, Siesjö BK (1973) Cerebral blood flow in ischemia caused by carotid artery ligation in the rat. *Acta Physiol Scand* 87(1): 69–77.
<https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1973.tb05367.x>
19. Demchenko IT, Luchakov YI, Moskvina AN, Gutsaeva DR, Allen BW, Thalmann ED, Piantadosi CA (2005) Cerebral blood flow and brain oxygenation in rats breathing oxygen under pressure. *J Cereb Blood Flow Metab* 25(10): 1288–1300.
<https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600110>
20. McGraw CP, Pashayan AG, Wendel OT (1976) Cerebral infarction in the Mongolian gerbil exacerbated by phenoxybenzamine treatment. *Stroke* 7(5): 485–488.
<https://doi.org/10.1161/01.str.7.5.485>
21. Ганнушкина ИВ (2000) Мозговое кровообращение при разных видах циркуляторной гипоксии мозга. *Вестник РАМН* 9: 22–27. [Gannushkina IV (2000) Cerebral circulation in different types of circulatory hypoxia of the brain. *Vestnik RAMN* 9: 22–27. (In Russ)].
22. Otori T, Katsumata T, Muramatsu H, Kashiwagi F, Katayama Y, Terashi A (2003) Long-term measurement of cerebral blood flow and metabolism in a rat chronic hypoperfusion model. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30(4): 266–272.
<https://doi.org/10.1046/j.1440-1681.2003.03825.x>
23. Tsuchiya M, Sako K, Yura S, Yonemasu Y (1992) Cerebral blood flow and histopathological changes following permanent bilateral carotid artery ligation in Wistar rats. *Exp Brain Res* 89(1): 87–92.
<https://doi.org/10.1007/BF00229004>
24. Dreier JP, Körner K, Görner A, Lindauer U, Weih M, Villringer A, Dirnagl U (1995) Nitric oxide modulates the CBF response to increased extracellular potassium. *J Cereb Blood Flow Metab* 15(6): 914–919.
<https://doi.org/10.1038/jcbfm.1995.116>

Vasoactive and Neuroprotective Action of c-Jun-N-Terminal Kinases Inhibitor in Rats with Chronic Brain Hypoperfusion

S. Yu. Zhilyaev^a, T. F. Platonova^a, A. I. Khlebnikov^b,
I. A. Schepetkin^{b, c}, I. T. Demchenko^a, and D. N. Atochin^{b, d, *}

^a*Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

^b*Tomsk Polytechnic University, Tomsk Russia*

^c*Department of Microbiology and Cell Biology, Montana State University, Bozeman, USA*

^d*Cardiovascular Research Center, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Charlestown, Massachusetts, USA*

*e-mail: atochin@cvrc.mgh.harvard.edu

The aim of this study was to evaluate the vasoactive and neuroprotective effects of c-Jun-N-terminal kinase inhibitor IQ-1 (11*H*-indeno[1,2-*b*]quinoxalin-11-one oxime) in chronic cerebral hypoperfusion caused by irreversible bilateral ligation of carotid arteries. Cerebral blood flow was measured quantitatively (hydrogen clearance method) simultaneously in the parietal cortex, hippocampus, substantia nigra, and striatum of the brain of awake rats. It was found that ligation of the carotid arteries caused a decrease in blood flow in the brain structures with a more pronounced decrease in the cortex (by 48% of the initial level) and with the smallest drop in the substantia nigra (by 25% of the initial level). The reduced level of blood flow persisted for 14 days of measurements. The responses of the cerebral vessels to hypercapnic probes (5% CO₂) were lost during the 2-week hypoperfusion period, and the neurological status of the animals did not improve. The administration of IQ-1 (50 mg/kg, intraperitoneally, every 48 hours for 14 days) was accompanied by an increase in blood flow in all brain structures. The maximum increase in blood flow was observed in the striatum and the minimum in the substantia nigra. After the administration of IQ-1, the sensitivity of the cerebral vessels to the hypercapnic stimulus was restored and the neurological state of the animals significantly improved by the end of the second week of cerebral hypoperfusion. The results show that the use of the JNK inhibitor can reduce cerebrovascular disorders and associated neurological disorders in hypoperfusion brain injury.

Keywords: c-Jun-N-terminal kinase inhibitors, chronic cerebral hypoperfusion, cerebral blood flow, neuroprotection, hypercapnic probe, striatum, substantia nigra