

## Влияние прекондиционирования десфлураном на содержание фосфорилированной формы гликоген синтетазы-киназы $\beta$ в эксперименте

В. В. Лихванцев<sup>1,2</sup>, О. А. Гребенчиков<sup>1,2</sup>, Р. А. Черпаков<sup>2</sup>, Ю. В. Скрипкин<sup>1,2</sup>, К. Ю. Борисов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского, Россия, 129110, г. Москва, ул. Щепкина д. 61/2

<sup>2</sup> НИИ общей реаниматологии имю В. А. Неговского, Россия, 107031, Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2

### Effect of Preconditioning with Desflurane on Phosphorylated Glycogen Synthase Kinase $\beta$ Contents in an Experiment

Valery V. Likhvantsev<sup>1,2</sup>, Oleg A. Grebenchikov<sup>1,2</sup>,  
Rostislav A. Cherpakov<sup>2</sup>, Yury V. Skripkin<sup>1,2</sup>, Kirill Yu. Borisov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> M. F. Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute, 61/2 Shchepkin Str., Moscow 129110, Russia

<sup>2</sup> V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology, 25 Petrovka Str., Build. 2, Moscow 107031, Russia

**Цель исследования** — оценить влияние прекондиционирования десфлураном на содержание фосфорилированной формы гликоген синтетазы-киназы  $\beta$  типа.

**Материалы и методы.** Исследование провели на 56-и белых беспородных крысах-самцах, случайным образом распределенных на 6 групп. Ишемию/реперфузию моделировали по методике В. Г. Корпачева. Контрольная группа состояла из ложно-оперированных животных. Вторая группа подверглась глобальной ишемии/реперфузии после анестезии с хлоралгидратом. В следующих двух группах крысам ингалировали 1 МАК севофлурана или десфлурана, а в двух последних группах, за применением этих анестетиков следовала глобальная ишемия/реперфузия. Содержание фосфорилированной формы гликоген синтетазы-киназы  $\beta$  в гомогенатах мозга осуществляли методом вестерн-блоттинга. Статистический анализ проводили с помощью *U*-критерия Манна-Уитни, достоверными считали различия при  $p < 0,05$ .

**Результаты.** Трехминутная ишемия с последующей реперфузией привела к значительному увеличению содержания фосфорилированной формы гликоген синтетазы-киназы  $\beta$  по сравнению с контрольной группой (620437 относительных единиц против 304574 относительных единиц соответственно,  $p < 0,05$ ). Сходные результаты наблюдались в группах, где только ингалировали севофлуран (743166 относительных единиц) или десфлуран (667119 относительных единиц) ( $p < 0,05$ ). В группе ишемии/реперфузии после ингаляции севофлурана содержание фосфорилированной формы гликоген синтетазы-киназы  $\beta$  составило 922231 относительную единицу ( $p < 0,05$  по сравнению с контролем). В группе с сочетанием десфлурана и ишемии/реперфузии, содержание фермента повышалось до 677084 относительных единиц ( $p < 0,05$  по сравнению с контролем). Различий по содержанию исследуемого фермента между группами, где применялись ингаляционные анестетики в сочетании с ишемией/реперфузией или без нее, не было. Кроме того, содержания этого фермента были сопоставимы с результатами в группе изолированной ишемии/реперфузии.

**Заключение.** Оба исследованных анестетика обладают выраженной и аналогичной по степени выраженности способностью повышать содержание фосфорилированной формы гликоген синтетазы-киназы  $\beta$  в гомогенатах мозга крыс.

**Ключевые слова:** прекондиционирование; севофлуран; десфлуран; вестерн-блоттинг; нейропротекция; крысы

**The purpose** of this study is to determine and evaluate if the preconditioning with desflurane depends on level of phospho-GSK- $\beta$ .

**Material and methods.** White outbred male rats (56) were randomly allocated to 6 groups. Ischemia/reperfusion modeling was performed using V. G. Korpachev's technique. The reference group consisted of sham (falsely-operated) animals. The second group underwent global ischemia/reperfusion after anesthesia with chloral hydrate. The next two groups were treated with either sevoflurane or desflurane at 1 MAC. In the final two groups, the use of same anesthetics was followed by global ischemia/reperfusion. The concentration of phospho-GSK- $\beta$  in brain homogenate was determined using western blotting. A statistical analysis was performed using the Mann-Whitney *U*-test, and the difference was considered significant at  $P < 0.05$ . A three-minute ischemia with subsequent reperfusion resulted in a sig-

Адрес для корреспонденции:

Кирилл Борисов  
E-mail: archont210@mail.ru

Correspondence to:

Kirill Borisov  
E-mail: archont210@mail.ru

nificant increase in the concentration of phospho-GSK-3 $\beta$  vs. the reference group (620437 relative units vs. 304574 relative units, respectively,  $P<0.05$ ). Similar results were observed in groups where animals received inhaled sevoflurane (743166 relative units) and desflurane (667119 relative units) alone ( $P<0.05$ ). In the ischemia/reperfusion group, the concentration of phospho-GSK-3 $\beta$  was equal to 922231 relative units after inhalation of sevoflurane ( $P<0.05$  vs. the reference group). In the group with a combination of desflurane and ischemia/reperfusion, the enzyme concentration increased up to 677084 relative units ( $P<0.05$  vs. reference group). No difference in concentrations of the enzyme between groups receiving inhaled anesthetics with and without ischemia/perfusion was found. In addition, the concentration of this enzyme was comparable with that in the ischemia/reperfusion group.

**Conclusion.** Two anesthetics under testing possess similarly increased concentration of phospho-GSK-3 $\beta$  in rat brain homogenates.

**Key words:** preconditioning; sevoflurane; desflurane; phospho-GSK-3 $\beta$ ; western blotting; neuroprotection; rats

DOI:10.15360/1813-9779-2016-6-8-15

## Введение

Ингаляционные анестетики являются одним из наиболее часто используемых классов лекарственных средств. Однако механизмы, посредством которых эти препараты вызывают анестезию, до конца не изучены и все еще интенсивно исследуются. Два других эффекта этих анестетиков на центральную нервную систему, анестетическая нейропротекция и нейротоксичность, также в настоящее время являются предметом активных исследований [1]. Ингаляционные анестетики оказывают прекодиционирующий эффект на головной мозг (нейропротекция вследствие анестетического прекодиционирования) [2–4]. Развитие этой защиты продемонстрировано в культуре нейронов крыс, культуре нейроноподобных клеток человека, у взрослых крыс после транзиторной очаговой ишемии головного мозга, мозге новорожденных крыс после повреждения гипоксией-ишемией, или у мышей после внутримозговых кровоизлияний. Ранее было показано, что у взрослых крыс отмечается меньший объем инфаркта мозга и лучшее неврологическое восстановление (по оценке на 14 или 28 дней после ишемии головного мозга), если ингалировать 1,8 об.% изофлурана (1,4 МАК) в течение 50-минутной или 80-минутной окклюзии срединной мозговой артерии [5]. Эти данные убедительно доказывают, что изофлуран обеспечивает долгосрочную нейропротекцию. Недавние исследования показали мощные нейропротекторные эффекты севофлурана после очаговой церебральной ишемии [6]. Конечной целью в каскаде реакций, инициированных ишемией, является неспецифическая митохондриальная пора (*mitochondrial permeability transition pore* (mPTP)) [7, 8]. Открытие этой поры приводит к выбросу факторов, вызывающих апоптоз, в первую очередь – цитохрома С. Предотвращение открытия митохондриальной поры защищает клетку от ишемического повреждения. Ключевым ферментом регулирующим проницаемость митохондриальной поры является гликоген синтаза-киназа 3 $\beta$  (ГСК-3 $\beta$ ): фосфорилирование

## Introduction

Inhalation anesthetics are the most commonly used classes of drugs. However, the mechanism of their anesthetic effect has not been specified to date and is still being thoroughly studied. Two other effects of these anesthetics on the central nervous system, namely, anesthetic-induced neuroprotection and neurotoxicity, are also actively studied [1]. Inhalation anesthetics produce preconditioning effects on the brain (neuroprotection due to anesthetic preconditioning) [2–4]. This protection has been demonstrated in rats' neuron cultures, human neuron-like cell cultures, adult rats' brain after transient focal brain ischemia, newborn rats' brain after a hypoxia-ischemia injury, or mice's brain after an intracerebral hemorrhagic stroke. Recent studies have demonstrated smaller brain infarction volume and better neurological recovery in adult rats (as evaluated on Days 14 or 28 after brain ischemia), if 1.8% isoflurane (1.4 MAC) is inhaled after a 50-min or 80-min middle cerebral artery occlusion [5]. These findings provide strong evidence that isoflurane provides long-lasting neuroprotection. Recent studies demonstrated potent neuroprotective effects of sevoflurane after focal cerebral ischemia [6]. The mitochondrial permeability transition pores (mPTP) are the final target in the cascade of reactions induced by ischemia [7, 8]. The opening of mPTP results in release of factors triggering apoptosis, first of all, the cytochrome C. Inhibition of mPTP opening protects cells from ischemic damage. Glycogen synthase-kinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) is a key enzyme regulating the mPTP permeability: phosphorylation of this enzyme inactivates it and prevents the pores from opening. Our previous study demonstrated that preconditioning with sevoflurane increases the concentration of the phosphorylated form of glycogen synthase-kinase 3 $\beta$  (p-GSK-3 $\beta$ ), and protects the mitochondria in rats' brain neurons during ischemia/reperfusion [9]. The purpose of this study was to determine, if desflurane has neuroprotective effects, and to evaluate their potency.

этого фермента инактивирует его и препятствует открытию поры. В предыдущем исследовании нами продемонстрировано, что прекондиционирование севофлураном увеличивает содержание фосфорилированной формы ГСК-3 $\beta$  (фосфо-ГСК-3 $\beta$ ) и защищает митохондрии нейронов в мозге крыс по время ишемии/реперфузии [9]. Целью настоящего исследования стало определить, обладает ли десфлуран нейропротекторными свойствами, и оценить их выраженность.

### Материал и методы

Остановку системного кровообращения моделировали в соответствии с методом, впервые описанным В. Г. Корпачевым и сотр. [10], востребованным в работах зарубежных авторов [11]. Анестезированных крыс фиксировали на препаровальном столе в положении лежа на спине. После срединного надреза кожи на груди, окклюзирующий крюк (провода диаметром 1 мм с изогнутым под углом 90° концом, длина которого 1 см) вводили в средостение на уровне второго межреберного промежутка. Крюк осторожно поворачивали путем перемещения его дистального конца вдоль задней стенки грудной клетки. Полное прекращение кровообращения достигали путем пережатия основных сосудов сердца и одновременным давлением на грудь пальцами. После 2–3 минут пережатия крюк удаляли. Остановка сердца подтверждалась отсутствием сердцебиения. Длительность остановки сердца составляла 3 минуты, после чего начинали реанимацию. Проводили компресии грудной клетки и искусственную вентиляцию легких (ИВЛ) воздухом респиратором для животных Ugo Basile Gas Anesthesia System (Ugo Basile, Италия). Компресии грудной клетки продолжали до восстановления спонтанной сердечной деятельности, но не более чем 5 минут, а ИВЛ прекращали после восстановления спонтанного дыхания.

Контрольная группа (С,  $n=12$ ). Животных анестезировали с помощью внутрибрюшинной инъекции хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг, который был подготовлен непосредственно перед введением. После достижения достаточной глубины анестезии крыс фиксировали на препаровальном столе. После интубации трахеи через рот тонкой силиконовой трубкой, животных вентилировали атмосферным воздухом с частотой дыхания 85•мин<sup>-1</sup> в течение 25 минут. Затем ИВЛ прекращали, крыс экстубировали и выводили из эксперимента путем декапитации. Мозг крыс извлекали, гомогенизировали и фиксировали в жидком азоте.

Группа «ишемия/реперфузия» (И/Р,  $n=8$ ). Животных анестезировали внутрибрюшинной инъекцией хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг, который готовили непосредственно перед введением. После достижения достаточной глубины анестезии, крыс фиксировали на препаровальном столе. После интубации трахеи начинали ИВЛ атмосферным воздухом с частотой дыхания 120•мин<sup>-1</sup> в течение 25 минут. Остановки сердца длительностью 3 мин моделировали ранее описанным способом. Затем животных реанимировали. После восстановления сердечной деятельности и дыхания, крыс

### Materials and Methods

Systemic circulatory arrest was induced according to the technique originally described by V.G. Korpatchev et al. [10], which is also applied by international researchers [11]. The anesthetized rats were immobilized in supine position on a dissection table. After a midline skin incision in the chest, an occluding hook (a 1 cm wire having 1 mm in diameter with a cranked end) was introduced into the mediastinum at the level of the second intercostal space. The hook was gently turned by moving its distal end along the dorsal wall of the thorax. A complete circulatory arrest was achieved by compression of major cardiac blood vessels and simultaneous pressure on the chest with fingers. The hook was removed 2–3 minutes after the compression. Cardiac arrest was confirmed by the absence of heartbeat. The duration of the cardiac arrest was 3 minutes, and then the resuscitation procedure was initiated. Chest compressions and mechanical ventilation were performed using an Ugo Basile Gas Anesthesia System animal respirator (Ugo Basile, Italy). Chest compressions continued until spontaneous cardiac activity and systemic blood circulation recovered, but for not longer than 5 minutes, and the mechanical ventilation was discontinued after recovery of spontaneous respiration.

Reference Group (C,  $n=12$ ). The animals were anesthetized using intraperitoneal chloral hydrate injection at a dose of 300 mg/kg, which was prepared directly prior to administration. After achieving a sufficient depth of anesthesia, the rats were fixed on a dissecting table. After oral intubation with a thin silicone tube, animals were mechanically ventilated using atmospheric air with a respiration rate of 85•min<sup>-1</sup> for 25 min. When the MV was discontinued, the rats were extubated and withdrawn from the experiment by decapitation. Then, the rat brain was removed and fixed in liquid nitrogen.

Ischemia/Reperfusion group (I/R,  $n=8$ ). The animals were anesthetized by intraperitoneal injection of chloral hydrate solution at a dose of 300 mg/kg, which was prepared directly prior to administration. When a sufficient depth of anesthesia was achieved, the rats were immobilized on a dissecting table. After oral intubation with a thin silicone tube, animals were mechanically ventilated using atmospheric air at a respiration rate of 120•min<sup>-1</sup> for 25 min. Cardiac arrest was induced by the procedure described previously. Then animals were then resuscitated. When cardiac activity and respiration had been restored, the rats were withdrawn from the experiment, and materials for examination were sampled.

Sevoflurane group (S,  $n=9$ ). Animals' heads were placed in a 5 ml glass container containing a cotton swab dipped in sevoflurane (Sevoflurane, Abbot Laboratories Limited, United Kingdom). When a sufficient depth of anesthesia was achieved, the rats were immobilized and intubated, and the mechanical ventilation was initiated. At the same time, sevoflurane was introduced into the ventilator circuit directly before the endotracheal tube at a dose of 50  $\mu$ l/min, providing an exhaled anesthetic concentration of 1 MAC. Sevoflurane administration lasted 25 minutes for each animal, and then the MV was discontinued. The rats were then extubated, withdrawn from the experiment, and materials for examination were sampled.

Sevoflurane + ischemia/reperfusion group (S+I/R,  $n=9$ ). The anesthesia was performed as in the S group.

выводили из эксперимента, забирали материал для исследования.

Группа «севофлуран» (S,  $n=9$ ). Голову животного помещали в стеклянный контейнер объемом 5 мл, содержащий ватный тампон, смоченным в севоране (севофлуран, Abbot Laboratories Limited, Великобритания). После достижения достаточной глубины анестезии крыс фиксировали, интубировали и начинали ИВЛ. В то же время севоран начинали вводить в дыхательный контур непосредственно перед эндотрахеальной трубкой в дозе 50 мкл/мин, создавая концентрацию анестетика на выдохе 1 МАК. Введение севорана длилось 25 минут для каждого животного, после чего ИВЛ прекращали. Крыс экстубировали, выводили из эксперимента и забирали материал.

Группа «севофлуран+ишемия/реперфузия» (S+И/Р,  $n=9$ ). Индукцию анестезии осуществляли как в группе S. После 25 минут ингаляции севорана моделировали остановку сердца. Затем животных реанимировали и забирали материал.

Группа «десфлуран» (D,  $n=9$ ). Голову животного помещали в стеклянный контейнер объемом 5 мл, содержащий ватный тампон, смоченным в супране (десфлуран, Baxter Healthcare Corporation, США). После достижения достаточной глубины анестезии крыс фиксировали, интубировали и начинали ИВЛ. В это время супран вводили в дыхательный контур непосредственно перед эндотрахеальной трубкой в дозе 170 мкл/мин, создавая концентрацию анестетика на выдохе 1 МАК. Введение супрана длилось 25 минут для каждого животного. После этого ИВЛ прекращали, крыс экстубировали и выводили из эксперимента, забирали материал. Так как десфлуран кипит при комнатной температуре, шприц помещали в специальную камеру, в которой температура поддерживалась в диапазоне от 0° до -4°С.

Группа «десфлурана + ишемия/реперфузия» группа (D+И/Р,  $n=9$ ). Индукцию анестезии осуществляли, как в группе D. После 25 минутной ингаляции супраном, моделировали остановку сердца. Затем животных реанимировали, забирали материал на исследование.

Образцы гомогенатов мозга погружали в 15% Трис-глицин полиакриламидный гель (10–20 мкг общего белка на полосу). После электрофореза гель переносили на ПВДФ (поливинилденфторид) мембраны (Amersham Pharmacia Biotech, Великобритания). Мембраны блокировали в 5% (вес/объем) обезжиренным молоком в PBS с 0,1% (об/об) Tween 20, а затем инкубировали с первичными антителами: кроличьи поликлональные анти-p-GSK-3 $\beta$  в разведении 1:1000 (Cell Signaling, США). Мембраны обрабатывали вторичными кроличьими антителами. Специфические полосы были визуализированы с помощью вестерн-блоттинг набора ECL Plus (Amersham Pharmacia Biotech, Великобритания) (рис. 1). После завершения сканирования плотность полученного окрашивания в мембране измеряли для каждой полоски с использованием программного обеспечения ImageLab (Bio-Rad, США).

Полученные данные измерили в относительных единицах (отн. ед.) и представили в виде медианы с межквартильным размахом. Статистический анализ провели с помощью *U*-критерия Манна-Уитни в про-

Cardiac arrest was modeled 25 min after sevoflurane inhalation. Then animals were resuscitated, and the materials for examination were sampled.

Desflurane group (D,  $n=9$ ). Animals' heads were placed in a 5 ml glass container containing a cotton swab dipped in suprane (desflurane, Baxter Healthcare Corporation, USA). When a sufficient depth of anesthesia was achieved, the rats were immobilized and intubated, and the mechanical ventilation was initiated. At the same time, suprane was introduced into the ventilator circuit directly before the endotracheal tube at a dose of 170  $\mu$ l/min, providing an exhaled anesthetic concentration of 1 MAC. Suprane administration lasted 25 minutes for each animal, and then the MV was discontinued. The rats were then extubated, withdrawn from the experiment, and materials for examination were sampled. Since desflurane boils at a room temperature, the syringe was placed into a special chamber in which the temperature was maintained within the range from 0° to -4°С.

Desflurane + ischemia/reperfusion group (D+I/R,  $n=9$ ). The anesthesia was performed as in the D group. Cardiac arrest was modeled 25 min after suprane inhalation. Then animals were resuscitated and the materials for examination were sampled.

Samples of brain homogenates were dipped into 15% tris-glycine polyacrylamide gels (10–20 mg of total protein per strip). The gel was transferred onto PVDF (polyvinylidene fluoride) membranes (Amersham Pharmacia Biotech, UK) after electrophoresis. The membranes were blocked with 5% (w/v) milk skimmed in PBS with 0.1% (v/v) Tween 20, and then incubated with primary antibodies (rabbit polyclonal anti-P-GSK-3 $\beta$  antibodies diluted at a ratio of 1:1000) (Cell Signaling, USA). The membranes were then treated with secondary rabbit antibodies. Specific bands were visualized using ECL Plus Western blotting kit (Amersham Pharmacia Biotech, UK) (Fig. 1). After scanning, the density of the resulting stain in the membrane was measured for each band using the Image Lab software (Bio-Rad, USA).

The obtained data were expressed as relative units (r.u.) and represented as medians and interquartile ranges. Statistical analysis was conducted using the Mann-Whitney *U*-test, and the difference was considered significant at  $P<0.05$  (Statistica 6.0, StatSoft, USA).

## Results and Discussion

Median concentration of p-GSK-3 $\beta$  in sham (falsely operated) animals in the C group was equal to 304574 [169651–426472] r.u. (Fig. 2).

The three-minute total ischemia followed by reperfusion in the I/R group led to a significant increase in p-GSK-3 $\beta$  concentration as compared to the C group ( $P<0.05$ ), namely to 620437 [454993–785880] r. u.

The same results were observed in rats treated either with sevoflurane in the S group or desflurane in the D group, with a mean increase in the p-GSK-3 $\beta$  concentration up to 743166 [742257–990792] and 667119 [619735–790934] r.u., respectively. Although these levels were comparable

## Experimental Studies

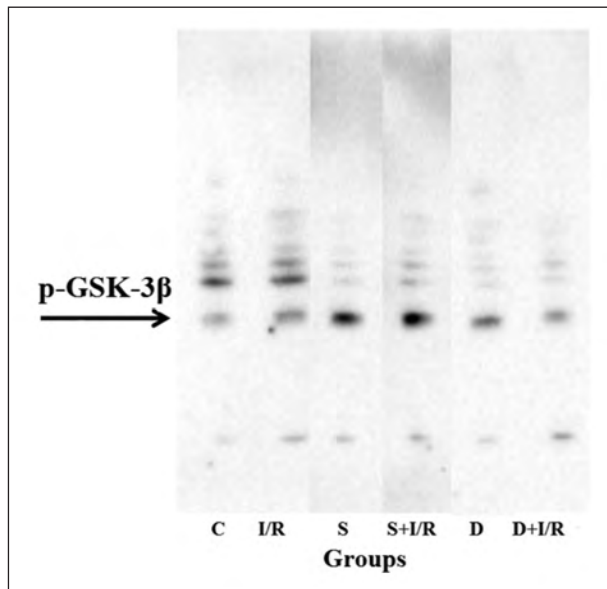


Рис. 1. Скан блот-пленок.

Fig. 1. Blot scan.

Note. For Fig. 1, 2: C – Control; I/R – "Ischemia/Reperfusion"; S – "Sevoflurane"; S+I/R – "Sevoflurane + ischemia/reperfusion"; D – "Desflurane"; D+I/R – "Desflurane + ischemia/reperfusion".

Примечание. Для рис. 1, 2: p-GSK-3 $\beta$  – фосфо-ГСК-3 $\beta$ ; Groups – группы; C – контроль; I/R – «ишемия/реперфузия»; S – «севофлуран»; S+I/R – «севофлуран + ишемия/реперфузия»; D – десфлуран; D+И/Р – «десфлуран + ишемия/реперфузия».

грамме Statistica 6.0 (StatSoft, США), статистически значимыми различия считали при  $p$  менее 0,05.

## Результаты и обсуждение

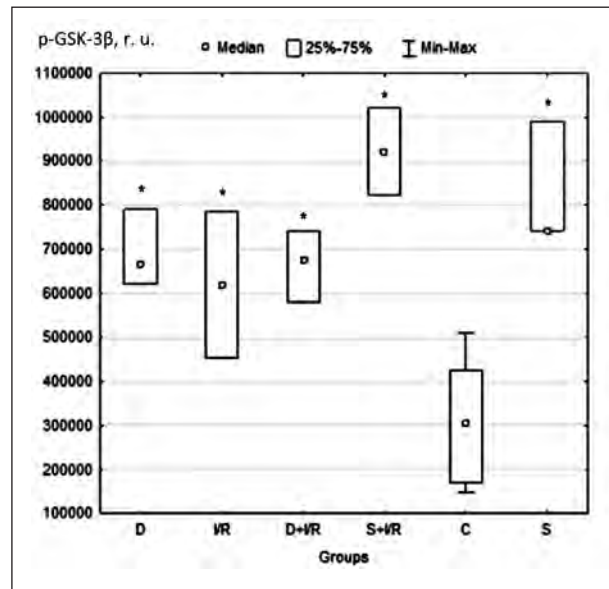
Среднее значение (медиана) содержания фосфо-ГСК-3 $\beta$  у ложно-оперированных животных в группе С составило 304574 [169651 – 426472] отн. ед. (рис. 2).

Трехминутная тотальная ишемия с последующей реперфузией в группе И/Р привела к значительному увеличению содержания фосфо-ГСК-3 $\beta$  по сравнению с группой С ( $p < 0,05$ ), до 620437 [454993 – 785880] отн. ед..

Мы наблюдали аналогичные результаты у крыс, анестезированных севофлураном в группе S или десфлураном в группе D, с увеличением содержания фосфо-ГСК-3 $\beta$  в среднем до 743166 [742257 – 990792] и 667119 [619735 – 790934] отн. ед. соответственно. Хотя эти показатели были сопоставимы между двумя группами ( $p > 0,05$ ), они были значительно выше, чем у группы С ( $p < 0,05$ ).

В группе S+И/Р среднее содержание фосфо-ГСК-3 $\beta$  равнялось 922231 [824201 – 1020261] отн. ед., что также было значительно выше, чем в группе С ( $p < 0,05$ ).

Ту же тенденцию наблюдали в группе D+И/Р где содержание фосфо-ГСК-3 $\beta$  составило

Рис. 2. Межгрупповые различия по концентрации фосфорилированной формы гликоген синтетазы-киназы-3 $\beta$ .Fig. 2. Between-group differences in concentration of p-GSK-3 $\beta$ .

Note. \* –  $P < 0,05$  compared with the control group.

Примечание. г. у. – отн. ед.; \* –  $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой.

between the two groups ( $P > 0,05$ ), they were significantly higher than those in the C group ( $P < 0,05$ ).

In the S+I/R group, the median p-GSK-3 $\beta$  concentration was 922231 [824201–1020261] r. u., which was also significantly higher than that in the C group ( $P < 0,05$ ).

The same trend was observed in the D+I/R group, where the median p-GSK-3 $\beta$  concentration was equal to 677084 [581352–742218] r. u. ( $P < 0,05$  vs. the C group).

There was no difference in p-GSK-3 $\beta$  concentrations between all four groups treated with inhalation anesthetics, both alone or followed by ischemia/reperfusion ( $P > 0,05$ ). Furthermore, levels of this enzyme were comparable with the results in the I/R group ( $P > 0,05$ ).

In 1979, D.R. Hunter and R.A. Haworth observed the phenomenon of excessive mitochondrial membrane permeability at increased  $Ca^{2+}$  concentrations in the matrix. They suggested that there were mitochondrial permeability transition pores [12]. During reperfusion, a great amount of reactive oxygen species (ROS) is released from ischemic cells, thus leading to mPTP opening [13], water and diluted substances enter mitochondria through the opened pores causing matrix swelling and outer membrane disruption. Cytochrome C is released from the intermembrane space and initiates apoptosis [14].

Inhalation anesthetics are known to trigger preconditioning by releasing a small amount of ROS from the mitochondria, thus leading to a significant increase in the ROS sensitivity threshold for mPTP

в среднем 677084 [581352 — 742218] отн. ед. ( $p < 0,05$ , по сравнению с группой С).

Мы не обнаружили никаких различий в содержании фосфо-ГСК-3 $\beta$  во всех 4-х группах, где применяли ингаляционные анестетики, как в одиночку, так и в сочетании с последующей ишемией/реперфузией ( $p > 0,05$ ). Кроме того, содержание этого фермента было сопоставимо с результатами в группе И/Р ( $p > 0,05$ ).

В 1979 году D.R. Hunter and R.A. Haworth наблюдали феномен чрезмерной проницаемости митохондриальной мембраны в условиях повышенной концентрации Ca<sup>2+</sup> в матриксе и высказали предположение о существовании неспецифической митохондриальной поры [12]. Во время реперфузии высокое количество активных форм кислорода (АФК) высвобождается из ишемизированных клеток, что приводит к открытию mPTP [13]. Через открытую пору в митохондрию поступает вода и растворенные в ней вещества, вызывая набухание матрикса и разрыв наружной мембраны. Из межмембранного пространства высвобождается цитохром С, инициируя апоптоз [14].

Известно, что ингаляционные анестетики запускают прекондиционирование за счет выброса малого количества АФК из митохондрий, что приводит к значительному увеличению порога чувствительности mPTP к АФК [15, 16]. Это небольшое количество АФК действует как сигнал для активации киназного каскада, который заканчивается гликоген синтазой-киназой 3 $\beta$ , расположенной непосредственно перед комплексом mPTP [15]. Фосфорилирование (инактивация) этого ключевого фермента предотвращает открытие митохондриальной поры, вызываемое повреждением вследствие ишемии/реперфузии.

В 2009 году были суммированы все доступные к тому времени данные о mPTP, ее связи с ГСК-3 $\beta$  и участии обеих каскаде феномена прекондиционирования [17].

В предыдущем исследовании мы продемонстрировали, что прекондиционирование севофлураном увеличивает содержание фосфо-ГСК-3 $\beta$  и защищает митохондрии нейронов в головном мозге крыс от повреждения активными формами кислорода при ишемии/реперфузии [9].

В данном исследовании ишемия/реперфузия в группе И/Р привела, как и было предсказано, к значительному увеличению содержания фосфо-ГСК-3 $\beta$  до 204% ( $p < 0,05$ ). Этот результат может быть связан со схожим с прекондиционирующим стимулом, вызванным 3-х минутной ишемией.

Прекондиционирование севофлураном в группе S вызвало увеличение содержания фосфо-ГСК-3 $\beta$  ( $p < 0,05$ ) до 244% по сравнению с ложнооперированными животными (группа С). Как упоминалось ранее, это наблюдение может еще раз указывать на активацию каскада, ведущего к

[15, 16]. This small amount of ROS acts as a signal for the activation of the kinase cascade which ends with glycogen synthase-kinase 3 $\beta$ , located directly before the mPTP complex [15]. Phosphorylation (inactivation) of this key enzyme prevents the mitochondrial pore opening caused by ischemia/reperfusion injury.

In 2009, all available data regarding mPTP, its relation to glycogen synthase-kinase 3 $\beta$  and the involvement of both in preconditioning cascade phenomenon were summarized [17].

Our previous study demonstrated that preconditioning with sevoflurane increases the p-GSK-3 $\beta$  concentration and protects the mitochondria in rats' brain neurons during ischemia/reperfusion [9].

In the current study, the ischemia/reperfusion in the I/R group cause a significant increase in the p-GSK-3 $\beta$  concentration up to 204%, as it had been predicted ( $P < 0.05$ ). This effect can be attributed to ischemic preconditioning-like stimulus, caused by the 3-minute ischemia.

Preconditioning with sevoflurane in the S group caused a 244% increase in the p-GSK-3 $\beta$  concentration ( $P < 0.05$ ) vs. sham animals (group C). As it has been mentioned previously, this observation may demonstrate an activation of the cascade, leading to augmented cell protection against ischemic injury, even if such injury did not follow [9].

Apparently, anesthetic and ischemic preconditioning have a limited ability to summarize their protective effects, as it has been evident from a 303% increase in the p-GSK-3 $\beta$  concentration in the S+I/R group. However, these findings did not differ significantly from values in S group and I/R group ( $P > 0.05$ ).

In the brain samples of animals preconditioned with desflurane, either alone (D), or followed by ischemia/reperfusion (D+I/R), the p-GSK-3 $\beta$  concentrations increased by 219% and 223%, respectively. This indicates that, like sevoflurane, desflurane triggers anesthetic preconditioning; however, unlike sevoflurane, it is not disposed to summation. In addition, we found no significant difference in p-GSK-3 $\beta$  concentrations between the groups treated with desflurane and sevoflurane, and that with ischemia/reperfusion modeling without any inhalation anesthetic ( $P > 0.05$ ).

## Conclusion

This study again demonstrates the ability of sevoflurane to increase the p-GSK-3 $\beta$  concentration in rats' brains exposed to 3-minute of global ischemia followed by reperfusion. Our data suggest that the observed effect is typical both for sevoflurane and desflurane. This result can be regarded as the evidence that inhalation anesthetics under test produce the effect of anesthetic preconditioning.

повышению клеточной защиты от ишемического повреждения, даже если ишемия в последующем не последовала [9].

По-видимому, у анестетического и ишемического прекондиционирования имеется ограниченная способность к суммированию протекторных эффектов, что отмечалось по увеличению содержания фосфо-ГСК-3 $\beta$  до 303% в группе S+И/Р. Тем не менее, этот результат существенно не отличается от значений в группах S или И/Р ( $p>0,05$ ).

В образцах мозга животных, только прекондиционированных десфлураном (D) или с последующей ишемией/реперфузией (D+И/Р), содержание фосфо-ГСК-3 $\beta$  увеличилось на 219% и 223% соответственно. Это указывает на то, что десфлуран как и севофлуран, является триггером анестетического прекондиционирования, в отличие от последнего, однако, не склонным к суммированию. Кроме того, мы не обнаружили существенной разницы в содержании фосфо-ГСК-3 $\beta$  между группами, где применялись севофлуран или десфлуран и группой где моделировалась ишемия/реперфузия без применения ингаляционных анестетиков ( $p>0,05$ ).

### Заклучение

Данное исследование еще раз демонстрирует способность севофлурана повышать содержание

The presented data may extend the range of therapeutic indications for inhalation anesthetics in clinical practice.

In addition, the long-forgotten, little-known, but easy-to-perform V. G. Korpatchev's model of ischemia/reperfusion could be deployed in further experiments.

фосфо-ГСК-3 $\beta$  в мозге крыс, перенесших 3-минутную глобальную ишемию с последующей реперфузией. Наши данные свидетельствуют о том, что наблюдаемый эффект характерен как для севофлурана, так и для десфлурана. Этот результат можно рассматривать как доказательство того, что исследуемые ингаляционные анестетики действительно проявляют эффект анестетического прекондиционирования.

Представленные данные потенциально могут расширить спектр показаний к применению ингаляционных анестетиков в клинике.

Кроме того, малоизвестная, давно забытая, но простая в выполнении модель ишемии/реперфузии В. Г. Корпачева может быть полезна в дальнейших экспериментах.

### Литература

1. Лихванцев В.В., Скрипкин Ю.В., Гребенчиков О.А. Изучение клинической значимости анестетического прекондиционирования (открытая база данных). *Общая реаниматология*. 2014; 10 (4): 82–85. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2014-4-82-85>
2. Kapinya K.J., Lowl D., Futterer C., Maurer M., Waschke K., Isaev N.K., Dirnagl U. Tolerance against ischemic neuronal injury can be induced by volatile anesthetics and is inducible NO synthase dependent. *Stroke*. 2002; 33 (7): 1889–1898. <http://dx.doi.org/10.1161/01.STR.0000020092.41820.58>. PMID: 12105371
3. Kitano H., Kirsch J.R., Hum P.D., Murphy S.J. Inhalational anesthetics as neuroprotectants or chemical preconditioning agents in ischemic brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2007; 27 (6): 1108–1128. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600410>. PMID: 17047683
4. Zheng S., Zuo Z. Isoflurane preconditioning induces neuroprotection against ischemia via activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Mol. Pharmacol.* 2004; 65 (5): 1172–1180. <http://dx.doi.org/10.1124/mol.65.5.1172>. PMID: 15102945
5. Sakai H., Sheng H., Yates R.B., Ishida K., Pearlstein R.D., Warner D.S. Isoflurane provides long-term protection against focal cerebral ischemia in the rat. *Anesthesiology*. 2007; 106 (1): 92–99. <http://dx.doi.org/10.1097/00000542-200701000-00017>. PMID: 17197850
6. Pape M., Engelhard K., Eberspächer E., Hollweck R., Kellermann K., Zintner S., Hutzler P., Werner C. The long-term effect of sevoflurane on neuronal cell damage and expression of apoptotic factors after cerebral ischemia and reperfusion in rats. *Anesth. Analg.* 2006; 103 (1): 173–179. <http://dx.doi.org/10.1213/01.ane.0000222634.51192.a4>. PMID: 16790648
7. Juhaszova M., Zorov D.B., Gleichmann M., Mattson M.P. The identity and regulation of the mitochondrial permeability transition pore where the known meets the unknown. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008; 1123: 197–212. <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1420.023>. PMID: 18375592
8. Zorov D.B., Juhaszova M., Yaniv Y., Nuss H.B., Wang S., Sollott S.J. Regulation and pharmacology of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovascular Research*. 2009; 83 (2): 213–225. <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvp151>. PMID: 19447775
9. Борисов К.Ю., Мороз В.В., Гребенчиков О.А., Плотицкий Е.Ю., Левиков Д.И., Черпаков Р.А., Лихванцев В.В. Влияние пропофола на ане-

### References

1. Likhvantsev V.V., Skripkin Y.V., Grebenchikov O.A. Izuchenie klinicheskoi znachimosti anesticheskogo prekonkonditsionirovaniya (otkrytaya baza dannyx). *Obshchaya Reanimatologiya*. [Investigation of the clinical value of anesthetic preconditioning (an openaccess database). *General Reanimatology*]. 2014; 10 (4): 82–85. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2014-4-82-85>. [In Russ.]
2. Kapinya K.J., Lowl D., Futterer C., Maurer M., Waschke K., Isaev N.K., Dirnagl U. Tolerance against ischemic neuronal injury can be induced by volatile anesthetics and is inducible NO synthase dependent. *Stroke*. 2002; 33 (7): 1889–1898. <http://dx.doi.org/10.1161/01.STR.0000020092.41820.58>. PMID: 12105371
3. Kitano H., Kirsch J.R., Hum P.D., Murphy S.J. Inhalational anesthetics as neuroprotectants or chemical preconditioning agents in ischemic brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2007; 27 (6): 1108–1128. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600410>. PMID: 17047683
4. Zheng S., Zuo Z. Isoflurane preconditioning induces neuroprotection against ischemia via activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Mol. Pharmacol.* 2004; 65 (5): 1172–1180. <http://dx.doi.org/10.1124/mol.65.5.1172>. PMID: 15102945
5. Sakai H., Sheng H., Yates R.B., Ishida K., Pearlstein R.D., Warner D.S. Isoflurane provides long-term protection against focal cerebral ischemia in the rat. *Anesthesiology*. 2007; 106 (1): 92–99. <http://dx.doi.org/10.1097/00000542-200701000-00017>. PMID: 17197850
6. Pape M., Engelhard K., Eberspächer E., Hollweck R., Kellermann K., Zintner S., Hutzler P., Werner C. The long-term effect of sevoflurane on neuronal cell damage and expression of apoptotic factors after cerebral ischemia and reperfusion in rats. *Anesth. Analg.* 2006; 103 (1): 173–179. <http://dx.doi.org/10.1213/01.ane.0000222634.51192.a4>. PMID: 16790648
7. Juhaszova M., Zorov D.B., Gleichmann M., Mattson M.P. The identity and regulation of the mitochondrial permeability transition pore where the known meets the unknown. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008; 1123: 197–212. <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1420.023>. PMID: 18375592
8. Zorov D.B., Juhaszova M., Yaniv Y., Nuss H.B., Wang S., Sollott S.J. Regulation and pharmacology of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovascular Research*. 2009; 83 (2): 213–225. <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvp151>. PMID: 19447775

- стетическое пре кондиционирование миокарда севофлураном в эксперименте. *Общая реаниматология*. 2013; 9 (4): 30–35. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2013-4-30>
10. Kawai K., Nitecka L., Ruetzler C.A., Nagashima G., Joó F., Mies G., Nowak T.S. Jr., Saito N., Lohr J.M., Klatzo I. Global cerebral ischemia associated with cardiac arrest in the rat: I. Dynamics of early neuronal changes. *J. Cereb. Blood Flow Met.* 1992; 12 (2): 238–249. <http://dx.doi.org/10.1038/jcbfm.1992.34>. PMID: 1548296
  11. Корпачев В.Г., Лысенков С.П., Тель Л.З. Моделирование клинической смерти и постреанимационной болезни у крыс. *Патол. физиол. и экперим. терапия*. 1982; 3: 78–80. PMID: 7208119
  12. Hunter D.R., Haworth R.A. The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. *Arch. Biochem. Biophys.* 1979; 195 (2): 453–459. PMID: 383019
  13. Griffiths E.J., Halestrap A.P. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem. J.* 1995; 307 (Pt 1): 93–98. <http://dx.doi.org/10.1042/bj3070093>. PMID: 7717999
  14. Kroemer G., Dallaporta B., Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu. Rev. Physiol.* 1998; 60: 619–642. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.physiol.60.1.619>. PMID: 9558479
  15. Juhaszova M., Zorov D.B., Kim S.-H., Pepe S., Fu Q., Fishbein K.W., Ziman B.D., Wang S., Ytrehus K., Antos C.L., Olson E.N., Sollott S.J. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J. Clin. Invest.* 2004; 113 (11): 1535–1549. PMID: 15173880
  16. Шевченко Ю.Л., Гороховатский Ю.И., Азизова О.А., Гудымович В.Г. Севофлуран в кардиохирургии. *Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия*. 2009; 2 (2): 58–65.
  17. Juhaszova M., Zorov D.B., Yaniv Y., Nuss H.B., Wang S., Sollott S.J. Role of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in cardioprotection. *Circ. Res.* 2009; 104 (11): 1240–1252. <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESA-NA.109.197996>. PMID: 19498210
9. Borisov K.Yu., Moroz V.V., Grebenchikov O.A., Plotnikov E.Yu., Levikov D.I., Cherpakov R.A., Likhvantsev V.V. Vliyanie propofola na anesteticheskoe pre konditsionirovanie miokarda sevo fluranom na eksperimente. *Obshchaya Reanimatologiya*. [Effect of propofol on sevoflurane-induced myocardial preconditioning in the experiment. *General Reanimatology*]. 2013; 9 (4): 30–35. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2013-4-30>. [In Russ.]
10. Kawai K., Nitecka L., Ruetzler C.A., Nagashima G., Joó F., Mies G., Nowak T.S. Jr., Saito N., Lohr J.M., Klatzo I. Global cerebral ischemia associated with cardiac arrest in the rat: I. Dynamics of early neuronal changes. *J. Cereb. Blood Flow Met.* 1992; 12 (2): 238–249. <http://dx.doi.org/10.1038/jcbfm.1992.34>. PMID: 1548296
  11. Корпачев В.Г., Лысенков С.П., Тель Л.З. Моделирование клинической смерти и постреанимационной болезни у крыс. [Modeling clinical death and postresuscitation disease in rats]. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimentalnaya Terapiya*. 1982; 3: 78–80. PMID: 7122145. [In Russ.]
  12. Hunter D.R., Haworth R.A. The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. *Arch. Biochem. Biophys.* 1979; 195 (2): 453–459. PMID: 383019
  13. Griffiths E.J., Halestrap A.P. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem. J.* 1995; 307 (Pt 1): 93–98. <http://dx.doi.org/10.1042/bj3070093>. PMID: 7717999
  14. Kroemer G., Dallaporta B., Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu. Rev. Physiol.* 1998; 60: 619–642. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.physiol.60.1.619>. PMID: 9558479
  15. Juhaszova M., Zorov D.B., Kim S.-H., Pepe S., Fu Q., Fishbein K.W., Ziman B.D., Wang S., Ytrehus K., Antos C.L., Olson E.N., Sollott S.J. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J. Clin. Invest.* 2004; 113 (11): 1535–1549. PMID: 15173880
  16. Shevchenko Yu.L., Gorokhovatsky Yu.I., Azizova O.A., Gudymovich V.G. Sevofluran v kardiokhirurgii. [Sevoflurane in cardiac surgery]. *Kardiologiya i Serdechno-Sosudistaya Khirurgiya*. 2009; 2 (2): 58–65. [In Russ.]
  17. Juhaszova M., Zorov D.B., Yaniv Y., Nuss H.B., Wang S., Sollott S.J. Role of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in cardioprotection. *Circ. Res.* 2009; 104 (11): 1240–1252. <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESA-NA.109.197996>. PMID: 19498210

Поступила 16.04.16

Received 16.04.16

## ОБЩАЯ РЕАНИМАТОЛОГИЯ

Научно-практический журнал «Общая реаниматология»,  
входящий в перечень ВАК РФ, предназначен для врачей анестезиологов-реаниматологов  
и научных сотрудников.

**Тематика журнала:** патогенез, клиника, диагностика, лечение, профилактика и патологическая анатомия критических, терминальных и постреанимационных состояний. Вопросы оказания догоспитальной помощи при критических состояниях. Вопросы обучения населения и медицинского персонала приемам оказания неотложной помощи при критических состояниях.

**Аудитория:** лечебные учреждения; высшие учебные заведения медицинского профиля; медицинские учреждения последиplomного образования, Федеральные и региональные органы управления здравоохранением, медицинские научно-исследовательские институты; медицинские библиотеки.

## ПОДПИСКА

В любом почтовом отделении связи по каталогу «Роспечать»

- индекс 46338 — для индивидуальных подписчиков
- индекс 46339 — для предприятий и организаций