

ФИЗИОЛОГИЯ

УДК 612.275; 615.275.4; 615.217.22

Д. П. ТОКАЛЬЧИК

**НЕЙРОПРОТЕКТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ КЛОНИДИНА У КРЫС
В МОДЕЛИ ОСТРОЙ ГИПОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ**

Государственное научное учреждение «Институт физиологии Национальной академии наук Беларусь», г. Минск, Республика Беларусь

Помимо широко используемого антигипертензивного действия альфа2-адреномиметика клонидина, существуют данные о его перспективном использовании в качестве антигипоксического средства. Эксперименты по моделированию острой гипобарической гипоксии, проведенные на крысах линии Вистар, позволяют предположить, что предварительное внутрибрюшинное введение клонидина обладает нейропротективными свойствами и уменьшает проявление отдаленных последствий гипоксии в реализации ориентировочно-двигательных реакций.

Ключевые слова: клонидин, адренорецепторы, гипоксия, нейропротекторы, приподнятый крестообразный лабиринт.

Введение. Альфа2-адреномиметик клонидин наиболее известен как антигипертензивный препарат, однако показана его эффективность в терапии хронической боли [1], абстинентного синдрома [2], повышенной тревожности [3]. Также клонидин нашел широкое применение в анестезиологии [4]. В экспериментальных условиях продемонстрировано его антигипоксическое и нейропротективное действие. К эффектам внутрибрюшинных инъекций клонидина приписываются восстановление нарушенных когнитивных функций, памяти и обучения, связанных с церебральной гипоперфузией у крыс [5]. В отличие от других альфа2-адреномиметиков, например, дексмедетомидина, клонидин обладает пролонгированным действием, способен снижать уровень глутамата и катехоламинов в отделах переднего мозга [6, 7]. При церебральной ишемии введение клонидина сопровождается уменьшением объема инфаркта [8], в то время как дексмедетомидин способствует снижению проявления неврологических последствий только при совместном введении с лидокаином [9, 10].

Существует ряд свидетельств участия норадренергических структур головного мозга в нейрохимических процессах, сопровождающих ишемию. Например, активация пре- и постсинаптических альфа2-адренорецепторов снижает синаптическую нейротрансмиссию и чувствительность глутаматных рецепторов в восприимчивых к ишемии пирамидальных нейронах CA1 и CA3 областей гиппокампа [11] и нейронах коры головного мозга [12]. Предполагают, что основным механизмом первичного нейропротекторного действия антигипоксических препаратов является прерывание патологического каскада биохимических реакций, ведущему к избыточному выбросу глутамата и неконтролируемому поступлению внеклеточного Ca^{2+} , путем запуска тормозных процессов [13]. Тем не менее, в некоторых случаях активация альфа2-адренорецепторов, которая приводила к снижению неврологического дефицита, не сопровождалась изменениями концентрации глутамата и норадреналина [10]. Нейропротективные эффекты в различных исследованиях наблюдали как при активации [14], так и блокаде альфа2-адренорецепторов (например, изадоксаном) [15].

В большинстве опубликованных исследований изучали нейропротективные свойства клонидина в процессе восстановления снабжения тканей кислородом, после гипоксического воздействия. Однако антигипоксанты могут использоваться не только в качестве экстренной терапии кислородной недостаточности, но и в качестве профилактического средства. Так, клонидин уже нашел применение в качестве адаптогена в радиационной медицине: показана его способность к снижению напряжения кислорода в органах кроветворения и их острого

лучевого поражения [16]. Предварительное введение клонидина характеризуется антиоксидантным влиянием. В модели геморрагического шока у крыс клонидин уменьшал образование гидропероксидов (LOOH) и супероксид-аниона (O_2^-), а также снижал уровень эндотоксемии [17]. Хроническое пероральное введение клонидина снижало концентрацию ряда маркеров окислительного стресса в сердце крыс – производных тиобарбитуровой кислоты и белковых карбонильных групп (PCO) [18]. Также клонидин усиливает активность регуляторных ферментов цикла Кребса в митохондриях постсинаптических окончаний [19]. Одним из возможных антиоксидантных механизмов может быть замедление апоптоза путем активации сигнального пути Nrf2/гем-оксигеназы-1 и ингибированием ядерного фактора-кВ (NF-кВ) [20].

Целью данной работы явилось установить профилактическую эффективность клонидина в предотвращении развития негативных эффектов острой гипобарической гипоксии на ориентированно-двигательные реакции крыс.

Материалы и методы исследования. Для моделирования сдвига газового гомеостаза создавали гипобарическую гипоксию. В данной модели имитируют подъем на большую высоту путем снижения барометрического давления в герметичной барокамере (гипоксикаторе). В зависимости от интенсивности гипобарического воздействия можно моделировать как физиологические, так и патофизиологические сдвиги гомеостаза. Имитация подъема на высоту до 5000 м (барометрическое давление 360 мм рт. ст.) приводит к развитию эффекта прекондиционирования и повышению устойчивости организма к пониженному уровню содержания кислорода, без которого моделирование экстремального подъема (5000–10000 м и выше) сопровождается необратимыми патологическими изменениями и частичной летальностью [21]. Методика неинвазивна, позволяет легко дозировать воздействие и получила широкое применение в экспериментальной практике. Количество медицинских и биологических публикаций в базе данных PubMed по запросу «hypobaric hypoxia» предоставляет около 200 публикаций за 2024 год, количество работ по теме из года в год растет экспоненциально.

Эксперименты проводили на крысах-самцах линии Вистар ($n = 22$, $m = 280 \pm 20$ г). Животных содержали в стандартных условиях вивария в соответствии с нормами содержания лабораторных животных, 12/12-часовом ритме освещения и темноты. Доступ к еде и воде не ограничен. В течение недели до начала эксперимента осуществляли ежедневное наблюдение и хендлинг крыс в виварии, контроль общего состояния животных по внешнему виду кожных покровов и слизистых оболочек, грумингу, питьевому поведению и т.п. Всех животных случайным образом разделили на 3 группы:

- «Контроль» ($n = 7$) – животные с внутрибрюшинным введением апирогенного физиологического раствора (АФР) в объеме 1 мл/кг;
- «Гипоксия» ($n = 7$) – животные с внутрибрюшинным введением АФР (1 мл/кг), которые подверглись гипобарической гипоксии;
- «Гипоксия + клонидин» ($n = 8$) – животные с внутрибрюшинным введением раствора клонидина (30 мкг/кг, 1 мл/кг), которые подверглись гипобарической гипоксии.

Внутрибрюшинное введение субстанций осуществляли за 30 минут до предъявления гипоксического стимула. Для пилотного исследования была выбрана доза клонидина 30 мкг/кг, что в 2 раза превышает рекомендуемую терапевтическую дозу для пациентов [22] и является приблизительно средней среди используемых на крысах в литературных источниках [5, 6]. Предварительную адаптацию животных к барокамере и прекондиционирование не производили. При моделировании кратковременной гипоксии руководствовались методическими рекомендациями [23]. Крысу помещали в гипоксикатор объемом 2 л на 5 мин и с применением декомпрессора в течение 20 с снижали барометрическое давление до 432 мм рт. ст., что соответствует парциальному давлению кислорода $pO_2 = 90$ мм рт. ст. (условный подъем на высоту 4500 м над уровнем моря) [24]. Для измерения давления разреженных газов использовали вакуумметр (100 кПа, Россия). С целью исключения влияния гиперкапнии CO_2 адсорбировали с помощью химического поглотителя $Ca(OH)_2$ 96 % и $NaOH$ 4%.

Наиболее чувствительными к нехватке кислорода являются нейроны переднего мозга и, в частности, гиппокампа. Для изучения таких функций гиппокампа как пространственное ориентирование, исследовательское поведение в незнакомой среде крыс использовали тест «Приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ, Elevated plus-maze test, Stoelting, США). Лабиринт представляет собой четыре перпендикулярно расположенные площадки размером 50 × 10 см, соединенные в форме креста. Две из них огорожены стенками высотой 30 см, две другие открыты. Конструкция установлена в экспериментальном помещении на высоте 50 см над уровнем пола. Ориентировочно-двигательные реакции экспериментальных животных фиксировали при помощи видеокамеры, закрепленной над лабиринтом. Регистрацию параметров ориентировочно-двигательных реакций проводили с помощью компьютерной программы для визуализации поведения животных (ANY-maze Video Tracking System software, Stoelting, США) [25]. Тестиование в ПКЛ проводили на следующие сутки (через 14 часов после моделирования гипоксии) для снижения влияния стрессового фактора от проведения процедуры и седативного эффекта инъекции клонидина на поведение экспериментальных животных. Длительность тестирования одной крысы в лабиринте составляла 5 мин.

Статистическую значимость полученных результатов для зависимых выборок оценивали при помощи критерия Уилкоксона для непараметрических выборок и представляли в виде Me [25 %; 75 %]. Различия считали значимыми при уровне достоверности $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. В таблице 1 отражены основные параметры ориентировочно-двигательных реакций, которые оценивали в эксперименте *in vivo* на крысах линии Вистар ($n = 22$).

Таблица 1. Особенности ориентировочно-двигательных реакций крыс линии Вистар после кратковременной гипобарической гипоксии и в сочетании с внутрибрюшинной инъекцией клонидина в дозировке 30 мкг/кг

Измеряемые параметры	«Контроль» (Me [LQ; UQ])	«Гипоксия» (Me [LQ; UQ])	«Гипоксия + клонидин» (Me [LQ; UQ])
Дистанция, м	6,84 [6,08; 7,38]	6,71 [5,69; 7,24]	8,67 [6,51; 9,17]
Средняя скорость, м/с	0,023 [0,021; 0,025]	0,022 [0,019; 0,024]	0,026 [0,021; 0,031]
Время подвижности, с	100,10 [93,35; 134,10]	90,90 [76,95; 98,15] ↓*	101,75 [87,13; 121,00]
Время активности, с	133,40 [127,75; 158,60]	129,10 [113,50; 134,95]	132,40 [108,50; 147,25]
Время замирания, с	31,90 [25,55; 41,30]	66,00 [55,40; 79,70] ↓*	35,05 [27,68; 61,95]
Время вертикализации, с	20,70 [19,25; 39,25]	25,60 [15,45; 32,70]	19,15 [12,85; 21,45]
Время груминга, с	14,50 [5,40; 26,20]	17,50 [10,95; 20,35]	7,90 [3,45; 8,85]
Время в закрытых рукавах, с	252,60 [218,65; 267,80]	226,90 [204,55; 237,35]	214,90 [203,70; 231,48]
Дистанция в закрытых рукавах, м	6,24 [5,03; 6,38]	5,65 [4,96; 6,16]	6,42 [5,39; 7,71]

Примечание: Статистически значимые ($p < 0,05$) отличия в сравнении с контрольной группой обозначены (*)

Сразу после извлечения из гипоксикатора у животных визуально наблюдали акроцианоз, снижение подвижности, учащение дыхания. Через 14 часов после острой гипобарической гипоксии у крыс линии Вистар в teste «Приподнятый крестообразный лабиринт» наблюдали статистически значимое снижение времени подвижности в среднем на 10 % ($p < 0,05$) и увеличение времени замирания в среднем на 107 % ($p < 0,05$). В то же время показатели ориентировочно-двигательных реакций в группе крыс после предварительного введения

клонидина и последующей гипоксии не отличались от контрольных животных. Таким образом, предварительное введение клонидина животным из группы «Гипоксия + клонидин» сопровождается минимизацией последствий острой гипобарической гипоксии, проявляющихся в изменении ориентировочно-двигательных реакций в teste ПКЛ через 14 часов.

Полученные результаты коррелируют с данными, полученными ранее *in vitro* на срезах гиппокампа, где на фоне введения клонидина в перфузационный раствор наблюдалось скорейшее восстановление амплитуд вызванных ответов возбуждающего постсинаптического потенциала по сравнению с введением альфа2-адреноблокатора йохимбина или АФР [26]. При этом, по данным литературы [27], предварительные инъекции клонидина не сопровождаются нейропротективным эффектом при хронической перевязке сонных артерий крыс, что может свидетельствовать об ограниченном, краткосрочном влиянием на транзиторные нарушения. Примедикация антагонистами альфа2-адренорецепторов (йохимбином), напротив, усугубляют восстановление и повышают смертность в экспериментальных группах.

Помимо предполагаемых нейропротекторных свойств, клонидин также обладает анксиолитическим действием [22]. Альтернативно, повышение времени замирания может рассматриваться как результат стресса от процедуры моделирования гипоксии, в то время как введение клонидина нивелировало бы избыточную стрессовую реакцию. Однако другие параметры, указывающие на повышенный уровень тревожности (нарушение длительности груминга и времени, проведенного в закрытых и открытых секторах) не изменились достоверно. Многократное моделирование гипоксии с целью приучить животных к процедуре и снизить влияние стрессового фактора привело бы к развитию эффекта прекондиционирования и изменению физиологической реакции на перепад атмосферного давления. Изученные эффекты действия клонидина на крысах ограничены продолжительностью в 2–3 часа, период полуыведения препарата из головного мозга составляет 40–50 минут [28]. Следовательно, анксиолитический эффект клонидина через 14 часов после введения был минимален. Тем не менее, для увереной интерпретации полученных данных следует расширить выборку и сравнить результаты с эффектами других доз клонидина, а также иных зарекомендовавших себя нейропротективных препаратов, а выводы, полученные в данном исследовании, считать предварительными.

Заключение. Зафиксировано антигипоксическое влияние внутрибрюшинной инъекции клонидина в дозе 30 мкг/кг, проявляющееся в нивелировании изменений, вызванных острой гипобарической гипоксией, которые проявляются в отсроченном периоде (через 14 часов). Механизм защитного действия клонидина по-прежнему требует пристального изучения. Существуют данные его влияния не только на концентрации других нейромедиаторов, но и на уровень окислительного стресса и регуляцию апоптоза в головном мозге. Полученные результаты дают возможность рассматривать клонидин в качестве нейропротектора для предупреждения развития нейрональных нарушений, вызванных острой экзогенной гипоксией *in vivo*.

Литература:

- [1]. Kumar A., Maitra S., Khanna P. Clonidine for management of chronic pain: A brief review of the current evidences // Saudi J Anaesth. 2014. Vol. 8. № 1. P. 92–96.
- [2]. Streetz V.N., Gildon B.L., Thompson D.F. Role of Clonidine in Neonatal Abstinence Syndrome: A Systematic Review // Ann Pharmacother. 2016. Vol. 50 № 4. P. 301–310.
- [3]. Ye L., Lippmann S. Reduction of anxiety after treatment with transdermal clonidine // Am J Health Syst Pharm. 2018. Vol. 75. № 11. P. 742–744.
- [4]. Munoz M.C.S., De Kock M., Forget P. What is the place of clonidine in anesthesia? Systematic review and meta-analyses of randomized controlled trials // J Clin Anesth. 2017. Vol. 38. P. 140–153.
- [5]. Li Y., Yu M., Zhao B. et al. Clonidine preconditioning improved cerebral ischemia-induced learning and memory deficits in rats via ERK1/2–CREB/ NF-κB–NR2B pathway // Eur J Pharmacol. 2018. Vol. 818. P. 167–173.

- [6]. Jellish W.S., Murdoch J., Kindel G. et al. The effect of clonidine on cell survival, glutamate, and aspartate release in normo- and hyperglycemic rats after near complete forebrain ischemia // *Exp Brain Res.* 2005. Vol. 167. № 4. P. 526–534.
- [7]. Miyazaki M., Nazarali A.J., Boisvert D.P. et al. Inhibition of ischemia-induced brain catecholamine alterations by clonidine // *Brain Res Bull.* 1989. Vol. 22. № 2. P. 207–211.
- [8]. Li Y., Zhang X., Wang Y. et al. Clonidine preconditioning alleviated focal cerebral ischemic insult in rats via up-regulating p-NMDAR1 and down-regulating NMDAR2A / p-NMDAR2B // *European Journal of Pharmacology.* 2016. Vol. 793. P. 89–94.
- [9]. Karlsson B.R., Löberg E.M., Steen P.A. Dexmedetomidine, a potent alpha 2-agonist, does not affect neuronal damage following severe forebrain ischaemia in the rat // *Eur J Anaesthesiol.* 1995. Vol. 12. № 3. P. 281–285.
- [10]. Goyagi T., Nishikawa T., Tobe Y., Masaki Y. The combined neuroprotective effects of lidocaine and dexmedetomidine after transient forebrain ischemia in rats // *Acta Anaesthesiol Scand.* 2009. Vol. 53. № 9. P. 1176–1183.
- [11]. Madison D.V., Nicoll R.A. Actions of noradrenaline recorded intracellularly in rat hippocampal pyramidal neurons, *in vitro* // *J. Physiol.* 1986. Vol. 372. P. 221–244.
- [12]. Dodt H.U., Pawelzik H., Ziegler H. Actions of noradrenaline on neocortical neurons *in vitro* // *Bruin Res.* 1991. Vol. 545. № 1-2. P. 307–311.
- [13]. Муравьева В.Ю. Церебропротекторные свойства новых производных циклических гуанидинов ингибиторов Na^+/H^+ обмена : дис. ... канд. мед. наук : 14.03.06 / В.Ю. Муравьева ; Волгоград, 2016. – 204 с.
- [14]. Laudenbach V., Mantz J., Lagercrantz H., et al. Effects of alpha(2)-adrenoceptor agonists on perinatal excitotoxic brain injury: comparison of clonidine and dexmedetomidine // *Anesthesiology.* 2002. Vol. 96. № 1. P. 134–141.
- [15]. Gustafson I., Miyauchi Y., Wieloch T.W. Postischemic Administration of idazoxan, an a-2 adrenergic receptor antagonist, decreases neuronal damage in the rat brain // *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism.* 1989. Vol. 9. P. 171–174.
- [16]. Студенцов Е.П., Рами С.М., Казурова Н.Г. и др. Адаптогены и родственные группы лекарственных препаратов – 50 лет поисков // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2013. Т. 11. С. 3–43.
- [17]. Filos K.S., Panteli E.S., Fligou F. et al. Clonidine pre-treatment prevents hemorrhagic shock-induced endotoxemia and oxidative stress in the gut, liver, and lungs of the rat // *Redox Report.* 2012. Vol. 17. № 6. P. 246–251.
- [18]. Syamimi N., Yusoff N., Zulkarnain M. et al. Effect of Clonidine (an Antihypertensive Drug) Treatment on Oxidative Stress Markers in the Heart of Spontaneously Hypertensive Rats // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* Vol. 2013. Article ID 927214, 7 p.
- [19]. Villa R.F., Gorini A., Ferrari F. Clonidine and Brain Mitochondrial Energy Metabolism: Pharmacodynamic Insights Beyond Receptor Effects // *Neurochem Res.* 2022. Vol. 47. P. 1429–1441.
- [20]. Su D., Gao H., He M. et al. The alpha2-adrenoceptor agonist clonidine protects against hypoxic-ischemic brain damage in neonatal mice through the Nrf2/NF-κB signaling pathway // *Immunology Letters.* 2024. Vol 270. P. 106928.
- [21]. Семенов Д.Г., Беляков А.В., Рыбникова Е.А. Экспериментальное моделирование повреждающей и протективной гипоксии мозга млекопитающих // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2022. Т. 108. № 12. С. 1592–1609.
- [22]. Клонидин (Clonidinum) описание // Регистр лекарственных средств России. URL: <https://www.rlsnet.ru/active-substance/klonidin-184>.
- [23]. Lukyanova L.D. (ed.). Metodicheskie rekomendatsii po eksperimental'nomu izucheniyu preparatov, predlagayemykh dlya klinicheskogo izucheniya v kachestve antogipoksicheskikh sredstv [Methodological recommendations for the experimental study of drugs proposed for clinical study as antihypoxic agents]. Moscow. 1990. 18 p.
- [24]. Gainutdinov Kh., Pashkevich S., Andrianov V. et al. Participation of NO-synthase in control of nitric oxide level in rat hippocampus after modeling of ischemic and hemorrhagic insult // *BioDiscovery.* 2018. Vol. 20. P.e14810.
- [25]. ANY-Maze // Elevated Plus-maze. URL: <https://www.any-maze.com/applications/elevated-plus-maze> (date of access: 08.04.2025).

- [26]. Токальчик Д.П. Кратковременная синаптическая пластичность CA1 области гиппокампа при активации или блокаде альфа2-адренорецепторов условиях моделирования гипоксии // Новости медико-биологических наук. 2023. Т. 23. № 1. С. 11–18.
- [27]. Yuan S.-Z., Runold M., Hagberg H. et al. Hypoxic-ischaemic brain damage in immature rats: effects of adrenoceptor modulation // European Journal of Paediatric Neurology. 2001. Vol. 5. № 1. P. 29–35.
- [28]. Conway E.L., Jarrott B. Clonidine distribution in the rat: temporal relationship between tissue levels and blood pressure response // Br. J. Pharmac. 1980. Vol. 71. P. 473–478.

D. P. TOKALCHIK

NEUROPROTECTIVE POTENTIAL OF CLONIDINE IN RATS IN A MODEL OF ACUTE HYPOBARIC HYPOXIA

*State Scientific Institution “Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus”,
Minsk, Republic of Belarus*

Summary

In addition to the widely used antihypertensive effect of alpha2-adrenomimetic clonidine, there are evidences of its promising use as an antihypoxic agent. Experiments on modeling acute hypobaric hypoxia, conducted on Wistar rats, suggest that preliminary intraperitoneal administration of clonidine has neuroprotective properties and minimise the development of remote consequences of hypoxia in the implementation of orientation-motor reactions.

Keywords: clonidine, adrenoreceptors, hypoxia, adaptogens, elevated plus maze.