УДК 616.831-07:577.11/.12]:616.831-005.4-036.3/.8]-092.9

С. В. Павлов, І. Ф. Бєленічев

ВМІСТ СТРЕС-БІЛКА HSP70 І МАРКЕРІВ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ В ГОЛОВНОМУ МОЗКУ ЩУРІВ НА РІЗНИХ ТЕРМІНАХ ЦЕРЕБРАЛЬНОЇ ІШЕМІЇ

Запорізький державний медичний університет, Запоріжжя, Україна

УДК 616.831-07:577.11/.12]:616.831-005.4-036.3/.8]-092.9
С. В. Павлов, И. Ф. Беленичев
СОДЕРЖАНИЕ СТРЕСС-БЕЛКА HSP70 И МАРКЕРОВ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС В РАЗНЫЕ СРОКИ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ
Запорожский государственный медицинский университет, Запорожье, Украина
Рассмотрена динамика изменений в тканях головного мозга маркеров окислительного повреждения белков — нитротирозина (НТЗ); нуклеиновых кислот — оксигидроксигуанина (OHG), а также цитопротекторного стресс-белка HSP70. Экспериментальными исследованиями установлено, что моделирование церебральной ишемии приводит к активации свободнорадикального окисления с последующим накоплением цито- и геномотоксичных маркеров окислительной деструкции молекул — НТЗ и OHG. Установленные нами изменения концентрации HSP70 белков в головном мозге обусловливают перспективность и актуальность поиска новых высокоэффективных средств нейропротекции среди лекарственных препаратов, способных влиять на синтез и экспрессию HSP70.
Ключевые слова: церебральная ишемия, нитротирозин, оксигидроксигуанин, HSP70.

UDC 616.831-07:577.11/.12]:616.831-005.4-036.3/.8]-092.9
S. V. Pavlov, I. F. Belenichev
LEVEL OF THE STRESS-PROTEIN HSP70 AND OXIDATIVE STRESS MARKERS IN THE RAT'S BRAIN AT DIFFERENT TERMS OF THE CEREBRAL ISCHEMIA
The Zaporizhzhya State Medical University, Zaporizhzhya, Ukraine
Brain destructive and degenerative disorders lead not only to the life long decrease, but limit social activity due to the occurrence of the cognitive deficiency.

Experimental and clinical studies showed that brain ischemia follows by occurrence of the active oxygen forms and decrease of the energetic sources. There is a wide spread theory about protective role of the HSP70 in the ischemic damage of the central nervous system due to the activation of the free radicals.

Aim of our work was to study dynamic changes of the oxidative damage markers (nitrotyrosine, oxyhydroxyguanin) in the brain tissue with the parallel study of the HSP70 level.

Materials and methods. Concentration of the HSP70 in the hyppocampus was detected by Western-blot analysis, nitrotyrosine — by immunoassay test, oxyhydroxyguanin — by specrofotometry.

Results. Experimental tests showed that modeling of the brain ischemia leads to the start of the biochemical reactions cascade in the brain tissue with gradual increase of the cell oxidative damage markers — nitrotyrosine, oxyhydroxyguanin. On the other hand, as the answer to the oxidative stress, compensative increase of the citoprotective protein HSP70 was detected. But later HSP70 level much decreases. We suggest that this paradox has connection with weakness of the compensative abilities of the organism. Described changes in the HSP70 protein level in the brain detect perspectiveness and actuality of the new high effective methods of the neuroprotection search between medical drugs that are able to change synthesis and expression of HSP70.
Key words: cerebral ischemia, nitrotyrosine, oxyhydroxyguanin, HSP70.

Вступ

Розлади мозкового кровообігу — одна з основних причин летальності та стійкої втрати працездатності — є важливою медико-соціальною проблемою. Як відзначають експерти Всесвітньої організації охорони здоров'я, церебральні ішемії за поширеністю посідають третє місце серед причин смертності у країнах СНД, поступаючись лише захворюванням серцево-судиної системи та злоякісним новоутворенням [1]. Деструктивні та дегенеративні захворювання головного мозку призводять не тільки до зменшення тривалості життя, але й обмежують

соціальну активність людини внаслідок розвитку когнітивного дефіциту [1; 2]. Багатьма експериментальними та клінічними дослідженнями встановлено, що ішемія головного мозку супроводжується виснаженням енергетичних ресурсів; ексайтотоксичністю й утворенням активних форм кисню (АФК), що пов'язано із втратою електронів, нагромаджених у проміжних ділянках дихального ланцюга. Одночасно розвивається інтенсифікація процесів вільнорадикального окиснення (ВРО) й ушкодження АФК білків, нуклеїнових кислот, ліпідів. Некерована та некомпенсована активація процесів ВРО, виснаження ендогенних антиоксидантів і порушення регуляторних механізмів антиоксидантного захисту розглядаються як ключові ланки ушкодження нейрональних клітин в умовах ішемії [3–5].

Крім того, у сучасній літературі широко обговорюється захисна дія стрес-білка HSP70 при ішемічних ушкодженнях головного мозку на тлі активації процесів ВРО. Білки HSP (heat shock proteins) вперше були виявлені у клітинах в умовах термічного стресу. У подальшому було встановлено, що при різних видах стресу різко підвищується синтез HSP, які в умовах норми практично не виявляються [6–7]. Підвищення експресії та нейропротекторна дія HSP70 виявлені в умовах глутаматної нейротоксичності, при депривації кисню, глюкози. Експериментальними дослідженнями була встановлена здатність HSP70 взаємодіяти з лігандною частиною мембрани й ініціювати фолдинг окисно-модифікованих функціонально активних макромолекул [8; 9]. Однак сьогодні ці дані не систематизовані, експериментальні дослідження проводилися переважно на моделях *in vitro.*

Метою нашого дослідження було вивчення динамічних змін вмісту маркерних продуктів окисного ушкодження молекул у тканинах головного мозку з паралельним дослідженням концентрації HSP70-білків.

Матеріали та методи дослідження

Порушення мозкового кровообігу моделювали шляхом двобічного перев'язування сонної артерії у лабораторних щурів масою 200–250 г [10]. Тварин утримували на стандартному раціоні харчування віварію при природній зміні дня та ночі. Усі експериментальні процедури здійснювали відповідно до «Положення про використання тварин у біомедичних дослідженнях» [11]. Вміст у гіпокампі HSP70 визначали за допомогою Вестерн-блот аналізу в такі терміни ішемії: 7 год, 1 доба, 4 доби, 7 діб. Тканину гомогенізували у буфері (50 мМ Tris-HCl, 5 мМ EDTA, 1 мМ DTT, 1 % розчин Triton X-100), pH 7,5 при температурі 4 °С у співвідношенні 1 : 6 тканина/буфер. Після центрифугування при 13 000 об/хв і 4 °С з пробірки вилучали супернатант з білками цитозолю й аналізували з використанням електрофорезу та блотингу. Білки розділяли у 10 % поліакриламідному гелі (ПААГ). Перенесення білків з ПААГ до мембрани PVDF здійснювали електроелюцією протягом 45 хв. Преінкубацію Вестерн-блотів проводили у розчині TBST (з додаванням 1 % розчин Tween-200) протягом 1 год. Після цього блоти інкубували з первинними моноклональними антитілами (Santa Cruz Biotechnology) проти HSP70 у розведенні 1 : 1000 протягом 1 год. Після промивання блоти інкубували із вторинними антитілами (Santa Cruz Biotechnology), кон'югованими з пероксидазою хрону (1 : 2000) протягом 1 год. Детекцію HSP70-білків здійснювали за допомогою сенситометричного аналізу у програмі Adobe Photoshop [10]. Інтенсивність і напруженість процесів ВРО визначали за концентрацією маркера окисного ушкодження білків — нітротирозину (НТЗ), який досліджували імуноферментним методом [10], і маркера ушкодження нуклеїнових кислот — оксигідроксигуаніну (OHG), визначеного шляхом спектрофотометрії [10].

Статистичну обробку результатів проводили з використанням програми "STATISTICA® for Windows 6.0" (StatSoft Inc., N AXXR712D833214FAN5). Вірогідність відмінностей визначали з допомогою t-критерію Стьюдента [12].

Результати дослідження та їх обговорення

Проведеними біохімічними дослідженнями вмісту маркерних продуктів оксидативного стресу (НТЗ та OHG) у тканинах головного мозку встановлено, що, починаючи вже з 7-ї години церебральної ішемії, відбувалося нагромадження НТЗ та OHG, максимум якого було зареєстровано на 7-му добу експериментальних досліджень (підвищення НТЗ більше ніж на 87 %, OHG — на 80 % відносно інтактної групи тварин) (рис. 1). На думку бага-

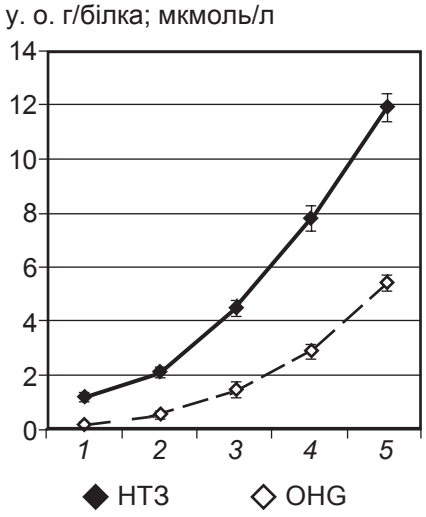

Рис. 1. Динаміка вмісту нітротирозину й оксигідроксигуаніну в тканинах головного мозку щурів на різних термінах церебральної ішемії: *1* — інтактні тварини; *2* — ішемія, 7-ма година; *3* — ішемія, 1-ша доба; *4* — ішемія, 4-та доба; *5* — ішемія, 7-ма доба

тьох дослідників, НТЗ є специфічним маркером окисного стресу головного мозку. Окисна модифікація функціонально активних білкових молекул призводить до порушення здатності мембран генерувати, проводити й утворювати нервовий імпульс [2; 4; 5]. Важливо відмітити, що головний мозок найбільш чутливий до окисного стресу. В умовах ішемічного ушкодження тканин головного мозку антиоксидантна рівновага зміщується у бік прооксидантної. Виникає нагромадження маркерних продуктів окисної деградації білків, а саме: НТЗ, гідропероксидів жирних кислот, малонового діальдегіду, що призводить до загибелі нейрональної клітини. Паралельно з цим окисне ушкодження нуклеїнових кислот спричинює порушення відповіді геному на ішемію, а саме пригнічення експресії генів, відповідальних за синтез ключових ензимів антиоксидантного захисту — каталази, супероксиддисмутази [1–3]. Крім того, змінюється характер експресії так званих генів раннього реагування — c-fos, внаслідок чого запускаються процеси клітинної загибелі, що було більш детально показано нашими попередніми дослідженнями [3; 13].

Одночасно з цим змінювався характер експресії HSP70, що відбивалося різноспрямованою динамікою концентрації HSP70-білка у різні терміни ішемії. Так, на 7-му годину ішемії спостерігалося статистично вірогідне підвищення концентрації досліджуваного білка більше ніж на 28 % стосовно інтактної групи тварин (табл. 1). У подальшому, починаючи з 1-ї доби ішемії, паралельно з нагромадженням НТЗ та ОНG відбувалося суттєве зниження концентрації HSP70: на 1-шу добу — на 40 % відносно інтактної групи тварин, а на 7-му добу досліджень вміст HSP70 був нижчим, ніж у інтактній групі, більш як на 90 % (див. табл. 1).

Таблиця 1

Концентрація HSP70-білка в тканинах головного мозку щурів на різних термінах ішемії, у. о., M±m

Група тварин	Площа HSP70⁺-забарвленого комплексу	Оптична концентрація HSP70⁺-забарвленого комплексу
Інтактні тварини	58,40±1,35	0,340±0,036
Ішемія		
7-ма година	81,50±3,45*	0,910±0,074*
1-ша доба	34,50±1,44**	0,110±0,048**
4-та доба	18,50±1,11**	0,085±0,028**
7-ма доба	6,10±0,34**	0,041±0,002**

Примітка. * — p≤0,05 щодо інтактних тварин; ** — p≤0,05 щодо інтактних тварин і щурів з ішемією протягом 7 год.

Підвищення концентрації HSP70-білків на 7-му годину ішемії пов'язане, на нашу думку, з розвитком компенсаторної реакції організму у відповідь на ішемію і, як наслідок, підвищення синтезу цитопротекторних HSP-білків. Відомо, що більшість захисних функцій HSP пов'язана з їх шаперонною активністю, тобто зі здатністю впізнавати ушкоджені поліпептиди та «виправляти» їхню структуру АТФ-опосередкованим способом або видаляти білки, які не підлягають «виправленню» через протеосомний апарат клітини [14]. У подальшому суттєве падіння концентрації HSP70 відбувається за рахунок розвитку оксидативного та нітрозуючого стресів, зриву компенсаторних можливостей організму. Крім того, під дією АФК окисній модифікації піддаються й самі HSP70-білки, що порушує їх функціональну активність і обмежує протекторні властивості в умовах ішемії. Важливо відмітити, що за рахунок окисної модифікації нуклеїнових кислот, про що свідчить суттєве нагромадження ОНG, відбувається порушення факторів, які відповідають за експресію та синтез білків HSP70 [7; 9; 14].

Таким чином, за результатами проведених експериментальних досліджень встановлено, що моделювання церебральної ішемії призводить до запуску каскаду патобіохімічних реакцій у тканинах головного мозку, спрямованих на активацію ВРО з поступовим нагромадженням цито- та геномотоксичних маркерів окисного ушкодження молекул — НТЗ та ОНG. Паралельно з цим, у відповідь на ішемію та розвиток окисного стресу, спостерігається компенсаторне підвищення цитопротекторного білка HSP70 з подальшим зниженням його вмісту в тканинах головного мозку, викликаним зривом резервно-адаптаційних властивостей організму.

Встановлені нами зміни вмісту HSP70-білків у головному мозку зумовлюють перспективність й актуальність пошуку нових високоефективних засобів нейропротекції серед лікарських засобів, здатних впливати на синтез та експресію HSP70 або підвищувати стійкість HSP70-білків до окисного стресу в умовах церебральної ішемії.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Верещагин Н. В.* Инсульт. Принципы диагностики, лечения и профилактики / Н. В. Верещагин, М. А. Пирадов, З. А. Суслина. – М. : Интермедика, 2002. – 208 с.

2. *Iadecola C.* Mechanisms of cerebral ischemic damage / C. Iadecola // Cerebral ischemia. – New Jersey : Humana Press, 1999. – P. 3–33.

3. *Рациональная* нейропротекция / И. Ф. Беленичев, В. И. Черний, Ю. М. Колесник, С. В. Павлов. – Донецк : Изд. дом Заславский, 2009. – 348 с.

4. *Coca A.* Cerebral involvement in hypertensive cardiovascular disease

/ A. Coca // Eur. Heart J. – 2003. – N 5. – P. 19–25.

5. *Скромец А. А.* Новые возможности нейропротекции в лечении ишемического инсульта / А. А. Скромец, Л. В. Стаховская, А. А. Белкин // Журнал неврологии и психиатрии. – 2008. – Т. 22. – С. 32–38.

6. *Белок* теплового шока (Hsp70) протектирует активность глутаматергической синаптической передачи в обонятельной коре мозга крыс in vitro от тяжелой аноксии / А. А. Мокрушин, Л. И. Павлинова, И. В. Гужова, Б. А. Маргулис // Доклад РАН. – 2004. – Т. 394, № 3. – С. 419–422.

7. *David J. C.* Perinatal expression of heat shock proteins HSC70 and HSP70 in neural and neural tissues of the piglet / J. C. David, R. M. Tanguay, J. F. Crongnet // Brain Res. Dev. Brain Res. – 2001. – Vol. 128. – P. 91–99.

8. *Beere H. M.* "The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis / H. M. Beere // J. Cell Science. – 2004. – Vol. 117. – P. 2641–2651.

9. *Transgenic* mice expressing the human inducible Hsp70 have hippocampal neurons resistant to ischemic injury / J. C. Plumier, A. M. Krueger, R. W. Currie, D. Kontoyiannis // Cell Stress Chaperones. – 1997. – N 2. – P. 162–167.

10. *Чекман И. С.* Доклиническое изучение специфической активности потенциальных нейропротективных препаратов / И. С. Чекман, Ю. И. Губский, И. Ф. Беленичев. – К. : ДФЦ МОЗ Украины, 2010. – 81 с.

11. *Стефанов О. В.* Доклінічні дослідження лікарських засобів : метод. рекомендації / О. В. Стефанов. – К. : Авіценна, 2002. – 527 с.

12. *Лапач С. Н.* Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием EXCEL / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – К. : МОРИОН, 2002. – 640 с.

13. *Павлов С. В.* Нейропротективное действие тиотриазолина в условиях 30-дневной алкоголизации крыс / С. В. Павлов, Д. С. Зуева // Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики. – 2008. – Т. 2, № 11. – С. 142–149.

14. *Overexpressed* heat shock protein 70 attenuates hypoxic injury in coronary endothelial cells / K. Suzuki, Y. Sawa, Y. Kaneda [et al.] // J. Mol. Cell Cardiol. – 1998. – Vol. 30. – P. 1129–1136.

REFERENCES

1. Vereshchagin N.V., Piradov M.A., Suslina Z.A. The principles of diagnosis, treatment and prevention. M. Intermedika, 2002. 208 p.

2. Iadecola C. Mechanisms of cerebral ischemic damage. In: Cerebral ischemia. New Jersey, Humana Press, 1999: 3-33.

3. Belenichev I.F., Cherniy V.I., Kolesnik Yu.M., Pavlov S.V. Rational neuroprotection. Donetsk Publishing House Zaslavsky, 2009. 348 p.

4. Coca A. Cerebral involvement in hypertensive cardiovascular disease. *Eur. Heart J.* 2003; 5: 19-25.

5. Skromets A.A., Stakhovskaya L.V., Belkin A.A. New features of neuroprotection in the treatment of ischemic stroke. *Zhurnal Nevrologii i Psikhiatrii* 2008; 22: 32-38.

6. Mokrushin A.A., Pavlinova L.I., Guzhova I.V., Margulis B.A. Heat shock protein (Hsp70) protects activity of glutamatergic synaptic transmission in the olfactory cortex of the rat brain in vitro from severe anoxia. *Reports. RAS.* 2004; 394 (3): 419-422.

7. David J.C., Tanguay R.M., Crongnet J.F. Perinatal expression of heat shock proteins HSC70 and HSP70 in neural and neural tissues of the piglet. *Brain Res. Dev. Brain Res* 2001; 128: 91-99.

8. Beere H.M. "The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J. Cell Science* 2004; 117: 2641-2651.

9. Plumier J.C., Krueger A.M., Currie R.W., Kontoyiannis D. Transgenic mice expressing the human inducible Hsp70 have hippocampal neurons resistant to ischemic injury. *Cell Stress Chaperones* 1997; 2: 162-67.

10. Chekman I.S., Gubskii Yu.I., Belenichev I.F. Preclinical study of the specific activity of potential neuroprotective drugs. Kiev "CF Ministry of Health of Ukraine", 2010, 1 p.

11. Stefanov O.V. Preclinical studies of drugs. Kyiv: "Avitsena", 2002. 27 p.

12. Lapach S.N., Tschubenko A.V., Babich P.N. Statistical methods biomedical studies using EXCEL. K., "Morion", 2002. 640 p.

13. Pavlov S.V., Zueva D.S. Thiotriazoline neuroprotection in a 30-day alcoholism rats. *Aktualni pytannya farmatsevtychnoi nauky ta praktyky* 2008; 11(2): 142-149.

14. Suzuki K., Sawa Y., Kaneda Y. Ichikawa H., Shirakura R., Matsuda H. Overexpressed heat shock protein 70 attenuates hypoxic injury in coronary endothelial cells. *J. Mol. Cell Cardiol*. 1998; 30: 1129-1136.

Надійшла 11.04.2013

УДК 616.853-08:615.213:616-092.9

О. О. Прищепа

ЗМІНИ ПЛАВАЛЬНОЇ ПОВЕДІНКИ ЩУРІВ ЗА УМОВ ДОВГОТРИВАЛОГО ПЕНТИЛЕНЕТЕТРАЗОЛОВОГО КІНДЛІНГУ

Одеський національний медичний університет, Одеса, Україна

УДК 616.853-08:615.213:616-092.9

Е. А. Прищепа

ИЗМЕНЕНИЯ ПОВЕДЕНИЯ КРЫС ВО ВРЕМЯ ПЛАВАНИЯ В УСЛОВИЯХ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОГО ПЕНТИЛЕНЕТЕТРАЗОЛОВОГО КИНДЛИНГА

Одесский национальный медицинский университет, Одесса, Украина

Приводятся данные экспериментальных исследований, посвященных изучению особенностей формирования двигательных программ хвостатыми ядрами крыс в условиях долговременного пентиленететразолового (ПТЗ) киндлинга. Автор изучала плавательное поведение (ПП) крыс, детерминируемое хвостатыми ядрами, а также способность животных к переключению на