

И. Ф. Беленичев, Ю. В. Била

## **Антиоксидантные свойства модуляторов HSP70 в условиях церебральной ишемии**

*Запорожский государственный медицинский университет*

*Ключевые слова: HSP 70, церебральная ишемия, эндогенная нейропротекция, тамоксифен, мелатонин, глутамин, HSF-1, оксидативный стресс*

Проблема мозговых инсультов в Украине продолжает оставаться достаточно актуальной. Это обусловлено высоким уровнем летальности и инвалидизации населения, перенесшего инсульт [1, 2].

Известно, что в основе механизмов повреждения нейронов в условиях гипоксии лежит оксидативный стресс, индуцируемый «глутаматной эксайтотоксичностью» и гиперпродукцией NO на фоне снижения функциональной активности антиоксидантной системы (АО-системы). Гиперпродукция активных форм кислорода (АФК) провоцирует стремительное снижение когнитивно-мнестических функций ЦНС и инициирует апоптоз [3, 4].

В настоящее время рассматривается роль эндогенной нейропротекции и ее интермедиата – HSP70 в регуляции антиоксидантной системы нейрона. Одной из первичных реакций организма на повреждение различного генеза является индукция белков теплового шока HSP70 [5]. Нашими предыдущими работами установлена тесная взаимосвязь между HSP70, антиоксидантом глутатионом и выраженностью неврологического дефицита при экспериментальной ишемии мозга [6]. Также нами определена нейропротективная эффективность модуляторов активности HSP70: тамоксифена, мелатонина, фактор теплового шока HSF-1 и глутамина [7]. Особый интерес представляет HSP-зависимая модуляция АО-системы в условиях ишемии.

*Цель исследования* – изучить влияние модуляторов HSP70: тамоксифена,

мелатонина, HSF-1 и глутамина на показатели оксидативного стресса и активность антиоксидантной системы в головном мозге при моделировании церебральной ишемии.

**Материалы и методы.** Экспериментальная часть выполнена на 148 крысах линии Вистар, которых содержали в условиях вивария при природном освещении и на стандартном рационе питания. Экспериментальные исследования проводили в соответствии с основными положениями Конвенции Совета Европы об охране позвоночных животных, которые используются в экспериментах и других научных целях (Страсбург, 1986 г.), и др. [8, 9].

Острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК) по типу ишемического инсульта моделировали путем двухсторонней необратимой окклюзии общих сонных артерий под тиопентал натриевым наркозом (40 мг/кг) [10]. Животные были разделены на VII групп путем рандомизации: I – ложнооперированные (ЛО, n = 10); II – животные с ОНМК (n = 10); III – ОНМК + тамоксифен (ОО «Фармацевтическая компания «Здоровье», Украина), 1 мг/кг [11], (n = 10); IV – ОНМК + мелатонин (АО «Киевский витаминный завод», Украина), 5 мг/кг [12], (n = 10); V – ОНМК + фактор теплового шока (HSF-1) (Sigma, США), 200 мкл/кг, (n = 10); VI – ОНМК + глутамин (Sigma, США), 25 мг/кг [13], (n = 10); VII – ОНМК + пирацетам (ПАО «Борщаговский химико-фармацевтический завод», Украина), 500 мг/кг [14], (n = 10).

На 4 сутки животных выводили из эксперимента под тиопенталовым наркозом (40 мг/кг). Использовали участки головного мозга, находящиеся в области сенсомоторной зоны коры, которые гомогенизировали при помощи гомогенизатора Silent Crusher S (Heidolph) в

сахарозном буфере (250 ммоль/л, ЭДТА 1 ммоль/л, pH 7,4)  $t = 40^\circ\text{C}$ . Последующим дифференциальным центрифугированием на рефрижераторной центрифуге «Sigma 3-30k» (Германия) при 14000 g,  $t = 40^\circ\text{C}$  выделяли цитозольную и митохондриальную фракцию. [10]

Выраженность нитрозативного стресса определяли в цитозольной фракции мозга по маркеру нитротирозина, используя иммуноферментный набор фирмы Nycultbiotech (Нидерланды).

Степень повреждения белков устанавливали в цитозольной фракции в реакции окислительной модификации белка (ОМБ) по уровню альдегидфенилгидразонов (АФГ) и кетонфенилгидразонов (КФГ) в соответствии с методом В. Halliwell [15]. Активность супероксиддисмутазы (СОД) в цитозольной фракции определяли путем реакции конкурентного ингибирования фермента с нитросиним тетразолием за супероксидрадикал [16]. Уровень белка теплового шока HSP70 определяли в цитозольной и митохондриальной фракции мозга методом иммуноферментного анализа, используя набор Enzo (Швеция). Концентрацию общего белка в исследуемых образцах определяли по методу Лоури [17].

Результаты обработаны с применением статистического пакета лицензионной программы «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoftInc.), «Microsoft Excel 2010». Данные представлены в виде среднего арифметического значения и стандартной ошибки ( $M \pm SEM$ ). Достоверность различий ( $p$ ) экспериментальных данных рассчитывали с использованием  $t$ -критерия Стьюдента при параметрическом распределении, или по  $U$ -критерию Манна-Уитни при непараметрических значениях. Различия считали статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** Острая церебральная ишемия приводит к запуску каскада нейродеструктивных повреждений, ключевым звеном которого является образование АФК (супероксид-радикала, NO-радикала, гидроксил-радикала и др.). Избыточное количество АФК окисляет SH-, NH<sub>2</sub>-группы

макромолекул, дестабилизирует антиоксидантную активность ферментов, активизирует факторы транскрипции NF- $\kappa$ B, APO-1, повышает активность iNOS и уровень провоспалительных цитокинов, запуская процессы некроза и апоптоза [3]. Наши данные подтверждают наличие ишемического повреждения у экспериментальных животных. Так, уровень нитротирозина в группе контроля повышался на 553,5 %, уровень АФГ и КФГ был выше на 84,7–92,4 % и 108,7–110,5 % относительно ЛО группы (табл. 1). При этом активность СОД группы контроля была снижена на 52,3 % (табл. 2). Полученные данные свидетельствуют о тотальном падении активности антиоксидантной защиты нейронов, накоплении продуктов свободнорадикального окисления и неспособности механизмов эндогенной нейропротекции прервать нейродеструктивный каскад. Подтверждением этого является снижение концентрации HSP70 в цитозоле и митохондриальной фракции в 9,7 и 3,2 раза по сравнению с ЛО (табл. 3).

Введение исследуемых препаратов в различной степени способствовало нормализации активности антиоксидантной системы и уменьшало выраженность оксидативного и нитротирозирующего стресса. Так, в цитозольной фракции мозга животных, получавших мелатонин, наблюдали снижение уровня нитротирозина на 66,4 %, уровень АФГ и КФГ был ниже на 32,5–35,5 % и 34,8–37,9 % по сравнению с показателями контрольной группы (табл. 1). В то же время активность СОД в цитозоле повышалась на 84,7 % (табл. 2), а уровень HSP70 в цитозоле и митохондриальной фракции повышался в 2,6 и 1,2 раза по сравнению с контролем (табл. 3).

Такое действие мелатонина объясняется, во-первых, его химической структурой. Индольное кольцо мелатонина является донором электронов, что уменьшает количество реакционноспособных акцепторных радикалов, в первую очередь, гидроксил радикала [18]. Таким образом, мелатонин выполняет функцию «ловушки» свободных радикалов в условиях оксидативного стресса.

Таблица 1

Уровень маркеров оксидативного и нитрозирующего стресса в коре головного мозга крыс на 4 сутки церебральной ишемии и на фоне фармакологической коррекции ( $M \pm m$ )

Группа животных (n = 10)	АФГ спонт. у.е./г белка	КФГ спонт. у.е./г белка	АФГ стим. у.е./г белка	КФГ стим. у.е./г белка	Нитро- розин, нмоль/г белка
Ложнооперированные животные (ЛО)	9,57 ± 0,68	6,37 ± 0,53	13,76 ± 1,01	10,69 ± 0,90	10,19 ± 0,80
Животные с острым нарушением мозгового кровообращения (контроль)	18,41 ± 1,36*	13,41 ± 0,95*	25,42 ± 1,59*	22,31 ± 1,5*	66,59 ± 13,1*
Животные с острым нарушением мозгового кровообращения + тамоксифен	12,37 ± 0,55**	8,68 ± 0,41**	17,99 ± 0,86**	14,19 ± 1,01**	20,39 ± 0,96**
Животные с острым нарушением мозгового кровообращения + мелатонин	11,88 ± 0,69**	8,75 ± 0,63**	17,17 ± 1,26**	13,86 ± 1,11*	22,40 ± 1,91**
Животные с острым нарушением мозгового кровообращения + HSF-1	12,89 ± 0,70**	9,57 ± 0,64**	19,71 ± 1,28**	15,77 ± 1,19**	20,04 ± 1,77**
Животные с острым нарушением мозгового кровообращения + глутамин	13,19 ± 0,88**	9,54 ± 0,90**	18,92 ± 1,02**	15,47 ± 0,95**	26,63 ± 2,47**
Животные с острым нарушением мозгового кровообращения + пирацетам	12,71 ± 0,72**	8,64 ± 0,90**	18,79 ± 1,49**	14,12 ± 1,13**	24,46 ± 2,13**

Примечание. Здесь и в табл. 2–3: \* $p \leq 0,05$  по сравнению с ЛО; \*\* $p \leq 0,05$  по сравнению с контролем.

са. Во-вторых, мелатонин увеличивает активность СОД, что обусловлено его способностью повышать транслокацию ядерного фактора Nrf2 в ядро, который связывается с ДНК-промотором и инициирует транскрипцию антиоксидативных генов и их белков (в том числе СОД) [19, 20]. Также мелатонин непосредственно повышает уровень HSP70 и экспрессию мРНК HSP70 за счет активации системы мелатониновых цитоплазматических и ядерных рецепторов [19, 21].

Введение тамоксифена животным с церебральной ишемией приводило к уменьшению уровня АФГ, КФГ и нитротирозина на 29,2–32,8 %, 35,3–36,4 % и 69,4 % соответственно по сравнению с контрольной группой (табл. 1). При этом активность СОД повышалась на 50,2 % (табл. 2), а уровень HSP70 в цитозоле и митохондриальной фракции повышался в 5,1 и 1,5 раза (табл. 3). Взаимодействие тамоксифена с эстроге-

новыми рецепторами (ER) приводит к отсоединению от последних инактивированных молекул HSP70 [11]. Белокшаперон нормализует редокс статус нейронов путем восстановления ферментативной активности антиоксидантных систем [22]. Также нами установлено прямое влияние тамоксифена на экспрессию мРНК HSP70 [21].

Введение HSF-1 при ОНМК приводило к снижению уровня нитротирозина на 69,9 %, уровень АФГ и КФГ был ниже на 22,5–30,0 % и 28,7–29,3 % по сравнению с контрольной группой (табл. 1). В то же время, активность СОД повышалась на 49,6 % (табл. 2), а уровень HSP70 в цитозоле и митохондриальной фракции повышался в 11,3 и 2,6 раза (табл. 3). Известно, что HSF-1 является транскрипционным фактором HSP70. При попадании HSF-1 в клетку происходит его тримеризация с последующим поступлением в ядро, где он взаимодействует с элементами транскрипции

Таблица 2

*Активность супероксиддисмутазы в коре головного мозга крыс на 4 сутки церебральной ишемии и на фоне фармакологической коррекции (M ± m)*

Группа животных, n = 10	СОД, у.е./ (мг белка • мин)
Ложнооперированные животные (ЛО)	135,92 ± 12,20
Животные с острым нарушением мозгового кровообращения (контроль)	64,83 ± 5,29*
Животные с острым нарушением мозгового кровообращения + тамоксифен	97,40 ± 8,22**
Животные с острым нарушением мозгового кровообращения + мелатонин	119,72 ± 9,18**
Животные с острым нарушением мозгового кровообращения + HSF-1	96,98 ± 8,49**
Животные с острым нарушением мозгового кровообращения + глутамин	91,91 ± 6,56**
Животные с острым нарушением мозгового кровообращения + пирарцетам	100,20 ± 8,18**

Таблица 3

*Концентрация белка HSP70 в цитозольной и митохондриальной фракциях головного мозга крыс на 4 сутки церебральной ишемии и на фоне фармакологической коррекции (M ± m)*

Группа животных, n = 10	HSP70, цитозольная фракция, нг/мл	HSP70, митохондриальная фракция, нг/мл
Ложнооперированные животные (ЛО)	16,83 ± 0,64	8,60 ± 0,58
Животные с острым нарушением мозгового кровообращения (контроль)	1,73 ± 0,11*	2,72 ± 0,19*
Животные с острым нарушением мозгового кровообращения + тамоксифен	8,81 ± 0,51**	4,15 ± 0,20**
Животные с острым нарушением мозгового кровообращения + мелатонин	4,55 ± 0,27**	3,30 ± 0,19**
Животные с острым нарушением мозгового кровообращения + HSF-1	19,50 ± 1,05**	7,08 ± 0,23**
Животные с острым нарушением мозгового кровообращения + глутамин	2,61 ± 0,16**	3,01 ± 0,17**
Животные с острым нарушением мозгового кровообращения + пирарцетам	2,24 ± 0,17**	2,80 ± 0,19

и запускает процесс экспрессии генов HSP70 [21, 23]. Высокий уровень HSP70 оказывает цитопротекторное действие за счет шаперонной функции, а также предупреждает процесс апоптоза зоны пенумбры.

На фоне введения глутамин наблюдалось снижение уровня нитротирозина на 60 %, уровень АФГ и КФГ был ниже на 25,6–28,4 % и 28,9–30,7 % соответственно относительно контроля (табл. 1), активность СОД повышалась на 41,8 % (табл. 2), а уровень HSP70 в цитозоле и митохондриальной фракции повышался

в 1,5 и 1,1 раза (табл. 3). Поскольку глутамин является предшественником неферментативного звена тиол-дисульфидной системы – глутатиона, препарат стабилизирует редокс статус ишемизированных клеток, восстанавливает транскрипционную функцию ядра и снижает степень повреждения белковых структур [13, 24]. Прямое влияние на уровень HSP70 у глутамин менее выражено по сравнению с предыдущими препаратами.

Референс-препарат пирарцетам также оказывал достоверное влияние на выра-

женность оксидативного стресса и понижал уровень АФГ, КФГ и нитротирозина на 26,1–31,0 %, 35,6–36,7 % и 63,3 % соответственно по сравнению с контролем (табл. 1). Активность СОД на фоне введения парацетама повышалась на 54,6 % (табл. 2), при этом уровень HSP70 достоверно повышался только в цитозольной фракции мозга в 1,3 раза по сравнению с контрольной группой (табл. 3).

## Выводы

1. Моделирование ОНМК приводит к активации оксидативного стресса на фоне снижения активности АО-системы и уменьшения уровня HSP70. У экспериментальных животных с ОНМК наблюдается повышение уровня нитротирозина в цитозоле на 553,5 %, уровня АФГ и КФГ на 84,7–92,4 % и 108,7–110,5 %, снижение активности СОД в цитозоле на 52,3 % и уменьшение уровня HSP70 в цитозоле и митохондриальной фракции в 9,7 и 3,2 раза по сравнению с группой ЛО ( $p \leq 0,05$ ), что свидетельствует о срыве механизмов эндогенной нейропротекции и повреждении нейронов.
2. Введение мелатонина (5 мг/кг), тамоксифена (1 мг/кг), HSF-1 (200 мкл/кг) и глутамина (25 мг/кг) животным с ОНМК уменьшает выраженность оксидативного стресса, что подтверждается снижением уровня нитротирозина на 66,4; 69,4; 69,9 и 60,1 % ( $p \leq 0,05$ ), а также уменьшением содержания маркеров окисли-

тельной модификации белка АФГ/КФГ на 32,5–35,5 %/34,8–37,9 %; 29,2–32,8 %/35,3–36,4 %; 22,5–30,0 %/28,7–29,3 % и 25,6–28,4 %/28,9–30,7 % соответственно по сравнению с контролем ( $p \leq 0,05$ ).

3. Введение модуляторов HSP70-системы повышало активность СОД, наиболее выраженное действие на активность СОД оказывало введение мелатонина, активность фермента повышалась на 84,7 % по сравнению с контролем ( $p \leq 0,05$ ).
4. Введение HSF-1 (200 мкл/кг), тамоксифена (1 мг/кг), мелатонина (5 мг/кг) и глутамина (25 мг/кг) повышало уровень белка теплового шока HSP70 в 11,3 раза, 5,1 раза, 2,6 раза и 1,5 раза в цитозольной фракции, также концентрация белка шаперона повышалась в митохондриальной фракции мозга в 2,6; 1,5; 1,2 и 1,1 раза соответственно по сравнению с контрольной группой ( $p \leq 0,05$ ), что свидетельствует о способности изучаемых препаратов модулировать HSP70-опосредованные механизмы эндогенной нейропротекции.
5. Данные экспериментального исследования подтверждают наличие у тамоксифена, мелатонина, HSF-1 и глутамина HSP70-зависимых механизмов регуляции эндогенной нейропротекции и обосновывают их применение в качестве нейропротекторных средств в лечении ОНМК.

1. Мищенко Т. С. Эпидемиология цереброваскулярных заболеваний и организация помощи больным с мозговым инсультом в Украине / Т. С. Мищенко // Український вісник психоневрології. – 2017. – Т. 25, № 1. – С. 22–24.
2. Зозуля А. І. Основні завдання покращання надання медичної допомоги при церебральному інсульті / А. І. Зозуля, І. С. Зозуля // Український медичний часопис. – 2014. – Т. 102, № 4. – С. 114–118.
3. Нейропротекция и нейропластичность / И. Ф. Беленичев, В. И. Черный, Е. А. Нагорная [и др.]. – Киев : Логос, 2015. – 512 с.
4. Антиоксиданти: клініко-фармакологічний аспект / І. С. Чекман, І. Ф. Беленічев, Н. О. Горчакова [та ін.] // Український медичний часопис. – 2014. – І/ІІ, № 1 (99). – С. 22–28.
5. Беленичев И. Ф. Роль белков теплового шока в реализации молекулярно-биохимических механизмов нейропротекции / И. Ф. Беленичев // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2013. – № 6 (36). – С. 72–80.
6. Беленичев И. Ф. Взаимосвязь между концентрацией HSP70, активностью тиол-дисульфидной системы и степенью неврологических нарушений при моделировании острой церебральной ишемии / И. Ф. Беленичев, Ю. В. Биля // Вісник проблем біології і медицини. – 2017. – № 1 (135). – С. 86–91.
7. Биля Ю. В. Особенности нарушения экспрессии матричной РНК Hif-1 $\alpha$  и Hif-3 $\alpha$  в условиях острого нарушения мозгового кровообращения и на фоне применения модуляторов HSP70 / Ю. В. Биля, И. Ф. Беленичев, А. М. Камышный // Фармакологія та лікарська токсикологія – 2018. – № 3. – С. 3–9.



8. Етика лікаря та права людини: положення про використання тварин у біомедичних дослідах // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2003. – № 2 (22). – С. 108–109.
9. Закон України. Про захист тварин від жорстокого поводження [Електронний ресурс] // Відомості Верховної Ради України (ВВР). – 2006. – Режим доступу: <http://zakon1.rada.gov.ua/laws/show/3447-15>.
10. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных лекарственных средств первичной и вторичной нейропротекции. Методические рекомендации / И. С. Чекман, И. Ф. Беленичев, Е. А. Нагорная [и др.]. – Киев : ООО Издательство «Юстон», 2016. – 82 с.
11. Павлов С. В. Молекулярно-биохимические аспекты нейропротективного действия селективного модулятора эстрогеновых рецепторов – тамоксифена в условиях моделирования острой церебральной ишемии / С. В. Павлов, И. Ф. Беленичев // Нейрохимия. – 2014. – Т. 31 (1). – С. 36–41. DOI: 10.7868/S1027813313040079
12. Melatonin-induced neuroprotection after close head injury is associated with increased brain anti-oxidants and attenuated late-phase activation of NF-kappa B and AP-1 / S. M. Beni, R. Kohen, R. J. Reiter [et al.] // FASEB J. – 2004. – V. 18. – P. 144–151.
13. Glutamine prevents oxidative stress in a model of mesenteric ischemia and reperfusion / G. P. Zabot, G. F. Carvalhal, N. P. Marroni [et al.] // World Journal of Gastroenterology. – 2014. – V. 20 (32). – P. 11406–11414.
14. Piracetam improves mitochondrial dysfunction following oxidative stress / U. Keil, I. Scherping, S. Hauptmann [et al.] // British Journal of Pharmacology. – 2006. – V. 147. – P. 199–208. doi:10.1038/sj.bjp.0706459
15. Halliwell B. Free radical in Biology and Medicine / B. Halliwell, M. C. Yutteridge. – Oxford : Clarendon press, 1999. – 320 p
16. Чевари С. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах / С. Чевари, И. Чаба, Й. Секей // Лабораторное дело. – 1985. – № 11. – С. 678–681.
17. Waterborg J. H. The Lowry Method for Protein Quantitation. In: J. M. Walker (eds) / J. H. Waterborg. – The Protein Protocols Handbook. Humana Press, 2002. – P. 7–9. DOI: <https://doi.org/10.1385/1-59259-169-8:7>
18. Galano A. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination / A. Galano, D. X. Tan, R. J. Reiter // Journal of Pineal Research. – 2011. – V. 51. – P. 1–16. doi:10.1111/j.1600-079X.2011.00916.x
19. Melatonin enhances antioxidant enzyme gene expression (CAT, GPx, SOD), prevents their UVR-induced depletion, and protects against the formation of DNA damage (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) in ex vivo human skin / T. W. Fischer, K. Kleszczyński, L. H. Hardkop [et al.] // J. Pineal Res. – 2013. – № 54. – P. 303–312. doi:10.1111/jpi.12018
20. Vrienda J. The Keap1-Nrf2-antioxidant response element pathway: A review of its regulation by melatonin and the proteasome / J. Vrienda, R. J. Reiter // Molecular and Cellular Endocrinology. – 2015. – V. 401, № 5. – P. 213–220. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.12.013>
21. Belenichev I. F. Study of the Expression Pattern of mRNA Hsp70 and the Level of HSP70 Protein in Experimental Subtotal Ischemia and in the Contrast of Pharmacological Correction of HSP70 Modulators / I. F. Belenichev, Yu. V. Bila, A. M. Kamyshnyi // Biological Markers and Guided Therapy. – 2018. – V. 5, № 1. – P. 75–84. <https://doi.org/10.12988/bmgt.2018.81010>
22. Heat shock protein 70 regulates cellular redox status by modulating glutathione-related enzyme activities / S. Guo, W. Wharton, P. Moseley [et al.] // Cell stress & chaperones. – 2007. – V. 12, № 3. – P. 245–54.
23. HSF1 modulation of Hsp70 mRNA polyadenylation via interaction with symplekin / H. Xing, C. Mayhew, K. Cullen [et al.] // The Journal of Biological Chemistry. – 2004. – V. 279, № 11. – P. 10551–5. doi:10.1074/jbc.M311719200. PMID 14707147.
24. Amores-Sánchez M. I. Glutamine as a Precursor of Glutathione, and Oxidative Stress / M. I. Amores-Sánchez, M. A. Medina // Molecular Genetics and Metabolism. – 1999. – V. 2, № 67. – P. 100–105. DOI: <https://doi.org/10.1006/mgme.1999.2857>

### **И. Ф. Беленичев, Ю. В. Била**

#### **Антиоксидантные свойства модуляторов HSP70 в условиях церебральной ишемии**

*Цель исследования* – изучить влияние модуляторов HSP70: тамоксифена, мелатонина, HSF-1 и глутамината на показатели оксидативного стресса и активность антиоксидантной системы в головном мозге при моделировании церебральной ишемии.

Исследование проводили на 148 крысах линии Вистар, у которых моделировали острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК) путем двухсторонней необратимой перевязки общих сонных артерий под тиопенталовым наркозом (40 мг/кг).

Установлено, что на 4 сутки экспериментальной церебральной ишемии исследуемые препараты достоверно снижали степень оксидативного стресса и повышали активность антиоксидантной системы. Так, введение мелатонина (5 мг/кг), тамоксифена (1 мг/кг), HSF-1 (200 мкл/кг) и глутамината (25 мг/кг) уменьшало уровень нитротирозина на 66,4; 69,4; 69,9 и 60,1 % ( $p \leq 0,05$ ), а также уменьшало количество маркеров окислительной модификации белка АФГ/КФГ на 32,5–35,5 %/34,8–37,9 %; 29,2–32,8 %/35,3–36,4 %; 22,5–30,0 %/28,7–29,3 % и 25,6–28,4 %/28,9–30,7 % соответственно по сравне-

нию с контролем ( $p \leq 0,05$ ). Наиболее выраженное действие на активность СОД оказывало введение мелатонина, активность фермента повышалась на 84,7 % относительно контроля ( $p \leq 0,05$ ). Исследуемые тест-образцы в различной степени повышали уровень белка шаперона, наиболее выраженное действие оказывал HSF-1: HSP70 увеличивался в цитозольной и митохондриальной фракции мозга в 11,3 и 2,6 раза соответственно по сравнению с контролем ( $p \leq 0,05$ ).

Анализ полученных данных подтверждает наличие у тамоксифена, мелатонина, HSF-1 и глутамину HSP70-зависимых механизмов регуляции эндогенной нейропротекции и обосновывает их применение в качестве нейропротекторных средств в лечении ОНМК.

*Ключевые слова:* HSP70, церебральная ишемия, эндогенная нейропротекция, тамоксифен, мелатонин, глутамин, HSF-1, оксидативный стресс

### **I. Ф. Беленічев, Ю. В. Біла**

#### **Антиоксидантні властивості модуляторів HSP70 за умов церебральної ішемії**

*Мета дослідження* – вивчити вплив модуляторів HSP70: тамоксифену, мелатоніну, HSF-1 і глутаміну на показники оксидативного стресу й активність антиоксидантної системи в головному мозку за умов моделювання церебральної ішемії.

Дослідження проводили на 148 щурах лінії Вістар, в яких моделювали гостре порушення мозкового кровообігу (ГПМК) шляхом двосторонньої незворотної перев'язки загальних сонних артерій під тиопенталовим наркозом (40 мг/кг).

Встановлено, що на 4 добу експериментальної церебральної ішемії досліджувані препарати достовірно знижували ступінь оксидативного стресу та підвищували активність антиоксидантної системи. Так, введення мелатоніну (5 мг/кг), тамоксифену (1 мг/кг), HSF-1 (200 мкл/кг) і глутаміну (25 мг/кг) зменшувало рівень нітритрози на 66,4; 69,4; 69,9 і 60,1 % ( $p \leq 0,05$ ), а також маркерів окисної модифікації білка АФГ/КФГ на 32,5–35,5 %/34,8–37,9 %; 29,2–32,8 %/35,3–36,4 %; 22,5–30,0 %/28,7–29,3 % і 25,6–28,4 %/28,9–30,7 % відповідно порівняно з контролем ( $p \leq 0,05$ ). Найвираженішу дію на активність СОД спричиняло введення мелатоніну, активність ферменту підвищувалася на 84,7 % до контролю ( $p \leq 0,05$ ). Досліджувані тест-зразки в різному ступені підвищували рівень білка шаперона, найвираженішу дію проявляв HSF-1: HSP70 підвищувався в цитозольній і митохондриальній фракції мозку в 11,3 і 2,6 рази відповідно порівняно з контролем ( $p \leq 0,05$ ).

Аналіз отриманих даних підтверджує наявність у тамоксифену, мелатоніну, HSF-1 і глутаміну HSP70-залежних механізмів регуляції ендогенної нейропротекції й обґрунтовує їхнє застосування як нейропротекторних засобів в лікуванні ГПМК.

*Ключові слова:* HSP70, церебральна ішемія, ендогенна нейропротекція, тамоксифен, мелатонін, глутамін, HSF-1, оксидативний стрес

### **I. F. Belenichev, Yu. V. Bila**

#### **Antioxidant properties of HSP70 modulators at cerebral ischemia**

*The aim of the study* was to evaluate the effects of modulators HSP70: tamoxifen, melatonin, HSF-1 and glutamine on oxidative stress indices and antioxidant system activity in the brain under cerebral ischemia modeling.

The study was carried out on 148 Wistar rats with modeled acute cerebrovascular accident (GMPPM) by bilateral irreversible ligation of common carotid arteries under thiopental anesthesia (40 mg/kg).

It was established that at 4 days of experimental cerebral ischemia the drugs studied significantly reduced the degree of oxidative stress and increased the activity of the antioxidant system. Thus, administration of melatonin (5 mg/kg), tamoxifen (1 mg/kg), HSF-1 (200  $\mu$ l/kg) and glutamine (25 mg/kg) reduced the level of nitrotyrosine by 66,4; 69,4; 69,9 and 60,1 % ( $p \leq 0,05$ ), as well as markers of oxidation modification of AFG/KFG protein by 32,5–35,5 %/34,8–37,9 %; 29,2–32,8 %/35,3–36,4 %; 22,5–30,0 %/28,7–29,3 % and 25,6–28,4 %/28,9–30,7 %, respectively, relative to the control ( $p \leq 0,05$ ). The studied drugs significantly reduced the level of oxidative stress and increased the activity of the antioxidant system.

Melatonin had the most pronounced effect on SOD activity, the enzyme activity increased by 84,7 % as to the control ( $p \leq 0,05$ ). The test compounds increased the level of chaperone protein to varying levels; HSF-1 had the most pronounced effect: HSP70 level had increased in the cytosolic and mitochondrial fractions of the brain by 11,3 and 2,6 times, respectively, as to the control ( $p \leq 0,05$ ).

Analysis of the data confirms the presence of HSP70-dependent mechanisms of tamoxifen, melatonin, HSF-1 and glutamine in regulation of endogenous neuroprotection and substantiates their use as neuroprotective agents in the treatment of stroke.

*Key words:* HSP70, cerebral ischemia, endogenous neuroprotection, tamoxifen, melatonin, glutamine, HSF-1, oxidative stress

*Надійшла: 6 листопада 2018 р.*

**Контактна особа:** Беленічев Ігор Федорович, доктор біологічних наук, професор, кафедра фармакології і медичної рецептури, Запорізький державний медичний університет, буд. 26, просп. Маяковського, м. Запоріжжя, 39035. Тел.: + 38 0 612 34 27 41.  
Електронна пошта: ifb1914@mail.ru