
СПІВЗАСНОВНИКИ

Національна академія медичних наук України •
Державна установа «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» •
Державне підприємство «Державний експертний центр
Міністерства охорони здоров'я України» •
Всеукраїнська громадська організація «Асоціація фармакологів України»

**Двомісячне
науково-практичне,
медичне видання**

Фармакологія та лікарська токсикологія

Заснований у серпні 2007 р.
Виходить 1 раз на 2 місяці

№ 1 (26)/2012

ЗМІСТ

ОГЛЯДИ

Чекман І. С., Полова Ж. М., Гребельник А. І. Наночастинки у лікарських формах: аспекти фармакології та фармацевтичної технології..... 3

СУЧАСНІ АСПЕКТИ НЕЙРОФАРМАКОЛОГІЇ

Жиляєв С. О., Штриголь С. Ю. Вплив препаратів кверцетину на наркотичний сон, спричинений алкоголем..... 11

Павлов С. В. Вплив тіолових антиоксидантів на вміст стрес-білка HSP70 у гіпокампі монгольських піщанок з гострою ішемією головного мозку..... 15

Степанюк Г. І., Маринич Л. І., Ходаківський О. А., Коваленко С. І., Берест Г. Г. Вплив похідного 6-заміщених 3R-2H-[1,2,4]триазино[2,3-с]хіназолін-2-онів (сполуки МТ-279) на стан кислотно-лужної рівноваги та рівень Ca^{2+} у крові гербел з моделлю гострого порушення мозкового кровообігу 19

Чекман І. С., Яковлева І. Ю., Белєнічев І. Ф., Бухтіярова Н. В., Горчакова Н. О. Вплив таурину та пірацетаму на біохімічні показники в головному мозку щурів при циркуляторній гіпоксії..... 24

Ярош О. О. Особливості фармакокінетики нової антиепілептичної сполуки AGB-31 у півкулях головного мозку щурів 29

У НАУКОВИХ ЛАБОРАТОРІЯХ

Горбенко Н. І., Звягіна Т. С., Шаламай А. С. Вплив таурин-вмісного препарату «Кратал» на розвиток діабетичної нефропатії в щурів 34

Новохацька Т. В., Тишкін С. М., Досенко В. Є., Іванова І. В., Добреля Н. В., Соловійов А. І. Пригнічення експресії гена дельта ізоформи протейнінази С усуває судинні порушення в щурів з генетично детермінованою гіпертензією 40

Ошитко Р. В., Грицик А. Р. Вивчення жирнокислотного складу насіння глоду одноматочкового (*Crataegus monogyna*) та глоду згладженого (*Crataegus laevigata*) і перспективи застосування жирної олії глодів у медицині 48

С. В. Павлов

Вплив тіолових антиоксидантів на вміст стрес-білка HSP70 у гіпокампі монгольських піщанок з гострою ішемією головного мозку

Запорізький державний медичний університет

Ключові слова: тіолові антиоксиданти, стрес-білок HSP70, ішемія головного мозку

Відомо, що ішемія головного мозку супроводжується виснаженням енергетичних ресурсів; ексайтотоксичністю та утворенням активних форм кисню (АФК), що пов'язано з втратою електронів, накопичених у проміжних ділянках дихального ланцюга. Порушення енергетичного метаболізму призводить до зміни трансмембранних іонних потоків та накопичення внутрішньоклітинного кальцію. Одночасно посилюються процеси вільно-радикального окиснення (ВРО) та відбувається пошкодження активними формами кисню білків, нуклеїнових кислот, ліпідів. Некерована та некомпенсована активація процесів ВРО, виснаження ендогенних антиоксидантів та порушення регуляторних механізмів антиоксидантного захисту розглядаються як ключові ланки пошкодження нейрональних клітин за умов ішемії [1–3].

Крім того, у сучасній літературі широко обговорюється захисна дія стрес-білка HSP70 при ішемічних пошкодженнях головного мозку на тлі активації процесів ВРО. Білки HSP (heat shock proteins) уперше були виявлені в клітинах за умов термічного стресу. У подальшому було встановлено, що при різних видах стресу різко підвищується синтез HSP, які за умов норми практично не виявляються. Підвищення експресії та нейропротекторна дія HSP70 виявлена за умов глутаматної нейротоксичності, при депривації кисню, глюкози та при відтворенні різноманітних моделей ішемії головного мозку [4–6]. З іншого боку, при зниженні концентрації

HSP70 збільшуються клітинні пошкодження, викликані локальною ішемією мозку в нокаутних та інтактних щурів [5, 6]. Експериментальними дослідженнями була встановлена здатність HSP70 взаємодіяти з лігандною частиною мембрани та ініціювати фолдінг окисно модифікованих функціонально активних макромолекул [4, 6].

Таким чином, наведене вище зумовлює пошук нейропротективних засобів серед сполук, здатних пригнічувати процеси ВРО та впливати на синтез HSP-білків.

Останніми роками як за умов експериментальної ішемії головного мозку, так і в клінічних дослідженнях, досить інтенсивно застосовуються так звані «тіолові антиоксиданти». Особливу увагу привернули до себе похідні 3-оксипіридину – емоксипін, мексидол та вітчизняний оригінальний препарат – тіотриазолін, що мають антиоксидантні властивості [7, 8]. Крім того, деякими дослідниками обговорюється можливість тіолових антиоксидантів впливати на синтез протективних HSP-білків [6, 9].

Мета дослідження – встановлення здатності емоксипіну, мексидолу та тіотриазоліну впливати на вміст HSP70 білків у гіпокампі монгольських піщанок за умов гострої церебральної ішемії.

Матеріали та методи. Порушення мозкового кровообігу моделювали шляхом перев'язки сонної артерії в монгольських піщанок (*Meriones unculatus*) масою 65–70 г [10]. Тварини утримувалися 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]. Досліджувані препарати вводили тва-

ринам один раз на день внутрішньоочере-
винно протягом 4 діб у наступних концен-
траціях: емоксипін – 100 мг/кг; мекси-
дол – 50 мг/кг; тіотриазолін – 50 мг/кг.

Інтенсивність процесів ВРО визначали за концентрацією маркера окисного пошкодження білків – нітротирозину, який досліджували імуноферментним методом [10].

Вміст у гіпокампі HSP70-білка визначали за допомогою Вестерн-блот аналізу. Тканину гомогенізували в буфері (50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 % Triton X-100), pH 7,5 при температурі 4 °C у співвідношенні 1:6 тканина/буфер. Після центрифугування при 13 000 об./хв та 4 °C з пробірки вилучали супернатант з білками цитозолу та аналізували з використанням електрофорезу та блотінгу. Білки розподіляли в 10 % поліакриламідному гелі (ПААГ). Перенос білків з ПААГ до мембрани PVDF здійснювали електроелекцією протягом 45 хв. Преінкубацію Вестерн-блотів проводили в розчині TBST (з додаванням 1 % 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 хрому (1:2000) протягом 1 год. Детекцію HSP70-білків здійснювали за допомогою денситометричного аналізу в програмі Adobe Photoshop [10].

Статистичну обробку результатів проводили з використанням програми «Statistica® for Windows 6.0» (Stat-Soft Inc., № AXXR712D833214FAN5). Достовірність відмінностей визначали за t-критерієм Ст'юдента.

Результати та їх обговорення. Експериментальними дослідженнями встановлено, що моделювання ішемії головного мозку в монгольських піщанок на 4 добу експерименту супроводжувалося розвитком оксидативного стресу, про що свідчило суттєве, більш ніж на 82 % відносно показників інтактних тварин накопичення в гіпокампі маркера окисного пошкодження білків – нітротирозину. Нітротирозин, на думку

багатьох дослідників – є специфічним маркером окисного стресу головного мозку. Окисна модифікація функціонально активних білкових молекул призводить до порушення здатності мембран генерувати та проводити нервовий імпульс [3, 8]. Важливо відмітити, що головний мозок найчутливіший до окисного стресу. За умов ішемічного пошкодження тканин головного мозку антиоксидантна система виснажується. Виникає накопичення маркерних продуктів окисної деградації білків, а саме, нітротирозину, гідропероксидів жирних кислот, малонового діальдегіду, що призводить до загибелі нейрональної клітини. HSP70, у свою чергу, запобігає агрегації білків, бере участь у протеолітичній деградації нестабільних білків [6, 9]. У зв'язку із цим, на 4 добу ішемії мозку рівень білка в даних дослідженнях був зниженим відносно показника інтактних тварин, про що свідчило зменшення площини HSP70-позитивно забарвленого комплексу та зниження оптичної щільності HSP70-позитивно забарвленого комплексу більш ніж на 68 та 75 % відповідно. Зменшення концентрації HSP70 пояснюється, на нашу думку, ще й тим, що за умов розвитку оксидативного стресу та зриву компенсаторних можливостей організму під дією АФК модифікуються самі HSP70-білки, що порушує їхнє функціонування.

4-разове введення емоксипіну – 100 мг/кг, мексидолу – 50 мг/кг та тіотриазоліну – 50 мг/кг призводило до покращання стану антиоксидантної системи на 4 добу досліджень, про що свідчило статистично значиме зниження концентрації нітротирозину в гіпокампі. Фармакологічна дія досліджуваних препаратів була односпрямована, але відрізнялась за силою ефекту. Так, з таблиці видно, що тіотриазолін перевищував показники емоксипіну й мексидолу та знижував рівень нітротирозину більш ніж на 75 %.

За рахунок досить високої антиоксидантної активності, досліджувані препарати позитивно впливають на вміст у гіпокампі протекторних HSP70-білків. Механізм цього впливу пояснюється здатністю тіолових антиоксидантів, за

Вплив тіолових антиоксидантів на вміст нітротирозину та HSP70-білка в гіпокампі монгольських піщанок на 4 добу експериментальної ішемії головного мозку

Групи тварин	Нітротирозин, у.о./г білка (M±m)	Площа позитивно забарвленого комплексу, у.о. (M±m)	Оптична концентрація позитивно забарвленого комплексу, у.о. (M±m)
Інтактні	1,20±0,11	54,8±1,7	0,28±0,041
Ішемія, 4 доба (контроль)	6,80±0,34	17,4±1,7	0,07±0,02
Ішемія + Емоксипін, 100 мг/кг	2,70±0,48*	38,7±2,4*	0,200±0,056*
Ішемія + Мексидол, 50 мг/кг	3,10±0,36*	33,7±2,2*	0,140±0,038*
Ішемія + Тіотриазолін, 50 мг/кг	1,70±0,19**	58,6±2,4**	0,27±0,05**

Примітка. * $P \leq 0,05$ відносно контролю;

** $P \leq 0,05$ відносно показників групи емоксипіну та мексидолу.

рахунок наявності в молекулярній структурі вільних SH-груп, зменшувати накопичення цитотоксичних дериватів АФК, що в свою чергу призводить до модуляції глобальних факторів транскрипції, які запускають синтез HSP-білків [6, 12]. Крім того, за рахунок прямої антиоксидантної активності, досліджувані препарати пригнічують окисну деструкцію самих HSP70-білків, що пролонгує їхню протекторну дію.

Порівняльний аналіз показав, що за своїм впливом на концентрацію HSP70-білків серед представлених тіолових антиоксидантів переважав тіотриазолін. Перевага тіотриазоліну пояснюється, по-перше, його більш вираженим, ніж у емоксипіну та мексидолу антиоксидантним ефектом. Тіотриазолін здатен не тільки зв'язувати АФК своїми тіоловими групами, але й зменшувати АФК у мітохондріях за рахунок утилізації відновлених форм піридиннуклеотидів та інгібуючого впливу на NADH-оксидазні системи мітохондрій, що підтверджено дослідями *in vitro* [13].

По-друге, тіотриазолін, здатний захищати від надлишку АФК чутливі до окисного стресу залишки цистеїну в ДНК-зв'язуючих доменах протеїнази, зокрема MAPK, які в свою чергу активують синтез HSP70-білків [13, 14].

Встановлений вплив тіолових антиоксидантів на концентрацію HSP70-білків є, на нашу думку, ключовим моментом у механізмі їхньої нейропротективної дії. Останнім часом зростає інтерес до використання в медицині антистресорних властивостей шаперонів, до яких належать і HSP70. Однак на сьогодні є труднощі в застосуванні екзогенних білків теплового шоку. У зв'язку із цим ведеться пошук лікарських засобів, що впливають на синтез ендогенних HSP70. Тому той факт, що тіолові антиоксиданти, а саме тіотриазолін, емоксипін та мексидол, за умов ішемії, збільшують синтез ендогенних HSP70, становить значний інтерес з огляду на перспективу застосування цих лікарських засобів при ішемічних ураженнях головного мозку.

1. Стаднік В. М. Нейровізуалізація в діагностиці церебрального інсульту / В. М. Стаднік, В. В. Куценко // Здоров'я України. – 2010. – № 1. – С. 78.
2. Дубенко О. Є. Причини і наслідки лакунарних інсультів головного мозку / О. Є. Дубенко, Г. Є. Костровська, С. Л. Костровський // Укр. неврологічний журнал. – 2007. – № 1. – С. 7–10.
3. Беленичев И. Ф. Рациональная нейропротекция / И. Ф. Беленичев, В. И. Черний, Ю. М. Колесник, С. В. Павлов – Донецк: Издательский дом Заславский, 2009. – 348 с.
4. Plumier J. C. 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. – № 2. – P. 162–167.

5. Yenari M. A. The neuroprotective potential of heat shock protein 70 (HSP70) / M. A. Yenari, R. G. Giffard, R. M. Sapolsky, G. K. Steinberg // *Mol. Med. Today.*– 1999.– V. 5.– P. 525–531.
6. Беленичев И. Ф. Возможная роль HSP-белков в реализации энерготропного механизма нейропротективного действия цереброфурина / И. Ф. Беленичев, С. В. Павлов // *Нейронауки: теоретичні та клінічні аспекти.*– 2010.– Т. 6, № 1.– С. 31–36.
7. Скромец А. А. Новые возможности нейропротекции в лечении ишемического инсульта / А. А. Скромец, Л. В. Стаховская, А. А. Белкин // *Журн. неврол. и психиатрии.*– 2008.– Т. 22.– С. 32–38.
8. Беленичев И. Ф. Антиоксидантна система захисту організму (огляд літератури) / І. Ф. Беленічев, Ю. І. Губський, Є. Л. Левицький // *Совр. пробл. токсикол.*– 2002.– № 3.– С. 24–31.
9. Katschinski D. M. Interaction of the PAS B domain with HSP90 accelerates hypoxia-inducible factor-1alpha stabilization / D. M. Katschinski, L. Le, S. G. Schindler [et al.] // *Cell Physiol. Biochem.*– 2004.– V. 14.– P. 351–360.
10. Чекман И. С. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных нейропротективных препаратов / И. С. Чекман, Ю. И. Губский, И. Ф. Беленичев.– К.: «ДФЦ МОЗ України», 2010.– 81 с.
11. Стефанов О. В. Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації) / О. В. Стефанов – К.: «Авіцена», 2002.– 527 с.
12. Эндогенная защита миокарда, роль белков теплового шока в механизмах прекодиционирования / И. В. Бабушкина, А. А. Рунович, Г. Б. Боровский, В. К. Войников // *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН.*– 2006.– № 5 (51).– С. 27–31.
13. Павлов С. В. Нейропротективное действие тиотриазолина в условиях 30-дневной алкоголизации крыс / С. В. Павлов, Д. С. Зуева // *Актуальні питання фармац. та медичної науки та практики.*– 2008.– № 11, Т. 2.– С. 142–149.
14. Мазур И. А. Метаболитотропные препараты / И. А. Мазур, И. С. Чекман, И. Ф. Беленичев.– Киев, 2008.– 375 с.

С. В. Павлов

Влияние тиоловых антиоксидантов на содержание стресс-белка HSP70 в гиппокампе монгольских песчанок с острой ишемией головного мозга

В экспериментальных исследованиях на модели острой ишемии головного мозга была установлена способность тиольных антиоксидантов влиять на синтез стресс-белков HSP70 в гиппокампе. Введение тиотриазолина (50 мг/кг); эмоксипина (100 мг/кг); мексидола (50 мг/кг) приводило к существенному снижению в гиппокампе цитотоксического маркера окислительного повреждения белков – нитротирозина, а также повышало концентрацию HSP70. Сравнительная характеристика исследуемых препаратов показала статистически достоверное преимущество тиотриазолина.

Ключевые слова: тиоловые антиоксиданты, стресс-белок HSP70, ишемия головного мозга

S. Pavlov

Thiol antioxidants influence on the stress-protein HSP70 in hippocampus of the *meriones unguiculatus* with acute cerebral ischemia

In experiment on the model of acute cerebral ischemia was shown thiol antioxidants ability to influence on the stress-proteins HSP70 synthesis in hippocampus. Administration of the Tiotriasolin (50 mg/kg), Emoxipine (100 mg/kg), Mexidol (50 mg/kg) leads to the significant decrease of the cytotoxic marker of the oxide injury of the proteins – nitrotyrosine, and to the increase of the HSP70 concentration. Comparative characteristics of the mentioned drugs showed statistically significant advantage of the Tiotriasolin.

Key words: thiol antioxidants, stress-proteins HSP70, acute cerebral ischemia.

Надійшла: 16.11.2011 р.

Контактна особа: Павлов С. В., Запорізький державний медичний університет, просп. Маяковського, 26, м. Запоріжжя, 69035. Тел.: (61) 224-64-69.