

УДК 615.27:612.82.015.3

## НАРУШЕНИЕ ШАПЕРОННОЙ АКТИВНОСТИ HSP-70 – ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ ФОРМИРОВАНИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ

© 2011 г. И. Ф. Беленичев, С. В. Павлов, Е. П. Соколик\*

*Запорожский государственный медицинский университет*

В статье исследована роль характера экспрессии генов HSP70 в развитии патологических изменений в головном мозге экспериментальных животных в условиях ишемии. Установлены нейрон- и митопротективные свойства белка теплового шока HSP 70 и Hif1 $\beta$ , реализуемые за счет усиления синтеза антиоксидантных ферментов, стабилизации окислительно поврежденных макромолекул, прямого антиапоптотического и митопротективного действия. Подобная роль этих белков обуславливает актуальность поиска новых нейропротективных лекарственных средств, способных обеспечить протекцию/модуляцию генов, кодирующих эти белки.

*Ключевые слова: митохондриальная дисфункция, белки теплового шока, шапероны, ишемия.*

Известно, что церебральная ишемия вызывает гибель клеток головного мозга и сопровождается активацией наборов генов, которые обеспечивают адаптацию клеток и тканей к низкому содержанию кислорода [1].

В последнее время рядом экспериментальных работ установлена активация в условиях ишемии генов, кодирующих синтез белка HIF-1 (hypoxia – inducible factor) и, особенно, его субъединицы HIF-1 $\beta$  (120 кДа), который в условиях ишемии отвечает за экспрессию гена эритропоэтина и еще приблизительно 60 генов, продукты которых участвуют в таких процессах как пролиферация, апоптоз, ангиогенез, стабилизация белковых молекул в условиях оксидативного стресса [2, 3]. Кроме того, в последнее время появились данные о роли белков теплового шока (HSP) в стабилизации HIF-1 $\beta$  при церебральной ишемии, сопровождающейся интенсификацией процессов свободнорадикального окисления, смещением тиол-дисульфидного равновесия, развитием нитрозативного стресса, глутаматной эксайтотоксичности [3, 4]. HSP индуцируются в клетках всех живых организмов в ответ на действие многочисленных стрессорных факторов, таких как тепловой шок, гипоксия, ишемия, метаболические нарушения, вирусная инфекция и воздействия фармакологических агентов. Гены этих белков активируются не только в условиях стресса, но и в ходе основных процессов клеточной жизнедеятельности, пролиферации, дифференцировки и апоптоза [5]. HSP принимают участие во всех процессах жизнедеятельности тканей и органов. По-видимому, боль-

шинство защитных функций HSP связано с шаперонной активностью, т. е. с их способностью узнавать поврежденные или вновь синтезированные полипептиды и выправлять их структуру АТФ-опосредованным образом или удалять не поддающиеся исправлению белки через протеосомный аппарат. Было установлено, что один из шаперонов, белок HSP90, способен связываться с доменом PAS B-фактора и стабилизировать его. Другой клеточный шаперон, HSP70, узнает иной структурный мотив молекулы HIF-1 $\beta$ , так называемый домен кислородзависимой дегградации (ODD) [6]. Следует отметить, что роль этих межбелковых взаимодействий неясна; предполагается, что они необходимы для стабилизации HIF-1 $\beta$  в условиях нормоксии. В условиях гипоксии по крайней мере один из шаперонов (HSP70) вытесняется из комплекса с HIF-1 $\beta$  белком ARNT, который в течение 20–30 мин гипоксии предохраняет структуру фактора от прицельного протеолиза. Таким образом, можно предположить, что HSP70 способен увеличивать время жизни фактора HIF-1 $\beta$  в условиях до и после гипоксии и, таким образом, необходим клеткам для надлежащей реакции на лишение кислорода [7].

В последнее время появились данные о регулирующем действии белков HSP на явления митохондриальной дисфункции, развивающейся при ишемическом поражении головного мозга вследствие вышперечисленных биохимических изменений в мозговой ткани. Однако в доступных литературных источниках данной информации недостаточно, некоторые аспекты противоречивы, что и определяет перспективность дальнейших исследований [8–11].

\* Адресат для корреспонденции: 69035, Украина, Запорожье, пр. Маяковского, 26, тел: (0612) 24-64-69, факс: (0612) 33-60-07, e-mail: sokolikep@gmail.com.

Цель настоящего исследования — изучение роли генов, кодирующих синтез белков HIF-1 $\beta$ , Hsp-70 в формировании митохондриальной дисфункции, а также в реализации клеточного ответа на ишемию головного мозга.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные исследования проводились в два этапа. Первый — исследования *in vitro* в суспензии нейронов с добавлением токсических доз глутамата, хлор-2,4-динитробензена (селективный ингибитор глутатион-S-трансферазы), DNIC (динитрозольный комплекс железа с цистеином — донатор оксида азота), вещества которые в условиях *in vitro* в некоторой степени могут воспроизвести основные патобиохимические изменения в мозговой ткани, а именно развитие глутаматной эксайтотоксичности и нитрозативного стресса, смещение тиол-дисульфидного равновесия. На втором этапе исследование геномного ответа клетки проводили на модельной патологии путем моделирования церебральной ишемии.

Для исследований *in vitro* нейроны выделяли из коры головного мозга растущих 4-недельных крыс линии Вистар. Выделение обогащенных фракций нейронов и нейроглии проводилось в два этапа. На первом этапе мозговая ткань дезинтегрировалась с целью получения клеточной суспензии, на втором — осуществлялось дифференциальное ультрацентрифугирование в градиенте плотности сахарозы и фиккола. Для получения нейронов и нейроглии крыс декапитировали, быстро извлекали мозг. Кору головного мозга отделяли от белого вещества, измельчали и переносили в раствор, содержащий 7.5% поливинилпирролидона (ПВП), 1% -ный бычий сывороточный альбумин (БСА) и 10 мМ CaCl<sub>2</sub>. Полученную суспензию фильтровали через три сита под незначительным давлением для уменьшения потерь нейрональных клеток. Последовательно пропускали через сита клеточную суспензию и наслаивали на градиент, состоящий из 1 М и 1.75 М сахарозы. Центрифугирование проводили при 60000 g в рефрижераторной центрифуге VAC-25. В результате центрифугирования получали два слоя и плотный осадок. Верхний слой представлен остатками миелиновых оболочек, второй слой состоит из глиальных и нейрональных клеток. Осадок представлен телами нейронов со степенью чистоты 90%. В дальнейшем проводят дополнительную очистку второго слоя путем второго фильтрования и ультрацентрифугирования. Выделенные нейрональные клетки отмывали от сахарозы и альбумина охлажденным физиологическим раствором [12]. Полученную таким образом клеточную суспензию разделяли на серии: интактную, серию с добавлением глутамата (100 мкМ); хлординитробензена (80 мкМ) и DNIC (250 мкМ). Забор проб

для исследования проводился на 15-, 30- и 60-й минутах, методом иммуноблотинга исследовали концентрацию белков HSP 70, Hif 1 $\beta$ . Для приготовления белковых проб клетки собирали, отделяя их от субстрата смесью растворов трипсина и версена (1 : 1), трижды промывали в 10 мл холодного PBS, центрифугируя при 200 g в течение 5 мин. К клеточному осадку добавляли 100 мкл лизирующего буфера, состоящего из 20 мМ Трис-HCl, pH 7.5, 150 мМ NaCl, 0.5 % тритона X-100, 2 мМ EDTA и 1 мМ PMSF (производство Sigma, США). Экстракты центрифугировали при 8000 g в течение 10 мин, отбирали супернатант и измеряли в нем концентрацию общего белка по методу Бредфорда (Bradford, 1976). Электрофоретическое разделение белков проводили по методу Лаэммли (Laemmli, 1970). После перенесения белков с геля на нитроцеллюлозную мембрану ее инкубировали в течение 1 ч с моноклональными антителами к Hsp70, Hif1 $\beta$ , и с вторичными антителами против иммуноглобулина (IgG) мыши, меченными пероксидазой хрена (Sigma, США) [13, 14].

Концентрацию в гомогенате головного мозга HIF- и HSP-белков определяли методом Вестерн-блот анализа. Белки разделяли в 10%-ном полиакриламидном геле (ПААГ). Перенос белков с ПААГ на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли электроолюцией в течение 45 мин. Преинкубацию Вестерн-блотов проводили в растворе TBST с 5%-ным обезжиренным молоком в течение 1 ч. Затем вестерн-блоты инкубировали в присутствии первичных моноклональных антител (Santa Cruz Biotechnology) против HIF и HSP в разведении 1 : 1000 в течение 1 ч. После отмычки блоты инкубировали в присутствии вторичных антител (Santa Cruz Biotechnology), конъюгированных с пероксидазой хрена (разведение 1 : 2000) в течение 1 ч. Детекцию HIF и HSP осуществляли при помощи денситометрии в программе Adobe Photoshop.

О выраженности нитрозативного стресса в суспензии судили по накоплению нитротирозина. Количественное измерение протеинов, содержащих нитротирозин, проводилось с помощью ELISA-набор Nitrotyrosine — набор для твердофазного иммуноферментного анализа нитротирозина, основанный по принципу “сэндвича” [15].

Образцы и стандарты инкубируются в микропланшете, покрытой антителами, которые связывают нитротирозин. Во время инкубации нитротирозин захватывается солидносвязанным антителом. Биотинилированное второе антитело (трейсер) добавляется в ячейки к нитротирозину. Если нитротирозин присутствует в образце, трейсер-антитело связывается с захваченным нитротирозином. Насыщенность цвета развивается пропорционально количеству нитротирозина в

образце. Концентрация нитротирозина в образцах, измерение которой проводится параллельно со стандартами, может быть определена по стандартной кривой.

Моделирование церебральной ишемии было выполнено на монгольских песчанках (*Meriones unculatus*), массой 70–90 г, которые по данным литературы последние лет наиболее часто используются для моделирования нарушения мозгового кровообращения, что обусловлено разъединением большого круга кровообращения, слабо развитой системой коллатерального кровообращения. Нарушение мозгового кровообращения вызывали необратимой односторонней перевязкой сонной артерии [16].

На 4- и 12-е сутки эксперимента выделенное ишемизированное полушарие головного мозга тщательно промывали охлажденным 0.9%-ным раствором KCl (4°C), измельчали и гомогенизировали в 10-кратном объеме среды: сахарозы – 250 мМ; трис HCl-буфера – 20мМ, ЭДТА- 1 мМ (рН 7.4). Для выделения митохондрий гомогенат центрифугировали 7 мин при 700 g, (4°C). Затем супернатант центрифугировали повторно 15 мин при 11000 g (4°C). Митохондрии суспензировали в небольшом объеме среды выделения, не содержащей ЭДТА, и хранили на льду. Образование поры регистрировали спектрофотометрически при 540 нм ( $A_{540}$ ), вызванное набуханием митохондрий. Открытие митохондриальной поры инициировали путем добавления в суспензию митохондрий избытка глутамата и кальция [12, 17].

Исследование характера экспрессии генов HSP 70, Hif 16 проводили методом иммуноблоттинга по выше описанной методике.

Результаты исследования обработаны с применением статистического пакета лицензионной программы “STATISTICA® for Windows 6.0” (Stat-Soft Inc., № AXXR712D833214FAN5), а также “SPSS 16.0”, “Microsoft Excel 2003”. Отдельные статистические процедуры и алгоритмы реализованы в виде специально написанных макросов в соответствующих программах.

Для всех видов анализа статистически значимыми считали различия при уровне значимости  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования *in vitro* показали, что введение в инкубационную среду глутамата (100 мкМ), хлординитробензена (ХДБ) (80 мкМ), а также DNIC (250 мкМ) приводило к изменению характера экспрессии HSP 70, Hif 16, однако, данные изменения носили разнонаправленный характер. Так, в суспензиях с внесением глутамата и ХДБ наблюдалось постепенное увеличение концентрации белков HSP 70 и Hif 16 с максимальным при-

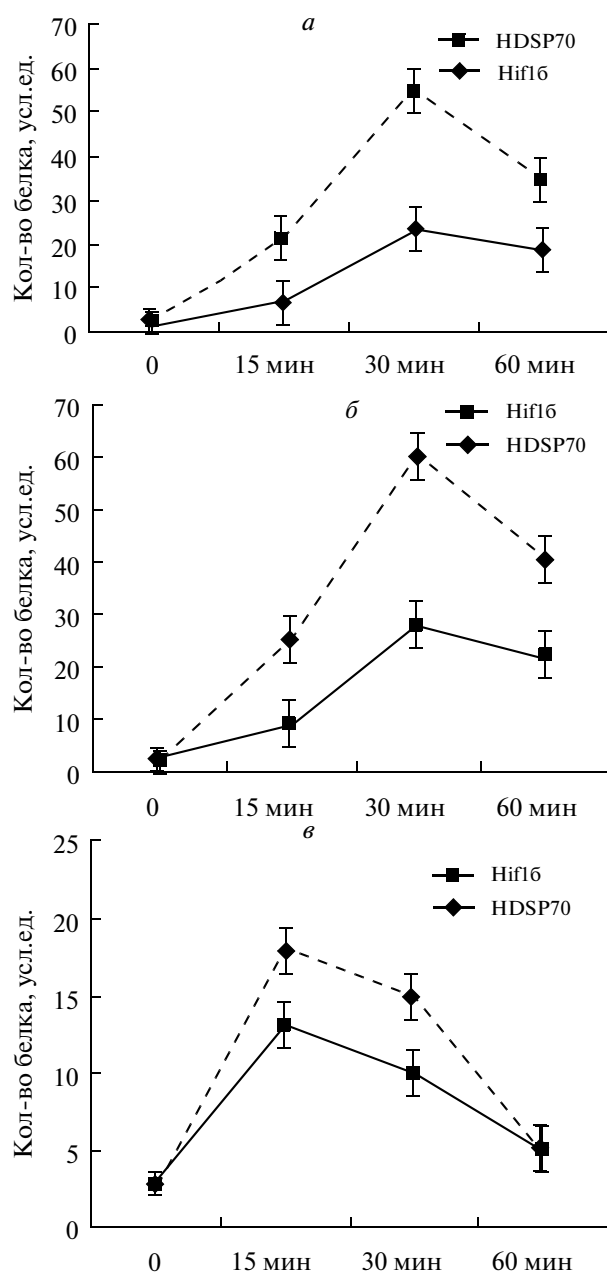
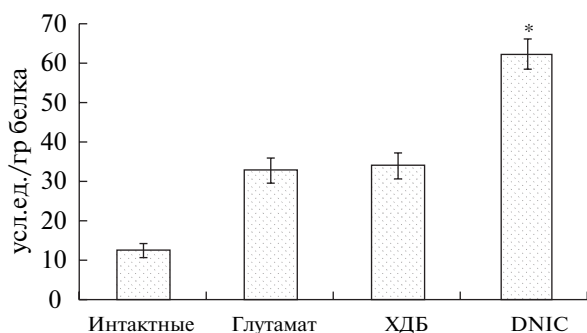


Рис. 1. Динамика экспрессии HSP70, Hif16 в суспензии нейронов с добавлением глутамата (А), ХДБ (Б), DNIC (В).

ростом на 30-й мин инкубации. Далее к 60-й мин наблюдалось падение концентрации HSP 70 в среднем на 33% по отношению к 15 минуте, Hif16 оказался более устойчив, падение его активности составило в среднем 18% (рис. 1 а, б). Исследования суспензии с добавлением DNIC показало, что накопление HSP 70 и Hif 16 на 15-й мин происходило менее интенсивно, чем в суспензиях с добавлением глутамата и ХДБ и на 60-й мин падение HSP 70 по отношению к 15-й мин составило 66%, а Hif 16 – на 50% (рис. 1 в).



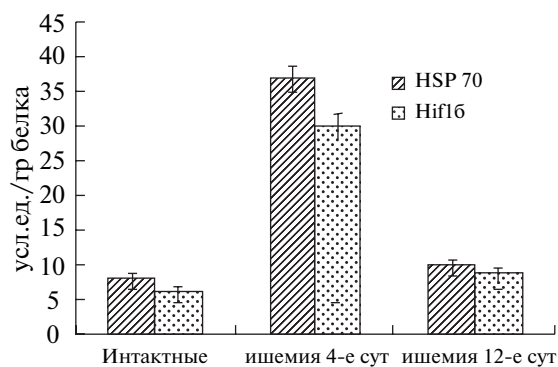
**Рис. 2.** Концентрация нитротирозина в суспензиях выделенных нейронов с добавлением глутамата, ХДБ, DNIC.

Примечание: \* —  $p \leq 0.05$  по отношению к глутамату и ХДБ.

Повышение в исследуемых суспензиях на 15-й мин экспрессии HSP 70 и Hif 1б объясняется шаперонной функцией HSP70 в условиях повреждающего действия различных токсических агентов на клетку. Считается, что белки теплового шока выполняют функции молекулярных шаперонов и предотвращают агрегацию поврежденных белков в клетке. В ряде работ было показано, что в условиях *in vitro* HSP 70 способен предотвращать агрегацию окислительно поврежденных цитратсинтазы, глутатион-S-трансферазы, супероксиддисмутазы, лактатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы [18, 19].

Кроме того, одной из основных функций HSP70 является индукция, а также увеличение продолжительности жизни стабильной формы Hif1б, которая включает дальнейшие приспособительные реакции в клетке. Hif 1б, в свою очередь, образует активный димер с субъединицей HIF-1 и начинает играть роль транскрипционного фактора, запуская транскрипцию генов ответа на гипоксию. Кроме того, как было описано выше, Hif 1б является индукционным фактором в синтезе некоторых ферментов антиоксидантной защиты. Данным обстоятельством объясняется более длительное накопление в суспензии Hif1б, кроме того, молекула Hif1б более стабильна к оксидативному стрессу [20].

Принимая во внимание полученные данные о способности Hsp70 в условиях токсического воздействия на клетку усиливать экспрессию фактора Hif1б, играющего первостепенную роль в клеточном ответе на гипоксию, можно предположить, что Hsp70 вмешивается в сигнальные пути ответа клетки на гипоксический стресс на уровне регуляции стабильности HIF-1б. Подобная двухступенчатая защита клетки является, по нашему мнению, эволюционно развитой и необходимой для усиления трансдукционного клеточного сигнала в ответ на повреждающие агенты.



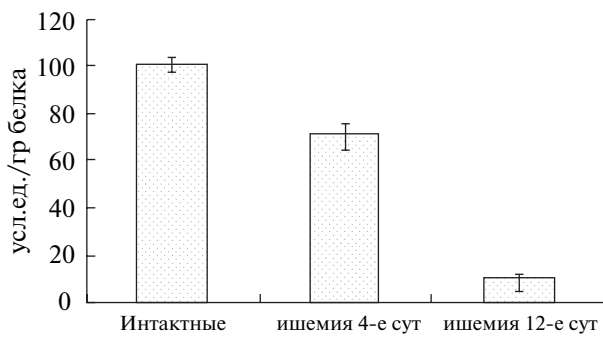
**Рис. 3.** Характер экспрессии генов HSP70 и Hif1б на 4 и 12 сутки моделирования ишемии головного мозга.

Разнонаправленный характер экспрессии исследуемых белков в суспензиях с добавлением глутамата, ХДБ и DNIC, объясняется тем, что DNIC является более токсической молекулой, так как NO-, и особенно, продукты его превращения, такие как пероксинитрит (ONOO<sup>-</sup>), ион нитрозония (NO<sup>+</sup>), нитроксил (NO) и диазотриоксид (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) являются основными факторами реализации нитрозативного стресса, в результате которого происходит прямое взаимодействие NO с металлами (гемовое железо гемоглобина, миоглобина, железосодержащих энзимов, а также негемовое железо железосерных белков и ДНК, медь и цинк активных центров ферментов), а также не прямое взаимодействие NO<sup>+</sup> (S-, N-, O-нитрозирование) с тиольными, фенольными, гидроксильными и аминогруппами белков и ДНК [21–23]. Слабой экспрессией факторов HSP 70 и Hif1б, и соответственно низкой их шаперонной активностью, объясняется значительный прирост в суспензии выделенных нейронов с DNIC, по отношению к глутамату и ХДБ нитротирозина — основного маркера окислительного повреждения белковых молекул (рис. 2).

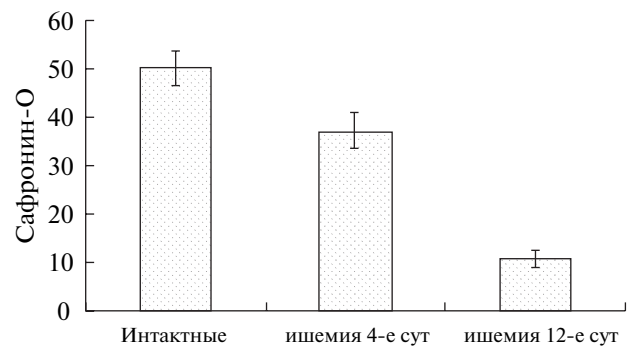
Вторым этапом исследований стали исследования характера экспрессии HSP 70, Hif1б на модели ишемического поражения головного мозга на 4-е и 12-е сут эксперимента.

Моделирование ишемического поражения на 4 сутки эксперимента показало существенное увеличение концентрации белков HSP70, Hif1б, что связано, по нашему мнению, с их шаперонной активностью в условиях развивающегося оксидативного стресса, направленное на интенсификацию резервно-адаптационных возможностей в острый период ишемии (рис. 3–5).

Известно, что в зависимости от концентрации образовавшихся активных форм кислорода окислительный стресс в конечном итоге ведет либо к некрозу, либо к апоптозу. Высокий уровень актив-



**Рис. 4.** Открытие митохондриальной поры на 4-е и 12-е сутки экспериментальной ишемии головного мозга.



**Рис. 5.** Изменение мембранного потенциала митохондрий мозга экспериментальных животных на 4-е и 12-е сутки эксперимента.

ных форм кислорода вызывает сильное повреждение белков, липидов, нуклеиновых кислот, следствием чего является некроз. Умеренный окислительный стресс вызывает программируемую гибель клетки, т.е. приводит к апоптозу. HSP70 и Hif1 $\beta$  за счет позитивного влияния на синтез антиоксидантных ферментов, шаперонную активность, стабилизацию актиновых филаментов препятствуют развитию некроза. Нейропротективная роль Hsp70 в условиях ишемии была показана и работами некоторых зарубежных исследователей [14, 18, 20]. Так, работами Paredoroulos M.C. была показана роль повышения экспрессии Hsp70 в клетках мозга (в астроцитах) в защите их от гибели, вызванной кислородным голоданием. Кроме того, была продемонстрирована способность очищенного препарата Hsp70 повышать выживаемость нейронов, участвующих в глутаматергической синаптической передаче в обонятельной коре мозга крыс, от разрушающего воздействия тяжелой аноксии [24]. Тем не менее, до сих пор неясно, каков механизм защитного действия Hsp70. Принимая во внимание данные о способности Hsp70 усиливать жизнеспособность нейрональной клетки в условиях гипоксии и факт взаимодействия Hsp70 и HIF-1 $\beta$ , играющего первостепенную роль в клеточном ответе на гипоксию, можно предположить, что Hsp70 участвует в регуляции сигнальных путей ответа клетки на гипоксический стресс на уровне регуляции стабильности HIF-1 $\beta$ . Зафиксированное повышение экспрессии Hsp70 на 4-е сут экспериментальной ишемии подтверждает значимость шаперона Hsp70 для стабилизации системы реакции клеток на ишемию; по-видимому, этот механизм лежит в основе защитной активности белка.

Кроме того, нейропротективный эффект Hsp70 в условиях ишемии объясняется и его антиапоптотическим, а также митопротективным действием. В настоящее время в литературе постулируется три основных пути влияния белков теплового шока на процессы апоптоза. Во-пер-

вых, они могут влиять на функционирование и передачу сигнала от рецептора Fas/Apo1 внутрь клетки, во-вторых, они могут тем или иным способом влиять на выход цитохрома C из митохондрий и, наконец, в-третьих, эти белки могут влиять на формирование апоптосом и активацию каскада каспаз. Hsp27 блокирует апоптоз, вызванный активацией рецептора Fas/Apo1. После связывания с лигандом рецептор взаимодействует с адаптерными белками, одним из которых может быть белок FAD [25, 26]. Этот адаптерный белок связывает неактивную прокаспазу 8 и способствует ее активации при связывании рецептора с лигандом. Каспаза 8 активирует каспазы 3, 6 и 7 и тем самым инициирует протеолиз белков мишеней, что в конечном итоге приводит к апоптозу. Кроме того, каспаза 8 может активировать белок Bid, вызывающий высвобождение цитохрома C из митохондрий. Место действия Hsp27 в этой сложной цепочке реакций пока точно не установлено. Альтернативный путь запуска апоптоза через Fas/Apo1 включает белок Daxx. Механизм действия этого белка не достаточно изучен. В норме Daxx локализован в ядре, где он связан с определенными белками, но способен перемещаться в цитоплазму и играть роль адаптерного белка, ответственного за запуск каскада JNK-киназ путем активации Fas/Apo. Предполагают, что HSP70 способен перемещаться в ядро, где он взаимодействует с Daxx, препятствуя его выходу в цитоплазму и активации рецептора. Ранее отмечалось, что HSP70 могут участвовать в регуляции апоптоза не только на уровне рецептора Fas/Apo1, но и на уровне определенных внутриклеточных белков-мишеней [27]. Действительно, было показано, что HSP70 предотвращает апоптоз, инициируемый митохондриями, при этом авторы предлагают разные механизмы действия белков теплового шока. Как известно, падение мембранного потенциала, вызываемое ишемией головного мозга, приводит к высвобождению цитохрома C из митохондрий. В цитоплазме цитохром C связывает-

Динамика изменений нитротирозина в гомогенате левого ишемизированного полушария головного мозга животных в различные сроки эксперимента

Серии животных	Нитротирозин, усл.ед./гр. белка
Интактные	8.7 ± 1.43
Ишемия 4-е сут	20.8 ± 1.75
Ишемия 12-е сут	84.2 ± 2.7

ся с белком Араf1, дезокси АТФ и прокаспазой 9, формируя так называемую апоптосому. Формирование апоптосомы сопровождается автокаталитической активацией прокаспазы 9 и ее переходом в активную форму каспазы 9. Этот фермент активирует прокаспазу 3 и следующие за ней каспазы, участвующие в процессе апоптоза. HSP70 ингибирует апоптоз на этапе между высвобождением цитохрома С и расщеплением прокаспазы 9 в апоптосоме. В последнее время в литературе появились данные о том, что HSP70 способен взаимодействовать с цитохромом С [28]. Вопрос о том, какая часть, освободившегося из митохондрий цитохрома С связывается с HSP 70, остается открытым. Рядом работ было показано, что HSP70 связывает лишь очень незначительную долю вышедшего из митохондрий цитохрома С и, поэтому, не может играть существенной роли в формировании апоптосомы [18, 29]. По данным этих авторов Hsp27 препятствует снижению мембранного потенциала, вызываемого белком Вах, но не взаимодействует с этим белком. Авторы предполагают, что при митохондриальном пути развития апоптоза HSP70 действует на более ранних этапах этого сложного процесса и предотвращает нарушение структуры актиновых филаментов. Данная гипотеза подтверждается и нашими данными. Так, на 4-е сут эксперимента на фоне значительного прироста HSP 70 и Hif1б явления митохондриальной дисфункции (открытие митохондриальной поры, сохранность заряда митохондрий) не были выражены. Однако регистрирование этих показателей на 12-е сут эксперимента показали существенное проявление данных изменений, а именно падение заряда митохондрий более чем на 60%, а также открытие митохондриальной поры. Следует отметить, что данные изменения протекали на фоне падение активности HSP 70 и Hif1б.

Подобные динамические изменения объясняются срывом адаптационных возможностей организма на 12-е сут эксперимента, а также развитием нитрозативного стресса, о чем свидетельствует увеличение количества нитротирозина в головном мозге более чем на 75% по отношению к животным на 4-е сут (табл. 1).

Подобные изменения связаны с гиперпродукцией АФК и цитотоксических форм оксида азота, приводящих не только к модификации (обрати-

мой и необратимой) макромолекул, в том числе и самих HSP 70 и Hif1б, но и снижением экспрессионной активности генов, кодирующих синтез последних. Рядом работ доказана роль дериватов оксида азота в подавлении геновой активности и снижении уровня различных транскрипционных факторов. В предыдущих работах было показано, что избыток таких форм оксида азота как пероксинитрит и ион нитрозония вначале нитролизует тиольные — редоксизависимые участки этих генов, затем, при повышении концентрации, окисляет их [17, 28]. Пероксинитрит приводит к нитрозилированию гуанина и разрыву цепочек ДНК. В отношении повреждений генома известен еще один эффект NO: его дериваты с супероксидрадикалом ингибируют ферменты, ответственные за репарацию ДНК. В зависимости от источника (разные доноры NO) показано действие NO на алкилтрансферазу, формамидопиримидин-ДНК-гликозилазу и лигазу. NO повышает активность PARP в клетках Беца и ADP-рибозилирование при глобальной ишемии, возможно вследствие разрывов ДНК, но это скорее приводит к некрозу из-за истощения пула NAD и АТФ [22].

Таким образом, подводя итог вышесказанному, можно сделать вывод, что белки HSP 70 и Hif1б являются неизбежными спутниками патобиохимических реакций, развивающихся при ишемическом повреждении головного мозга и выполняющих в данных условиях протективную функцию, реализующуюся посредством усиления синтеза антиоксидантных ферментов, стабилизацией окислительно поврежденных макромолекул, прямым антиапоптотическим и митопротективным действием. Подобная роль данных белков в клеточных реакциях при ишемии ставит вопрос о разработке новых нейропротективных средств, способных обеспечивать модуляцию/протекцию генов, кодирующих синтез белков HSP 70 и Hif1б.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Iadecola C.* / Cerebral ischemia. New Jersey: Humana Press, 1999. P. 3–33.
2. *Маргулис Б.А., Гужова И.В.* // Цитология. Т. 4. 2000. № 42. С. 323–328.
3. *Мокрушин А.А., Павлинова Л.И., Гужова И.В., Маргулис Б.А.* // Докл. РАН. 2004. Т. 394. № 3. С. 419–422.
4. *Berchner-Pfannschmidt U., Wotzlaw C., Merten E., Ackner H., Fandrey J.* // Biol. Chem. 2004. V. 385. P. 231–237.
5. *Dhar-Mascareno M., Sacramo J.M.* // Free Radic. Biol. Med. 2005. V. 38. № 10. P. 1548–1554.
6. *Dery M.A., Michaud M.D., Richard D.E.* // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2005. V. 37. P. 535–540.
7. *Huang L.E., Gu J., Schau M., Bunn H.F.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 7987–7996.

8. Лю Б.Н. // Усп. совр. биологии. 2001. Т. 121. № 5. С. 488–501.
9. Carmody R.J., Cotter T.G. // Redox Rep. 2001. № 6. P. 77–90.
10. Katschinski D. M., Le L., Schindler S.G., Thomas T., Voss A.K., Wenger R. // Cell Physiol. Biochem. 2004. V. 14. P. 351–360.
11. Suzuki K., Sawa Y., Kaneda Y., Ichikawa H., Shirakura R., Matsuda H. // J. Mol. Cell Cardiol. 1998. V. 30. P. 1129–1136.
12. Прохорова М.И. Современные методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен). Л.: Изд-во ЛГУ. 1982. 272с.
13. Bradford M. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.
14. Brown I.R. // J. Neurosci. Res. 1990. V. 27. P. 247–255.
15. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Free radicals in biology and medicine. Oxford Press, 1999. 248 p.
16. Стефанов О.В. Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації). Київ: “Авіацелена”, 2002. 527с.
17. Беленичев И.Ф., Колесник Ю.М., Павлов С.В., Абрамов А.В., Бухтиярова Н.В. // Междунар. невролог. журн. 2008. № 4 (20). С. 23–29.
18. Morimoto R.I., Kline M.P., Bimston D.N., Cotto J.J. // Essays Biochem. 1997. V. 32. P. 17–29.
19. Nowak T.S., Jr., Osborne O.C., Suga S. // Prog. Brain Res. 1993. V. 96. P. 195–208.
20. Plumier J.C., Krueger A.M., Currie R.W., Kontoyianis D., Kollias G., Pagoulatos G.N. // Cell Stress Chaperones. 1997. № 2. P. 162–167.
21. Соловьев А.И., Стефанов А.В. // Соврем. проблемы токсикологии. 1998. № 1. С. 35–38.
22. Dimatteo M.A., Loweth A.C., Thomas S. // Apoptosis. 1997. № 2. P. 164–169.
23. Rivier C. // Neuroimmunomodulation. 1998. № 5. P. 203–213.
24. Papadopoulos M.C., Sun X.Y., Cao J., Mivechi N.F., Giffard R.G. // Neuroreport. 1996. V. 7. P. 429–432.
25. Kehrer J.P. // Teratology. 2000. V. 62. P. 235–246.
26. Suzuki K., Sawa Y., Kagisaki K., Taketani S., Ichikawa H., Kaneda Y., Matsuda H. // Basic Res. Cardiol. 2000. V. 95. P. 397–403.
27. Zhou J., Schmid T., Franc R., Bruno R. // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. P. 13506–13513.
28. Беленичев И.Ф., Черный В.И., Колесник Ю.М., Павлов С.В. и др. Рациональная нейропротекция – Донецк: Изд. Дом Заславский, 2009. 261с.
29. Yenari M. A., Giffard R. G., Sapolsky R. M., Steinberg G. K. // Mol. Med. Today. 1999. V. 5. P. 525–531.

Поступила в редакцию  
26.03.2011 г.