

УДК: 615.31:547.792:616.831-005.4-036.11-021

**ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ МОДУЛЯЦИЯ HSP70-ЗАВИСИМЫХ
МЕХАНИЗМОВ ЭНДОГЕННОЙ НЕЙРОПРОТЕКЦИИ В УСЛОВИЯХ
ПРЕНАТАЛЬНОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ
ЦЕРЕБРОКУРИНОМ И ТИОЦЕТАМОМ**

Соколик Е.П., Стеценко В.А.

Запорожский государственный медицинский университет, Украина, Запорожье.
Кафедра фармакологии и медицинской рецептуры (Научный руководитель –
зав. кафедрой, профессор, д.б.н. Беленичев И.Ф.)
E-mail: sokolikep@gmail.com

Данными исследованиями показано, что применение Цереброкурина и Тиоцетама по предложенной нами схеме оказывает позитивное воздействие на экспрессию HSP и HIF и значительно повышает их концентрацию в головном мозге в условиях пренатальной алкоголизации. Полученные нами результаты исследования раскрывают не только молекулярный механизм нейропротективного действия Цереброкурина и Тиоцетама, но и являются экспериментальным обоснованием для внедрения их в клиническую практику.

**Pharmacological modulation of HSP70 – dependent mechanisms
of endogenous neuroprotection in conditions of prenatal chronic
alcoholism by Cerebrocurin and Tiocetam**

Sokolik E.P., Stetsenko V.A.

One of the primary reactions of the genome in response to stress is different genesis induction of heat shock proteins – HSP (Heat shock proteins). The purpose of this study was to investigate the concentration of heat shock protein (HSP70) and hypoxia-inducible factor (HIF- 1) in the brain of rats undergoing chronic prenatal alcoholism in different periods of ischemia and define the role of these proteins in the implementation of neuroprotective effect of Cerebrocurin and Tiocetam. Cerebrocurin and Tiocetam directly or indirectly can modulate the expression of early response genes c-fos and thus the «run» software adaptation protein synthesis (including HSP and HIF) in neurons with acute cerebral ischemia. These studies have shown that using Cerebrocurin and Tiocetam on our proposed scheme has a positive impact on the expression of HSP and HIF and significantly increases their effect on concentration in the brain under conditions of prenatal alcoholism. Thus, our results reveal not only the study

of the molecular mechanism of neuroprotective activity of Cerebrocurin and Tiocetam, but are experimental basis for their introduction into clinical practice.

Различные виды физиологического стресса (тепловой шок, радиация, гемодинамические нарушения, ишемия, оксидативный стресс и др.) обуславливают множественные изменения в клетках, в том числе структуры и функции белков. Одной из первичных реакций генома в ответ на различного генеза стресс является индукция белков теплового шока – HSP (Heatshockproteins). Повышение экспрессии генов, кодирующих белки теплового шока, регулируется на этапе транскрипции. Белки теплового шока называют белками стресса, так как повышение экспрессии соответствующих генов часто наблюдается при ответе на стресс [1]. Активное участие их в важнейших процессах функционирования клетки свидетельствует, что эти белки играют ведущую регуляторную роль в обеспечении репарации и деградации, а «поломки» в функционировании этой «белковой машины» – одна из причин дисфункции и повреждения органов и тканей. Белки теплового шока называют согласно их молекулярным массам. Например, наиболее изученные белки теплового шока HSP60, HSP70 и HSP90 относятся к семействам белков с молекулярными массами 60, 70 и 90 кДа, соответственно [1]. Существует класс белков (шапероны), главная функция которых состоит в восстановлении правильной третичной структуры повреждённых белков, а также образование и диссоциация белковых комплексов. Многие шапероны являются белками теплового шока, то есть белками, экспрессия которых начинается в ответ на рост температуры или другие клеточные стрессы [2]. Различные типы шаперонов участвуют в транспортировке веществ через мембраны, например в митохондриях и эндоплазматическом ретикулуме, участвуют в исправлении потенциального вреда, который возникает из-за неправильного сворачивания белков, участвуют в фолдинге только что созданных белков в тот момент, когда они «вытягиваются» из рибосомы [2].

В последнее время появились данные о роли HSP₇₀ в стабилизации индуцируемого гипоксией фактора (HIF-1a), который в условиях ишемии отвечает за экспрессию гена эритропоэтина и еще приблизительно 60 генов, продукты которых участвуют в таких процессах как пролиферация, апоптоз, ангиогенез, стабилизации белковых молекул в условиях оксидативного стресса [3-5]. В условиях гипоксии по крайней мере один из шаперонов (HSP70) вытесняется

из комплекса с HIF-1а белком ARNT, который в течение 20–30 мин гипоксии предохраняет структуру фактора от прицельного протеолиза. Таким образом, можно предположить, что HSP70 способны увеличивать время жизни фактора HIF-1а в условиях до и после гипоксии и, таким образом, необходимы клеткам для надлежащей реакции на лишение кислорода в условиях острого нарушения мозгового кровообращения. В настоящее время практически нет работ о фармакологической модуляции HSP70-зависимых молекулярных факторов эндогенной нейропротекции при хронической алкогольной интоксикации. Не существует и подходов к использованию нейропротекторов с HSP70-зависимым действием в комплексной терапии пренатальной хронической алкоголизации. Нашими работами описаны нейропротективные эффекты цереброкурина, тиоцетама и пирацетама при алкогольной энцефалопатии.

Исходя из выше приведенного, целью данного исследования явилось изучение концентрации белков теплового шока (HSP70) и фактора индуцированного гипоксией (HIF-1) в головном мозге перенесших хроническую пренатальную алкоголизацию в различные сроки ишемии и установление роли данных белков в реализации нейропротективного эффекта Цереброкурина и Тиоцетама.

Материалы и методы. Опыты проводили на самках белых крыс массой 150-180 г, полученных из питомника ГУ «Институт фармакологии и токсикологии АМН Украины». Крысы с 5-го по 20-й день беременности получали этанол в дозе 6-8 г/кг/день, контрольные крысы – изокалорический раствор сахарозы. Потомству алкоголизированных крыс сразу после рождения в течение 25 дней внутрибрюшинно вводили тиоцетам (125 мг/кг), пирацетам (125 мг/кг) и цереброкурин (0,05 мл/кг), контроль получал физиологический раствор. В каждой группе было по 20 новорожденных. Биохимические исследования головного мозга проводили на 26 сутки эксперимента, с этой целью животных декапитировали под тиопенталовым наркозом (30 мг/кг, внутрибрюшинно).

Все экспериментальные процедуры проводили согласно «Положения про использование животных в биомедицинских исследованиях»

Концентрацию в тканях головного мозга HSP- и HIF-белков определяли методом Вестерн-блот анализа. Белки разделяли в 10% полиакриламидном геле (ПААГ). Перенос белков с ПААГ на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли электроэлюцией в течение 45 мин. Преинкубацию Вестерн-блотов проводили в растворе TBST

с 5% обезжиренным молоком в течение 1ч. Затем вестерн-блоты инкубировали в присутствии первичных моноклональных антител (Santa Cruz Biotechnology) против HSP в разведении 1:1000 в течение 1 ч. После отмывки блоты инкубировали в присутствии вторичных антител (Santa Cruz Biotechnology), конъюгированных с пероксидазой хрена (разведение 1:2000) в течение 1 часа. Детекцию HSP-, HIF- белков осуществляли при помощи денситометрии в программе Adobe Photoshop.

Об эффективности проводимой фармакокоррекции судили по выраженность неврологического дефицита, который определяли по шкале McGrow. Тяжесть состояния определяли по сумме соответствующих баллов: до 3 баллов – лёгкая степень, от 3 до 7 баллов – средняя степень и от 7 баллов и выше – тяжёлая степень. Отмечали парезы, параличи конечностей, тремор, манежные движения, птоз, положение на боку, подвижность. Животных тестировали ежедневно, выставя сумму баллов.

Результаты исследования обработаны с применением статистического пакета программы «SPSS 16», «MicrosoftExcel 2003», «STATISTICA®forWindows 7.0» (StatSoftInc.), для всех видов анализа статистически значимыми считали различия при уровне значимости менее 0,05 .

Результаты и их обсуждения.Изучение концентрации в тканях головного мозга HIF- и HSP-белков показало, что после перенесенной пренатальной хронической алкоголизации наблюдалось снижение концентрации как HSP, так и HIF-белков, что по нашему мнению, объясняются срывом адаптационных возможностей организма при хронической алкогольной интоксикации, и обусловлено гиперпродукцией активных форм кислорода (АФК), цитотоксических форм оксида азота, приводящих не только к модификации (обратимой и необратимой) макромолекул, в том числе и самих HSP70 и HIF1б, но и снижением экспрессионной активности генов, кодирующих синтез последних [4]. Протективная функция HSP-белков при патологии ЦНС (ишемия, гипоксия, нейроинфекции, ЧМТ) направлена как на координацию свертывания новосинтезированных белков, исправление неправильно свернутых поврежденных и окислительно модифицированных белковых молекул, на перенос белков через клеточные мембраны, ингибирование агрегации белков и осуществление деградации по протеосомному пути. Кроме того, необходимо учитывать и тот факт, что HSP-белки являются основными индукторами фактора HIF, который включает дальнейшие приспо-

собительные реакции в клетке. Показано, что HSP-белок является шапероном фактора HIF и увеличивает продолжительность его жизни в условиях дефицита кислорода. Белок HIF, 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 показано нашими более ранними экспериментальными работами, HIF является индукционным фактором в синтезе некоторых ферментов антиоксидантной защиты [4]. Таким образом, можно предположить, что HSP70 способен увеличивать время жизни фактора HIF в условиях гипоксии и, таким образом, необходим клеткам для надлежащей реакции на лишение кислорода [4].

Курсовое назначение Цереброкурина и Тиоцетама приводило достоверному повышению содержания HIF и HSP белков в головном мозге. Их комбинация приводила к усилению эффекта. Назначение Цереброкурина и Тиоцетама повышало содержание HSP- и HIF-белков более чем в 1,5 раза по отношению к аналогичным показателям группы нелеченных животных.

Нейропротективное действие Цереброкурина и Тиоцетама проявлялось в уменьшении неврологического дефицита, о чем свидетельствовало достоверное снижение среднего балла по шкале С.Р. McGrow, а их комбинация имела более выраженное действие на исследуемый показатель.

Таким образом, реализация нейропротективного действия Цереброкурина и Тиоцетама осуществляется, по-видимому, за счет их способности повышать концентрацию в тканях головного мозга HSP-белков.

В условиях токсического пренатального повреждения головного мозга белки теплового шока (HSP) и фактор, индуцированный гипоксией (HIF-1) за счет позитивного влияния на синтез антиоксидантных ферментов, за счет шаперонной активности, стабилизации актиновых филаментов, препятствуют развитию некроза. Кроме того, рядом работ была показана роль повышения экспрессии HSP70 в клетках мозга (в астроцитах), в защите их от гибели, вызванной кислородным голоданием [1]. Также была продемонстрирована способность очищенного препарата HSP70 повышать выживаемость нейронов, участвующих в глутаматергической синаптической передаче в обонятельной коре мозга крыс, от разрушающего воздействия тяжелой аноксии [2].

Принимая во внимание данные о способности HSP усиливать

жизнеспособность нейрональной клетки в условиях гипоксии и факт взаимодействия HSP и HIF, играющего первостепенную роль в клеточном ответе на гипоксию, можно предположить, что HSP участвует в регуляции сигнальных путей ответа клетки на гипоксический стресс на уровне регуляции стабильности HIF. Известно, что изучаемые нами препараты – цереброкурин и тиоцетам непосредственно или опосредованно способны модулировать экспрессию генов раннего реагирования c-fos и, таким образом «запускать» программу синтеза адаптационных белков (в том числе HSP и HIF) в нейронах в условиях острой церебральной ишемии.

Литература

1. Santoro M.G. Heat shock factors and the control of the stress response // *Biochemical pharmacology* – 2000. – Vol.59. – №1. – P. 55-63.
2. Ellis R.J., Vies S.M. Molecular chaperones // *Annu. Rev. Biochem.* – 1991. – Vol. 60. – P. 321-47.
3. Dhar-Mascareno M., Sacramo J.M. Hypoxia – reoxygenation – induced mitochondrial damage and apoptosis in human endothelial cells // *Free Radic. Biol. Med.* – 2005. – Vol. 38. – №10. – P.1548-1554.
4. Беленічев І.Ф., Губський Ю.І., Левицький Є.Л. та інші. Антиоксидантна система захисту організму (огляд літератури) // *Совр. пробл. токсикол.* – 2002. – №3. – С.24-31.
5. Kehrer J.P. Cause-effect of oxidative stress and apoptosis // *Teratology.* – 2000. – 62. – P. 235-246.

УДК: 618.39-07-085-021.383

ОЦЕНКА МЕХАНИЗМОВ ГОРМОНАЛЬНОЙ АДАПТАЦИИ БЕРЕМЕННЫХ С НЕВЫНАШИВАНИЕМ

Сюсюка В.Г., Плотник В.А.

Запорожский государственный медицинский университет, Украина, г. Запорожье
Кафедра акушерства и гинекологии (зав. кафедрой – проф. Круть Ю.Я.)
E-mail svg.zp@i.ua, plotnikva@gmail.com

В статье дана оценка состояния механизмов гормональной адаптации у 67 женщин с невынашиванием и физиологическим течением беременности. Проведенное исследование позволи-