

УДК: 616-005.4-092-07:577.112

Павлов С. В., Бєленічев І. Ф., Нікітченко Ю. В., Горбачова С. В.

**МОЛЕКУЛЯРНО-БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ HSP 70-ОПОСЕРЕДКОВАНОЇ
ЦИТОПРОТЕКЦІЇ В УМОВАХ ПАТОЛОГІЇ ІШЕМІЧНОГО ГЕНЕЗУ****Запорізький державний медичний університет (м. Запоріжжя)****julianikitchenko25@gmail.com**

На сьогодні, патологія серцево-судинної і центральної нервової систем гіпоксичного генезу визначається значною поширеністю, високою частотою інвалідизації та смертністю. За даними ВООЗ, в економічно розвинених країнах летальність від інсульту займає 2-3 місце в структурі загальної смертності і лідирує серед усіх причин інвалідизації. У зв'язку з вищевикладеним, актуальним є подальше дослідження молекулярно-біохімічних аспектів патогенезу даних патологічних станів, а також розробка патогенетично обґрунтованих шляхів фармакокорекції [3,7].

Широко відомо, що в умовах гіпоксії в клітині відбувається посилення вільно-радикального окислення (ВРО) з подальшим розвитком оксидативного та нітрозуючого стресів. Локальна активація ВРО в зоні ішемії та накопичення продуктів деградації вільних радикалів стимулюють згортання крові, збільшують її в'язкість, підсилюють агрегацію і адгезію формених елементів крові. Висока концентрація пероксидів прискорює дегенерацію NO з утворенням пероксинітриа – вкрай цитотоксичного з'єднання. Прискорений розпад ендотеліального NO стимулює ангіоспазм. Крім того, вільні радикали модифікують ендотеліальні NO- рецептори, зменшуючи їх чутливість, а також безпосередньо шкідливу дію на кардіоміоцити та нейрони. Зазначені процеси посилюють ішемію, надають аритмогенний ефект, сприяють поширенню зони некрозу та пошкодження [2,8,24]. Зниження концентрації кисню в тканинах організму супроводжується накопиченням великої кількості відновлених форм різних з'єднань, в тому числі коферментів – НАДН, НАДФН, ФАДН, убіхінон. В умовах O₂-дефіциту це призводить до одноклеточного відновлення кисню до O₂⁻. Даний процес відбувається на кінцевій ділянці електронного дихального ланцюга [3,12,18,4].

Виявлено також, що радикал-утворюючі системи мітохондрій – рН-залежні і активізуються при ацидозі, а активність одного з ферментів – НАДН-оксидази мітохондрій, що утворює активні форми кисню, зростає в пошкоджених гіпоксією тканинах [5,9,13,27]. При ішемії різко зростає утворення АФК в мітохондріях при роз'єднанні дихального ланцюга і окисного фосфорилування. Причому швидкість утворення АФК знаходиться в прямій залежності від ступеня блокування дихального ланцюга. Даний процес призводить до відновлення переносників на передуючих блокаді ділянках, особливо ротенон- і актіноміцин – залежних, які сприяють посиленню блокади і «витік» електронів, і в кінцевому підсумку, гіперпродукції АФК. Представлений вище патологічний каскад, призводить до окислювальної

деструкції ліпідів, білків мембрани клітини і мітохондрій, що в значній мірі визначає запуск процесів клітинної загибелі, яку ініціює порушенням клітинної відповіді генома.

Однією з типових реакцій клітини у відповідь на гіпоксію і посилення ВРО є індукція HSP 70. Відомо, що стресові впливи, і в першу чергу тепловий шок, викликають накопичення HSP 70 в клітинах різного походження. (Georgopoulos, Welch, 1993; Hartl 1996; Маргуліс, Гужова, 2000). Також синтез HSP 70 посилюється і при підвищенні температури та при багатьох інших несприятливих впливах, таких як додавання до клітин органічних розчинників, важких металів, сильних оксидантів, а також під впливом деяких гормонів і ростових факторів. У зв'язку з цим деякі автори називають HSP 70 – «стрес-білками». В еволюційному відношенні HSP 70 відносяться до висококонсервативних білків і виявляються у всіх організмах від бактерій до людини. Це свідчить про те, що вони виконують фундаментальні клітинні функції. Як цитопротекторні властивості стрес-білків, так і їх роль в процесах нормальної життєдіяльності клітини багато в чому залежить від того, що ці білки є шаперонами, полегшуючи таким чином формування вторинної та третинної структури інших білків [10,11,23,35].

HSP 70 також беруть участь в процесах репарації або елімінації неправильно згорнутих або денатурованих білків. Як шаперони, вони беруть участь в синтезі глікопротеїнів, до яких відноситься тиреоглобулін, причому механізми стресорної активації синтезу білків теплового шоку характеризуються високою тканиною специфічністю. Передбачуваний механізм взаємодії малих білків теплового шоку з частково денатурованими білками [3,5,24,25,29,32].

У людини існує не менше 11 генів сімейства HSP 70, які кодують групу близьких білків з молекулярною масою від 66 до 78 кДа. Базовий рівень експресії і індукційність у відповідь на різні фактори стресу розрізняються для більшості членів цього сімейства. Шаперони HSP 70 мають два основних функціональних домена. Високо консервативний NH₂-кінцевий домен має АТФ-азну активність і міцно зв'язується з АДФ і АТФ, а COOH-термінальний домен зв'язується з поліпептидами. Відомо, що HSP 70 переважно зв'язується з незгорнутими або частково згорнутими білками, та запобігає їх агрегації або неправильному фолдінгу. Номенклатура різних білків сімейства HSP 70 обширна і заснована на клітинному розподілі і індукційності [5,10,11,35].

Індукційний HSP 70 – це білок, експресія якого активується при попаданні клітини або організму в умови стресу. HSP 70 необхідний для клітинного

відновлення, виживання і забезпечення нормальних клітинних функцій. Він також є молекулярним шапероном, який запобігає агрегації білків і відновлює пошкоджені білки у відповідь на клітинний стрес, викликаний несприятливими впливами навколишнього середовища, патогенами і захворюваннями. В даний час проводяться дослідження з метою застосування протективних можливостей HSP 70 для терапевтичних цілей. Молекула HSP 70 являє собою димер, який має здатність формувати високоолімерні комплекси з багатьма структурами в клітині і має щонайменше 8 ізоформ, набір і концентрація яких залежать від типу клітини і контролюються видом стресового впливу. У людей і приматів ініціація синтезу HSP при стресі пов'язана з активацією, щонайменше, трьох рецепторних систем: Са-мобілізуючих, α -блокаторів та рецепторів стероїдних гормонів [2,24,28]. Максимальний синтез HSP 70 в клітинах спостерігається через 7-8 годин після закінчення теплового шоку і підтримується на високому рівні ще 4-5 ч. Через 24 год після шоку синтез HSP 70 значно зменшується. Навпаки, для загального синтезу клітинних білків характерна значна депресія під час шоку і в перші години після нього. Синтез основних клітинних білків починає посилюватися через 7-8 год і досягає нормальних значень лише через 24 годин після закінчення шоку. У зв'язку з цим, на певному етапі після шоку Hsp70 може становити 15-20% від усіх білків цитоплазми. Крім того, після стресу HSP 70 може накопичуватися в найбільш «вразливих» ділянках клітини, а саме: в перші 4-5 год – в ядрі, потім в перинуклеарній, присарколемальній зонах і вздовж актинових філаментів. Сенс накопичення HSP 70 в ядрі після пошкодження клітини полягає в захисті генетичного матеріалу. Таким чином, HSP 70 відіграє значну роль в підвищенні стійкості клітинного апарату біосинтезу білка до пошкоджуючих факторів. Крім того, є дані про зв'язок HSP 70 з знову синтезованими важкими ланцюгами Ig в тих областях, де може відбуватися як нормальне зв'язування з легким ланцюгом, так і небажане зв'язування важких ланцюгів один з одним, тобто його присутність перешкоджає утворенню агрегатів з важких ланцюгів. Потім в ході АТФ-азної реакції легкий ланцюг витісняє білок теплового шоку і формується нормальна структура Ig. Накопичення HSP 70 після короточасних впливів на клітину тепловим шоком лежить в основі феномена тимчасового підвищення порогу температурної чутливості клітин, так званої термо-толерантності. Фізіологічна роль HSP 70 вивчалася на безлічі моделей при таких умовах, як гіпертермія, гіпертензія, контакт з токсичними хімічними речовинами, гіпоксія, ішемія, запалення, аутоімунні патології, апоптоз, злоякісні пухлини, трансплантація органів, бактеріальні та вірусні інфекції. Рівень HSP 70 також досліджували при нормальних процесах старіння, сперматогенезу, в залежності від фази менструального циклу та фізичного навантаження. Поруч дослідників зазначено, що при аутоімунних захворюваннях, таких як ВКВ, РА, підвищення вмісту HSP 70 в лімфоцитах крові пов'язано з активністю патологічного процесу

[3,5,25,35]. При повторюваних епізодах ішемії також була виявлена активація синтезу HSP 70. Було показано, що короточасні епізоди оклюзії коронарних артерій з інтервалами реперфузії істотно підвищували толерантність міокарда до наступних, більш тривалих її епізодами, що призводило до зниження частоти розвитку інфаркту міокарда, зниження ризику загрожуючих життю аритмій. Білки теплового шоку в цій ситуації виступають не тільки як шаперони, але і як потенційні антиоксиданти. Таким чином, виявлено зв'язок між вмістом HSP 70 в клітинах і стійкістю тканин до ішемії та реперфузії, Участь HSP 70 у формуванні термотолерантності і явищ перехресної толерантності до різних пошкоджуючих агентів служать проявом їх яскраво виражених цитопротекторних властивостей. Разом з тим, HSP 70 необхідні для нормальної життєдіяльності клітини, тому що беруть участь в підтримці клітинного гомеостазу, процесах росту і диференціюванні клітин [5,26,30,31].

Можна виділити наступні основні положення про фізіологічну роль HSP 70: у клітині після стресу швидкими темпами відбувається накопичення HSP 70, попереднє відновлення синтезу інших клітинних білків. У ранній постстресорний період HSP 70 локалізується в основному в ядрі, в пізній – в 3 областях цитоплазми: присарколемальній, перинуклеарній і вздовж актинових філаментів. У клітині, що зазнала стресорного впливу, HSP 70 миттєво нормалізують формування рибосом, попереджаючи агрегаційні процеси при згортанні білків і відновлюючи нормальну структуру міофібрілярного апарату. У постстресорний період HSP 70 є складовою частиною клітинної системи репарації, захищаючи процеси біосинтезу білка і структурну цілісність клітинних пептидів [6,19,26].

Шаперонна активність HSP 70 модулюється білками-помічниками або ко-шаперонами, пов'язаними з молекулою HSP 70, нуклеотидами, змістом одно- і двовалентних іонів, а також концентрацією білків-мішеней. У кожній клітинній органелі вищих тварин є свій шаперонний механізм, дія якого заснована на певному члені сімейства HSP 70. Одним з найбільш примітних властивостей HSP 70 є захисна функція, яку білок демонструє в ході реакції клітини або організму на дію різних несприятливих факторів середовища [6,28]. Отримано багато доказів протективного ефекту HSP 70, і в цьому плані написані сотні робіт і кілька десятків монографій. Найбільш переконливі аргументи на користь захисної функції HSP 70 отримані в експериментах по введенню в клітини самого білка або його гена, після чого оцінювалася стійкість клітин до пошкоджень факторами. З'ясувалося, що протективний ефект HSP 70 залежить від дози білка, отриманої даною клітиною, і проявляється по відношенню до безлічі факторів, зокрема тих, які викликають програмовану клітинну смерть, апоптоз. В даний час зацікавленість до цитозахисних властивостей білків-шаперонів виходить за рамки суто біологічних досліджень. Результати експериментів останніх 10-15 років, виконаних, в основному, на клітинних культурах і експериментальних тваринах, дали можливість пред- ставити кілька напрямків практичного використання

захисних властивостей HSP 70 [5,26,28,29,31]. По-перше, стійкість клітини, так і організму в цілому, можна підвищити шляхом збільшення внутрішньоклітинного вмісту HSP 70. Останнє може бути досягнуто в результаті прекодиціонування (дозоване нагрівання, гіпоксія), під дією лікарських препаратів, після трансфекції клітин геном HSP 70. По-друге, останнім часом привертає увагу питання про захисні властивості позаклітинного HSP 70. Уже в кінці 1980-х рр. було виявлено, що HSP 70 може залишати клітини моллюсків [3,5], ембріональні клітини щура і виходити в позаклітинний матрикс. Подібні дані були отримані при аналізі білків, що виходять з клітин гліоми людини [19]. Опинившись в позаклітинному середовищі, HSP 70 може взаємодіяти з іншими клітинами, наприклад, нейронами і захищати їх від загибелі [19]. Захисний ефект екзогенного HSP 70 при дії індукуючого апоптозу фактору некрозу пухлин був показаний також Андреевою Л.І та співавторами на лінії клітин мієлоїдної лейкемії людини U-937 [21]. Таким чином, HSP 70, доданий до клітин ззовні, здатний захищати їх подібним з внутрішньоклітинним білком чином. На тканинному рівні також було показано, що препарат HSP 70, що складається з суміші двох ізоформ: індубібельної (HSP 70) та конститутивної (HSP 70), при введенні в око щура поглинався сітківкою і захищав фоторецептори при їх пошкодженні світлом [6,21,26]. На зрізах мозку миші було показано, що рекомбінантний HSP 70, доданий в інкубаційне середовище, імітував захисний ефект теплового прекодиціонування, який полягав в нормалізуючій дії на мініатюрні синаптичні струми, викликані гамма-аміномасляною кислототою, глутаміновою кислотою і гліцином [1,3]. Взаємодія HSP 70 з клітинною поверхнею і його поглинання було показано для декількох типів клітин різного походження. У центральній нервовій системі екзогенний HSP 70, ймовірно, може взаємодіяти з гліальними клітинами і нейронами. Імуногістохімічно показано, що обидві ізоформи HSP 70 найбільшою мірою представлені в синапсах. Однак, основна роль у функціонуванні ендо- та екзоцитозу синаптичних бульбашок належить HSP 70 [14]. У корі мозку і гіпокампі щура HSP 70 є основним компонентом постсинаптичної мембрани, а також пов'язаний з аморфними субсинаптичними структурами і цистернами шипикового апарату. HSP 70 виявлений лише в невеликих кількостях в постсинаптичній мембрані. Обидві ізоформи HSP 70 можна вважати синаптичними маркерами [5, 15].

Крім того, вони виявлені в достатній кількості в астроглії. Таким чином, можна припускати, що БТШ70, може залишати клітини паренхіми мозку і поглинатися ними. Присутність HSP 70 в синапсах передбачає його причетність до їх функціонування і, можливо, до модуляції синаптичної передачі. Нарешті, необхідно доповнити картину взаємодії позаклітинного HSP 70 зі спеціалізованими Tolllike рецепторами (TLR-2 і TLR-4), пов'язаними з CD14 [3,5] на поверхні мікрогліальних клітин, що мають мезенхімальне походження, які традиційно вважаються спеціалізованими макрофагами ЦНС. В результаті такої взаємодії клітини мікроглії активуються, що призводить до збільшення синтезу прозапальних

цитокінів. Такий же спрямованістю дії HSP 70 виявляють в кардіоміоцитах в умовах гіпоксії. Рядом досліджень продемонстрована здатність даних білків регулювати процеси енергетичного метаболізму (активуючи компенсаторні шляхи продукції енергії), а також зменшуючи цитотоксичні наслідки нітрозуючого, оксидативного стресу, модулювати концентрацію IL33. Подібні ефекти HSP 70 щодо IL33, на нашу думку, пояснюється тим, що білки теплового шоку мають так званий процитокіновий ефект. Цю властивість мають не тільки HSP 70, а й іншим шаперони, такі як HSP 90, HSP 32. Для позаклітинного HSP 70 був запропонований новий термін «шаперокін» [1,5,5,19]. На відміну від позаклітинного HSP 70 збільшення експресії або вмісту внутрішньоклітинного HSP 70 викликає гальмування передачі проліферативних, апоптотичних, запальних сигналів.

У зв'язку з посиленням біологічної ролі HSP 70 даний білок останнім часом широко використовується, як маркер для лікування і моніторингу ефективності лікування гіпоксичних станів. Результати всезростаючого числа сучасних досліджень, присвячених білкам теплового шоку і зокрема Hsp70, свідчать про важливість їх ролі у відновленні кардіоміоцитів і клітин головного мозку після ішемії і реперфузії, обмеження обсягу інфаркту, а також в ішемічному прекодиціонуванні. Як ми вже вказували, практично всі клітинні елементи відповідають на стрес гіперекспресією білків теплового шоку.

В ході проведення досліджень В. Dybdahl і співавт., представили гіпотезу, про те, що білок теплового шоку HSP 70 може бути представлений в якості цінного маркера некрозу міокарда. Спостерігалася група пацієнтів з ГІМ які мали помірні пікові концентрації сTnT, КК-МВ, а також типові ехокардіографічні висновки хоча і з суттєвими індивідуальними відмінностями. Була чітко помічена кореляція між маркерами пошкодження міокарду і HSP 70 пацієнтів з інфарктом. Це може свідчити про те, що концентрація HSP 70 пов'язана з розміром інфаркту [16].

Важливою відмінністю між встановленими маркерами некрозу міокарда: сTnT, КК-МВ і HSP 70 є їх кінетика. Біологічний період напіврозпаду HSP 70, як повідомляється, близько 18 годин. При гострому інфаркті міокарда, активність TnT все ще висока через кілька днів після первинного інсульту. Дослідження рівня HSP 70 може мати важливе діагностичне значення при виявленні повторного інфаркту протягом перших кількох днів після первинного інфаркту міокарда [16,20,22,34].

Важливість досліджень функцій внутрішньоклітинного білка HSP 70 визначається тим, що він грає роль імунomodulatory і отже є кандидатом на використання в терапевтичних цілях [3,5,17,21]. Нашими роботами також було встановлено зв'язок концентрації HSP 70 з різними термінами гіпоксії нейронів *in vitro* і динамікою вмісту гіпоксії індукуючого фактора HIF [3,5,27].

Так, дослідження *in vitro*, показали, що введення в інкубаційне середовище цитотоксичних сполук: глутамату (100 мкм), хлорднітробензена (ХДБ) (80 мкм), а також DNIC (250 мкм) приводило до зміни характеру експресії HSP 70, Hif 16, проте, дані зміни

носили різноспрямований характер. Так, в суспензіях з внесенням глутамату і ХДБ спостерігалось поступове збільшення концентрації білків HSP 70 і Hif 16 з максимальним приростом на 30 хвилину інкубації. Далі до 60 хвилини спостерігалось падіння концентрації HSP 70 в середньому на 33% по відношенню до 15 хвилини, Hif16 виявився більш стійкий, падіння його активності склало в середньому 18% (рис. 1 а, б). Дослідження суспензії з додаванням DNIC показало, що накопичення HSP 70 і Hif 16 на 15 хвилину відбувалося менш інтенсивно ніж в суспензіях з додаванням глутамату і ХДБ і на 60 хвилину падіння HSP 70 по відношенню до 15 хвилини склало 66%, а Hif 16 – на 50 % (рис. 1 в).

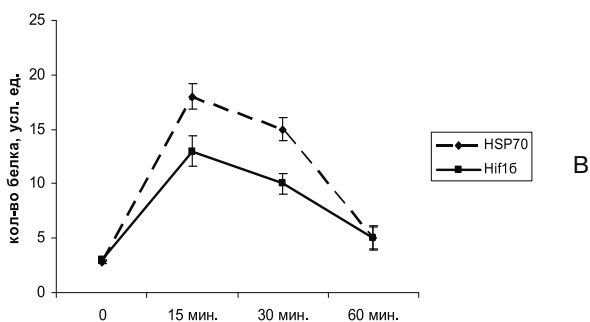
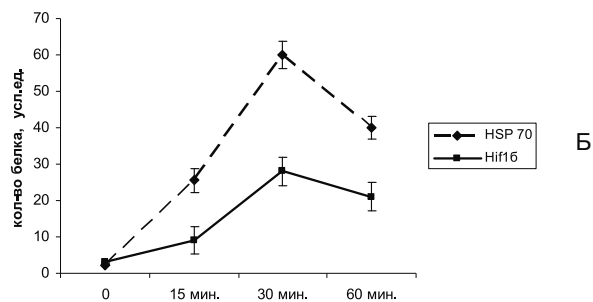
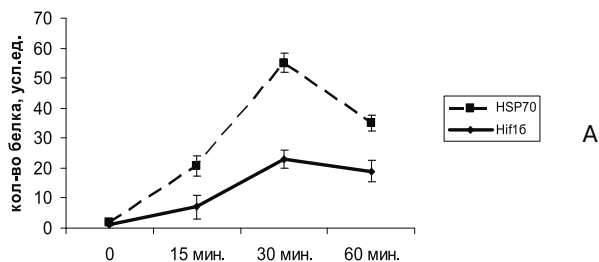


Рис. 1. Динаміка зміни характеру експресії HSP 70, Hif 16 в суспензії нейронів з додаванням глутамату (А), ХДБ (Б), DNIC (В).

Підвищення в досліджуваних суспензіях на 15 хвилину експресія HSP 70 і Hif 16 пояснюється шаперонною функцією HSP 70 в умовах шкідливої дії різних токсичних агентів на клітину. Вважається, що білки теплового шоку виконують функції молекулярних шаперонів і запобігають агрегації пошко-

джених білків в клітині. У ряді робіт було показано, що в умовах *in vitro* HSP 70 здатний запобігати агрегації окислювально пошкоджених цитратсинтазу, глутатіон-S-трансферазу, супероксиддисмутази, лактатдегідрогенази, малатдегідрогеназа [5,25,32].

Крім того, однією з основних функцій HSP 70 є індукція, а також збільшення тривалості життя стабільної форми Hif16, яка включає подальші пристосувальні реакції в клітці. Hif 16, в свою чергу, утворює активний димер з субодиниць HIF-1 і починає грати роль транскрипційного фактору, запускаючи транскрипцію генів відповіді на гіпоксію. Крім того, як було описано вище, Hif 16 є індукційним фактором в синтезі деяких ферментів антиоксидантного захисту. Даним обставиною пояснюється більш тривале накопичення в суспензії Hif16, крім того, молекула Hif16 стабільніша до оксидативного стресу [33].

Беручи до уваги отримані дані про здатність HSP 70 в умовах токсичного впливу на клітину посилювати експресію фактору Hif16, що грає першорядну роль в клітинній відповіді на гіпоксію, можна припустити, що HSP 70 втручається в сигнальні шляхи відповіді клітини на гіпоксичний стрес на рівні регуляції стабільності HIF-16. Подібний двоступеневий захист клітини є, на нашу думку еволюційно розвиненим і необхідним для посилення трансдукційного клітинного сигналу у відповідь на ушкоджуючі агенти.

Таким чином, підводячи підсумок вищесказаному, можна зробити висновок, що білки HSP 70 і Hif1 є неминучими супутниками патобіохімічних реакцій, що розвиваються при ішемічному пошкодженні клітин і виконують в даних умовах протективну роль, що реалізується за допомогою посилення синтезу антиоксидантних ферментів, стабілізацією окислювально-пошкоджених макромолекул, прямою антиапоптичною та мітопротективною дією. Подібна роль даних білків в клітинних реакціях при ішемії ставить питання про розробку нових цитопротективних засобів, здатних забезпечувати модуляцію / протекцію генів, що кодують синтез білків HSP 70, а також розробку методів лабораторної діагностики і скринінгу ефективності проведеної терапії з використанням біомаркерів – HSP 70.

Література

1. Andreeva L.I. Tsentral'nye efekty belka teplovogo shoka s molekulyarnoi massoi 70 kDa / L.I. Andreeva, P.D. Shabanov, B.A. Margulis, I.V. Guzhova // Zhurnal PF i B'nyu. – 2005. — № 1. – S. 794-803.
2. Babushkina N.V. Endogennaya zashchita miokarda: rol' belkov teplovogo shoka v mekhanizмах prekonditsionirovaniya / N.V. Babushkina, A.A. Runovich, G.B. Borovskii, T.E. Kuril'skaya // Byulleten' VSNTs SO RAMN. – 2006. — № 5. – S. 27-31.
3. Belenichev I.F. Neuroproteksiya i neiroplastichnost' / I.F. Belenichev, V.I. Chernii, S.V. Pavlov [i dr.]. — Kiev – Logos, 2015. – 509 s.
4. Belenichev I.F. Vozmozhnaya rol' HSP-belkov v realizatsii energotropnogo mekhanizma neuroprotektivnogo deistviya tserebrokurina / I.F. Belenichev, S.V. Pavlov // Neironauki: teoretichni ta klinichni aspekti. – 2010. – T. 6, № 1. – S. 31-36.
5. Belenichev I.F. Ratsional'naya neuroproteksiya / I.F. Belenichev, V.I. Chernii, Yu.M. Kolesnik, S.V. Pavlov [i dr.]. – Donetsk: Izd. Dom Zaslavskii, 2009. – 261 s.
6. Evdonin A.L. Vnekletochnye belki teplovogo shoka 70 i ego funktsii / A.L. Evdonin, N.D. Medvedeva // Tsitologiya. – 2009. – T. 51, № 2. – S. 113-145.
7. Kovalenko V.M. Khvorobi sistemi krovoobigu u strukturi smertnosti naseleennyia Ukraïni: mifi i real'nist' / V.M. Kovalenko, Yu.M. Sirenko, A.P. Dorogoi // Materiali XIV Natsional'nogo kongresu kardiologiv Ukraïni. — Kiïv, 2013.
8. Kolesnik Yu.M. Biokhimiicheskie mekhanizmy regulyatsii produktsii energii v usloviyakh eksperimental'noi ostroi tserebral'noi ishemii / Yu.M. Kolesnik, I.F. Belenichev, S.V. Pavlov, I.S. Chekman [i dr.] // Dopovidi natsional'noi akademii nauk Ukraïni. – 2011. — № 9. – S. 165-169.
9. Lyu B.N. Kislorodno-perekisnaya kontseptsiya apoptoza i vozmozhnye varianty ego mekhanizma / B.N. Lyu // Usp. sovr. biologii. — 2001. — T. 121, № 5. — S. 488-501.
10. Margulis B.A. Belki stressa v eukarioticheskoï kletke / B.A. Margulis, I.V. Guzhova // Tsitologiya. — 2000. — T. 4, № 42. — S. 323-328.
11. Mokrushin A.A. Belok teplovogo shoka (Hsp70) protektiruet aktivnost' glutamatergicheskoi sinapticheskoi peredachi v obnyatel'noi kore mozga krys in vitro ot tyazheloi anoksii / A.A. Mokrushin, L.I. Pavlinova, I.V. Guzhova, B.A. Margulis // Dokl. RAN. – 2004. — T. 394, № 3. – S. 419-422.
12. Pavlov S.V. Mitoprotektivna diya tiol'nykh antyoksydantiv v umovakh modelyuvannya nitrozuyuchoho stresu in vitro / S.V. Pavlov // Zdobutky klin. i eksperym. medytsyny. – 2011. — № 2. – S. 95-97.
13. Pavlov S.V. Vplyv Tserebrokurynu, tiotryazolinu ta emoksypinu na hlutationovyy lantsyuh tiol-dysul'fidnoyi systemy mozku v umovakh eksperymental'noho porushennya mozkovoho krovoobihu / S.V. Pavlov, I.F. Byelenichev // Medychna khimiya. – 2009. — № 3, T. 11. – S. 26-33.
14. Pavlov S.V. Vplyv estroheniv ta selektyvnykh modulyatoriv estrohenovykh retseptoriv na sertsevo-sudynnu systemu / S.V. Pavlov, K.V. Levchenko // Visnyk problem biolohiyi ta medytsyny. – 2016. — T. 3, № 2. – S. 40-44.
15. Pavlov S.V. Antyoksydantni ta kardioprotektivni vlastyosti tamoksyfenu tsytratu za umov hipoksychnoho poshkodzhennya kardiomiotsytiv / S.V. Pavlov, K.V. Levchenko // Farmakolohiya ta likars'ka toksykolohiya. – 2016. – T. 51, № 6. – S. 66-72.
16. Pavlov S.V. Tsytoprotektivni efekty selektyvnykh modulyatoriv estrohenovykh retseptoriv za umov hipoksiyi kardiomiotsytiv in vitro / S.V. Pavlov, K.V. Levchenko // Farmakolohiya ta likars'ka toksykolohiya. – 2016. – T. 50, № 4-5. – S. 78-83.
17. Pavlov S.V. Vplyv antyoksydantiv na systemu oksydu azotu v holovnomu mozku shchuriv pry hostriy tserebral'niy ishemiyi / S.V. Pavlov // Odes'kyy med. zhurn. – 2014. — № 1. – S. 21-26.
18. Khodakovs'kyy O.A. Vplyv ademolu na pokaznyky obminu NO v shchuriv iz modellyu infarktu miokarda / O.A. Khodakovs'kyy, S.V. Pavlov, N.V. Bukhtiyarova // Ukr. biokhim. zhurn. — 2013. — T. 85, № 3. – S. 85-89.
19. Arif A. Extraneuronal activities and regulatory mechanisms of the atypical cyclin-dependent kinase Cdk5 / A. Arif // Biochem. Pharmacol. – 2012. – Vol. 84. – P. 985-993.
20. 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.
21. Demange L. Potent inhibitors of CDK5 derived from roscovitine: synthesis, biological evaluation and molecular modeling / L. Demange, F.N. Abdellah, O. Lozach, Y. Ferandin // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2013. – Vol. 23. – P. 125-131.
22. Dybdahi B. Myocardial ischemia and the inflammatory response: release of heat shock protein 70 after myocardial infarction / B. Dybdahi, S.A. Slordahi, A. Waage, P. Kierulf // Heart. – 2005. – Vol. 91. – P. 299-304.
23. Jason C. Young Mechanisms of the Hsp70 chaperone system / C. Young Jason // J. Biochem. Cell Biol. – 2010. – Vol. 88. – P. 291-300.
24. Kolesnyk M. Relationship between biochemical markers of cardiac remodelling and postexercise elevation of left ventricular filling pressure in arterial hypertension / M. Kolesnyk, G.V. Dzyak // ESC. Congress 30.07-03.09.2014, Barcelona, Spain. – P. 86 (1091).
25. Marada A. A Single Point Mutation in Mitochondrial Hsp70 Cochaperone Mge1 Gains Thermal Stability and Resistance / A. Marada, Srinivasu Karri, Swati Singh, Praveen Kumar Allu // Biochemistry. — 2016. – Vol 55 (51). – P. 7065-7072.
26. M. Morey Trevor Heat Shock Inhibition of CDK5 Increases NOXA Levels through miR-23a Repression / Trevor M. Morey, Rabi Rofayel, Donald S. Johnston, Andrew S. Fletcher // Journal of Biological Chemistry. – 2015. – Vol. 290, № 18. – P. 11443-11545.
27. Pavlov S. Molecular and Biochemical Aspects of the Neuroprotective Effect of the Selective Estrogen Receptor Modulator Tamoxifen in a Model of Acute Cerebral Ischemia / S. Pavlov, I. Belenichev // Neurochemical Journal. – 2014. – Vol. 8, № 1. – P. 28-32.
28. Place R.F. Non-coding RNAs turn up the heat: an emerging layer of novel regulators in the mammalian heat shock response / R.F. Place, E.J. Noonan // Cell Stress Chaperones. – 2014. – Vol. 19. – P. 159-172.
29. 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.
30. Roy Ananya Mast Cell Chymase Degrades the Alarmins Heat Shock Protein 70, Biglycan, HMGB1, and Interleukin-33 (IL-33) and Limits Danger-induced Inflammation / Ananya Roy, Goutham Ganesh, Helena Sippola, Sara Bolin, Osama Sawesi // J. Biol. Chem. — 2014. — Jan 3; 289 (1). — P. 237-250.
31. Shah K. Cdk5 activity in the brain - multiple paths of regulation / K. Shah, D.K. Lahiri // Cell Sci. – 2014. — № 127. – P. 2391-2400.

32. 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. — Vol. 5. — P. 525-531.
33. Zhen-Tao Mo The effects of icariin on the expression of HIF-1 α , HSP-60 and HSP-70 in PC12 cells suffered from oxygen-glucose deprivation-induced injury / Tao Mo Zhen-, Na Li Wen-, Yu-Rong Zhai, Shu-Ying Gao // Pharmaceutical Biology. — 2017. — Vol. 55. — P. 848-852.
34. Zhou J. PI3K/AKT is required from heat shock proteins to protect hypoxia-inducible factor-1 β from pVHL-independent degradation / J. Zhou, T. Schmid, R. Franc, R. Bruno // J. Biol. Chem. — 2004. — Vol. 279. — P. 13506-13513.
35. Zuiderweg Erik R.P. The Amazing Multi-Valency of the Hsp70 Chaperones / Erik R.P. Zuiderweg, Jason E. Gestwick // J.S.M. Cell Dev Biol. — 2016. — Vol. 4 (1) 1019. — P. 1-13.

УДК 616-005.4-092-07:577.112

МОЛЕКУЛЯРНО-БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ HSP 70-ОПОСЕРЕДКОВАНОЇ ЦИТОПРОТЕКЦІЇ В УМОВАХ ПАТОЛОГІЙ ІШЕМІЧНОГО ГЕНЕЗУ

Павлов С. В., Беленічев І. Ф., Нікітченко Ю. В., Горбачова С. В.

Резюме. У статті розглянуто сучасний стан питання щодо характеру експресії та синтезу білків теплового шоку в умовах патології серця та головного мозку ішемічного генезу. Проведено літературний огляд зарубіжних та вітчизняних досліджень щодо вмісту білків теплового шоку в тканинах за умов гіпоксії. Згідно літературних джерел, шаперонна активність HSP 70 модулюється білками-помічниками або ко-шаперонами, пов'язаними з молекулою HSP 70, нуклеотидами, змістом одно- і двовалентних іонів, а також концентрацією білків-мішеней. Крім того, за результатами власних досліджень *in vitro*, авторами продемонстровано, що введення в інкубаційне середовище цитотоксичних сполук: глутамату (100 мкм), хлорднітробензена (ХДБ) (80 мкм), а також DNIC (250 мкм) приводило до зміни характеру експресії HSP 70. Беручи до уваги отримані нами дані про здатність HSP 70 в умовах токсичного впливу на клітину посилювати експресію фактору HIF-1 β , що грає першорядну роль в клітинній відповіді на гіпоксію, можна припустити, що HSP 70 втручається в сигнальні шляхи відповіді клітини на гіпоксичний стрес на рівні регуляції стабільності HIF-1 β . Подібний двоступеневий захист клітини на нашу думку є еволюційно розвиненим і необхідним для посилення трансдукційного клітинного сигналу у відповідь на пошкодуючі агенти. Встановлена роль білків теплового шоку в клітинних реакціях при ішемії ставить питання про розробку нових цитопротективних засобів, здатних забезпечувати модуляцію / протекцію генів, що кодують синтез білків HSP 70, а також розробку методів лабораторної діагностики і скринінгу ефективності проведеної терапії з використанням біомаркерів – HSP 70.

Ключові слова: білки теплового шоку, гіпоксія, цитопротекція, HSP 70.

УДК 616-005.4-092-07:577.112

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ HSP 70-ОПОСРЕДОВАННОЙ ЦИТОПРОТЕКЦИИ В УСЛОВИЯХ ПАТОЛОГИЙ ИШЕМИЧЕСКОГО ГЕНЕЗА

Павлов С. В., Беленичев И. Ф., Никитченко Ю. В., Горбачева С. В.

Резюме. В статье рассмотрено современное состояние вопроса о характере экспрессии и синтезе белков теплового шока в условиях патологии сердца и головного мозга ишемического генеза. Проведено литературный обзор зарубежных и отечественных исследований по содержанию белков теплового шока в тканях в условиях гипоксии. Согласно литературных источников, шаперонная активность HSP 70 модулируется белками-помощниками или ко-шаперонами, связанными с молекулой HSP 70, нуклеотидами, содержанием одно- и двухвалентных ионов, а также концентрацией белков-мишеней. Кроме того, по результатам собственных исследований *in vitro*, авторами показано, что введение в инкубационную среду цитотоксических соединений: глутамата (100 мкм), хлординитробензена (ХДБ) (80 мкм), а также DNIC (250 мкм) приводило к изменению характера экспрессии HSP 70. Принимая во внимание полученные нами данные о способности HSP 70 в условиях токсического воздействия на клетку усиливать экспрессию фактора HIF-1 β , что играет первостепенную роль в клеточном ответе на гипоксию, можно предположить, что HSP 70 вмешивается в сигнальные пути ответа клетки на гипоксический стресс на уровне регуляции стабильности HIF-1 β . Подобная двухступенчатая защита клетки по нашему мнению является эволюционно развитой и необходимой для усиления трансдукционного клеточного сигнала в ответ на повреждающие агенты. Установленная роль белков теплового шока в клеточных реакциях при ишемии ставит вопрос о разработке новых цитопротективных средств, способных обеспечивать модуляцию / протекцию генов, кодирующих синтез белков HSP 70, а также разработку методов лабораторной диагностики и скрининга эффективности проведенной терапии с использованием биомаркеров - HSP 70.

Ключевые слова: белки теплового шока, гипоксия, цитопротекция, HSP 70.

UDC 616-005.4-092-07:577.112

MOLECULAR BIO-CHEMICAL MECHANISMS OF HSP 70-MEDIATED CYTOPROTECTION IN PATHOLOGIES OF ISCHEMIC ORIGIN

Pavlov S. V., Belenichev I. F., Nikitchenko Yu. V., Gorbachova S. V.

Abstract. The article presents a current view on the nature of expression and synthesis of heat shock proteins in heart and brain pathology of ischemic origin. A review of foreign and domestic literature on the research regarding heat shock proteins content in tissues under hypoxia has been carried out. According to literature sources, HSP 70 chaperon activity is modulated by protein-assistants, or co-chaperons, which are related to the HSP 70 molecule, as well as by nucleotides, the content of mono- and bivalent ions, and by the concentration of target proteins. One of the most noticeable properties of HSP 70 is its protective function, which is projected in the course of the cell reaction or body reaction on the impact of different unfavorable environmental factors. A lot of evidence has been obtained of HSP 70 protective effect, and hundreds of research papers and dozens of monographs have been published with the regard to this. The most conclusive proofs of the HSP 70 protective function were drawn from the experiment on introducing the protein or its gene into the cell, which was followed by the evaluation of the cell stability under damage factors. The results of the experiments carried out mostly on cell cultures and test animals in recent 10-15 years made it possible to outline several areas of HSP 70 protective effect practical use. Firstly, the stability of the cell, as well as of the whole body, may be enforced by increasing the intracellular content of HSP 70. The latter may be achieved as a result of cell preconditioning (dosed heating, hypoxia) under drugs, after its transfection by the HSP 70 gene. Secondly, the issue of the extracellular HSP 70 protective effect has attracted attention recently. Furthermore, as the in vitro result of own research shows, the authors have revealed that introducing into the incubation environment of cytotoxic compounds, namely, Glutamate (100 μm), Dinitrochlorbenzene (DNCB) (80 μm), and DNIC (250 μm), led to the change in the nature of HSP 70 expression. Considering the data obtained in our research on the ability of HSP 70 to increase, under toxic influence on the cell, the expression of the Hif-1b factor, which is key to the cellular response to hypoxia, it can be assumed that HSP 70 intervenes into the signal pathways of the cell's response to hypoxia at the Hif-1b stability regulation level. This kind of two-level cell protection, in our opinion, has evolutionized to become necessary for enhancing transduction responsive cellular signal to damaging agents.

The established role of heat shock proteins in ischemic cellular reactions puts up the issue of elaborating new cytoprotective means to allow for modulation/protection of the genes that encode HSP 70 protein synthesis, along with working out of laboratory diagnose techniques and screening of HSP 70 biomarker therapy effectiveness.

Keywords: heat shock proteins, hypoxia, cytoprotection, HSP 70.

Рецензент — проф. Костенко В. О.

Стаття надійшла 10.06.2017 року