

DOI 10.29254/2077-4214-2018-1-1-142-103-108

УДК 612.822.014.1:577.112

Беленичев И. Ф., Литвиненко Е. С., Камышный А. М.

ХАРАКТЕР ЭКСПРЕССИИ мРНК HIF-1 α И HIF-3 α , УРОВЕНЬ НИТРОТИРОЗИНА, цГМФ И ИНТЕРЛЕЙКИНОВ В ГОМОГЕНАТЕ МОЗГА МОНГОЛЬСКИХ ПЕСЧАНОК С ОСТРЫМ НАРУШЕНИЕМ МОЗГОВОГО КРОВОТОКА И НА ФОНЕ ПРОВОДИМОЙ ТЕРАПИИ МОДУЛЯТОРАМИ СИСТЕМЫ ГЛУТАТИОНА

Запорожский государственный медицинский университет (г. Запорожье)

vitalena90@gmail.com

Связь публикации с плановыми научно-исследовательскими работами. Данная работа выполнена в рамках кафедральной НИР «HSP₇₀ / HIF-1 α - опосередковані механізми ендогенної нейропротекції: розробка підходів до її фармакологічної регуляції», № государственной регистрации 0117U000658.

Вступление. Высокий риск смертности и инвалидизации в последствие острой церебральной ишемии диктует необходимость поиска новых подходов фармакологической коррекции данной патологии [1,2]. Поиск эффективных нейропротекторов на сегодня идет по двум направлениям: первое это повышение устойчивости нервной ткани к условиям гипоксии и второе ограничение интенсивности оксидативного и нитрозативного стресса, снижение местной воспалительной реакции и последствий ишемии/гипоксии тканей [1].

В свете проблемы гипоксии при церебральных патологиях головного мозга, большое значение уделяется регуляторным белкам, которые индуцируются в ответ на гипоксию – белкам семейства HIFs. Данные белки играют ведущую роль в системном ответе организма на снижение кислорода и синтезируются в большинстве тканей, а максимальная их экспрессия отмечена в нейронах [9-13,15].

Гипоксия является фактором, при котором клетки переходят на нитратно-нитритное дыхание с образованием NO. Оксид азота в условиях оксидативного стресса в нервной ткани образует токсичные активные дериваты пероксинитрит (ONOO⁻), ион нитрозония (NO⁺), нитроксил (NO⁻) и диазоттриоксид (N₂O₃), которые являются главными факторами нитрозирующего стресса при ишемии. При фокальной форме ишемии к 3-4 суткам гиперпродукция токсичных форм азота в условиях сохраняющегося оксидативного стресса является результатом действия индуцибельной NOS, которая интенсивно продуцируется активированными глиальными клетками и клетками воспаления при участии провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-1 β) [6].

Факторы HIF-1 α и HIF-3 α , которые участвуют в формировании основы долговременной адаптации к гипоксии, а также регуляция гиперпродукции активных форм азота (АФА) и активности NOS являются перспективными мишенями для разработки стратегии лечения острых нарушений мозгового кровообращения (ОНМК), в генезе которых ведущую роль играет гипоксия. В литературе имеются убедительные данные положительного действия индукторов HIF-1 α и ингибиторов NOS по ограничению прогрессирования ишемии мозга [9].

Цель исследования. Изучить характер экспрессии мРНК HIF-1 α и HIF-3 α , уровень цитокинов (IL-4, IL-1 β , TNF- α), нитротирозина и цГМФ в гомогенате мозга монгольских песчанок с экспериментальной ОНМК на фоне курсового лечения модуляторами системы глутатиона-селеназы, глутоксима и глуторедоксина.

Объект и методы исследования. Экспериментальная часть выполнена на 60 самцах монгольских песчанок (*Meriones unguiculatus*) массой 60-80 г. Животные содержались на стандартном рационе питания и питья с 12 часовым циклом смены света/темноты на протяжении всего эксперимента. Исследования на животных проводились в соответствии с Директивой Европейского Союза 2010/10/63 EU. Экспериментальные группы формировали по 10 особей одинакового веса в группе. Согласно с программой исследования, использовали общепринятую в данное время модель экспериментального острого нарушения мозгового кровообращения – необратимую одностороннюю перевязку общей сонной артерии. Операцию выполняли под тиопенталовым наркозом (40 мг/кг), путём хирургического доступа выделяли общую сонную артерию, подводили под нее шелковую лигатуру и перевязывали. Для изучения действия препаратов животным вводили селеназу (ArzneimittelGmbH, Germany) – 50 мкг/кг, глутоксим (ФАРМА-ВАМ, Москва) – 50 мг/кг и глутаредоксин (Sigma, Aldrich) – 200 мкл/кг в течение всего срока наблюдения (4 суток). Препараты вводили внутривентриально 1 раз в сутки. Животным

контрольной группы на протяжении эксперимента внутрибрюшинно вводили физиологический раствор в эквивалентном объеме. Животным группы сравнения по той же схеме вводили парацетам в дозе 500 мг/кг. В качестве интактной группы использовали ложнооперированных (ЛО) животных, которым выделяли сонную артерию, но не перевязывали. По окончании эксперимента согласно протоколу исследования, животных наркотизировали тиопенталом натрия (40 мг/кг), декапитировали, вскрывали черепную коробку и извлекали головной мозг.

амплификации включала краситель SYBR Green, ДНК – полимеразу *SynTaq* с игибирующими активностью фермента антителами, по 0,2 мкл прямого и обратного специфических праймеров, dNTP- дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, 1 мкл матрицы (кДНК). Реакционную смесь доводили до общего объема 25 мкл добавлением деионизированной H₂O. Специфические пары праймеров (5'-3') для анализа исследуемых и референс генов были подобраны с помощью программного обеспечения PrimerBlast (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) и изготовлены фирмой ThermoScientific, США. Амплификация происходила при таких условиях: иницированная денатурация 95°C – 10 мин.; далее 50 циклов: денатурация – 95°C, 15 сек., отжиг праймеров – 58-63°C, 30 сек., элонгация – 72°C, 30 сек. Регистрация интенсивности флуоресценции происходила автоматически в конце стадии элонгации каждого цикла по каналу автоматически SybrGreen. В качестве референс-гена для определения относительного значения изменения уровня экспрессии исследуемых генов был использован ген *actin, beta (Actb)*. Нормальность распределения оценивали по критериям Колмогорова-Смирнова (D) и Shapiro-Wilk (W). Полученные данные были проанализированы вариационно-статистическим методом с использованием критерия U-параметра Манна-Уитни. Результаты исследования обработаны с применением статистического пакета лицензионной программы «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoft Inc., № AXXR712D833214FAN5). Все результаты представлены в виде

Таблица 1.

Показатели экспрессии мРНК HIF-1 α в гомогенате мозга монгольских песчанок с ОНМК и на фоне лечения (M \pm m, n=10)

Группа животных	Экспрессии мРНК HIF-1 α , у.е.	
	По отношению к ЛО	По отношению к контролю
Ложно-оперированные ОНМК	1.00000 \pm 0.32381	1.00000 \pm 0.21165
ОНМК+селеназа	0.88749 \pm 0.06702	20.36108 \pm 1.03035*
ОНМК+глутоксим	1.56550 \pm 1.27181	37.89533 \pm 7.18197*
ОНМК+глутаредоксин	0.70213 \pm 0.13905	15.74745 \pm 3.05498*
ОНМК+парацетам	0.73577 \pm 0.30162	17.07044 \pm 4.36168*

Примечание. * – отличия достоверны (p<0,05) по отношению к группе контроля.

Таблица 2.

Показатели экспрессии мРНК HIF-3 α в гомогенате мозга монгольских песчанок с ОНМК и на фоне лечения (M \pm m, n=10)

Группа животных	Экспрессии мРНК HIF-3 α , уе	
	По отношению к ЛО	По отношению к контролю
Ложно-оперированные ОНМК	1.00000 \pm 0.23806	1.00000 \pm 0.08766
ОНМК+селеназа	0.08465 \pm 0.04886	0.12623 \pm 0.07283
ОНМК+глутоксим	1.78905 \pm 0.17758	2.66670 \pm 0.26479
ОНМК+глутаредоксин	6.05445 \pm 1.84938*	9.02424 \pm 2.68003
ОНМК+парацетам	1.10734 \pm 0.08257	1.65044 \pm 0.12303

Примечание. * – отличия достоверны (p<0,05) по отношению к группе контроля.

Исследование биохимических маркеров проводили в гомогенате головного мозга. Мозг промыли в 0,25 М сахарозном буфере (рН 7,4) охлажденном до 2°C и измельчали в 10 кратном объеме этого же буфера, используя гомогенизатор Silent Crusher S (Heidolph). Грубую часть гомогената удаляли путем центрифугирования при 4°C на центрифуге Eppendorf-5804R при 3000 об/мин в течение 20 мин. Содержание нитротирозина, цГМФ, IL-4, IL-1 β , TNF- α определяли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа методом ELISA с использованием тест-наборов («NuCult biotechnology», «e-Bioscience» и «ENZO») в соответствии с прилагаемыми к наборам инструкциями.

Полимеразно-цепная реакция в режиме реального времени. Для определения уровня экспрессии исследуемых генов использовали амплификатор CFX96™Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США) и набор реактивов для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green R-402 («Синтол», Россия). Финальная реакция смеси для

амплификации включала краситель SYBR Green, ДНК – полимеразу *SynTaq* с игибирующими активностью фермента антителами, по 0,2 мкл прямого и обратного специфических праймеров, dNTP- дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, 1 мкл матрицы (кДНК). Реакционную смесь доводили до общего объема 25 мкл добавлением деионизированной H₂O. Специфические пары праймеров (5'-3') для анализа исследуемых и референс генов были подобраны с помощью программного обеспечения PrimerBlast (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) и изготовлены фирмой ThermoScientific, США. Амплификация происходила при таких условиях: иницированная денатурация 95°C – 10 мин.; далее 50 циклов: денатурация – 95°C, 15 сек., отжиг праймеров – 58-63°C, 30 сек., элонгация – 72°C, 30 сек. Регистрация интенсивности флуоресценции происходила автоматически в конце стадии элонгации каждого цикла по каналу автоматически SybrGreen. В качестве референс-гена для определения относительного значения изменения уровня экспрессии исследуемых генов был использован ген *actin, beta (Actb)*. Нормальность распределения оценивали по критериям Колмогорова-Смирнова (D) и Shapiro-Wilk (W). Полученные данные были проанализированы вариационно-статистическим методом с использованием критерия U-параметра Манна-Уитни. Результаты исследования обработаны с применением статистического пакета лицензионной программы «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoft Inc., № AXXR712D833214FAN5). Все результаты представлены в виде

M \pm m, где M – среднее значение, m – ошибка среднего, для всех видов анализа статистически значимыми считали различия при p < 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение. Анализ экспрессии мРНК HIF-1 α и HIF-3 α у животных с ОНМК представлен в **таблицах 1 и 2**. Показатели экспрессии мРНК HIF-1 α в группах, получавших исследуемые препараты, имеют относительно контроля более высокие цифровые значения, чем соответствующие значения по отношению к ЛО группе. Характер экспрессии мРНК HIF-3 α в экспериментальных группах получавших модуляторы ТДС, имеет обратную зависимость – более низкое значение по отношению к контролю и более высокое значение в отношении ЛО, что может объясняться экспрессией данной изоформы в более раннем гипоксическом периоде.

Наглядно видно из **рисунка 1**, что курсовое назначение исследуемых препаратов в течение 4 суток после модельной ОНМК, приводит к достоверному повышению экспрессии *HIF-1 α* , лидирует

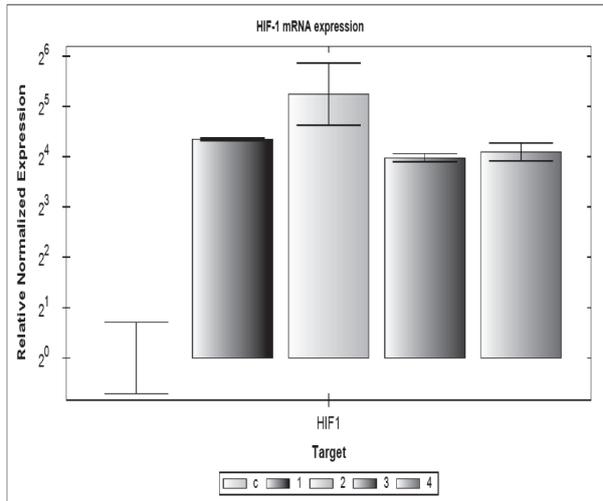


Рис. 1. Экспрессия мРНК HIF-1 α .
1-селеназа; 2-глутоксим; 3-глутаредоксин; 4-парацетам, с-контроль.

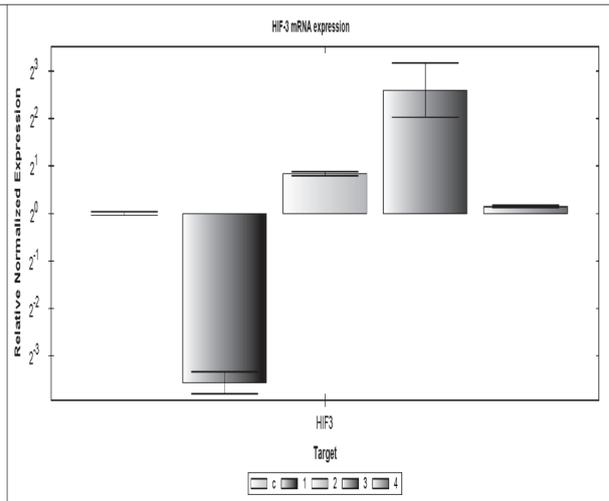


Рис. 2. Экспрессия мРНК HIF-3 α .
1-селеназа; 2-глутоксим; 3-глутаредоксин; 4-парацетам, с-контроль.

в этом ряду глутоксим (в 37 раз выше контрольной группы) >селеназа (в 20 раз выше контроля) >парацетам (в 17 раз выше контроля) > глутаредоксин (в 15 раз выше контроля). Такое индуцирующее действие исследуемых препаратов на экспрессию *HIF-1 α* имеет достаточно важное значение в условиях гипоксии. Стабилизированная HIF-1, впоследствии активирует экспрессию генов способствующих клеточной адаптации к этим условиям. К ним относятся EPO, VEGF, HSPs, белки увеличивающие метаболизм глюкозы (переносчики глюкозы, гликолитические ферменты). Некоторые из генов, таких как EPO и VEGF, обеспечивают прямую защиту клеток от гипоксического стресса. Другие, такие как HSPs, могут повышать уровень GSH, способствуя стабилизации HIF-1. Кроме того ряд зарубежных работ указывает на то, что HIF-1 может повышать уровень GSH в мозге крыс, подверженных гипоксии [12,14,16], что приведет к повышению выживаемости нейронов в условиях гипоксии и истощении антиоксидантной защиты клетки. В ранних наших исследованиях показана способность у изучаемых препаратов повышать уровень GSH в условиях гипоксии/ишемии [3,4,5], что с другой стороны обеспечивает оптимальные условия для стабилизации HIF-1. Все вышесказанное указывает на то, что поддержание уровня GSH и снижение токсичности ROS является частью HIF-1-опосредованной нейрозащиты под действием проводимой терапии [13,14,15]. Как видно из **таблицы 2** и **рисунка 2** достоверные отличия ($p < 0,05$) в отношении экспрессии *HIF-3 α* , показал только глутаредоксин (в 9 раз выше группы контроля). Изменения этого показателя, при лечении остальными препаратами носил лишь характер тенденции, а селеназа вообще оказалась не эффективной в отношении экспрессии *HIF-3 α* . Выявленный у глутаредоксина эффект, может быть обусловлен стабилизирующей и индуцирующей ролью аддуктов глутатиона, образующихся в реакциях S-глутатионилирования под действием GRx-1 в условиях ишемии [16]. Полученные в ходе эксперимента данные свидетельствуют, что

экспрессия *HIF-1 α* , обеспечивает защиту на более поздних этапах гипоксии, тогда как *HIF-3 α* , оказывает позитивное модулирующее действие в первые часы ишемии, что согласуется с литературными источниками [12].

Локальное воспаление является обязательным последствием оксидативного и нитрозирующего стресса, развивающегося вследствие ишемии мозга, что приводит к активации микроглии. Активированная микроглия является источником гиперпродукции АФА, АФК и индуцибельной NOS. В полученном нами на 4 сутки ишемии гомогенате мозга монгольских песчанок отмечено статистически значимое ($p < 0,05$) повышение уровня нитротирозина (в 4,3 раза), TNF- α (в 4,6 раза), IL-1 β (в 2,5 раза) с одновременным снижением цГМФ на 33,3%, что говорит о повышении продукции токсичных дериватов оксида азота и снижении биодоступности NO в условиях гипоксии. Уровень IL-4 снизился на 82,9% в сравнении с ложно-оперированными животными, что свидетельствует о наличии локальной воспалительной реакции в зоне экспериментальной ишемии (**табл. 3**).

Курсовая терапия модуляторами системы глутатиона приводит к статистически значимому ($p < 0,05$) повышению содержания противовоспалительного IL-4 (селеназа на 11,8%, глутоксим на 23,7% и глутаредоксин на 19,7% в сравнении с группой контроля). Такое повышение IL-4 подавляет провоспалительную активность макрофагов и секрецию ими TNF- α и IL-1 β . Это выражается в достоверном ($p < 0,05$) снижении содержания TNF- α у всех изучаемых препаратов (селеназа на 69,6%, глутоксим на 75,9%, глутаредоксин на 31,6% в сравнении с контрольной группой), снижение уровня IL-1 β не показало статистически значимых отличий в сравнении с группой контроля и носило лишь характер тенденции. Описанное изменение соотношений между противовоспалительными и провоспалительными цитокинами первое ограничивает локальную воспалительную реакцию в зоне ишемической полутени, что повышает шансы нервной клетки к выживанию,

Таблиця 3.

Уровень цГМФ, нитротирозина и цитокинов при экспериментальном ОНМК и при терапии модуляторами ТДС (M±m, n=10)

Группы животных	Нитротирозин, нмоль/г ткани	TNF-α, пг/мл	IL-1β, пг/мл	IL-4, пг/мл	цГМФ, мМоль/мл
ЛО	10,90±1,28	0,17±0,061	0,16±0,046	12,9±0,25	0,12±0,0032
ОНМК	47,60±4,20*	0,79±0,18*	0,4±0,13*	7,05±0,14*	0,09±0,0032*
ОНМК+селеназа	21,40±2,24#	0,24±0,026#	0,39±0,057	7,88±0,52#	0,08±0,0021#
ОНМК+глутоксим	12,40±1,15#	0,19±0,038#	0,37±0,076	8,72±1,28#	0,037±0,004#
ОНМК+глутаредоксин	11,90±1,13#	0,54±0,2#	0,31±0,12	8,44±0,75#	0,045±0,038#

Примечание. * изменения статистически значимы по отношению к группе ЛО (p < 0,05), # изменения статистически значимы по отношению к группе контроля (p < 0,05).

и второе предотвращает цитокин-опосредованное повышение активности индуцибельной NOS. Последнее, проявляется в снижении гиперпродукции NO (снижение уровня цГМФ селеназа на 11,1%, глутоксим на 58,9%, глутаредоксин на 50%), а также уровня токсичных дериватов оксида азота-нитротирозина (в группе с введением глутоксима – на 73,94 %; селеназы – на 55%; глутаредоксина – на 75%). Все вышеперечисленное приводит к снижению цитотоксического отека в зоне пенумбры в острый период ишемии и ограничению реакций нитрозирующего стресса. Снижение концентрации провоспалительных цитокинов под действием изучаемых препаратов возможно оказывает по нашему мнению позитивное регулирующее действие на активность редокс-чувствительных транскрипционных факторов (NF-1, AP-1, NF-kB), главных участников апоптотического и некротического сценария гибели клетки. Таким образом, свойства селеназы, глутоксима и глутаредоксина ограничивать реакции оксидативного и нитрозативного стресса за счет их антиоксидантного, энерготропного и митопротективного действия [3,4,5,7,8] дополняется способностью снижать цитотоксический отек в зоне ишемии и повышать устойчивость нейрона к гипоксии, что объясняет возможность их использования в качестве средств, вторичной нейропротекции.

Выводы

1. Моделирование ОНМК приводит к достоверному повышению мРНК HIF-1α, HIF-3α нитротирозина, TNF-α и IL-1β, с одновременным снижением IL-4 и цГМФ.

2. Курсовое назначение модуляторов ТДС (селеназы, глутоксима и глутаредоксина) приводит к статистически значимой экспрессии мРНК HIF-1α, что определяет важность этого гена в отдаленном периоде гипоксии.

3. Влияние исследуемых препаратов на экспрессию мРНК HIF-3α не оказались достоверными, кроме группы глутаредоксина, что по-видимому связано со способностью у препарата повышать экспрессию данного гена в первые часы гипоксии.

4. Курсовое введение препаратов (селеназы, глутоксима и глутаредоксина) приводило к ограничению реакций нитрозирующего стресса (снижение значений нитротирозина и цГМФ).

5. Терапия изучаемыми препаратами оказала позитивное влияние на соотношение провоспалительного цитокина TNF-α и IL-4 в пользу последнего.

6. Введение селеназы, глутоксима и глутаредоксина не оказало достоверных отличий от группы контроля на показатель IL-1β.

7. Полученные данные являются экспериментальным обоснованием для применения глутоксима, глутаредоксина и селеназы в комплексной терапии острого нарушения мозгового кровотока.

Перспективы дальнейших исследований.

Углубление изучения нейропротективных способностей селеназы, глутоксима и глутаредоксина и возможность их использования в качестве вспомогательных средств, в составе базисной нейропротективной терапии.

Литература

1. Belenichev IF, Cherniy VI, Nagornaya YeA, Pavlov SV, Cherniy TV, Bukhtiyarova NV, i dr. Neuroproteksiya i neyroplastichnost'. Kuiv: Logos; 2015. 510 s. [in Russian].
2. Belenichev IF, Cherniy VI, Kolesnik YuM, Pavlov SV, Andronova IA, Abramov AV, i dr. Ratsional'naya neyroproteksiya. Donetsk: Izdatel' Zaslavskiy A.Yu; 2009. 262 s. [in Russian].
3. Belenichev IF, Litvinenko YeS. Fermentativnoye i nefermentativnoye zveno tiol-disul'fidnoy sistemy v golovnom mozge eksperimental'nykh zhivotnykh s tserebral'noy ishemiyey: efekty selenazy. Farmakologiya ta likars'ka toksikologiya. 2015;1(42):13-6. [in Russian].
4. Belenichev IF, Litvinenko YeS. Neyroprotektivnyye efekty pri modulyatsii glutationovoy sistemy golovnoy mozga, vliyaniye na letal'nost', nevrologicheskiy defitsit, oksidativnyy stress v usloviyakh eksperimental'noy ONMK. Visnik problem biologii i meditsini. 2016;3(2):94-9. [in Russian].
5. Belenichev IF, Litvinenko YeS. Neyroprotektivnaya aktivnost' modulyatorov tiol-disul'fidnoy sistemy v usloviyakh modelirovaniya glutamatnoy eksaytotoksichnosti in vitro. Farmakologiya ta likars'ka toksikologiya. 2017;4-5(55):20-7. [in Russian].
6. Belenichev IF, Steblyuk VS, Kamyshnyy AM. Kharakter ekspressii mRNK iNOS I yeNOS v miokarde krysa s alkogol'noy kardiomiopatiyei i na fone provodimoy terapii metabolitotropnyimi. Visnik problem biologii i meditsini. 2017;2(136):82-7. [in Russian].
7. Burova YeB, Vasilenko KP, Antonov VG, Nikol'skiy NN. Transaktivatsiya retseptora epidermal'nogo faktora rosta oksislennym glutationom i yego farmakologicheskim analogom glutoksimom v kletkakh A 431. Doklady akademii nauk. 2005;1(404):1-3. [in Russian].

- Novikov VYe, Levchenkova OS. Novyye napravleniya poiska lekarstvennykh sredstv s antigipoksicheskoy aktivnost'yu i misheni dlya ikh deystviya. Eksper. i klin. farmakol. 2013;5(76):37-46. [in Russian].
- Alan McIntyre & Adrian L Harris. Metabolic and hypoxic adaptation to antiangiogenic therapy: a target for induced essentiality. EMBO Molecular Medicine. 2015;4(7):368-79.
- Badawi Y, Ramamoorthy P, Shi H. Hypoxia-inducible factor 1 protects hypoxic astrocytes against glutamate toxicity. ASN NEURO [Internet]. [cited 2012];4(4):art:e00090. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi:10.1042/AN20120006>
- Florian Rieß. Regulation of expression and functional characterization of human HIF-3 α . München; 2015. 111 p.
- Heidbreder Marc, Fro Frederike Hlich, Olaf Jo Hren. Hypoxia rapidly activates HIF-3 mRNA expression. The FASEB Journal. 2003;17:1541-3.
- Prabhu Ramamoorthy and Honglian Shi. Ischemia induces different levels of hypoxia inducible factor-1 α protein expression in interneurons and pyramidal neurons. Acta Neuropathological Communications [Internet]. [cited 2014];2(51):1-10. Available from: www.actaneurocomms.org/content2014
- Qingdong Ke, Max Costa. HIF-1, a new target for therapy. Mol Pharmacol. 2006;70:1469-80.
- Shrivastava K, Shukla D, Bansal A, Sairam M, Banerjee P, Ilavazhagan G. Neuroprotective effect of cobalt chloride on hypobaric hypoxia-induced oxidative stress. Neurochem Int. 2008;52:368-75.
- Yosuke Watanabe, Colin E. Murdocha, Soichi Sanob, Yasuo Idoc, Markus M. Bachschmida, Richard A. Cohena, et al. Glutathione adducts induced by ischemia and deletion of glutaredoxin-1 stabilize HIF-1 α and improve limb revascularization. PNAS [Internet]. [cited 2016 May 24];113(21):6011-6. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1524198113 PNAS

ХАРАКТЕР ЕКСПРЕСІЇ мРНК HIF-1 α І HIF-3 α , РІВНЯ НІТРОТИРОЗИНУ, цГМФ І ІНТЕРЛЕЙКІНІВ В ГОМОГЕНАТІ МОЗКУ МОНГОЛЬСЬКИХ ПІЩАНОК З ГОСТРИМ ПОРУШЕННЯМ МОЗКОВОГО КРОВООБІГУ І НА ТЛІ ТЕРАПІЇ МОДУЛЯТОРАМИ СИСТЕМИ ГЛУТАТІОНУ

Беленічев І. Ф., Литвиненко О. С., Камішний А. М.

Резюме. На моделі незворотної односторонньої оклюзії загальної сонної артерії у монгольських піщанок вивчено вплив модуляторів системи глутатіону – глутоксіма, селенази і глутаредоксіна на характер експресії мРНК HIF-1 α і HIF-3 α . Досліджено вплив перерахованих препаратів на рівень TNF- α , IL-4, IL-1 β , цГМФ і нітротирозину. Селеназа в дозі 50 мкг/кг, глутоксім в дозі 50 мг/кг і глутаредоксім в дозі 200 мкл/кг в різного ступеня вираженості приводили до зростання експресії HIF-1 α і HIF-3 α , що на нашу думку, може підвищувати стійкість нейрона до умов гіпоксії. На тлі модуляції глутатіонової системи досліджуваними препаратами зареєстровано зниження рівня TNF- α , нітротирозину і цГМФ з одночасним підвищенням IL-4, що підвищує шанси нейрона до виживання в гострому постішемичному періоді.

Ключові слова: церебральна ішемія, HIF-s, інтерлейкіни, цГМФ, нітротирозин, селеназа, глутоксім, глутаредоксім.

ХАРАКТЕР ЭКСПРЕССИИ мРНК HIF-1 α И HIF-3 α , УРОВЕНЬ НИТРОТИРОЗИНА, цГМФ И ИНТЕРЛЕЙКИНОВ В ГОМОГЕНАТЕ МОЗГА МОНГОЛЬСКИХ ПЕСЧАНОК С ОСТРЫМ НАРУШЕНИЕМ МОЗГОВОГО КРОВОТОКА И НА ФОНЕ ПРОВОДИМОЙ ТЕРАПИИ МОДУЛЯТОРАМИ СИСТЕМЫ ГЛУТАТИОНА

Беленічев І. Ф., Литвиненко О. С., Камішний А. М.

Резюме. На модели необратимой односторонней окклюзии общей сонной артерии у монгольских песчанок изучено влияние модуляторов системы глутатиона – глутоксима, селеназы и глутаредоксина на характер экспрессии мРНК HIF-1 α и HIF-3 α . Исследовано влияние перечисленных препаратов на уровень TNF- α , IL-4, IL-1 β , цГМФ и нитротирозина. Селеназа в дозе 50 мкг/кг, глутоксим в дозе 50 мг/кг и глутаредоксин в дозе 200 мкл/кг в разной степени выраженности приводили к росту экспрессии HIF-1 α и HIF-3 α , что по нашему мнению, может повышать устойчивость нейрона к условиям гипоксии. На фоне модуляции глутатионової системы изучаемыми препаратами зарегистрировано снижение уровня TNF- α , нитротирозина и цГМФ с одновременным повышением IL-4, что повышает шансы нейрона к выживанию в остром постшемическом периоде.

Ключевые слова: церебральная ишемия, HIF-s, интерлейкины, цГМФ, нитротирозин, селеназа, глутоксим, глутаредоксин.

THE mRNA EXPRESSION CHARACTER OF HIF-1 α AND HIF-3 α , NITROTYROSINE, cGMP AND INTERLEUKINS IN THE MONGOLIAN GERBILS BRAIN WITH ACUTE ISCHEMIA DURING THE GLUTATHIONE SYSTEM MODULATORS THERAPY

Беленічев І. Ф., Литвиненко О. С., Камішний А. М.

Abstract. The growth and spread of ischemic brain lesions among people around the world continues to grow steadily, in spite of the progress made in modern neuropharmacology. Under these circumstances an important aspect in the treatment of cerebral stroke becomes the pharmacological regulation of the molecular and biochemical mechanisms of endogenous neuroprotection. The important directions of modern neuroprotection are: increasing the resistance of the nervous tissue to hypoxia, reducing the local inflammatory response and limiting the reactions of nitrosative stress.

The aim of our study was to investigate the effect of glutathione system modulators- selenase, glutoxim and glutaredoxin – on the mRNA expression character of HIF-1 α and HIF-3 α , markers of nitrosative stress and interleukins in the Mongolian gerbils brain with acute ischemia.

Object and methods. The experimental part was conducted on 60 male Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) weighing between 60 and 80 g. In accordance to the research program, an irreversible one-way ligation of

the common carotid artery was utilized, which presently is generally accepted as an experimental model of acute cerebral circulatory disorders. To study the effect of experimental drugs they were administered intraperitoneally one time daily for 4 days, starting from the first ones, after recovery from anesthesia. Comparison drug and physiological solution (control group) were administered in the same way. Efficiency of glutathione system modulators (selenase – 50 µg/kg, glutoxim – 50 mg/kg, glutaredoxin – 200 µl/kg) and comparison drug (pyracetam – 500 mg/kg) evaluated by their influences on the mRNA expression state of *HIF-1α* and *HIF-3α*, real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in brain tissue was used. The nitrotyrosine, TNF- α , IL-4, IL-1 β , cGMP levels was determined by ELISA in brain tissue. The results of the study were processed using a statistical package of the licensed programs «STATISTICA for Windows 6.1» (StatSoft Inc.), «SPSS 16.0», «Microsoft Excel 2003».

Results. It has been established that the cerebral ischemia modeling leads to a significant increase mRNA expression of *HIF-1α* and insignificant mRNA expression of *HIF-3α* on the 4th day of model pathology in brain tissue. The course injection of the study drugs within 4 days after the experimental ischemia leads to a significant increase in the expression of *HIF-1α*, leading in this series glutoxim (37 times higher than the control group) > selenase (20 times higher control) > pyracetam (17 times higher control) > glutaredoxin (15 times higher control). This increase in *HIF-1α* expression increases the neuron's resistance to hypoxia. It should be noted that injections of glutaredoxin resulted in an increase in mRNA of *HIF-3α* expression relative to control values, and selenase and glutoxim did not significantly change the expression of this gene. The results of these studies show that compared with the sham operated animals, the group of gerbils with stroke showed significant increase of nitrotyrosine, TNF- α , IL-1 β , levels and a decrease in IL-4 cGMP levels. A course of treatment with selenase, glutoxim and glutaredoxin increase of IL-4 level and decrease nitrotyrosine, TNF- α and cGMP levels. The results confirm the presence of neuroprotective properties in selenase, glutoxim and glutaredoxin. These properties were identified by their ability to restore the thiol-disulfide balance, to raise the level of IL-4 and the expression of HIFs and reduce the high levels of nitrotyrosine and pro-inflammatory interleukins in ischemic brain injury, resulting in the reduction of neuronal loss following a stroke.

Conclusion. The obtained data are experimental justification for the use of selenase, glutoxim and glutaredoxin in the complex therapy of cerebral ischemia.

Key words: cerebral ischemia, HIF-s, interleukins, cGMP, nitrotyrosine, selenase, glutoxim, glutaredoxin.

Рецензент – проф. Дев'яткіна Т. О.

Стаття надійшла 29.01.2018 року

DOI 10.29254/2077-4214-2018-1-1-142-108-112

УДК 616-001.1/616.8-089/616-085.2/3-092.18:073.173

Білецький О. В.

ЕФЕКТИВНІСТЬ ЗАСТОСУВАННЯ КОМПЛЕКСУ ЗАХОДІВ ДЛЯ ПОКРАЩЕННЯ ПРОЦЕСІВ ТКАНИННОГО ДИХАННЯ В СКЛАДІ ІНТЕНСИВНОЇ ТЕРАПІЇ ДЛЯ ПОСТТРАВДАЛИХ З ТЯЖКОЮ ЧЕРЕПНО-МОЗКОВОЮ ТРАВМОЮ

КЗОЗ «Харківська міська клінічна лікарня швидкої та невідкладної медичної допомоги
ім. проф. О. І. Мещанінова» (м. Харків)

alliexdok@gmail.com

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Результати дослідження, що представлені, є частково виконання НДР кафедри медицини невідкладних станів та медицини катастроф Харківської медичної академії післядипломної освіти на тему «Недиференційна терапія у хворих на гостру церебральну недостатність», № державної реєстрації 0115U000147.

Вступ. Відновлення функції свідомості у постраждалих на тяжку черепно-мозкову травму (ТЧМТ) та зменшення відсотку інвалідизації та летальності в зазначеного контингенту пацієнтів являють найскладніші проблеми сучасної медицини, зокрема в галузі інтенсивної терапії. Кількість постраждалих на ТЧМТ з кожним роком зростає [12]. На сучасному етапі в процесі проведення лікування

постраждалих на ТЧМТ в умовах відділень інтенсивної терапії (ВІТ) фахівці керуються авторитетними міжнародними рекомендаціями, основний зміст яких є вельми близьким [5,6]. Одним з важливих механізмів патогенезу тривалих розладнань функцій головного мозку в умовах ТЧМТ є формування нейрональної мітохондріальної дисфункції. Фахівці з нейрохірургії та інтенсивної терапії Кембриджського університету визначають мітохондріальну дисфункцію як «нездатність клітин виробляти та накопичувати енергію навіть при достатньому постачанні їх киснем та енергетичними субстратами». Мітохондріальна дисфункція обумовлена порушеннями функціонування мітохондріального дихального ланцюга та асоційована з гістотоксичною гіпоксією [7,10].