

С. В. Горбачева, И. Ф. Беленичев, Л. И. Кучеренко

Механизмы эндогенной нейропротекции при использовании модуляторов тиол-дисульфидной системы в условиях экспериментального нарушения мозгового кровообращения

Запорожский государственный медицинский университет

Ключевые слова: эндогенная нейропротекция, белки теплового шока, модуляторы тиол-дисульфидной системы, нарушение мозгового кровообращения

Значительная роль в системе антиоксидантной защиты и редокс-зависимой регуляции принадлежит восстановленному глутатиону (GSH) и глутатион-зависимым ферментам. За последнее десятилетие выявлены принципиально новые особенности участия глутатион-зависимых ферментов, глутаредоксина и самого глутатиона в процессах пролиферации, апоптоза, фолдинга белка, клеточного сигналинга. GSH является важным внутриклеточным антиоксидантом, играет особую роль в поддержании клеточного редокс-статуса за счет участия в тиол-дисульфидном обмене, что обеспечивает регуляцию целого ряда функций клетки, в том числе регуляцию генной экспрессии, активности отдельных ферментов и ферментных систем. Сохранение оптимального для клетки соотношения GSH/GSSG является существенным для ее жизнеспособности. Снижение уровня GSH ниже показателей нормы может служить индикатором нарушения клеточного редокс-статуса и изменения редокс-зависимой регуляции генов. Нарушение внутриклеточного баланса GSH наблюдается при ряде патологий, включая злокачественные новообразования. Следствием этого нарушения являются существенные изменения в механизме клеточного редокс-зависимого сигналинга, контролируемого как неферментативно, так и ферментативно при участии изоформ глутатионтрансферазы и глутаредоксина [1].

Известно, что восстановленный глутатион является нейротрансмиттером и нейромодулятором (в микромолярных концентрациях является агонистом глутаматных рецепторов; в миллимолярных концентрациях модулирует SH-группы NMDA рецепторов). Окисленные формы глутатиона в концентрациях свыше 200 мкмоль/л снижают экспрессию генов раннего реагирования, а в концентрации 5 ммоль/л и более активизирует р53-зависимый апоптоз и снижают уровень HSP [2]. Следует отметить, что возрастание внутриклеточного уровня цитотоксических форм NO и АФК, а также активация нейроапоптоза могут быть связаны с депривацией уровня белка теплового шока (HSP₇₀) [3]. Было показано, что в условиях *in vitro* HSP₇₀ способен предотвращать агрегацию окислительно поврежденных ферментов – цитратсинтазы, глутатион-S-трансферазы, супероксиддисмутазы, лактатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы [4].

Кроме того, в последнее время появились данные о роли белков теплового шока (HSP) в стабилизации HIF-1 β при церебральной ишемии, сопровождающейся интенсификацией процессов свободнорадикального окисления, смещением тиол-дисульфидного равновесия, развитием нитрозирующего стресса, глутаматной эксайтотоксичности [5].

Ранее был изучен характер экспрессии белка теплового шока HSP₇₀ и белка HIF-1 в опытах *in vitro* при депривации системы глутатиона путем внесения в нейрональную среду токсических концентраций окисленного глутатиона [6].

Цель исследования – оценить роль белка теплового шока HSP₇₀ и фактора,

индуцированного гипоксией, HIF-1 в реализации механизмов эндогенной нейропротекции при острой церебральной ишемии и на фоне фармакологической модуляции тиол-дисульфидной системы.

Материалы и методы. Исследования проведены в соответствии с Директивой Европейского Союза 2010/10/63 EU относительно экспериментов на животных. Опыты выполнены на белых беспородных крысах обоего пола массой 180–200 г, полученных из ЧП «Биомодельсервис». Экспериментальные животные были распределены на 6 групп: I – ложнооперированные животные, II – животные с экспериментальным нарушением мозгового кровообращения (НМК) (контроль), III – НМК + тиотриазолин («Артериум», Украина) в дозе 50 мг/кг, IV – НМК + ангиолин («Фарматрон», Украина) в дозе 50 мг/кг, V – НМК + тиоцетам (АО «Галичфарм», Украина) в дозе 250 мг/кг, VI – НМК + липоевая кислота («Марбиофарм», Россия) в дозе 50 мг/кг. Нарушение мозгового кровообращения вызывали необратимой двухсторонней окклюзией общих сонных артерий. Процедуру выполняли под этаминал-натриевым наркозом (40 мг/кг), путем хирургического доступа выделяли общие сонные артерии, подводили под них шелковые лигатуры и перевязывали. Учитывая высокую смертность при данной модельной патологии, использовали такое количество животных, чтобы каждая экспериментальная группа состояла из 10 особей. Препараты вводили внутривентриально в указанных дозах 1 раз в сутки на протяжении 18 суток наблюдения, начиная с момента выхода животных из наркоза. Животным I та II групп на протяжении исследования в соответствующем объеме внутривентриально вводили физиологический раствор. Из эксперимента животных выводили под этаминал-натриевым наркозом (40 мг/кг) [7].

Для биохимических исследований использованы участки головного мозга, находящиеся в области сенсо-моторной зоны коры, которые гомогенизировали в жидком азоте. Цитозольную фракцию выделяли методом дифференциального центрифугирования (15 000 г)

при температуре + 4 °С. Содержание окисленного и восстановленного глутатиона определяли флюориметрически [8]. Активность глутатионпероксидазы оценивали спектрофотометрически [9].

Концентрацию HSP₇₀ и HIF-1 определяли методом иммуноблот-анализа. Белки разделяли в 10 % полиакриламидном геле (ПААГ). Белки с геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану при напряжении 100 V и силе тока 0,35 A в течение 1 ч. После переноса мембрану помещали в блокирующий буфер, содержащий 1 % раствор бычьего сывороточного альбумина (SIGMA, USA) на 20 часов. Отмытую в растворе 0,1 моль/л фосфатного буфера мембрану помещали в раствор первичных антител против HSP₇₀ и HIF-1 α (1:500) (Santa Cruz Biotechnology) и инкубировали 2 ч при комнатной температуре. После проводили повторное промывание в 0,1 моль/л фосфатном буфере, помещали мембрану в раствор вторичных антител (1:1000) (биотинилированный антимышиный IgG, SIGMA, USA) и инкубировали 2 ч. Для визуализации мембрану обрабатывали раствором 3-амино-9-этилкарбазола (АЭК): 1 таблетка (Sigma, USA), растворенная в 2,5 мл ДМФА, содержащем 47,5 мл 0,05 моль/л ацетатного буфера, pH 5,0, 25 мкл 30 % H₂O₂. Инкубировали мембрану в субстратной смеси 5–10 мин. Красный нерастворимый преципитат характеризует комплекс антиген-антитело. Промывали мембрану в дистиллированной воде несколько раз. Высушивали полоски между листами фильтровальной бумаги в потоке холодного воздуха. Детекцию HSP₇₀ и HIF-1 осуществляли при помощи денситометрии в программе Adobe Photoshop.

Данные представлены в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего значения ($M \pm m$). Результаты исследования обработаны с использованием статистического пакета лицензионной программы «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoft Inc., № AXXR712D833214FAN5), а также «Microsoft Excel 2010». Статистическую обработку проводили с применением t-критерия Стьюдента и U-критерия

Манна-Уитни. Для всех видов анализа статистически значимыми считали различия с уровнем значимости менее 0,05 (95 %) [10].

Результаты и их обсуждение. Моделирование нарушения мозгового кровообращения (НМК) путем билатеральной окклюзии общих сонных артерий вызывало активацию транскрипции генов, кодирующих белок теплового шока HSP₇₀ и белок HIF-1, на что указывает повышение уровня соответствующих белков в исследуемой ткани мозга. Уже на 1 сут НМК наблюдали параллельное увеличение содержания HSP и HIF-белков в 2,16 и 2,13 раза соответственно относительно показателей ложнооперированных животных (таблица). Это связано, по нашему мнению, с их шаперонной активностью в условиях развивающегося оксидативного стресса, направленной на интенсификацию резервно-адаптационных возможностей в острый период ишемии. Содержание изучаемых белков в более поздние сроки ишемии (18 сут) связано, по-видимому, с развитием оксидативного и нитрозирующего стрессов и срывом компенсаторных возможностей организма. Кроме того, под действием избытка АФК окислительной модификации подвергаются сами HSP₇₀ белки, снижается экспрессионная активность генов, кодирующих синтез последних. Это нарушает функциональную активность HSP-белков, ограничивает их протекторные свойства в условиях ишемии, в частности шаперонную активность в отношении HIF-белков.

Применение животным модуляторов тиол-дисульфидной системы оказывало позитивный эффект на концентрацию HSP и HIF-белков, начиная с 1 суток ишемии. Способность препаратов в условиях ишемии повышать содержание в тканях головного мозга HSP₇₀-белков приводило и к достоверному увеличению концентрации HIF-белков. Наиболее активными в этом отношении были ангиолин и тиотриазолин. Применение ангиолина способствовало активации экспрессии HSP₇₀ на 16,8% через 24 ч после моделирования патологии, а на 4 сут и 18 сут – на 24,4 % и на 52,9 % соответственно (таблица).

Моделирование НМК у крыс приводило и к нарушению тиол-дисульфидного равновесия, что проявлялось уменьшением пула восстановленной формы глутатиона (таблица). Так, в данных условиях отмечается снижение содержания GSH, начиная с 1 сут наблюдения на 19,4 %, а на 4 и 18 сут его уровень снижался в 5,8 и 8,4 раза соответственно по сравнению с показателем ложнооперированных животных. Параллельно регистрировали значительное увеличение содержания окисленной формы – уже через 24 ч после окклюзии сонных артерий содержание дисульфида глутатиона составляло 0,29 мкмоль/г белка, что в 2,2 раза больше показателя группы ложнооперированных животных. Накопление окисленных интермедиатов вызывает формирование окислительного и нитрозативного стресса в тканях мозга. Известен еще один механизм негативного влияния высоких концентраций окисленной формы глутатиона – прямое ингибирование экспрессии белка HSP₇₀ [11]. Анализ полученных результатов подтверждает представление о том, что ишемическое повреждение нейронов сопровождается изменениями функционального состояния компонентов белков теплового шока и связанной с их функцией глутатионовой редокс-системы, необходимой не только для антиоксидантной защиты, но и для фолдинга белковых молекул [12].

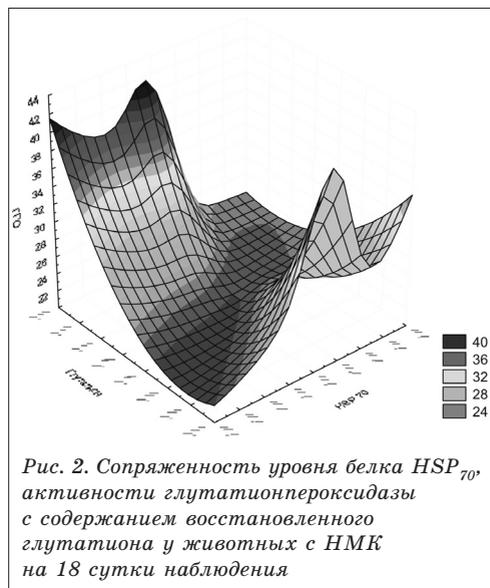
Изложенные данные подтверждают визуальными 3D-диаграммами, на которых изображена взаимосвязь между уровнем белка HSP₇₀, активностью ГПО и содержанием восстановленного глутатиона (рис. 1, рис. 2). Из представленных диаграмм видно, что у ложнооперированных животных сформирована тесная однонаправленная взаимосвязь между содержанием восстановленной формы глутатиона, активностью ГПО и уровнем HSP₇₀ (рис. 1). Однако в восстановительном периоде (на 18 сут) значительное снижение GSH и ГПО сопровождалось небольшим повышением HSP₇₀. Последнее дает возможность предположить наличие разнонаправленной взаимосвязи между изучаемыми показателями (рис. 2).

Содержание белков HSP₇₀ и HIF-1 α , уровень глутатиона и активность глутатионпероксидазы в ткани головного мозга крыс в разные сроки нарушения мозгового кровообращения на фоне терапии модуляторами тиол-дисульфидной системы, $M \pm m$

Экспериментальная группа животных	HSP ₇₀ , у.е./г белка	HIF-1 α , у.е./г белка	Глутатион восстановленный, мкмоль/г белка	Глутатион окисленный, мкмоль/г белка	Активность глутатион-перок- сидазы, мкмоль/ мин (мг белка · мин)
Ложнооперированные	15,20 \pm 1,35	17,90 \pm 1,29	3,60 \pm 0,17	0,13 \pm 0,06	72,50 \pm 3,16
Нарушение мозгового кровообращения, 1 сутки	32,80 \pm 2,64*	38,20 \pm 2,17*	2,90 \pm 0,21*	0,29 \pm 0,09	24,50 \pm 3,14*
Нарушение мозгового кровообращения, 1 сутки + тиоцетам	35,40 \pm 2,47	33,50 \pm 2,34	3,10 \pm 0,35	0,22 \pm 0,08	45,60 \pm 3,92**
Нарушение мозгового кровообращения, 1 сутки + ангиолин	38,30 \pm 1,84	34,80 \pm 2,18	3,30 \pm 0,28	0,19 \pm 0,07	48,60 \pm 2,84**
Нарушение мозгового кровообращения, 1 сутки+ липоевая кислота	33,20 \pm 2,32	30,30 \pm 2,43**	2,90 \pm 0,37	0,28 \pm 0,09	38,10 \pm 3,36
Нарушение мозгового кровообращения, 1 сутки + тиотриазолин	34,70 \pm 2,51	31,50 \pm 2,42	3,00 \pm 0,26	0,21 \pm 0,07	41,50 \pm 3,09**
Нарушение мозгового кровообращения, 4 сутки	27,40 \pm 1,84*	35,40 \pm 2,39*	0,62 \pm 0,08*	1,68 \pm 0,11*	15,30 \pm 2,68*
Нарушение мозгового кровообращения, 4 сутки + тиоцетам	31,30 \pm 2,11	29,70 \pm 2,04	1,84 \pm 0,22**	0,82 \pm 0,05**	37,50 \pm 2,63**
Нарушение мозгового кровообращения, 4 сутки + ангиолин	34,10 \pm 2,25**	31,20 \pm 2,16	2,08 \pm 0,34**	0,71 \pm 0,07**	40,20 \pm 1,36**
Нарушение мозгового кровообращения, 4 сутки + липоевая кислота	28,60 \pm 2,58	27,70 \pm 2,55	1,69 \pm 0,41	0,88 \pm 0,11**	27,70 \pm 2,02**
Нарушение мозгового кровообращения, 4 сутки + тиотриазолин	30,50 \pm 2,63	28,40 \pm 2,33	1,93 \pm 0,21**	0,76 \pm 0,08**	35,90 \pm 2,87**
Нарушение мозгового кровообращения, 18 сутки	18,50 \pm 1,22	19,60 \pm 1,43	0,43 \pm 0,11*	2,74 \pm 0,14*	21,50 \pm 1,69**
Нарушение мозгового кровообращения, 18 сутки + тиоцетам	26,90 \pm 1,47**	27,40 \pm 2,08**	1,72 \pm 0,19**	0,83 \pm 0,09**	42,60 \pm 2,24**
Нарушение мозгового кровообращения, 18 сутки + ангиолин	28,3 \pm 1,39**	30,70 \pm 2,16**	2,12 \pm 0,20**	0,62 \pm 0,05**	51,20 \pm 1,93**
Нарушение мозгового кровообращения, 18 сутки + липоевая кислота	24,80 \pm 1,74**	26,90 \pm 2,58	1,55 \pm 0,24**	0,94 \pm 0,07**	31,70 \pm 2,19**
Нарушение мозгового кровообращения, 18 сутки + тиотриазолин	26,40 \pm 1,33**	28,10 \pm 1,94**	1,89 \pm 0,18**	0,77 \pm 0,08**	41,80 \pm 2,08**

Примечания: * $p \leq 0,05$ по отношению к показателю ложнооперированных животных;

** $p \leq 0,05$ по отношению к показателю животных с НМК.



Проведенные нами ранее исследования показывают способность модуляторов тиол-дисульфидной системы повышать биодоступность оксида азота и ограничивать токсическое действие его активных дериватов на нейроны в условиях ишемии [13]. К настоящему времени доказано, что оксид азота активирует синтез белков-шаперонов. NO-зависимая активация HSP₇₀ может составлять важный эндогенный механизм защиты клеток при ишемии. Возможен и другой механизм – белки теплового шока могут подавлять гиперэкспрессию индуцибельной NOS за счет снижения активации фактора транскрипции iNOS (NFκB), что приводит к ограничению нитрозирующего стресса и нейроапоптоза [14]. Значение этих влияний

состоит в ограничении гиперпродукции оксида азота и его цитотоксического действия.

Выводы

Впервые выявлена взаимосвязь экспрессии белков-шаперонов молекулярной массы 70 кДа с нарушениями функционирования глутатионного звена тиол-дисульфидной системы. Введение животным модуляторов тиол-дисульфидной системы вызывало прямое повышение восстановленной формы глутатиона и опосредованно приводило к активации экспрессии белка HSP₇₀, который в свою очередь пролонгирует действие HIF-1. Выявленный механизм может быть одним из проявлений нейропротективного действия изучаемых препаратов.

1. Калинина Е. В. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов / Е. В. Калинина, Н. Н. Чернов, М. Д. Новичкова // Успехи биол. наук. – 2014. – Т. 54. – С. 299–348.
2. Przybytkowski E. Correlation between glutathione and stimulation of the pentose phosphate cycle in situ in Chinese hamster ovary cells exposed to hydrogen peroxide / E. Przybytkowski, D. A. Averill-Bates // Arch Biochem Biophys. – 1996. – № 325. – P. 91–98.
3. Нейропротекция и нейропластичность / И. Ф. Беленичев, В. И. Черний, Е. А. Нагорна [и др.]. – Киев : Логос, 2015. – 512 с.
4. Belenichev I. F. Disturbance of HSP70 Chaperone Activity is a possible mechanism of Mitochondrial Dysfunction / I. F. Belenichev, Yu. M. Kolesnik, N. V. Bukhtiyarova // Neurochem. Journal. – 2011. – V. 5, № 4. – P. 251–256.
5. Specific inhibition of hypoxia inducible factor 1 exaggerates cell injury induced by *in vitro* ischemia through deteriorating cellular redox environment / G. Shuhong, M. Minoru, J. L. Ke, S. Honglian // J. Neurochem. – 2009. – V. 108 (5). – P. 1309–1321.
6. Горбачева С. В., Беленичев И. Ф. Антиоксидантная модуляция нейроапоптоза в условиях дисбаланса тиол-дисульфидной системы и накопления окисленных промежуточных соединений *in vitro* / Горбачева С. В., Беленичев И. Ф. // Вісник проблем біології та медицини. – 2015. – № 3 – С. 124–129.

7. Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації) / за ред. О. В. Стефанова. – Київ : ВД «Авіцена», 2002. – 527 с.
8. Чекман И. С. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных нейропротективных препаратов / И. С. Чекман, Ю. И. Губский, И. Ф. Беленичев. – Киев : ГФЦ МОЗ Украины, 2010. – 81 с.
9. Асатиани В. С. Ферментные методы анализа / В. С. Асатиани. – Москва : Наука, 1969. – 739 с.
10. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. – Москва : Медиасфера, 2002. – 312 с.
11. Функциональное состояние компонентов белков теплового шока, глутатионредуктазы и глутатионовой редокс-системы при нагревании и охлаждении / С. О. Тапбергенев, Р. Б. Бекбо-сынова, Б. С. Советов, С. М. Большбекова // Успехи соврем. естествознания. – 2015. – № 1. – С. 781–784.
12. Горожанская Э. Г. Содержание глутатиона и активность глутатион-S-трансферазы как фактор прогноза эффективности лекарственной терапии. / Э. Г. Горожанская, В. Б. Ларионова, Г. Н. Зубрихина // Российский онкологический журнал. – 2002. – № 5. – С. 29–32.
13. Gorbacheva S. V. The Thiol–Disulfide Balance and the Nitric Oxide System in the Brain Tissue of Rats Subjected to Experimental Acute Impairment of Cerebral Blood Flow / Gorbacheva S. V., Belenichev I. F. // Neurochemical Journal. – 2014. – V. 8, № 1. – P. 24–27.
14. Garcia-Nogales P. Peroxynitrite protects neurons against nitric oxide-mediated apoptosis. A key role for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in neuroprotection / P. Garcia-Nogales, A. Almeida, J. P. Bolanos // J. Biol Chem. – 2003. – № 278. – P. 864–874.

С. В. Горбачева, И. Ф. Беленичев, Л. И. Кучеренко

Механизмы эндогенной нейропротекции при использовании модуляторов тиол-дисульфидной системы в условиях экспериментального нарушения мозгового кровообращения

Цель исследования – оценить роль белка теплового шока HSP₇₀ и фактора, индуцированного гипоксией, HIF-1 в реализации механизмов эндогенной нейропротекции при острой церебральной ишемии и фармакологической модуляции тиол-дисульфидной системы.

Нарушение мозгового кровообращения (НМК) моделировали на крысах путем билатеральной окклюзии общих сонных артерий. В тканях головного мозга на 1, 4 и 18 сут определяли уровень белка теплового шока HSP₇₀ и белка HIF-1 методом иммуноблотинга. Параллельно изучали состояние системы глутатиона. В ранние сроки наблюдения выявлена активация транскрипции генов, кодирующих белки HSP₇₀ и HIF-1, что связано с их шаперонной активностью. Восстановительный период ишемии характеризовался снижением уровня исследуемых белков и нарушением тиол-дисульфидного равновесия, что связано с развитием оксидативного стресса и срывом компенсаторных возможностей организма. В данных условиях отмечали уменьшение уровня восстановленной формы глутатиона, начиная с 1 сут наблюдения – на 19,4 %, а на 4 и 18 сут уровень этого показателя снижался в 5,8 и 8,4 раза соответственно по сравнению с показателем ложноперированных животных.

Параллельно регистрировали значительное увеличение окисленной формы, уже через 24 ч после окклюзии сонных артерий содержание дисульфида глутатиона было в 2,2 раза больше показателя группы псевдооперированных животных. Введение модуляторов тиол-дисульфидной системы вызывало прямое повышение восстановленной формы глутатиона и косвенно приводило к активации экспрессии белка HSP₇₀, который, в свою очередь, продлевал действие HIF-1. Наиболее активными в этом отношении были Ангиолин и Тиотриазолин. Применение Ангиолина способствовало активации экспрессии HSP₇₀ на 16,8 % через 24 ч после моделирования патологии, а на 4 сут и 18 сут – на 24,4 % и на 52,9 % соответственно по сравнению с показателем при НМК.

В ходе проведенных исследований впервые выявлена взаимосвязь экспрессии белков теплового шока с нарушениями функционирования глутатинового звена тиол-дисульфидной системы. Обнаруженный механизм может быть одним из проявлений нейропротективного действия исследуемых препаратов.

Ключевые слова: эндогенная нейропротекция, белки теплового шока, модуляторы тиол-дисульфидной системы, нарушение мозгового кровообращения

С. В. Горбачова, І. Ф. Беленічев, Л. І. Кучеренко

Механізми ендогенної нейропротекції при застосуванні модуляторів тиол-дисульфідної системи за умов експериментального порушення мозгового кровообігу

Мета дослідження – оцінити роль білка теплового шоку HSP₇₀ і фактора, індукованого гіпоксією, HIF-1 у реалізації механізмів ендогенної нейропротекції за гострої церебральної ішемії та на тлі фармакологічної модуляції тиол-дисульфідної системи. Порушення мозгового кровообігу (ПМК) моделювали на щурах шляхом білатеральної оклюзії загальних сонних артерій. У тканинах головного мозку на 1, 4 і 18 добу визначали рівень білка теплового шоку HSP₇₀ і білка HIF-1 методом

імуноблотингу. Паралельно вивчали стан системи глутатіону. У ранній термін спостереження виявлено активацію транскрипції генів, які кодуєть білки HSP₇₀ і HIF-1, що пов'язано з їхньою шаперонною активністю. Відновлювальний період ішемії характеризувався зниженням рівня досліджуваних білків і порушенням тиол-дисульфідної рівноваги, що пов'язано з розвитком оксидативного стресу і зривом компенсаторних можливостей організму. За даних умов відзначали падіння рівня відновленої форми глутатіону, починаючи з 1 доби спостереження – на 19,4 %, а на 4 і 18 добу рівень цього показника знижувався в 5,8 і 8,4 рази відповідно порівняно з показником несправжньооперованих тварин. Паралельно реєстрували значне збільшення окисненої форми – вже через 24 год після оклюзії сонних артерій уміст дисульфиду глутатіону був у 2,2 разу більшим, ніж показник групи несправжньооперованих тварин. Введення модуляторів тиол-дисульфідної системи викликало пряме підвищення відновленої форми глутатіону й опосередковано призводило до активації експресії білка HSP₇₀, який, у свою чергу, пролонгував дію HIF-1. Найактивнішими в цьому відношенні були Ангіолін і Тіотриазолін. Застосування Ангіоліну сприяло активації експресії HSP₇₀ на 16,8 % через 24 год після моделювання патології, а на 4 добу і 18 добу – на 24,4 % і на 52,9 % відповідно порівняно з показником за умов ПМК.

У ході проведених досліджень уперше виявлено взаємозв'язок експресії білків теплового шоку з порушеннями функціонування глутатіонової ланки тиол-дисульфідної системи. Виявлений механізм може бути одним з проявів нейропротективної дії досліджуваних препаратів.

Ключові слова: ендогенна нейропротекція, білки теплового шоку, модулятори тиол-дисульфідної системи, порушення мозкового кровообігу

S. V. Gorbacheva, I. F. Belenichev, L. I. Kucherenko

Mechanisms of endogenous neuroprotection when using thiol-disulfide system modulators under experimental impairment of cerebral circulation

The aim of this work was to estimate a role of heat shock protein HSP₇₀ and hypoxia-inducible factor (HIF-1) in realization of endogenous neuroprotection mechanisms under acute cerebral ischemia and pharmacological modulation of thiol-disulfide system.

Cerebral circulation impairment was modeled on rats by bilateral occlusion of common carotid arteries. The levels of heat shock protein HSP₇₀ and protein HIF-1 were determined in cerebral tissues on the 1, 4 and 18 days of post occlusion period using an immunoblotting method. At the same time it was studied a state of glutathione system. An activation of transcription of genes which code proteins such as HSP₇₀ and HIF-1 was detected at early stages of observation that was corresponded to their chaperone activity. Recovery period of ischemia was characterized by the reduction of investigated proteins level and disturbance of thiol-disulfide balance that was connected with the development of oxidative stress and derangement of compensatory capabilities of an organism. In the given conditions it was observed a drop of reduced glutathione level on 19,4 % starting from the 1 day of observation. On the 4 and 18 days the level of this factor was reduced in 5,8 and 8,4 times correspondingly. At the same time it was recorded a significant increase of oxidized form. In 24 h glutathione disulfide content were in 2,2 times more than this parameter in the group of false-operated animals. The introduction of thiol-disulfide system modulators caused direct increase of reduced glutathione form and indirectly caused an activation of protein HSP₇₀ expression that prolonged HIF-1 action. Angioline and thiotriazoline were the most active in this case. Angioline usage promoted an activation of HSP₇₀ expression by 16,8 % on 24 h after pathology modeling and on the 4 and 18 days – by 24,4 % and 52,9 % correspondingly.

It was obtained a new data of interconnection between the expression of heat shock proteins and impairments of glutathione link of thiol disulfide system functioning. This mechanism could be involved in neuroprotective action of the investigated drugs.

Key words: endogenous neuroprotection, heat shock proteins, thiol-disulfide system modulators, cerebral circulation impairments

Поступила: 24 ноября 2015 г.

Контактное лицо: Горбачова Светлана Васильевна, кандидат биологических наук, доцент, кафедра биохимии и лабораторной диагностики, Запорожский государственный медицинский университет, д. 26, просп. Маяковского, г. Запорожье, 69035. Электронная почта: swg18@yandex.ua