

С. В. Павлов, К. В. Левченко, О. М. Камишний

Вплив селективних модуляторів естрогенових рецепторів на експресію та синтез HSP 70 білків у кардіоміоцитах щурів з гострим інфарктом міокарда

Запорізький державний медичний університет

Ключові слова: гострий інфаркт міокарда, селективні модулятори естрогенових рецепторів, експресія та синтез HSP 70 білків, кардіопротекція

Останніми роками проведено значну кількість експериментальних і клінічних досліджень, присвячених вивченню феномена метаболічної терапії гострого періоду інфаркту міокарда (ІМ). Проте молекулярні та біохімічні процеси метаболічної адаптації до ішемії залишаються не до кінця дослідженими [1–3]. Крім того, сьогодні залишається актуальним пошук нових високоєфективних метаболітотропних лікарських засобів фармакотерапії гострого ІМ.

Відомо, що ішемічні пошкодження серця пов'язані з активацією вільнорадикальних процесів, кальцієвим навантаженням, денатурацією білкових молекул, виснаженням внутрішньоклітинного пулу АТФ та глюкози, накопиченням токсичних метаболітів, зниженням клітинного рН, розвитком мітохондріальної дисфункції. Вищенаведені фактори залучені до активації експресії та синтезу HSP 70 у гострому періоді ІМ. Значення індукції HSP 70 за умов гострої гіпоксії кардіоміоцитів набуло важливості за вивчення феномена ішемічного прекодиціювання [3, 4]. Було показано, що короткотривала ішемія (декілька хвилин) призводить до значного накопичення в кардіоміоцитах HSP 70 та підвищення стійкості міокарда до подальшої тривалої гіпоксії. Результатом багатьох експериментальних робіт є висновок про те, що активація синтезу HSP 70 лежить в основі компенсаторно-адаптаційних

механізмів міокарда до гіпоксичного пошкодження [4, 5].

Сьогодні активно проводиться пошук цитопротекторів серед сполук та факторів, що здатні індукувати синтез HSP 70. Однак більшість з цих сполук/факторів мають досить слабку фармакологічну активність, деякі значно збільшують уміст цих білків, обумовлюючи розвиток небажаних побічних реакцій [6, 7]. У цьому аспекті на особливу увагу заслуговують естрогени, які потенціюють вхід HSP 70 білків у клітину, що зумовлено механізмом їхньої біологічної дії. Дійсно, багатьма експериментальними та клінічними дослідженнями доведені кардіо- та нейротропні ефекти естрогенів за умов патології гіпоксичного генезу [8–10]. З іншого боку, впровадження в клініку естрогенів як кардіопротективних препаратів обмежується їхньою прямою гормональною активністю, а також неоднозначним впливом на систему згортання крові [8].

У зв'язку з цим, перспективним напрямом може стати застосування як агоністів естрогенових рецепторів так званих селективних модуляторів естрогенових рецепторів (SERM). SERM за своєю хімічною будовою не належать до естрогенів. Однак завдяки особливостям своєї молекулярної структури та фізико-хімічним властивостям вони здатні взаємодіяти з естрогеновими рецепторами [9–11].

Мета дослідження – вивчити здатність SERM впливати на експресію/синтез HSP 70 білків та оцінити їхню цитопротективну дію за умов гострого ІМ.

Матеріали та методи. Експериментальну частину роботи виконано на 120

статевозрілих щурах-самцях масою 190–230 г. Експериментальні тварини були отримані з ПП «Біомодельсервіс» (м. Київ). Гострий ІМ моделювали шляхом введення впродовж 3 діб коронароспазмуючого агента – пітуїтрину (1 од/кг підшкірно), та $\beta_{1, 2, 3}$ адреноміметика ізопреналіну (200 мг/кг внутрішньом'язово) [12, 13].

Як SERM були обрані тамоксифену цитрат (0,1 мг/кг) та тореміфен (0,1 мг/кг), які в наших попередніх дослідженнях *in vitro* та *in vivo* продемонстрували високу цито- та кардіопротективну активність [4, 6–8].

Референс-препаратом було обрано метаболітотропний препарат капікор (6 мг/кг).

Експериментальні групи тварин: 1 група – інтактна (n = 10); 2 група – контрольні – ІМ, 4 доба (n = 10); 3 група – ІМ + тамоксифену цитрат (0,1 мг/кг) (n = 10); 4 група – ІМ + тореміфен (0,1 мг/кг) (n = 10); 5 група – ІМ + капікор (6 мг/кг) (n = 10).

Дослідження експресії HSP 70 у кардіоміоцитах проводили в усіх експериментальних групах тварин на 4 добу ІМ.

Для аналізу експресії HSP 70 генів використовували метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ЗТ-ПЛР). Молекулярно-генетичне дослідження включало декілька етапів: виділення тотальної РНК; зворотна транскрипція (виділення кДНК); полімеразно-ланцюгова реакція в режимі реального часу. Для визначення рівня експресії досліджуваних генів використовували ампліфікатор CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США) і набір реактивів для проведення ПЦР-РВ у присутності SYBR Green R-402 («Синтол»). Фінальна реакційна суміш для ампліфікації включала барвник SYBR Green, ДНК – полімераза SynTaq з інгібуючими активність ферменту антитілами. Для вираження відносного рівня експресії генів використовували порівняльний Ct-метод ($\Delta\Delta$ Ct метод). В експеримент були включені негативні контролю: без додавання кДНК матриці в реакцію ПЛР, без додавання мРНК

матриці в синтезі кДНК, без додавання ферменту в синтезі кДНК. Усі реакції ампліфікації виконували на індивідуальних зразках у трьох повторах.

Інтенсивність біосинтезу HSP 70 білків у кардіоміоцитах досліджували імуноферментним методом за вмістом у гомогенаті серця концентрації HSP 70 білків (Enzo Life Science, EKS-715) [13].

Цитопротективну дію вивчали за концентрацією в гомогенаті серця щурів нітритрозинову імуноферментним методом («Nitritirosin» (ELISA Kit «Nucultbiotechnology b.v.»), а також за показниками біохімічного дослідження стану енергетичного метаболізму (АТФ, АДФ, АМФ) серцевого м'яза в дослідних групах тварин. Для більш детальної оцінки процесів енергетичного обміну на підставі отриманих даних щодо концентрації макроергічних фосфатів розраховували такі показники енергозабезпечення: енергетичний заряд (ЕЗ); енергетичний потенціал (ЕП); індекс фосфорильовання (ІФ); термодинамічний контроль дихання (ТКД) [13]:

- ЕЗ обчислювали за формулою:
$$\text{АТФ} + 1/2\text{АДФ} / \text{АТФ} + \text{АДФ} + \text{АМФ};$$
- ЕП – за формулою: $\text{АТФ} + \text{АДФ};$
- ТКД – за формулою: $\text{АДФ} / \text{АМФ}.$

Нормальність розподілу оцінювали за критерієм Kolmogorov-Smirnov (D) та Lilliefors, Shapiro-Wilk (W). У випадку розподілення, відмінного від нормального, або аналізу порядкових змінних, використовували Mann-Whitney U. Для двох непов'язаних вибірок та для більшого числа вибірок – критерій Kruskal-Wallis H з подальшим порівнянням за Games-Howell. Порівняння груп за якісною ознакою проводили за допомогою критерію χ^2 з аналізом таблиць зв'язаності. Дані представлено у вигляді середнього арифметичного та стандартної похибки репрезентативності середнього значення. Взаємозв'язок між досліджуваними змінними проводили, використовуючи процедуру бінарного регресійного аналізу. Результати дослідження оброблені з застосуванням статистичного пакета програми «SPSS 16», «Microsoft Excel 2003», «STATISTICA® for Windows 7.0» (StatSoft Inc. № AXXR712D833214FAN5), для всіх

видів аналізу статистично значущими вважали відмінності за рівня значущості менше ніж 0,05 [14].

Результати та їх обговорення. За оцінки стану антиоксидантної системи кардіоміоцитів щурів з гострим ІМ було встановлено суттєве збільшення вмісту нітротирозину (НТЗ), більш ніж на 89 % щодо інтактної групи тварин (табл. 1). Встановлені патобіохімічні зміни відбувалися на тлі розвитку енергодефіциту кардіоміоцитів, про що свідчило статистично вірогідне падіння показників ЕЗ, ЕП, ТКД на 45, 62 і 80 % відповідно (табл. 1).

Важливо зазначити, що за дослідження характеру експресії/синтезу HSP 70 білків у кардіоміоцитах було зафіксовано різноспрямований характер експресії та синтезу цього білка. Так, на 4 добу гострого ІМ, як видно з таблиці 2, у щурів контрольної групи було зареєстровано суттєве, більше ніж на 90 %, підвищення експресії mRNA HSP 70. Однак у разі аналізу концентрації HSP 70 білка в кардіоміоцитах було зафіксовано падіння його вмісту більше ніж на 74 %, що, на нашу думку, пов'язано зі зривом компенсаторно-адаптаційних реакцій клітини у відповідь на гіпоксію

та неспроможність білоксинтезуючого апарату клітини реалізувати продукцію HSP 70 білка [15].

Разом з цим, курсове призначення тамоксифену (0,1 мг/кг), тореміфену (0,1 мг/кг) і капікору (6 мг/кг) тваринам з гострим ІМ призводило до модулюючого ефекту відносно характеру експресії та синтезу HSP 70 білка. Аналіз даних щодо експресивної активності mRNA HSP 70 показав, що SERM та референс-препарат капікор здатні за умов гіпоксії модулювати експресію HSP 70. Тобто, за умов гострого ІМ дослідні препарати не стимулювали та не підвищували експресію HSP 70, а, навпаки, спричиняли її нормалізацію. Ці процеси відбувалися на тлі збільшення, відносно контрольної групи тварин, вмісту самих HSP 70 білків у кардіоміоцитах на 4 добу ІМ. На нашу думку, подібний вплив препаратів є ключовим механізмом їхньої кардіопротективної дії та пояснюється наступним. По-перше, експериментальна терапія SERM і капікором обмежувала розвиток оксидативного стресу та разом з цим запобігала окисній деструкції HSP 70 білків. Так, на тлі призначення тамоксифену (0,1 мг/кг),

Таблиця 1

Концентрація нітротирозину, функціональні показники енергообміну серцевого м'яза та кількість тварин, що вижили на 4 добу гострого інфаркта міокарда за впливу SERM, M ± t

Експериментальна група тварин (n = 10)	Нітротирозин, нг/мл	Енергетичний заряд	Енергетичний потенціал	Термодинамічний контрольний контроль дихання	Відсоток тварин, що вижили, 4 доба гострого інфаркту міокарда
Інтактна група	0,14 ± 0,03	10,0 ± 0,10	7,90 ± 0,04	3,0 ± 0,02	0
Гострий інфаркт міокарда, 4 доба (контрольна група)	1,30 ± 0,27	5,50 ± 0,04	3,00 ± 0,02	0,60 ± 0,01	40
Гострий інфаркт міокарда + Тамоксифен, (0,1 мг/кг)	0,65 ± 0,14*	7,40 ± 0,05*	5,10 ± 0,04*	1,40 ± 0,02*	70
Гострий інфаркт міокарда + Тореміфен, (0,1 мг/кг)	0,52 ± 0,09*	7,80 ± 0,03*	5,70 ± 0,02*	1,90 ± 0,03**	80
Гострий інфаркт міокарда + Капікор, (6 мг/кг)	0,68 ± 0,11*	6,40 ± 0,08*	4,10 ± 0,03*	1,10 ± 0,04*	60

Примітки. Тут і в табл. 2: *p ≤ 0,05 відносно контрольної групи тварин, **p ≤ 0,05 відносно груп тварин з курсовим призначенням тамоксифену та капікору.

Експресія та синтез HSP 70 білків у кардіоміоцитах щурів з гострим інфарктом міокарда за впливу SERM

Експериментальна група тварин (n = 10)	HSP 70, (mRNA, ум.од.)	HSP 70, нг/мл
Інтактна група	1,10 ± 0,03	2,70 ± 0,21
Гострий інфаркт міокарда, 4 доба (контрольна група)	10,30 ± 1,10	0,68 ± 0,10
Гострий інфаркт міокарда + Тамоксифен, (0,1 мг/кг)	0,77 ± 0,05*	1,74 ± 0,20*
Гострий інфаркт міокарда + Тореміфен, (0,1 мг/кг)	0,86 ± 0,06*	2,30 ± 0,34**
Гострий інфаркт міокарда + Капікор, (6 мг/кг)	1,0 ± 0,04*	1,40 ± 0,12*

тореміфену (0,1 мг/кг) та капікору (6 мг/кг) відбувалося статистично вірогідне порівняно з контролем падіння вмісту НТЗ – на 50, 60, 48% відповідно. По-друге, за даними низки джерел літератури, а також наших попередніх досліджень встановлено, що за умов зв'язування SERM з естрогеновими рецепторами серця відбувається вивільнення HSP 70 з комплексу ER-HSP 70 та входження останніх усередину клітини, без зміни експресивної активності mRNA HSP70 [15–17]. Збільшення надходження HSP 70-білків у клітину призводить до реалізації протективних властивостей HSP 70-білків за умов гіпоксичного пошкодження кардіоміоцитів. Низкою 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 [8, 18]. Подібні ефекти HSP 70 щодо IL33, на нашу думку, пояснюються тим, що білки теплового шоку мають так званий процитокіновий ефект. Цю властивість мають не тільки HSP 70, а й інші шаперони, такі як HSP 90, HSP 32. Для позаклітинного HSP 70 був запропонований новий термін «шаперокін» [15–17]. На відміну від позаклітинного HSP 70, збільшення експресії або вмісту внутрішньоклітинного HSP 70 ви-

кликає гальмування передачі проліферативних, апоптотичних, запальних сигналів.

Дійсно, аналіз отриманих даних показав, що кардіопротекторна дія SERM та референс-препарату капікор проявлялась їхньою здатністю покращувати енергетичний метаболізм кардіоміоцитів. Як видно з таблиці 2, SERM та, особливо, тореміфен покращували всі функціональні показники енергообміну. Так, на тлі призначення тореміфену відбувалося збільшення ЕЗ у середньому на 30 %, ЕП – на 47 %, ТКД – на 68 %. Встановлений спектр цитопротективних ефектів дослідних препаратів призводив до збільшення кількості тварин, які вижили на 4 добу гострого ІМ.

Висновок

Таким чином, за умов моделювання гострого ІМ SERM спричиняли комплексну цитопротективну дію, а саме: модулювали характер експресії та синтез HSP-білків, зменшували напруженість оксидативного стресу, покращували енергетичний обмін клітини. Проявом подібних цитопротективних ефектів було збільшення кількості тварин, що вижили, у дослідних групах, тварини яких отримували SERM.

Встановлений спектр фармакологічних ефектів SERM обумовлює перспективність та актуальність подальших досліджень у цьому напрямі.

1. Коваленко В. М. Хвороби системи кровообігу у структурі смертності населення України: міфи і реальність / В. М. Коваленко, Ю. М. Сіренко А. П. Дорогой // Матеріали XIV Національного конгресу кардіологів України. – Київ, 2013.

2. Красуля О. І. Дослідження сучасного стану надання лікарської допомоги хворим на інфаркт міокарда в країнах світу та в Україні / О. І. Красуля, А. А. Котвіцька, О. О. Суріков // Запорозький медичний журнал. – 2010. – Т. 12, № 3. – С. 8–10.
3. Ходаковский О. А. Влияние адемола на показатели обмена NO в щурів із моделлю інфаркту міокарда / О. А. Ходаковский, С. В. Павлов, Н. В. Бухтіярова // Український біохімічний журнал. – 2013. – Т. 85, № 3. – С. 85–89.
4. Павлов С. В. Цитопротективні ефекти селективних модуляторів естрогенових рецепторів за умов гіпоксії кардіоміоцитів *in vitro* / С. В. Павлов, К. В. Левченко // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2016. – Т. 50, № 4–5. – С. 78–83.
5. Мойбенко О. О. Эндогенные механизмы кардиопротекции как основа патогенетической терапии заболеваний сердца / О. О. Мойбенко, В. Э. Досенко, О. М. Пархоменко. – Киев : Наук. думка, 2008. — 520 с.
6. 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. – V. 8, № 1. – P. 28–32.
7. Belenichev I. Disturbance of HSP 70 Chaperone Activity Is a Possible Mechanism of Mitochondrial Dysfunction / I. Belenichev, Yu. Kolesnik, S. Pavlov // Neurochemical Journal. – 2012. – V. 15, № 4. – P. 251–256.
8. Pavlov S. Cardioprotective effects of the estrogen receptors modulators in the conditions of experimental acute myocardial infarction / S. V. Pavlov, K. V. Levchenko, S. V. Gorbachova // Zaporozhye medical journal. – 2017 – V. 19, № 6. – P. 731–736.
9. The Neuroprotective Activity of Tamoxifen and Tibolone during Glutathione Depletion *in vitro* / I. Belenichev, O. Odnokoz, S. Pavlov [et al.] // Neurochemical Journal. – 2012. – V. 6, № 3. – P. 202–212.
10. Сметник В. П. Защитное влияние эстрогенов на сердечно-сосудистую систему / В. П. Сметник // Consilium medicum. – 2002 (экстравыпуск). – С. 3–6.
11. Complex actions of sex steroids in adipose tissue, the cardiovascular system, and brain: Insights from basic science and clinical studies / J. L. Turgeon, M. C. Carr, P. M. Maki [et al.] // Endocrine reviews. – 2006. – V. 27. – P. 575–605.
12. Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації); за ред. О. В. Стефанова. – Київ : ВД «Авіцена», 2002. – 527 с.
13. Чекман И. С. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных нейропротективных препаратов / И. С. Чекман, Ю. И. Губский, И. Ф. Беленичев – Киев: ДФЦ МОЗ Украины, 2010. – 81 с.
14. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием EXCEL / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич – Киев : МОРИОН, 2002. – 640с.
15. Павлов С. В. Молекулярно-біохімічні механізми HSP 70-опосередкованої цитопротекції в умовах патологій ішемічного генезу / С. В. Павлов, І. Ф. Беленичев, Ю. В. Никитченко // Вісник проблем біології та медицини. – 2017. – Т. 1, № 3. – С. 61–67.
16. Нейропротекция и нейропластичность / И. Ф. Беленичев, В. И. Черный, С. В. Павлов [и др.]. – Киев : Логос, 2015. – 509 с.
17. Guisasaola M. Heat shock proteins, end effectors of myocardium ischemic preconditioning? / M. Guisasaola // Cell Stress & Chaperones. – 2006. – V. 11 (3). – P. 250–258.
18. Prognostic Value of Soluble ST2 During Hospitalization for ST-Segment Elevation Myocardial Infarction / O. Barbarash, O. Gruzdeva, E. Uchasova, Y. Dyleva // Clinical Chemistry. – 2016. – V. 36. – P. 1–7.

С. В. Павлов, К. В. Левченко, О. М. Камишний

Вплив селективних модуляторів естрогенових рецепторів на експресію та синтез HSP 70 білків у кардіоміоцитах щурів з гострим інфарктом міокарда

Останніми роками проведено значну кількість експериментальних та клінічних досліджень, присвячених вивченню феномена метаболічної терапії гострого періоду інфаркту міокарда (ІМ). Проте молекулярні та біохімічні процеси метаболічної адаптації до ішемії залишаються не до кінця дослідженими. Сьогодні активно проводиться пошук цитопротекторів серед сполук і факторів, що здатні індукувати синтез білків HSP 70. У цьому аспекті на особливу увагу заслуговують естрогени, які потенціюють вхід HSP 70 білків у клітину, що зумовлено механізмом їхньої біологічної дії.

Мета дослідження – встановити здатність SERM впливати на експресію/синтез HSP 70 білків та оцінити їхню цитопротективну дію за умов гострого ІМ.

Експериментальну частину роботи було виконано на 120 статевозрілих щурах-самцях масою 190–230 г. Гострий ІМ моделювали шляхом введення впродовж 3 діб коронароспазмуючого агента – пітіутрину (1 од/кг підшкірно), та $\beta_{1,2,3}$ адреноміметика ізопреналіну (200 мг/кг внутрішньом'язово). Як SERM були обрані тамоксифену цитрат (0,1 мг/кг) і тореміфен (0,1 мг/кг). Як референс-препарат було обрано метаболітотропний препарат капікор (6 мг/кг). Для аналізу експресії HSP 70 генів використовували метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу. Інтенсивність біосинтезу HSP 70 білків у кардіоміоцитах досліджували імуоферментним методом. Кардіопротективні ефекти досліджуваних препаратів оцінювали за їхньою здатністю впливати на енергетичний метаболізм та оксидативний стрес.

За оцінки стану антиоксидантної системи кардіоміоцитів щурів з гострим інфарктом міокарда було встановлено суттєве збільшення вмісту нітротирозину, більш ніж 89 %, щодо інтактної групи тварин. Встановлені патобіохімічні зміни відбувалися на тлі розвитку енергодефіциту кардіоміоцитів, про що свідчило статистично вірогідне падіння показників ЕЗ, ЕП, ТКД відповідно на 45, 62 і 80 %. Важливо зазначити, що в разі дослідження характеру експресії/синтезу HSP 70 білків у кардіоміоцитах було зафіксовано різноспрямований характер експресії та синтезу цього білка. Так, на 4 добу ІМ у щурів контрольної групи було зареєстровано суттєве, більш ніж на 90 %, підвищення експресії mRNA HSP 70. Однак концентрація HSP 70 білка в кардіоміоцитах знижувалася більш ніж на 74 %.

Разом з цим, курсове призначення тамоксифену, тореміфену та капікору тваринам з гострим ІМ приводило до модулюючого ефекту щодо характеру експресії та синтезу HSP 70 білка. Аналіз даних щодо експресивної активності mRNA HSP70 показав, що SERM та референс-препарат капікор здатні за умов гіпоксії модулювати експресію HSP 70. Крім того, курсове застосування SERM приводило до обмеження розвитку оксидативного стресу та покращання енергообміну кардіоміоцитів. Встановлений спектр фармакологічних ефектів SERM обумовлює перспективність та актуальність подальших досліджень у цьому напрямі.

Ключові слова: гострий інфаркт міокарда, селективні модулятори естрогенових рецепторів, експресія та синтез HSP 70 білків, кардіопротекція

С. В. Павлов, Е. В. Левченко, А. Н. Камышный
Влияние селективных модуляторов эстрогеновых рецепторов на экспрессию и синтез HSP 70 белков в кардиомиоцитах крыс с острым инфарктом миокарда

В последние годы проведено значительное количество экспериментальных и клинических исследований, посвященных изучению феномена метаболической терапии острого периода инфаркта миокарда (ИМ). Однако молекулярные и биохимические процессы метаболической адаптации к ишемии остаются не до конца исследованными. В настоящее время активно проводится поиск цитопротекторов среди соединений и факторов, способных индуцировать синтез белков HSP 70. В этом аспекте особого внимания заслуживают эстрогены, которые потенцируют вход HSP 70 белков в клетку, что обусловлено механизмом их биологического действия.

Цель исследования – установить способность SERM влиять на экспрессию/синтез HSP 70 белков и оценить их цитопротективное действие в условиях острого ИМ.

Экспериментальная часть работы была выполнена на 120 половозрелых крысах-самцах массой 190–230 г. Острый ИМ моделировали путем введения в течение 3 суток коронароспазмизирующего агента – питуитрина (1 ед/кг подкожно) и $\beta_{1,2,3}$ адреномиметика изопреналина (200 мг/кг внутримышечно). В качестве SERM были выбраны тамоксифен цитрат (0,1 мг/кг) и торемифен (0,1 мг/кг). В качестве референс-препарата был выбран метаболитотропный препарат капикор (6 мг/кг). Для анализа экспрессии HSP 70 генов использовали метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени. Интенсивность биосинтеза HSP 70 белков в кардиомиоцитах исследовали иммуноферментным методом. Кардиопротективные эффекты исследуемых препаратов оценивали по их способности влиять на энергетический метаболизм и явления оксидативного стресса.

При оценке состояния антиоксидантной системы кардиомиоцитов крыс с острым ИМ было установлено существенное увеличение содержания нитротирозина, более чем 89 %, по отношению к интактной группе животных. Установленные патобіохімічні зміни походили на фоні розвитку енергодефіциту кардіоміоцитів, о чім свідечувало статистично достовірне падіння показателів ЕЗ, ЕП, ТКД на 45, 62 і 80 % відповідно. Важно отметить, что при исследовании характера экспрессии/синтеза HSP 70 белков в кардиомиоцитах был зафиксирован разнонаправленный характер экспрессии и синтеза этого белка. Так, на 4 сутки ИМ у крыс контрольной группы было зарегистрировано существенное, более чем на 90 %, повышение экспрессии mRNA HSP 70. Однако концентрация HSP 70 белка в кардиомиоцитах снижалась более чем на 74 %.

Вместе с тем, курсовое назначение тамоксифена, торемифена и капикора животным с острым ИМ приводило к модулирующему эффекту в отношении характера экспрессии и синтеза HSP 70 белка. Анализ данных по экспрессивной активности mRNA HSP 70 показал, что SERM и референс-препарат капикор способны в условиях гипоксии модулировать экспрессию HSP 70. Кроме того, курсовое применение SERM приводило к ограничению развития оксидативного стресса и улучшению энергообмена кардиомиоцитов. Установленный спектр фармакологических эффектов SERM обуславливает перспективность и актуальность дальнейших исследований в этом направлении.

Ключевые слова: острый инфаркт миокарда, селективные модуляторы эстрогеновых рецепторов, экспрессия и синтез HSP 70 белков, кардиопротекция

S. V. Pavlov, K. V. Levchenko, O. M. Kamyshniy

Influence of the selective estrogen receptor modulators on the expression and synthesis of HSP 70 proteins in cardiomyocytes of rats with acute myocardial infarction

A considerable number of experimental and clinical studies devoted to the study of the metabolic therapy in the acute period of myocardial infarction (MI) have been conducted in recent years. However, the molecular and biochemical processes of metabolic adaptation to ischemia still remain underexplored. Currently, cytoprotectors are being searched actively among compounds and factors that can induce the HSP 70 synthesis. In this aspect special attention deserves estrogen which potentiates the HSP 70 proteins entry into the cell based on the mechanism of their biological effect.

The aim of the study was to determine the SERM ability to influence the expression/synthesis of HSP 70 proteins and evaluate their cytoprotective action in acute MI.

The experimental part of the work was performed on 120 sexually mature male rats 190–230 g of weight. Small-focal acute myocardial infarction was modeled by the 3 days introduction of coronary spasm agent – pituitrin (1 unit/kg subcutaneously) and $\beta_{1,2,3}$ adrenomimetic isoprenaline (200 mg/kg intramuscularly). Tamoxifen citrate (0,1 mg/kg) and toremifen (0,1 mg/kg) were used as SERMs. Capicor metabolite tropic agent (6 mg/kg) was selected as reference drug. To analyze the expression of HSP 70 genes, a reverse transcriptase polymerase chain reaction method was used in real time mode. The intensity of the biosynthesis of HSP 70 proteins in cardiomyocytes was investigated by the use of the immunoassay method. The cardioprotective effects of the investigational drugs were evaluated by their ability to influence the energy metabolism and the oxidative stress.

In assessing the state of the cardiomyocytes antioxidant system in rats with acute MI we have found a significant increase in the content of nitrotyrosin, more than 89 % in relation to the intact group of animals. The identified pathobiochemical changes took place against the background of the cardiomyocytes energy deficit, as evidenced by a statistically significant drop in EH, EP, TKD – respectively by 45, 62 and 80 %. It is important to note that when investigating the nature of the expression/synthesis of HSP 70 proteins in cardiomyocytes, we have fixed a multi-directional pattern of expression and synthesis of this protein. Thus, on the 4th day of MI, a significant increase in the expression of mRNA HSP 70, by more than 90 %, was recorded in the control group of rats. However the concentration of HSP 70 protein in cardiomyocytes decreased by more than 74 %.

Administration of Tamoxifen, Toremifen and Capicor to animals with a acute MI led to a modulating effect on the nature of the expression and synthesis of HSP 70 protein. The data analysis of the mRNA HSP 70 expressive activity has demonstrated that the SERM and the Capicor reference drug are able to modulate the expression of HSP 70 under hypoxia. In addition, a course administration of SERM led to limitation of the oxidative stress amplification and improving energy exchange in cardiomyocytes. The established spectrum of pharmacological effects of SERM determines the viability and relevance of further research in this direction.

Key words: acute myocardial infarction, selective estrogen receptor modulators (SERM), expression and synthesis of HSP 70 proteins; cardioprotection

Надійшла: 18 жовтня 2017 р.

Контактна особа: Павлов Сергій Васильович, доктор біологічних наук, доцент, кафедра клінічної лабораторної діагностики, Запорізький державний медичний університет, буд. 26, просп. Маяковського, м. Запоріжжя, 69035. Тел.: + 38 0 97 797 08 84.
Електронна пошта: svpavlov1980@gmail.com