

Ю. В. Била, И. Ф. Беленичев, А. М. Камышний

Особенности нарушения экспрессии матричной РНК Hif-1 α и Hif-3 α в условиях острого нарушения мозгового кровообращения и на фоне применения модуляторов HSP₇₀

Запорожский государственный медицинский университет

Ключевые слова: эндогенная нейропротекция, мРНК Hif-1 α , мРНК Hif-3 α , тамоксифен, мелатонин, глутамин, HSF-1, ПЦР-ОТ

Несмотря на значительные успехи современной неврологии, проблема цереброваскулярных заболеваний с достаточно высоким уровнем летальности остается особо актуальной.

Научные работы последних десятилетий дают достаточно полное представление о механизмах нейродеструкции в условиях тотальной гипоксии [1, 2]. Однако основополагающим этапом в решении проблемы мозговых инсультов является раскрытие механизмов эндогенной нейропротекции с последующим применением полученных данных в целях рациональной фармакокоррекции.

Известно, что особая роль в адекватном ответе клеток на острую гипоксию и в механизмах эндогенной нейропротекции принадлежит транскрипционным факторам HIF-1 [3]. Белковый гетеродимер HIF-1 состоит из двух субъединиц: Hif- α , которая в условиях нормоксии подвергается деградации, и Hif- β , которая является конститутивной и кислороднезависимой субъединицей. В условиях гипоксии происходит стабилизация Hif-1 α , ее димеризация с Hif-1 β и связывание с гипоксия-чувствительными элементами (HREs) в промоторе генов-мишеней [3, 4].

Согласно литературным данным, Hif- α имеет несколько подтипов, оказывающих разнонаправленное действие на транскрипционный ответ. Так, Hif-1 α и Hif-2 α обеспечивают адаптацию клеток к гипоксии путем повышения экспрессии генов, ответственных за процессы

адаптации к гипоксии. При этом Hif-3 α является ингибитором активности Hif-1/2 α . Однако некоторые авторы говорят о том, что Hif-3 α функционирует как активатор транскрипции и играет незаменимую роль в регуляции экспрессии генов в ответ на гипоксию [3–6].

Важным компонентом системы эндогенной нейропротекции является семейство белков теплового шока HSP₇₀, которые, в первую очередь, выполняют функцию внутриклеточных шаперонов и обеспечивают процессы фолдинга, холдинга и транспорта вновь синтезированных белков, а также их деградацию как в условиях нормоксии, так и при стрессиндуцированной денатурации. Кроме того, установлено прямое цитопротекторное и антиапоптотическое действие HSP₇₀, его влияние на «жизнь» и действие HIF [7]. Поэтому особый интерес в качестве нейропротекторных препаратов представляют модуляторы экспрессии HSP₇₀. На данный момент имеется небольшое количество информации относительно данной группы средств. Рядом зарубежных и отечественных работ высказывается гипотеза о нейропротективном действии селективных эстроген-рецепторных модуляторов (SERM), в частности, тамоксифена, которое опосредовано индукцией факторов эндогенной нейропротекции – HSP и HIF-белков [1, 8].

Также обращает на себя внимание мелатонин – эндогенный гормон-антиоксидант, который в условиях оксидативного стресса выступает в роли сквенджера свободных радикалов [9]. Ранее было отмечено, что на фоне применения мелатонина происходит повышение концентрации HSP₇₀ [10, 11], при этом вопрос об окончательных

механизмах этой регуляции/взаимосвязи остается открытым.

Как известно, глутамин является важной аминокислотой, регулирующей внутриклеточный гомеостаз и защищающей клетки от повреждения. Выдвигается предположение, что в основе цитопротективного действия глутамина лежит его способность усиливать экспрессию белков-шаперонов HSP₇₀ через активацию фосфорилирования транскрипционного фактора HSF (фактор теплового шока) [12, 13].

Поскольку основным индуктором транскрипции белков-шаперонов является фактор теплового шока HSF, нами предложено изучение фармакологических свойств первой изоформы данного белка в качестве потенциального нейрорепротективного агента [14].

Нашими работами показана тесная взаимосвязь между уровнем HSP₇₀ и активностью субъединицы Hif-1 α в условиях ишемического повреждения мозга [15, 16], однако механизмы регуляции/модуляции этой сопряженной системы являются малоизученными.

Цель исследования – определение уровня экспрессии генов Hif-1 α и Hif-3 α *in vivo* в условиях применения препаратов, обладающих свойствами модуляторов уровня HSP₇₀: тамоксифена, мелатонина, HSF-1 и глутамина в условиях острого нарушения мозгового кровотока (ОНМК) по типу ишемического инсульта.

Материалы и методы. Экспериментальная часть выполнена на 148 крысах линии Вистар, которых содержали в условиях вивария при природном освещении и стандартном рационе питания. Экспериментальные исследования проводились в соответствии с основными положениями Конвенции Совета Европы об охране позвоночных животных, которые используются в экспериментах и в других научных целях (Страсбург, 1986 г.) и др. [17, 18].

ОНМК моделировали путем двухсторонней необратимой окклюзии общих сонных артерий под тиопентал натриевым наркозом (40 мг/кг) [19]. Животные случайно были разделены на VII групп: I – ложнооперированные крысы (ЛО, n = 10), II – животные с ОНМК

(n = 10), III – ОНМК + тамоксифен (ООО «Фармацевтическая компания «Здоровье»», Украина) (1 мг/кг) [20], (n = 10), IV – ОНМК + мелатонин (АО «Киевский витаминный завод», Украина) (5 мг/кг) [21], (n = 10), V – ОНМК + фактор теплового шока (HSF-1) (200 мкл/кг), (n = 10), VI – ОНМК + глутамин (Sigma, США) (25 мг/кг) [22], (n = 10), VII – ОНМК + пираретам (ПАО «Борщаговский химико-фармацевтический завод», Украина) 500 мг/кг [23], (n = 10).

На 4 сутки животных выводили из эксперимента под тиопенталовым наркозом (40 мг/кг). Использовали участки головного мозга, находящиеся в области сенсомоторной зоны коры, которые гомогенизировали при помощи гомогенизатора Silent Crusher S (Heidolph) в сахарозном буфере (250 ммоль/л, ЭДТА 1 ммоль/л, рН 7,4) t = + 40 °С. Последующим дифференциальным центрифугированием при 13 000 об/мин, t = + 40 °С выделяли цитозольную фракцию [19].

Для анализа экспрессии генов использовали метод полимеразной цепной реакции с обратимой транскрипцией в режиме реального времени (ПЦР – ОТ).

Выделение тотальной РНК из ткани крыс проводили с использованием набора «Trizol RNA Prep 100» («ИЗО-ГЕН», Россия), который содержит следующие реактивы: Trizol reagent и ExtraGene E.

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 реакционная смесь для амплификации содержала краситель SYBR Green, ДНК – полимеразу SynTaq с ингибирующими активностью фермента антителами, по 0,2 мкл прямого и обратимого специфических праймеров, dNTP- дезоксинуклеозидтрифосфаты, 1 мкл матрицы (кДНК). Специфические пары праймеров (5'-3') для анализа исследуемых и референсного генов были подобраны с помощью программного обеспечения PrimerBlast (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) и изготовлены фирмой ThermoScientific,

США (табл.1). Амплификация происходит по таким этапам: иницированная денатурация 95 °С – 10 мин.; затем 50 циклов: денатурация – 95 °С, 15 с, отжиг праймеров – 58–63 °С, 30 с, элонгация – 72 °С, 30 с. Регистрация интенсивности флуоресценции происходила автоматически в конце стадии элонгации каждого цикла по каналу SybrGreen.

В качестве референс-гена для определения относительного значения изменения уровня экспрессии исследуемых генов был использован ген actin, beta (Actb). Для выражения относительного уровня экспрессии генов использовали сравнительный Ct метод ($\Delta\Delta Ct$ метод). Статистический анализ данных ПЦР – ОТ проводили с помощью программного обеспечения CFX Manager™ (BioRad, США). Все реакции амплификации проводили на индивидуальных образцах в трех повторах. Результаты ПЦР-анализа Hif-1 α , Hif-3 α в реальном времени были выражены как относительная нормализованная экспрессия указанных мРНК.

Результаты обработаны с применением статистического пакета лицензионной программы «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoftInc.), «Microsoft Excel 2010». Достоверность различий (p) экспериментальных данных рассчитывали с использованием t-критерия Стьюдента. Различия считали значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение. В результате проведенного исследования были получены следующие результаты (табл. 2).

Анализ результатов ЛО группы и ОНМК группы показывает выраженное

уменьшение экспрессии мРНК Hif-1 α во второй группе. Такое снижение Hif-1 α является индикатором угнетения механизмов эндогенной нейропротекции, так как Hif-1 α регулирует компенсаторные шунты энергии (малат-аспартатный), усиливает экспрессию эритропоэтина, влияет на функциональное состояние циклоспорин А-зависимой поры митохондрии.

Применение тамоксифена в течение 4 суток на фоне ОНМК приводило к повышению экспрессии мРНК Hif-1 α в цитозольной фракции на 339,6 % (в 4,4 раза) относительно ЛО и на 1055,3 % (в 11,6 раза) относительно контроля. Тамоксифен является селективным эстроген-рецепторным модулятором и реализует свое действие через эстрогеновые рецепторы ЭР- α и ЭР- β . В результате взаимодействия препарата с рецепторами происходит высвобождение рецепторно-связанного белка теплового шока HSP₇₀ [20]. По всей видимости, в условиях острой церебральной ишемии тамоксифен непосредственно влияет на экспрессию основных транскрипционных факторов и усиливает транскрипцию генов Hif-1 α , что является одним из механизмов его нейропротективного действия.

Введение фактора теплового шока HSF 1 экспериментальным животным приводило к достоверному повышению экспрессии мРНК Hif-1 α относительно группы контроля на 723,3 % (в 8,2 раза) и ЛО на 205,2% (в 3,1 раза). Однако по силе действия HSF 1 уступал тамоксифену. Такое действие можно объяснить тем, что HSF 1 является транскрипционным фактором экспрессии генов HSP₇₀, в результате белки

Таблица 1

Специфические праймеры, использованные в ПЦР-анализе в режиме реального времени

| Ген | Нуклеотидная последовательность праймера | Тпл, °С | Длина продукта ПЦР, п. н. | Экзон-эксонный стык |
|--------------------|---|----------------|---------------------------|---------------------|
| HIF-1 α | F=GGCGAGAACGAGAAGAAAAATAGG R = TCGACGTTCCGGAACATCC | 59,97 59,83 | 42 | 58/59 |
| HIF-3 α | F = CACGCTTTGGACTCTGATGC R = GCTCAGCAAAGTGTGGATGC | 59,55 60,11 | 51 | 874/875 |
| actin, beta (Actb) | F = ACAACSTTCTTGCAGCTCCTC R= TCGTCATCCATGGCGAACTGG | 60,54 60,76 | 64 | 72/73 |

Показатели экспрессии мРНК Hif-1 α в цитозольной фракции головного мозга крыс с острым нарушением мозгового кровообращения (ОНМК)

| Группа | Относительно ЛО | Относительно контроля |
|-------------------------|--------------------|-----------------------|
| Ложнооперированные (ЛО) | 1,0 \pm 0,247 | – |
| Контроль (ОНМК) | – | 1,0 \pm 0,475 |
| ОНМК + Тамоксифен | 4,396 \pm 0,641* | 11,553 \pm 2,259** |
| ОНМК + HSF 1 | 3,052 \pm 0,595* | 8,233 \pm 0,468** |
| ОНМК + Мелатонин | 0,841 \pm 0,144 | 1,355 \pm 0,145 |
| ОНМК + Глутамин | 3,360 \pm 1,053* | 7,029 \pm 1,957** |
| ОНМК + Пирацетам | 1,154 \pm 0,213 | 1,764 \pm 0,269 |

Примечание. Здесь и в табл. 3: * $p < 0,05$ относительно ЛО, ** $p < 0,05$ относительно контроля.

шапероны стабилизируют белок HIF-1 α в условиях гипоксии, и, по всей видимости, прямого влияния на экспрессию мРНК Hif-1 α фактор теплового шока не оказывает.

На фоне введения мелатонина наблюдалось недостоверное изменение экспрессии мРНК Hif-1 α .

Курсовое применение глутамина приводило к повышению экспрессии мРНК Hif-1 α на 235,8 % (в 3,4 раза) по отношению к ЛО и на 602,9 % (в 7,03 раза) по отношению к контролю. По нашему мнению, такое действие препарата связано с тем, что глутамин является предшественником основного неферментативного компонента антиоксидантной системы глутатиона восстановленного. Повышение уровня последнего приводит к уменьшению оксидативного стресса, увеличению активности супероксиддисмутазы и каталазы [12, 13]. Повышение экспрессии мРНК Hif-1 α обуславливает увеличение уровня белка Hif-1 α , который в условиях гипоксии стабилизируется и

активирует транскрипцию основных адаптационных факторов VEGF, EPO, HSPs.

Дальнейшая обработка данных относительно влияния препаратов на мРНК Hif-3 α показала следующее (табл. 3).

На 4 сутки ОНМК в группе контроля наблюдали выраженное снижение экспрессии мРНК Hif-3 α , что, по всей видимости, подтверждает развитие стойких нейродеструктивных нарушений.

Введение тамоксифена, HSF-1, глутамина практически не влияло или же снижало уровень экспрессии мРНК Hif-3 α , но данные были статистически не значимы ($p > 0,05$). Однако назначение мелатонина приводило к достоверному повышению мРНК Hif-3 α в ЛО группе на 213,7 % (в 3,1 раза), а в группе контроля на 263,6 % (в 3,6 раза). Таким образом, мелатонин реализует свое нейропротективное действие через активацию HIF-звена эндогенной нейропротекции опосредовано через стимуляцию экспрессии мРНК Hif-3 α .

Таблица 3

Показатели экспрессии мРНК Hif-3 α в цитозольной фракции головного мозга крыс с острым нарушением мозгового кровообращения (ОНМК)

| Группа | Относительно ЛО | Относительно контроля |
|-------------------------|--------------------|-----------------------|
| Ложнооперированные (ЛО) | 1,0 \pm 0,223 | – |
| Контроль (ОНМК) | – | 1,0 \pm 0,306 |
| ОНМК + Тамоксифен | 0,680 \pm 0,106 | 0,625 \pm 0,105 |
| ОНМК + HSF 1 | 1,224 \pm 0,624 | 1,076 \pm 0,537 |
| ОНМК + Мелатонин | 3,137 \pm 0,519* | 3,636 \pm 0,699** |
| ОНМК + Глутамин | 0,985 \pm 0,466 | 0,884 \pm 0,416 |
| ОНМК + Пирацетам | 0,615 \pm 0,812 | 0,965 \pm 0,361 |

Выводы

1. Моделирование ОНМК у экспериментальных животных приводит к понижению экспрессии мРНК Hif-1 α , что свидетельствует о срыве механизмов эндогенной нейропротекции.
 2. Введение модуляторов HSP₇₀ – тамоксифена, HSF-1 и глутамина повышало экспрессию мРНК Hif-1 α на 1055,3 % (в 11,6 раза), 723,3 % (в 8,2 раза) и 602,9% (в 7,03 раза) соответственно относительно контроля. Таким образом, данные препараты оказывают нейропротективное действие через повышение экспрессии мРНК Hif-1 α , что приводит к повышению уровня HIF-1 белка.
 3. Моделирование ОНМК у экспериментальных животных приводит к снижению экспрессии мРНК Hif-3 α , что приводит к срыву механизмов эндогенной нейропротекции.
 4. Впервые нами установлено положительное влияние мелатонина на экспрессию мРНК Hif-3 α изоформы белка HIF-1, что является особенностью влияния мелатонина на процессы эндогенной нейропротекции в условиях ОНМК.
 5. Референс-препарат пираретам не влиял на Hif-зависимые механизмы нейропротекции.
1. Нейропротекция и нейропластичность / И. Ф. Беленичев, В. И. Черний, С. В. Павлов [и др.]. – Киев : Логос, 2015. – 509 с.
 2. Гусев Е. И. Ишемия головного мозга / Е. И. Гусев, В. И. Скворцова. – Москва : Медицина, 2001. – 327 с.
 3. Ziello J. E. Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 Regulatory Pathway and its Potential for Therapeutic Intervention in Malignancy and Ischemia / J. E. Ziello, I. S. Jovin, Y. Huang // The Yale Journal of Biology and Medicine. – 2007. – V. 80 (2). – P. 51–60.
 4. Semenza G. L. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology / G. L. Semenza // Trends Mol. Med. – 2001. – V. 7. – P. 345–350.
 5. HIF isoforms in the skin differentially regulate systemic arterial pressure / Andrew S. Cowburn, Norihiko Takeda, Adam T. Boutin [et al.] // Proc. Natl Acad. Sci. USA. – 2013. – V. 110. – P. 17570–17575.
 6. Wang G. L. Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia / G. L. Wang, G. L. Semenza // J. Biol. Chem. – 1993. – V. 268. – P. 21513–21518.
 7. Mayer M. P. Hsp₇₀ chaperones: Cellular functions and molecular mechanism / M. P. Mayer, B. Bukau // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2005. – V. 62 (6). – P. 670–684. DOI:10.1007/s00018-004-4464-6.
 8. Estrogen and aging affect the subcellular distribution of estrogen receptor-alpha in the hippocampus of female rats / M. Adams, S. E. Fink, R. A. Shah [et al.] // Journal of Neuroscience. – 2002. – V. 22. – P. 3608–3614.
 9. Арушанян Э. Б. Универсальные терапевтические возможности мелатонина / Э. Б. Арушанян // Клиническая медицина. – 2013. – Т. 91, № 2. – С. 4–8.
 10. Neuroprotective Effect of Melatonin: A Novel Therapy against Perinatal Hypoxia-Ischemia / D. Alonso-Alconada, A. Álvarez, O. Arteaga [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2013. – V. 14 (5). – P. 9379–9395. DOI:10.3390/ijms14059379
 11. Veysel H. O. Melatonin provides neuroprotection by reducing oxidative stress and HSP₇₀ expression during chronic cerebral hypoperfusion in ovariectomized rats / H. O. Veysel, B. Figen, H. S. Ozacmak // Journal of Pineal Reseach. – 2009. – V. 47 (2). – P. 156–163.
 12. Glutamine's protection against cellular injury is dependent on heat shock factor-1 / A. L. Morrison, M. Dinges, K. D. Singleton [et al.] // American Journal of Physiology-Cell Physiology. – 2006. – V. 290 (6). – P. 1625–1632.
 13. The effect of glutamine on cerebral ischaemic injury after cardiac arrest / K. S. Kim, G. J. Suh, W. Y. Kwon [et al.] // Resuscitation. – 2013. – V. 84, Issue 9. – P. 1285–1290. <https://doi.org/10.1016/j.resuscitation.2013.03.019>
 14. Никитин К. Д. Белки теплового шока: биологические функции и перспективы применения / К. Д. Никитин // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2008. – Т. 1, № 2. – С. 125–130.
 15. Беленичев И. Ф. Роль белков теплового шока в реализации молекулярно-биохимических механизмов нейропротекции / И. Ф. Беленичев // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2013. – № 6 (36). – С. 72–80.
 16. Горбачева С. В. Механизмы эндогенной нейропротекции при использовании модуляторов тиол-дисульфидной системы в условиях экспериментального нарушения мозгового кровообращения / С. В. Горбачева, И. Ф. Беленичев, Л. И. Кучеренко // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2016. – № 1. – С. 24–30.
 17. Етика лікаря та права людини: положення про використання тварин у біомедичних дослідках // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2003. – № 2 (22). – С. 108–109.

18. Закон України. Про захист тварин від жорстокого поводження [Електронний ресурс] // Відомості Верховної Ради України (ВВР). – 2006. – Режим доступу: <http://zakon1.rada.gov.ua/laws/show/3447-15>.
19. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных лекарственных средств первичной и вторичной нейропротекции / И. С. Чекман, И. Ф. Беленичев, Е. А. Нагорная [и др.] // Методические рекомендации. – Киев : ООО Издательство «Юстон», 2016. – 82 с.
20. Павлов С. В. Молекулярно-биохимические аспекты нейропротективного действия селективного модулятора эстрогеновых рецепторов – тамоксифена в условиях моделирования острой церебральной ишемии / С. В. Павлов, И. Ф. Беленичев // Нейрохимия. – 2014. – Т. 31, № 1. – С. 36–41. DOI: 10.7868/S1027813313040079
21. Melatonin-induced neuroprotection after close head injury is associated with increased brain anti-oxidants and attenuated late-phase activation of NF-kappaB and AP-1 / S. M. Beni, R. Kohen, R. J. Reiter [et al.] // FASEB J. – 2004. – V. 18. – P. 144–151.
22. Glutamine prevents oxidative stress in a model of mesenteric ischemia and reperfusion / G. P. Zabol, G. F. Carvalho, N. P. Marroni [et al.] // World Journal of Gastroenterology. – 2014. – V. 20 (32). – P. 11406–11414.
23. Piracetam improves mitochondrial dysfunction following oxidative stress / U. Keil, I. Scherping, S. Hauptmann [et al.] // British Journal of Pharmacology. – 2006. – V. 147. – P. 199–208. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706459

Ю. В. Біла, І. Ф. Беленичев, А. М. Камышний

Особенности нарушения экспрессии матричной РНК Hif-1 α и Hif-3 α в условиях острого нарушения мозгового кровообращения и на фоне применения модуляторов HSP₇₀

Важным компонентом системы эндогенной нейропротекции является семейство белков теплового шока HSP₇₀, которые, в первую очередь, выполняют функцию внутриклеточных шаперонов и обеспечивают процессы фолдинга, холдинга и транспорта синтезированных белков, а также их деградацию как в условиях нормоксии, так и при стресс-индуцированной денатурации. Кроме того, установлено прямое цитопротекторное и антиапоптотическое действие HSP₇₀, его влияние на «жизнь» и действие HIF белков.

Цель исследования – определение уровня экспрессии генов Hif-1 α и Hif-3 α *in vivo* в условиях применения препаратов, обладающих свойствами модуляторов уровня HSP₇₀: тамоксифена, мелатонина, HSF-1 и глутамина в условиях острого нарушения мозгового кровотока (ОНМК) по типу ишемического инсульта.

Исследование проводили на белых крысах линии Вистар. ОНМК моделировали путем двухсторонней необратимой окклюзии общих сонных артерий под тиопентал натриевым наркозом (40 мг/кг). В течение 4 суток животным вводили тамоксифен (1 мг/кг), мелатонин (5 мг/кг), фактор теплового шока (HSF-1) (200 мкл/кг), глутамин (25 мг/кг), референс-препарат пирacetам (500 мг/кг). Для определения уровня экспрессии мРНК Hif-1 α и Hif-3 α использовали метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ПЦР-ОТ).

В ходе исследования установлено, что в результате ОНМК происходит резкое снижение уровня экспрессии мРНК Hif-1 α и Hif-3 α , что свидетельствует о срыве механизмов эндогенной нейропротекции. Введение препаратов-модуляторов HSP₇₀ оказывало разнонаправленное действие на экспрессию генов. Так, тамоксифен, HSF-1 и глутамин повышали экспрессию мРНК Hif-1 α , при этом мелатонин не оказывал достоверного влияния. Впервые нами установлено положительное влияние мелатонина на экспрессию мРНК Hif-3 α изоформы белка HIF-1, что является особенностью влияния мелатонина на процессы эндогенной нейропротекции в условиях ОНМК.

Ключевые слова: эндогенная нейропротекция, мРНК Hif-1 α , мРНК Hif-3 α , тамоксифен, мелатонин, глутамин, HSF-1, ПЦР-ОТ

Ю. В. Біла, І. Ф. Беленічев, О. М. Камішний

Особливості порушення експресії матричної РНК Hif-1 α і Hif-3 α за умов гострого порушення мозгового кровообігу та на фоні застосування модуляторів HSP₇₀

Важливим компонентом системи ендогенної нейропротекції є сімейство білків теплового шоку HSP₇₀, які, у першу чергу, виконують функцію внутрішньоклітинних шаперонів і забезпечують процеси фолдингу, холдингу й транспорту синтезованих білків, а також їхню деградацію за умов нормоксії, так і за стрес-індукованої денатурації. Крім того, встановлено пряму захисну й антиапоптотичну дію HSP₇₀, його вплив на «життя» і дію HIF білків.

Мета дослідження – визначення рівня експресії генів Hif-1 α і Hif-3 α *in vivo* за умов застосування препаратів з властивостями модуляторів рівня HSP₇₀: тамоксифену, мелатоніну, HSF-1 та глутаміну в разі гострого порушення мозгового кровотоку (ГПМК) за типом ішемічного інсульту.

Дослідження проводили на білих щурах лінії Вистар. ГПМК моделювали шляхом двобічної незворотної оклюзії загальних сонних артерій під тиопентал натрієвим наркозом (40 мг/кг). Протягом 4 днів

тваринам вводили тамоксифен (1 мг/кг), мелатонін (5 мг/кг), фактор теплового шоку (HSF-1) (200 мкл/кг), глутамін (25 мг/кг), референс-препарат пірацетам (500 мг/кг). Для визначення рівня експресії мРНК Hif-1 α і Hif-3 α використовували метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ПЛР-ЗТ).

У ході дослідження встановлено, що в результаті ГПМК відбувається різке зниження рівня експресії мРНК Hif-1 α і Hif-3 α , що свідчить про зрив механізмів ендогенної нейропротекції. Уведення препаратів-модуляторів HSP₇₀ має різноспрямовану дію на експресію генів. Так, тамоксифен, HSF-1 і глутамін підвищують експресію мРНК Hif-1 α , а мелатонін не виявляє достовірного впливу. Вперше нами встановлено позитивний вплив мелатоніну на експресію мРНК Hif-3 α ізоформи білка HIF-1, що є особливістю впливу мелатоніну на процеси ендогенної нейропротекції за умов ГПМК.

Ключові слова: ендогенна нейропротекція, мРНК Hif-1 α , мРНК Hif-3 α , тамоксифен, мелатонін, глутамін, HSF-1, ПЛР-ЗТ

Yu. V. Bila, I. F. Belenichev, O. M. Kamyshnyi

Peculiarities of the Hif-1 α and Hif-3 α expression violation in acute cerebral circulatory disorders and administration of HSP₇₀ modulators

An important component of the endogenous neuroprotection system is heat shock proteins HSP₇₀, which primarily function as intracellular chaperones and provide the processes of folding, holding and transporting of synthesized proteins, as well as their degradation both under normoxia and under stress-induced denaturation. In addition, the direct cytoprotective and anti-apoptotic effects of HSP₇₀, its effect on «life» and the effect of HIF proteins have been established.

The aim of the study was to determine the level of expression of Hif-1 α and Hif-3 α genes *in vivo* using HSP₇₀ modulators: tamoxifen, melatonin, HSF-1 and glutamine in acute cerebral circulation disorder of ischemic stroke type.

The study was carried out on white Wistar rats. Acute cerebral circulation disorder was modeled by bilateral irreversible occlusion of common carotid arteries under thiopental sodium narcosis (40 mg/kg). During 4 days, animals were administered tamoxifen (1 mg/kg), melatonin (5 mg/kg), heat shock factor (HSF-1) (200 μ l/kg), glutamine (25 mg/kg) and piracetam (500 mg/kg) as drug-reference. To determine the level of mRNA expression of Hif-1 α and Hif-3 α , a real-time reverse transcription polymerase chain reaction (PCR-RT) was used.

It was found that as a result of the acute cerebral circulation disorder, the levels of Hif-1 α and Hif-3 α mRNA expression sharply decreased, which indicates the failure of the mechanisms of endogenous neuroprotection. Administration of HSP₇₀ modulators had a multidirectional effect on the genes expression. Tamoxifen, HSF-1 and glutamine increased the expression of Hif-1 α mRNA, and melatonin had no significant effect. It was firstly established the positive effect of melatonin on the expression of mRNA Hif-3 α , the isoform of the HIF-1 protein, which is a feature of the effect of melatonin on the processes of endogenous neuroprotection in conditions of acute cerebral circulation disorder.

Key words: endogenous neuroprotection, mRNA Hif-1 α , mRNA Hif-3 α , tamoxifen, melatonin, glutamine, HSF-1, PCR-RT

Надійшла: 11 квітня 2018 р.

Контактна особа: Бєленічев Ігор Федорович, професор, кафедра фармакології та медичної рецептури, Запорізький державний медичний університет, буд. 26, просп. Маяковського, м. Запоріжжя, 69035. Тел.: + 38 0 61 224 64 69.