

ВЛИЯНИЕ АФОБАЗОЛА НА СОДЕРЖАНИЕ СТРЕСС-БЕЛКА HSP70 В ТКАНИ МОЗГА КРЫС ПРИ ГЛОБАЛЬНОЙ ПРЕХОДЯЩЕЙ ИШЕМИИ

Т. А. Антипова, И. О. Логвинов, И. Н. Курдюмов, Н. Р. Мирзоян, Т. С. Ганьшина,
А. И. Турилова, Р. С. Мирзоян, С. Б. Середенин¹

В опытах на наркотизированных крысах показано, что глобальная проходящая ишемия мозга вызывает значительное снижение мозгового кровотока в коре большого мозга крыс и снижает уровень стресс-белка HSP70 в стриатуме. Афобазол восстанавливает нарушенное в условиях ишемии кровоснабжение мозга, а также увеличивает синтез стресс-белка HSP70.

Ключевые слова: афобазол, глобальная проходящая ишемия головного мозга, стресс-белок HSP70, Вестерн-блот анализ

ВВЕДЕНИЕ

В литературе широко обсуждается защитное действие стресс-белка HSP70 при ишемических поражениях мозга и сердца. Белки HSP (heat shock proteins) впервые были выявлены в клетках, подвергнутых острому тепловому воздействию. В дальнейших исследованиях было показано, что при различных видах стресса резко возрастает синтез индуцибельной формы HSP, которая в условиях нормы практически не обнаруживается. Повышенная экспрессия и нейропротекторное действие HSP70 обнаружены в условиях глутаматной нейротоксичности, при депривации кислорода и глюкозы и на различных моделях ишемии головного мозга [3, 10 – 13]. С другой стороны, при пониженном содержании HSP70 увеличиваются клеточные повреждения, вызванные локальной ишемией мозга как у нокаутных, так и у интактных мышей [12].

Выявлена способность HSP70 защищать синаптическую функцию ГАМК, глутамата и глицина в условиях термического стресса, а также увеличивать продолжительность медленного сна, которая опосредуется через стимуляцию ГАМК-ергической тормозной системы. Кроме того, предполагается, что взаимодействие HSP70 с липидной частью мембраны может играть существенную роль в фолдинге полипептидов мембраны и в процессах их транслокации через мембрану [9].

Ранее нами была установлена способность афобазола оказывать выраженное нейропротекторное действие в условиях локальной перманентной [1, 5, 6] и глобальной проходящей ишемии мозга, увеличивать кровоснабжение мозга, опосредуемое через ГАМК_A-рецепторы сосудов [7], а также повышать в условиях ишемии устойчивость мембранных структур нейронов коры и стриатума к свободнорадикальным процессам [8]. Кроме того, на культуре нейронов линии HT-22 на модели глутаматной токсичности и оксидативного

стресса обнаружен нейропротекторный эффект афобазола [2].

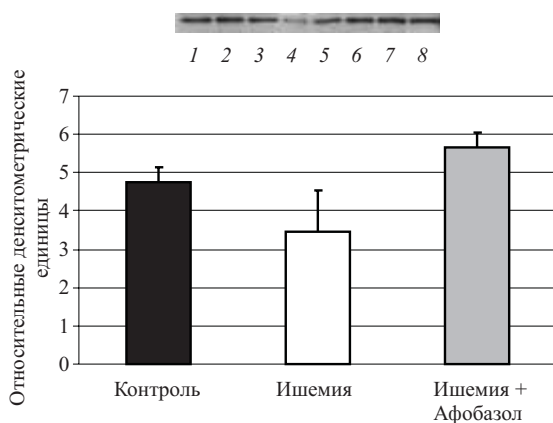
Целью исследования явилось изучение влияния афобазола на содержание стресс-белка HSP70 в коре и стриатуме крыс в условиях глобальной проходящей ишемии головного мозга.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании использовано 50 наркотизированных (хлоралгидрат, 400 мг/кг, внутривенно) и 10 бодрствующих беспородных крыс-самцов массой 260 – 300 г при естественном дыхании. Регистрацию локального кровотока проводили в теменной области головного мозга крыс с помощью лазерного доплеровского флоуметра ALF-21 (“Transonic System Inc.”, США). Для этой цели игольчатый датчик флоуметра диаметром 0,8 мм устанавливали на теменной области коры большого мозга с помощью микроманипулятора и коромысла. Для регистрации артериального давления и введения препарата в бедренные артерию и вену вставляли силиконовые катетеры. Регистрацию уровня артериального давления осуществляли электроманометром ВРР-01 (Электрометрия, Венгрия).

Содержание HSP70 в цитоплазматической фракции стриатума и коры мозга крыс определяли с помощью методики Вестерн-блот анализа. Ткань гомогенизировали (тефлон/стекло) в буфере (50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 % Triton X-100), pH 7,5 при температуре 4 °C в соотношении 1:6 ткань/буфер. Затем гомогенаты помещали в центрифужную пробирку объемом 1,5 мл и центрифугировали 10 мин при 13000 rpm и 4 °C. Супернатант, содержащий белки цитозоля, анализировали с использованием электрофореза и иммуноблоттинга. Белки разделяли в 10 % полиакриламидном геле (ПААГ). Перенос белков с ПААГ на мембрану PVDF осуществляли электроолюцией в течение 45 мин. Преинкубацию Вестерн-блотов проводили в растворе TBST (с добавлением 1 % Tween-20) с 5 % (вес/объем) обезжиренным молоком в течение 1 ч. Затем Вестерн-блоты инкубировали в присутствии первых моноклональных антител (Santa Cruz

¹ ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8.



Изменение содержания стресс-белка HSP70 после ишемического повреждения мозга и введения афобазола в стриатуме крыс (результаты Вестерн-блот анализа и денситометрии). Дорожки: 1, 2 — контроль, 3, 4, 5 — ишемия, 6, 7, 8 — ишемия + афобазол.

Biotechnology) против HSP70 в разведении 1:1000 в течение 1 ч. Затем после отмывки блоты инкубировали в присутствии вторых антител (Santa Cruz Biotechnology и Bio-Rad), конъюгированных с пероксидазой хрена (разведение 1: 2000) в течение 1 ч. Детектирование HSP70 осуществляли в реакции с ECL-реагентами на пленку фирмы Kodak с последующей денситометрией в программе Adobe Photoshop.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием статистической программы Microsoft Excel. Достоверность различий между контролем

и опытом проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Глобальную преходящую ишемию вызывали у крыс окклюзией обеих общих сонных артерий с одновременным снижением артериального давления до 40 мм рт. ст. методом кровопускания. Через 15 мин зажимы с обеих сонных артерий удаляли и кровь реинфузировали. Исходный локальный мозговой кровоток в среднем составлял $32,3 \pm 3,2$ усл. ед., среднее артериальное давление при этом составляло 90 мм рт. ст. На фоне окклюзии общих сонных артерий и геморагии (3 – 5 мл крови) кровоток снижался до $6,2 \pm 1,05$ усл. ед. После снятия зажимов и реинфузии крови в первые 5 – 10 мин кровоток повышался до $33,5 \pm 2,7$ усл. ед. В 7 опытах из 20 увеличение мозгового кровотока в среднем составило $49,7 \pm 6,5$ усл. ед по сравнению с доишемическим периодом ($p < 0,004$). Следовательно, после окончания ишемии наблюдается постишемическая гиперперфузия, которая не сопровождается повышением артериального давления выше исходного уровня. Спустя 30 – 40 мин после нарушения мозгового кровообращения кровоток понижался в среднем на $19,6 \pm 3,2$ усл. ед. (в среднем на 41 % от исходного уровня, табл. 1). Однонаправленных выраженных изменений уровня артериального давления в постишемическом периоде не наблюдалось, поэтому можно за-

Таблица 1. Изменения локального мозгового кровотока — ЛМК (в усл. ед. и в %) к контролю в коре большого мозга крыс в условиях глобальной преходящей ишемии

№ опыта	ЛМК, контроль	1 мин после ишемии	10 мин после ишемии	30 – 60 мин после ишемии	% изменений
1	26	6	25	10	– 60
2	73	16	73	60	– 18
3	22	10	14	10	– 55
4	30	15	20	14	– 53
5	20	11	16	16	– 20
6	34	2	16	16	– 53
7	33	9	32	22	– 33
8	28	14	36	27	– 4
9	22	7	27	21	– 5
10	28	2	26	9	– 68
11	60	6	76	56	– 7
12	38	4	66	14	– 63
13	27	3	26	14	– 48
14	17	2	12	9	– 47
15	25	2	14	14	– 44
16	25	2	44	10	– 60
17	22	3	6	6	– 73
18	25	3	43	19	– 24
19	49	4	56	30	– 31
20	43	3	43	15	– 65
<i>m</i> ± <i>M</i>	$32,3 \pm 3,2$	$6,2 \pm 1,05^*$	$33,5 \pm 2,7$	$19,6 \pm 3,2^*$	$- 41 \pm 5,01$

* $p < 0,001$ — по отношению к контролю.

ключить, что изменения мозгового кровотока связаны с непосредственным изменением тонуса сосудов мозга.

Далее было изучено влияние афобазола на кровоснабжение мозга крыс в условиях глобальной преходящей ишемии мозга. Оказалось, что препарат в дозе 5 мг/кг при внутривенном введении крысам, перенесшим глобальную ишемию, увеличивал локальный мозговой кровоток в среднем на $40 \pm 9,3\%$ ($n = 7$, табл. 2), т.е. до исходного уровня. Цереброваскулярный эффект препарата наблюдался в одних опытах через 10 мин после введения, в других — через 20 мин, иногда через 40 и 60 мин. Длительность эффекта — 60 и более мин.

Препарат оказывал неоднозначное влияние на уровень артериального давления: в одних опытах оно снижалось (3 опыта), в других — не изменялось (3 опыта), в одном — повышалось. Следовательно, эффект афобазола на сосуды мозга не опосредуется через влияние на артериальное давление; препарат действует непосредственно на тонус сосудов мозга, нарушенный вследствие ишемического воздействия.

Далее представляло интерес изучить изменения синтеза HSP70 в условиях глобальной преходящей ишемии и влияние афобазола на эти изменения.

При изучении изменений синтеза стресс-белка HSP70 в коре и стриатуме мозга крыс было проведено 3 серии опытов: 1 — контрольная группа, 2 — животные после глобальной преходящей ишемии и 3 — животные, получавшие афобазол в дозе 10 мг/кг внутривенно через 30 мин после реперфузии.

Проведенные исследования показали, что у контрольных животных исходный уровень содержания HSP70 составлял $4,75 \pm 0,39$ отн. д. ед. (относительные денсиметрические единицы). Через 24 ч после ишемического повреждения мозга уровень белка в стриатуме был статистически достоверно снижен на 26,9 % по сравнению с контролем и составил $3,47 \pm 1,06$ отн. д. ед. ($p < 0,05$). В серии опытов с использованием афобазола через 24 ч синтез белка достоверно увеличивался в среднем на 46 % по сравнению с ишемией и составил $5,66 \pm 0,38$ отн. д. ед. ($p < 0,05$), см. рисунок.

Ранее нами было показано, что нейроны стриатума более чувствительны к ишемическому повреждению, чем нейроны коры [8]. Настоящее исследование подтвердило эти данные, так как наблюдались изменения в основном в нейронах стриатума, а в коре изменений синтеза белка HSP70 не обнаружено.

Таким образом, исследование показало, что нейропротекторное действие афобазола связано, с одной стороны, с улучшением кровоснабжения мозга в условиях глобальной преходящей ишемии, с другой — со способностью препарата повышать в условиях ишемии устойчивость мембранных структур нейронов коры и стриатума к свободнорадикальным процессам,

а также увеличивать синтез стресс-белка HSP70 в стриатуме мозга крыс.

Известно, что одним из наиболее важных звеньев в развитии ишемического поражения ткани мозга является окислительный стресс. Вместе с тем головной мозг высоко чувствителен к свободнорадикальному окислению вследствие того, что его мембранные структуры богаты полиненасыщенными жирными кислотами. Они являются мишенью для свободнорадикального повреждения. В то же время в мозге в сравнении с другими органами и тканями активность антиоксидантной системы ниже. В норме антиоксидантная система уравнивает действие прооксидантной, тогда как в условиях ишемического повреждения равновесие смещается в сторону увеличения функции последней. Происходит накопление окисленных липидов (гидропероксиды жирных кислот, малоновый диальдегид и др.) и белков, содержащих S — S-связи, карбонилы и др. модифицированные группы, а также фрагментов окисленных нуклеотидов, что в конечном итоге приводит к гибели клетки. HSP70, в свою очередь, предотвращает агрегацию белков, участвует в раскладывании и реорганизации поврежденных при окислительном стрессе белков [14], а также в протеолитической деградации нестабильных белков. Поэтому после ишемического повреждения мозга уровень белка в наших экспериментах в стриатуме был снижен по сравнению с контролем. В последнее время растет интерес к использованию в медицине антистрессовых свойств шаперонов, к которым относятся и HSP70 [4]. Однако есть трудности в применении экзогенных белков теплового шока [4]. В связи с этим ведется поиск лекарственных средств, влияющих на синтез эндогенных HSP70. Поэтому тот факт, что афобазол при ишемии мозга увеличивает синтез эндогенных HSP70 представляет интерес для клинического применения афобазола при ишемических поражениях мозга.

Таблица 2. Влияние афобазола на локальный мозговой кровоток (ЛМК) в условиях глобальной преходящей ишемии мозга крыс

№ опыта	ЛМК, усл. ед., после ишемии	ЛМК, усл. ед., после введения афобазола	% изменений
1	18	31	+ 72
2	11	13	+ 18
3	8	11	+ 38
4	6	10	+ 67
5	11	13	+ 18
6	16	25	+ 56
7	28	32	+ 14
	$14 \pm 2,8$	$19,3 \pm 3,07^*$	+ 40 \pm 9,3

* $p < 0,01$

ВЫВОДЫ

1. Глобальная преходящая ишемия вызывает значительное снижение кровоснабжения мозга у крыс и снижает содержание стресс-белка HSP70 в стриатуме.

2. Афобазол восстанавливает нарушенное вследствие ишемии кровоснабжение мозга и увеличивает синтез HSP70 в стриатуме.

ЛИТЕРАТУРА

1. М. Г. Баласанян, *Автореф. дис. докт. фарм. наук*, Ереван, (2003).
2. Т. А. Зенина, И. В. Гавриш, Д. С. Мелкумян, Т. С. Середенина, С. Б. Середенин, *Бюл. exper. биол.*, **8**, 161 – 163 (2005).
3. И. Ю. Малышев, Е. В. Малышева, *Бюл. exper. биол.*, **126**(12), 604 – 611 (1998).
4. Ю. Ф. Пастухов, И. В. Екимова, *Нейронауки*, **2**(2), 3 – 25, (2005).
5. С. Б. Середенин, В. П. Акопян, М. Г. Баласанян, А. В. Топчян, *Экспер. и клин. фармакол.*, **69**(2), 3 – 5 (2006).
6. С. Б. Середенин, О. В. Поварова, О. С. Медведев и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **69**(4), 3 – 5 (2006).
7. И. В. Силкина, В. В. Александрин, Т. С. Ганьшина, С. Б. Середенин, Р. С. Мирзоян, *Экспер. и клин. фармакол.* **67**(5), 9 – 13, (2004).
8. И. В. Силкина, Т. А. Зенина, С. Б. Середенин, Р. С. Мирзоян, *Экспер. и клин. фармакол.*, **69**(4), 47 – 50 (2006).
9. N. Arispe, M. Doh, and A. De Maio, *Cell Stress Chaperons*, **7**, 330 – 338 (2002).
10. R. G. Giffard, L. Xu, H. Zhao, et al., *J. of Experimental Biology*, **207**, 3213 – 3220 (2004).
11. T.-H. Lee, K. Hiroyuki, S.-T. Chen, et al., *Stroke*, **29**, 1678 – 1697 (1998).
12. S.-H. Lee, M. Kim, B.-W. Yoon, et al., *Stroke*, **32**, 2905 – 2912 (2001).
13. S.-H. Lee, H.-M. Know, Y.-Ju Kim, et al., *Stroke*, **35**, 2195 – 2199 (2004).
14. D. A. Parsell and S. Lindquist, *Annu Rev. Genet.*, **27**, 437 – 496 (1993).

Поступила 22.09.08

EFFECTS OF AFOBAZOLE ON STRESS PROTEIN HSP70 CONTENT IN BRAIN TISSUE OF RATS WITH GLOBAL TRANSIENT ISCHEMIA

T. A. Antipova, I. O. Logvinov, I. N. Kurdyumov, N. R. Mirzoyan, T. S. Gan'shina, A. I. Turilova, R. S. Mirzoyan, and S. B. Seredenin

Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Baltiiskaya 8, Moscow, 125315, Russia

Experiments in anesthetized rats showed that global transient brain ischemia caused a significant decrease in cerebral blood flow in rat cerebral cortex and reduced the stress protein HSP70 level in striatum. Afobazole administration restored the cerebral blood supply disturbed by ischemia and increased the stress protein HSP70 synthesis in striatum.

Key words: Afobazole, global transient brain ischemia, stress protein HSP70, western-blot analysis