

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
РАБОТЫ

УДК 616.831-06:616.831-005]-018.83-085-092.9

ФАРМАКОКОРРЕКЦИЯ НАРУШЕНИЙ ТИОЛ-ДИСУЛЬФИДНОГО РАВНОВЕСИЯ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС ИНТРАНАЗАЛЬНОЙ ФОРМОЙ АНТАГОНИСТА П-1b ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ХРОНИЧЕСКОЙ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

© 2021 г. И. Ф. Беленичев¹*, Б. С. Бурлака¹, Н. В. Бухтиярова¹, Е. Г. Алиева¹,
Э. В. Супрун², А. М. Ищенко³, А. С. Симбирцев³

¹Запорожский государственный медицинский университет, Запорожье, Украина

²Харьковская медицинская академия последипломного образования, Харьков, Украина

³ФГУП «Гос. НИИ ОЧБ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 09.06.2020 г.

После доработки 07.12.2020 г.

Принята к публикации 14.12.2020 г.

Проведено исследование влияния геля РАИЛ (антагонист П-1b) при интраназальном применении у крыс с экспериментальной хронической церебральной ишемией, вызванной необратимой окклюзией общих сонных артерий на основные показатели тиол-дисульфидной системы и экспрессию белка теплового шока (HSP₇₀) в головном мозге. Установлено, что при моделировании хронической церебральной ишемии происходит нарушение тиол-дисульфидной системы – снижения активности ГПР, GST и ГР, дефицит восстановленных тиолов, GSH, снижение содержания цистеина и метионина на фоне увеличения окисленной формы глутатиона в головном мозге животных. Параллельно регистрировали повышение содержания маркера нитрозативного стресса-нитротирозина снижение концентрации эндогенного цитопротектора – HSP₇₀. Интраназальное введение в течение 18 суток РАИЛа приводило к увеличению на 58.2% восстановленных интермедиатов тиол-дисульфидной системы (SH-группы) и повышению на 100% уровня GSH, на фоне снижения содержания его окисленной формы на 36.3% по сравнению с контролем. РАИЛ повышал активность ГР на 96.1%, ГПР на 68.1%, а GST на 137.7% относительно показателей контроля. При курсовом интраназальном введении геля РАИЛа концентрация белка HSP₇₀ в цитозоле гомогената головного мозга животных повышалась на 98.4%, а в митохондриях на 142.8% раз по сравнению с показателями контроля. Применение РАИЛа демонстрирует нейропротективный эффект, направленный на стабилизацию тиол-дисульфидного равновесия и активацию HSP₇₀-зависимых механизмов эндогенной нейропротекции.

Ключевые слова: хроническая церебральная ишемия, тиол-дисульфидная система, HSP₇₀, нейропротекция, антагонист П-1b(РАИЛ), интраназальный гель

DOI: 10.31857/S1027813321010155

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ:

HIF-1α – фактор, индуцируемый гипоксией
1-альфа (Hypoxia-inducible factor 1-alpha)

HSP₇₀ – белок теплового шока 70 кДа (70 kilodalton heat shock proteins)

iNOS – индуцибельная синтаза оксида азота

nNOS – нейрональная синтаза оксида азота

АФК – активные формы кислорода

ГПР – глутатионпероксидаза

GST- глутатионтрансфераза

ГР – глутатионредуктаза

ТДС – тиол-дисульфидная система

ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения

ХЦИ – хроническая церебральная ишемия

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на значительные успехи современной медицины, проблема нарушений мозгового кровообращения продолжает оставаться актуальной. В последнее десятилетие в промышленно развитых странах регистрируется постоянное увеличение цереброваскулярных заболеваний, особенно, ишемического инсульта [1–5]. С 90-х годов про-

* Адресат для корреспонденции: 69035, Украина, г. Запорожье, пр. Маяковского, 26; тел.: +38 (0612) 34-27-41; e-mail: ifb1914@mail.ru

шлого столетия в комплексной терапии НМК применяются первичные и вторичные нейропротекторы (модуляторы NMDA, блокаторы Ca^{2+} , ноотропы, антиоксиданты и т.д.). Однако большинство из них не дают ожидаемого нейропротективного эффекта. Поэтому актуальным является изучение тонких молекулярно-биохимических механизмов повреждений головного мозга при НМК, поиск новых перспективных мишеней для таргетной нейропротекции [3]. Анализ динамики патогенетических механизмов, запускаемых ишемией мозга, установил их четкую временную последовательность. В течение первых 3 часов с момента ОНМК максимально представлен энергетический дефицит в ишемизированной ткани, через 3–6 ч развивается глутаматная “эксайтотоксичность”, нарушение кальциевого гомеостаза и лактат-ацидоз, которые угасают к концу первых суток. Отдаленные последствия ишемии, такие как оксидантный, нитрозативный стресс и локальное воспаление начинают проявляться через 2–3 ч, достигают максимума через 12–36 ч, а на 2–3 сут начинается нейроапоптоз [2–4, 6]. В ответ запускаются компенсаторные механизмы эндогенной нейропротекции среди которых особый интерес представляют белки теплового шока HSP₇₀ и тиол-дисульфидная система [7, 8]. Интермедиат ТДС глутатион является важным компонентом защиты нейрона, повышает его устойчивость к гипоксии, ограничивает гипервозбудимость NMDA, выступает в качестве резерва цистеина в клетке, регулирует синтез и стабильность HSP₇₀, участвует в NO- и IL-1b-зависимых механизмах апоптоза [2, 7–10]. В опытах *in vitro* выявлено, что депривация уровня GSH в нейронах приводит к падению HSP₇₀, а в условиях моделирования НМК выявлена корреляционная взаимосвязь между выраженностью неврологических нарушений и дефицитом GSH и HSP₇₀ в головном мозге животных [3, 6]. Среди механизмов вторичного повреждения головного мозга особое значение имеют реакции локального воспаления вокруг зоны “ядра” инфаркта, сопровождающие резким подъемом уровня провоспалительных цитокинов, в частности IL-1b [9, 11, 12]. При взаимодействии IL-1b с рецепторами активируются факторы ядерной транскрипции AP-1 и NF-κB, которые меняют поведение клеток-мишеней и приводят к развитию острофазного клеточного ответа, экспрессии других провоспалительных факторов, стимуляции астроцитами экспрессии iNOS и цитотоксических производных NO, повышению проницаемости митохондриальной поры и инициации нейроапоптоза [4, 6, 11]. Выявлена корреляционная взаимосвязь между повышением уровня провоспалительных цитокинов (IL-1b, TNF-α, IL-6, IL-8), степенью тяжести неврологических нарушений и дефицитом ростовых факторов (BDNF, IGF-1, PDGF). Сигнальный путь с

IL-1b, направленный на усиление отсроченных механизмов гибели нейронов после ОНМК может регулироваться HSP₇₀ [3]. Повышение концентрации HSP₇₀ в пределах физиологической нормы приводит к повышению IL-1β до уровня, необходимого для участия в цито- и нейропротекции, дефицит HSP₇₀ может повлечь значительную экспрессию IL-1. Сверхэкспрессия HSP₇₀ ослабляет экспрессию IL-1β за счет ингибирования факторов транскрипции C/EBPβ и C/EBPδ [1]. HSP₇₀ может предотвращать продукцию воспалительных цитокинов путем вмешательства в NF-κB-зависимую транскрипцию [6]. Известно, что повышенная продукция TNF-α, IL-1β, IL-6 и IL-8 происходит на фоне дефицита GSH [10]. GSH и его предшественник N-ацетилцистеин способны модулировать NF κB, снижать экспрессию IL-1β и проявлять противовоспалительное действие [9, 10, 12–15]. IL-1β в зависимости от концентрации может регулировать транспорт GSH и влиять на механизмы нейропротекции/нейродеструкции [1]. Рациональная нейропротекция предполагает прерывание каскадных механизмов гибели нейронов, что и определяет IL-1b как важную мишень фармакологического воздействия [3, 7, 13]. В настоящее время получены убедительные данные о нейропротективном действии антагониста IL-1b – РАИЛ [8]. Получены данные, что парентеральное введение РАИЛ животным с ОНМК приводит к снижению летальности, уменьшению неврологических нарушений, а также уменьшению зоны инфаркта мозга, повышение плотности нейронов сенсомоторной зоны и гиппокампа [11]. С целью уточнения механизма действия РАИЛ, с учетом известных взаимосвязей между экспрессией IL-1b, уровнем GSH и HSP₇₀, предоставляется интересным определить направленность и выраженность влияния этого антагониста IL-1b на показатели тиол-дисульфидной системы и концентрацию HSP₇₀ в условиях экспериментальной хронической церебральной ишемией. Интерес фармакологов и клиницистов представляет и новая лекарственная форма РАИЛ – гель для интраназального применения. Все это определяет актуальность настоящего исследования.

Цель настоящей работы – изучить влияние геля РАИЛ при интраназальном применении на показатели тиол-дисульфидной системы и концентрацию белка теплового шока 70 кДа в головном мозге крыс при хронической церебральной ишемии, вызванной необратимой окклюзией общих сонных артерий.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты выполнены на 80 белых беспородных крысах массой 170–180 г, обоего пола, полученных из питомника ГУ “Институт фармакологии и

токсикологии АМН Украины”. Длительность карантина (акклиматизационного периода) для всех животных составляла 14 дней. В течение карантина проводили ежедневный осмотр каждого животного (поведение и общее состояние), дважды в день животных наблюдали в клетках (заболеваемость и смертность). Перед началом исследования животные, отвечающие критериям включения в эксперимент, были распределены на группы с помощью метода рандомизации. Животные, не соответствующие критериям, были исключены из исследования в течение карантина. Клетки с животными были помещены в отдельные комнаты. Световой режим: 12 ч – свет, 12 ч – темнота. Температура воздуха поддерживалась в пределах 19–25°C, относительная влажность – 50–70%. Температура и влажность воздуха регистрировались ежедневно. Был установлен режим проветривания, обеспечивающий около 15 объемов помещения в час. Опытных животных содержали на одинаковых рационах, в обычных условиях вивария [16, 17]. Животные помещались в стандартных клетках по 5 особей в клетке. Рацион питания – фуражное зерно, рыба, творог, хлеб, корнеплоды (свекла, морковь). Все манипуляции были проведены согласно положению об использовании животных в биомедицинских опытах (Страсбург, 1986г., с изменениями, внесенными в 1998г.). Протоколы экспериментальных исследований и их результаты утверждены решением Комиссии по биоэтике ЗГМУ (протокол № 32 от 26 октября 2018 г.). В работе использовали модель хронической церебральной ишемии, которую воспроизводили путем двухсторонней окклюзии общих сонных артерий у экспериментальных животных под наркозом (тиопентал натрия, 40 мг/кг). Стоит обратить внимание на то, что данная модель является травматичной, гибель животных особенно в первые часы довольно часто происходит вследствие ошибки экспериментаторов, которые перевязывают вместе с а. carotidis и n. vagus. Правильно выполненная операция по моделированию церебральной ишемии путем перевязки обеих общих сонных артерий по данным ряда исследований вызывает смертность на 1–20 сут 50–80% в зависимости от вида крыс [16, 17]. Учитывая высокую смертность для этой экспериментальной модели, оперировали такое количество животных, чтобы к 18 суткам в каждой группе было по 20 животных. Также была серия ложно-оперируемых животных, которым под наркозом, разрезалась кожа, под сонные артерии подводилась лигатура, но не производили окклюзию и затем кожа ушивалась. Животных всех групп выводили из эксперимента на 18-е сутки после операции под тиопенталовым наркозом (40 мг/кг). Исследуемые препараты вводили по схеме: РАИЛ – интраназально в виде геля 1 раз в сутки в течение 18 дней (1 мг/кг), референс-препарат Цитиколин –

внутрибрюшинно 1 раз в сутки в течение 18 дней (500 мг/кг) [1]. Цитиколин одобрен и широко применяется более 30 лет в странах Западной Европы и США для лечения мозгового инсульта (ишемического и геморрагического) и ЧМТ. В работе использовался Цитиколин производства Ferrer Internacional, S.A. (Испания) и представленным Nycomed Austria, GmbH (Австрия).

В эксперименте животные были разделены на четыре группы:

- 1) ложнооперированные, получавшие в течение 18 сут основу геля интраназально – (20 крыс);
- 2) контрольные – животные с хронической церебральной ишемией (ХЦИ), получавшие в течение 18 сут основу геля интраназально (20 крыс);
- 3) животные с ХЦИ, получавшие гель РАИЛ интраназально в течение 18 сут (20 крыс);
- 4) животные с ХЦИ, получавшие Цитиколин парентерально в течение 18 сут (20 крыс).

В работе использовалась субстанция РАИЛ, полученная из Федерального государственного унитарного предприятия “Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биологических препаратов” (Россия, С.-Петербург, ЛСР-007452/1-0300710). Субстанция получена биотехнологически из *E. coli* TG1(pTAC-hIL-1ra), состоит из 153 аминокислот. М.м. 17.906 кДа. РАИЛ-гель (5мг/1 мл) разработан на кафедре технологии лекарственных средств ЗГМУ.

Биохимические методы исследования. Из головного мозга быстро удаляли кровь, отделяли от мозговой оболочки и исследуемые кусочки помещали в жидкий азот. Затем измельчали в жидком азоте до порошкообразного состояния и гомогенизировали в 10-кратном объеме среды при (2°C), содержащей (в ммольях): сахарозы – 250, трис-HCl-буфера – 20, ЭДТА -1 (рН 7.4) [2, 11]. При температуре (+4°C) методом дифференциального центрифугирования на рефрижераторной центрифуге Sigma 3-30k (Германия) разделяли цитозольную и митохондриальную фракции (17000 g). Супернатант сливали и хранили при –80°C. Состояние тиол-дисульфидных системы головного мозга оценивали по содержанию восстановленного глутатиона (GSH) и окисленного глутатиона (GSSG) в цитозольной фракции флуориметрически с использованием *o*-фталевого ангидрида на флуориметре Quantech [2]. Уровень свободных SH-групп, активность глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы и глутатионтрансферазы в цитозольной фракции измеряли спектрофотометрически на спектрофотометре Libra S 32 PC [13]. Содержание цистеина и метионина определяли методом тонкослойной хроматографии в цитозольной фракции с последующей спектрофотометрией на спектрофотометре Libra S 32 PC [17]. Общее содержание восстановленных и окисленных сульфгидрильных групп в цитозольной

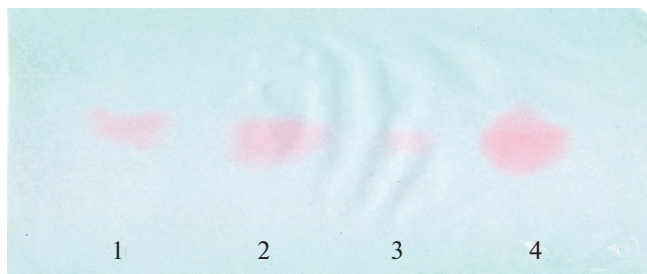


Рис. 1. Экспрессия белка HSP₇₀ в цитозоле головного мозга крыс (нитроцеллюлозная мембрана после обработки первичными и вторичными антителами, для визуализации использовали 3-амино-9-этилкарбазолом). 1 – животные с хронической церебральной ишемией (ХЦИ), получавшие Цитиколин; 2 – животные с ХЦИ, получавшие гель РАИЛ; 3 – животные с ХЦИ без лечения (контроль); 4 – ложноперированные животные.

фракции определяли с помощью реактива Элмана спектрофотометрически на спектрофотометре Libra S 32 PC [17]. Концентрацию белка оценивали по методу Бредфорда.

Иммуноферментный анализ. Степень интенсивности нитрозативного стресса в головном мозге определяли по концентрации нитротирозина в цитозольной фракции методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) на полнопланшетном иммуноферментном анализаторе (SIRIOS, Италия) с применением тест-набора “Nitrotyrosine ELISAKit” (“Nu Cultbiotechnology”). Гомоцистеин определяли аналогичным методом с применением тест-набора (“Axis-Shield”).

Вестерн-блоттинг. Концентрацию в цитоплазматической и митохондриальной фракциях головного мозга HSP₇₀ определяли методом Вестерн-блот анализа (рис. 1). Белки разделяли в 10% полиакриламидном геле (ПААГ) путем электрофореза. После переноса белков на нитроцеллюлозную мембрану ее помещали в блокирующий буфер, содержащий 1% раствор бычьего сывороточного альбумина (SIGMA, США, кат. № A2153) и после отмывки помещали в раствор первичных антител против HSP₇₀ (1 : 500), (Santa Cruz Biotechnology). Затем обрабатывали вторичными антителами (1 : 1000), (биотинилированный анти-мышинный IgG, SIGMA, США, кат. №051M4885). Мембрану помещали в раствор ExtrAvidin-пероксидазы (SIGMA, США, кат. № 051M4885) в 1% растворе бычьего сывороточного альбумина (1 : 1000). Для визуализации использовали 3-амино-9-этилкарбазола (Sigma, США, кат. № a6926). Детекцию HSP₇₀ осуществляли при помощи денситометрии в программе Adobe Photoshop.

Статистические методы. Статистическая обработка данных научных исследований проводилась с

использованием пакета программ “STATISTICA® for Windows 6.0” (StatSoft Inc., № AXXR712D833214-FAN5), а также “SPSS 16.0”, “Microsoft Office Excel 2003”. Перед применением статистических критериев проводилась проверка гипотезы о нормальном законе распределения случайных величин (по критерию Shapiro-Wilk и Колмогорова-Смирнова). В условиях нормального распределения установления достоверности межгрупповых различий по полученным данным экспериментов проводилось с помощью параметрического *t*-критерия Стьюдента. В случае, когда данные не соответствовали законам нормального распределения, сравнительный анализ проводили с помощью непараметрического *U*-критерия Манна-Уитни. Для сравнения независимых переменных в более чем двух выборках применяли дисперсионный анализ (ANOVA) при нормальном распределении или критерий Kruskal-Wallis для распределения, отличного от нормального. Для анализа закономерностей связи между отдельными показателями проведен корреляционный анализ с помощью коэффициента корреляции Пирсона или Спирмена. Для всех видов анализа статистически значимыми считали различия $p < 0.05$ (95%).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенных нами исследований указывают на то, что формирование хронической церебральной ишемии у крыс приводит к смещению тиол-дисульфидной системы в виде уменьшения пула ее восстановленных форм и снижение активности ГПР, GST и ГР ($p < 0.05$) цитозольной фракции вплоть до 18 суток эксперимента по сравнению с показателями ложноперированных животных (табл. 1–3). Снижение уровня GSH ($p < 0.05$) в головном мозге у крыс с НМК по сравнению с показателями ложноперированных животных может быть следствием нарушения его синтеза, связанного с нарушением тканевого дыхания, обусловленного ишемией, а также расходом в неэнзиматических реакциях и реакциях катализируемых ГПР, направленных на “утилизацию” свободных радикалов и перекисей [3]. Другой причиной, уменьшения пула внутриклеточного глутатиона, может выявленный нами быть дефицит цистеина (–63.8%), вследствие его активного использования в качестве антиоксиданта [6, 10]. На данном фоне характерным было достоверное повышение уровня гомоцистеина на фоне снижения концентрации метионина. Гомоцистеин является нейротоксичным серосодержащим промежуточным звеном метаболизма метионина, подавляет экспрессию eNOS и увеличивает выработку АФК за счет высвобождения арахидоновой кислоты из тромбоцитов, ингибирует ГПР и ГР. Повышенная концентрация гомоцистеина стимулирует многие пути внутриклеточной пере-

Таблица 1. Влияние РАИЛа и Цитиколина на состояние ферментативного звена тиол-дисульфидной системы в головном мозге животных с хронической церебральной ишемией (ХЦИ) на 18-е сут эксперимента

Группы животных	ГР мкмоль/мг белка/мин	ГПР мкмоль/мг белка/мин	Г-S-T мкмоль/мг белка/мин
Ложнооперированные (n = 20)	19.5 ± 1.35	61.8 ± 2.9	15.8 ± 1.07
ХЦИ (контроль) (n = 20)	5.2 ± 0.42 [#]	34.2 ± 1.54 [#]	6.1 ± 0.57 [#]
ХЦИ + Цитиколин, 500мг/кг (n = 20)	8.2 ± 0.45* [#]	48.8 ± 3.14*	5.2 ± 0.72 [#]
ХЦИ + РАИЛ, 1 мг/кг (n = 20)	10.2 ± 0.71*	57.5 ± 2.72*	14.5 ± 1.11* ¹

Примечание: [#] p < 0.05 по отношению к группе ложнооперированных животных; * p < 0.05 по отношению к контрольной группе; ¹ p < 0.05 по отношению к группе Цитиколина.

Таблица 2. Влияние РАИЛа и Цитиколина на состояние неферментного звена тиол-дисульфидной системы в головном мозге животных с ХЦИ на 18-е сут эксперимента

Группы животных	SH-группы мкмоль/г ткани	SS-группы мкмоль/г ткани	GSH мкмоль/г ткани	GSSG мкмоль/г ткани
Ложно-оперированные (n = 10)	57.3 ± 2.8	3.5 ± 0.2	4.3 ± 0.23	0.033 ± 0.008
ХЦИ (контроль) (n = 20)	24.4 ± 1.2 [#]	7.2 ± 0.42 [#]	1.62 ± 0.05 [#]	0.066 ± 0.005 [#]
ХЦИ + Цитиколин, 500 мг/кг (n = 20)	30.4 ± 2.8*	6.4 ± 0.51 [#]	2.20 ± 0.10* [#]	0.060 ± 0.004 [#]
ХЦИ + РАИЛ, 1 мг/кг (n = 20)	38.6 ± 3.8*	4.5 ± 0.38* ¹	3.24 ± 0.22* ¹	0.042 ± 0.003* ¹

Примечание: [#] p < 0.05 по отношению к группе ложнооперированных животных; * p < 0.05 по отношению к контрольной группе; ¹ p < 0.05 по отношению к группе Цитиколина.

Таблица 3. Влияние РАИЛа и Цитиколина на состояние неферментного звена ТДС и нитрозативного стресса в головном мозге животных с ХЦИ на 18-е сут эксперимента

Группа животных	Гомоцистеин мкмоль/г ткани	Цистеин мкмоль/г ткани	Метионин мкмоль/г ткани	Нитротирозин нмоль/г ткани
Ложно-оперированные (n = 20)	2.8 ± 0.26	3.15 ± 0.16	2.86 ± 0.15	18.6 ± 1.23
ХЦИ (контроль) (n = 20)	8.5 ± 0.52 [#]	1.14 ± 0.074 [#]	1.25 ± 0.082 [#]	42.3 ± 2.32 [#]
ХЦИ + Цитиколин, 500 мг/кг (n = 20)	7.7 ± 0.53 [#]	1.87 ± 0.057* [#]	1.71 ± 0.12* [#]	30.8 ± 2.42*
ХЦИ + РАИЛ, 1 мг/кг (n = 20)	4.1 ± 0.42* ¹	2.77 ± 0.093*	2.52 ± 0.11* ¹	24.2 ± 1.1* ¹

Примечание: [#] p < 0.05 по отношению к группе ложнооперированных животных; * p < 0.05 по отношению к контрольной группе; ¹ p < 0.05 по отношению к группе Цитиколина.

дачи сигналов, включая модификации рецепторов, индукцию различных киназ, например митоген-активирующий белок (MAP) и включение нейроаптоза, а также усиливает эксайтотоксичность за счет стимуляции NMDA и AMPA [1].

На фоне курсового интраназального введения РАИЛа отмечены выраженные изменения, которые характеризовались значимым на 58.2% увеличением восстановленных интермедиатов тиол-дисульфидной системы и повышением на 100% уровня GSH, на фоне снижения содержания его окисленной формы на 36.3% по сравнению с показателями контроля. Важным явилось то, что увеличение уровня GSH в группе, получавшей

РАИЛ, происходило на фоне увеличения цистеина (+143%). Подобные по направленности изменения были отмечены и при использовании Цитиколина, однако параметры зафиксированных значений в этой группе, по выраженности уступали показателям группы животных с введением РАИЛа. Применение РАИЛа также приводило и к снижению содержания в тканях мозга нейротоксических веществ – нитротирозина и гомоцистеина на 42.7 и 51.7% соответственно (табл. 3). При этом снижение гомоцистеина регистрировали на фоне повышения метионина на 101.6%. РАИЛ повышал активность ГР на 96.1%, ГПР на 68.1%,

Таблица 4. Влияние РАИЛа и Цитиколина на содержание HSP₇₀ в головном мозге животных с ХЦИ на 18-е сут эксперимента

Группа животных	HSP ₇₀ , у.е./ г белка	
	Митохондриальная фракция	Цитозольная фракция
Ложнооперированные (<i>n</i> = 20)	7.2 ± 0.21	15.5 ± 0.36
ХЦИ (контроль) (<i>n</i> = 20)	2.1 ± 0.11 [#]	6.4 ± 0.55 [#]
ХЦИ + Цитиколин, 500 мг/кг (<i>n</i> = 20)	2.2 ± 0.54 [#]	7.8 ± 0.52 [#]
ХЦИ + РАИЛ, 1 мг/кг (<i>n</i> = 20)	5.1 ± 0.32 ^{*1}	12.7 ± 0.95 ^{*1}

Примечание: [#] *p* < 0.05 по отношению к группе ложнооперированных животных; * *p* < 0.05 по отношению к контрольной группе; ¹ *p* < 0.05 по отношению к группе Цитиколина.

а GST на 137.7% относительно показателей контроля.

Увеличение функциональности системы глутатиона, а также повышение активности GSH-ферментов не только приводит к усилению защиты головного мозга от нейротоксических продуктов оксидативного и нитрозативного стресса, но и может запустить GSH-зависимые механизмы эндогенной нейропротекции [10]. Увеличение функциональности тиол-дисульфидной системы в условиях НМК и увеличение его восстановленных интермедиатов, под влиянием РАИЛ, может способствовать повышению биодоступности NO и уменьшению его превращения в цитотоксический пероксинитрит [4], а также уменьшает активность реакций нитрозативного стресса, что проявлялось в виде выраженного снижения уровня нитротирозина [3, 7, 8].

Таким образом, одним из звеньев нейропротективного действия геля РАИЛа в условиях экспериментального НМК является его позитивное влияние на показатели тиол-дисульфидной системы и, особенно, ее глутатионовой части.

Нами обнаружено снижение уровня белка теплового шока HSP₇₀ в цитозоле и митохондриях (*p* < 0.05) головного мозга экспериментальных животных (табл. 4). При курсовом интраназальном введении геля РАИЛа концентрация белка HSP₇₀ в цитозоле гомогената головного мозга животных повышалась на 98.4%, а в митохондриях на 142.8% раз по сравнению с показателями контроля (рис. 1). Полученные данные свидетельствуют о возможном влиянии РАИЛа на HSP₇₀-зависимые механизмы эндогенной нейропротекции при церебральной ишемии. По всей видимости, РАИЛ, блокируя IL-1b, способен регулировать экспрессию HSP₇₀ и GSH. Это новый и перспективный, учитывая концепцию таргетной нейропротекции, механизм действия РАИЛа. Hsp₇₀ блокирует пусковой рецептор апоптоза Fas/Apo-1, ингибирует апо-

птоз в митохондриях на этапе между высвобождением цитохрома С и расщеплением прокаспазы-9, препятствует связи цитохрома С с проапоптотическим белком Араф-1 в митохондриях [1, 6].

HSP₇₀ способен исправлять окислительно поврежденные антиоксидатные ферменты и транспортировать их из цитоплазмы в другие клеточные органеллы [1, 15]. Увеличение экспрессии и/или содержания внутриклеточного HSP₇₀ вызывает торможение передачи пролиферативных, апоптотических, воспалительных сигналов [3]. HSP₇₀ проявляет прямое митопротективное действие, а также поддерживает активность компенсаторного малат-аспаратного челночного механизма в условиях церебральной ишемии, “продолжая” действие HIF-1a, HSP₇₀ самостоятельно поддерживает экспрессию НАД-МДГ-мх [1, 3, 6].

Выявленное у Цитиколина влияние на тиол-дисульфидную систему головного мозга в условиях НМК не противоречит нашим предыдущим результатам и данным других исследователей. Цитиколин проявляет митопротективный эффект, сохраняет целостность внутренней мембраны митохондрии, влияя на уровень кардиолипина [1–3]. Цитиколин опосредовано, через увеличения активности GSH-зависимых ферментов, регулирует участие GSH в механизмах эндогенной нейропротекции [6].

Полученные нами результаты исследования позволят по-новому оценить механизм нейропротективного действия РАИЛа. РАИЛ, прерывая IL-1b-зависимую экспрессию iNOS, может снизить продукцию цитотоксических форм NO, активность нитрозативного стресса и “расходование” восстановленных интермедиатов ТДС [18]. С учетом полученных нами результатов можно предположить, что РАИЛ может регулировать IL-1b-зависимый транспорт GSH. Возможно, РАИЛ за счет повышения концентрации HSP₇₀ влияет на активацию редокс-чувствительных

факторов транскрипции AP-1, NF-κB, NF-1, которые повышают экспрессии генов ГПР, ГР и GST, а также генов ферментов, обеспечивающих стабильность внутриклеточной концентрации GSH (γ-глутамилтрансферазы, γ-глутамилцистеинсинтетазы) в условиях хронической церебральной ишемии [3, 6, 19].

ВЫВОДЫ

1. Необратимая окклюзия общих сонных артерий в течение 18 сут приводит к нарушению тиол-дисульфидной системы головного мозга – угнетению активности ГПР, GST и ГР, дефициту SH-групп, восстановленного глутатиона, снижению содержания цистеина, метионина, повышению концентрации окисленного глутатиона и увеличению уровня нитротирозина в цитозоле, а также к дефициту белка теплового шока 70 кДа в цитозоле и митохондриях головного мозга экспериментальных животных.

2. Курсовое интраназальное применение геля РАИЛ в течение 18 сут после необратимой окклюзии общих сонных артерий у крыс способствует улучшению основных показателей тиол-дисульфидной системы, снижению уровня нитротирозина в цитозольной фракции головного мозга. Применение РАИЛ-геля приводит к повышению экспрессию белка теплового шока 70 кДа в цитозоле и митохондриях головного мозга.

3. РАИЛ-гель по степени влияния на показатели тиол-дисульфидной системы и экспрессию HSP₇₀ превосходит референс-препарат Цитиколин.

4. Полученные результаты позволили выявить новые звенья нейропротективного действия РАИЛ в условиях хронической церебральной ишемии, а именно влияние на GSH/HSP₇₀-зависимые механизмы эндогенной нейропротекции, что экспериментально обосновывает перспективность дальнейших исследований этой лекарственной формы.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Внешнее финансирование отсутствует.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Этическое одобрение. Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Беленичев И.Ф., Фероз Шах, Чекман И.С., Нагорная Е.А., Горбачева С.В., Горчакова Н.А., Бухтиярова Н.В.* // Тиол-дисульфидная система: роль в эн-

догенной цито- и органопротекции, пути фармакологической модуляции. Киев: ТОВ “Видавництво “Юстон”, 2020. 232 с.

2. *Чекман И.С., Беленичев И.Ф., Бухтиярова Н.В., Нагорная Е.А., Горчакова Н.А.* // Доклиническое изучение специфической активности потенциальных лекарственных средств первичной и вторичной нейропротекции. Методические рекомендации ГП “Государственного экспертного центра МЗ Украины”. Киев, 2016. 80с.

3. *Беленичев И.Ф., Черний В.И., Бухтиярова Н.В., Горчакова Н.А.* // Нейропротекция и нейропластичность. Киев: Логос, 2015. 512 с.

4. *Никонов В.В., Феськив А.Э., Беленичев И.Ф., Бухтиярова Н.В.* // Медицина неотложных состояний. Донецк: Изд. дом Заславского, 2012. 512 с.

5. *Liu P., Zhang R., Liu D.g, Wang J., Yuan Ch., Zhao X., Li Y., Ji X., Chi T., Zou L.* // J. Physiol. Sci. 2018. V. 68. P. 121–127.

6. *Беленичев И.Ф., Бухтиярова Н.В., Черний В.И., Павлов С.В., Колесник Ю.М., Абрамов А.А.* // Рациональная нейропротекция. Донецк: Изд. Дом Заславского, 2008. 264 с.

7. *Demchenko A.V., Belenichev I.F.* // Neurochem. J. 2016. V. 10(1). P. 64–68.

8. *Belenichev I.F., Kolesnik Y.M., Pavlov S.V., Sokolik E.P., Bukhtiyarova N.V.* // Neurochem. J. 2011. V. 5(4). P. 251–256.

9. *Tschoe Ch., Bushnell C.D., Duncan P.W., Alexander-Miller M.A., Wolfe S.Q.* // J. Stroke. 2020. V. 22(1). P. 29–46.

10. *Aquilano K., Baldelli S., Ciriolo M.R.* // Front. Pharmacol. 2014. V. 5. P. 196.

11. *Belenichev I.F., Bukhtiyarova N.V.* // Neurochem. J. 2014. V. 8(1). P. 24–27.

12. *Ruland J.* // Nat. Immunol. 2011. V. 12. P. 709–714.

13. *Jin R., Yang G., Li G.* // J. Leukocyte Biology. 2010. V. 87(5). P. 779–789.

14. *Pradillo J.M., Denes A., Greenhalgh A.D.* // J. Cerebral Blood Flow and Metabolism. 2012. V. 32(9). P. 1810–1819.

15. *Belenichev I.F., Kolesnik Y.M., Pavlov S.V., Sokolik E.P., Bukhtiyarova N.V.* // Neurochem. J. 2012. V. 6(1). P. 22–28.

16. *Lundblad R.L., Macdonald F.* // Handbook of Biochemistry and Molecular Biology. CRC Press, 2010. 1098 p.

17. *Миронов А.Н., Бунатян Н.Д.* // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. I. М.: ФГБУ НЦЭСМП. 2012. 944 с.

18. *Супрун Э.В.* // Дис. ... д. мед. н. Киев. 2011. 348 с.

19. *Liu R., Yuan H., Yuan F., Yang S.-H.* // Neurological Research. 2012. V. 34(4). P. 331–337.

Pharmacocorrection of Thiol-Disulfide Balance in the Brain of Rats by the Intranasal Form of the IL-1b Antagonist in a Model of Chronic Cerebral Ischemia

I. F. Belenichev^a, B. S. Burlaka^a, N. V. Bukhtiyarova^a,
E. G. Aliyeva^a, E. V. Suprun^b, A. M. Ishchenko^c, and A. S. Simbirtsev^c

^aZaporizhzhya State Medical University, Zaporozhye, Ukraine

^bKharkov Medical Academy of Postgraduate Education, Kharkov, Ukraine

^cFSUE "State Research Institute of Especially Purified Bioproducts" FMBA of Russia, St. Petersburg, Russia

We studied the effects of intranasal application of RAIL gel (IL-1b antagonist) to rats with experimental chronic cerebrovascular disorders on the indices of the thiol-disulfide system and heat shock protein HSP₇₀ in the brain. We found that chronic cerebral ischemia (permanent occlusion of the common carotid arteries) shifts the state of thiol-disulfide system: the pool of reduced forms of glutathione and the activity of GPR, GST and GR decreased. Intranasal application of RAIL for 18 days resulted in a 58.2% increase in the reduced intermediates of the thiol-disulfide system and in 100% increase of GSH level, against the background of a 36.3% decrease in the content of its oxidized form compared to the control. The administration of RAIL led to a 98% increase in the heat shock protein HSP₇₀ concentration in the brain of experimental animals. The use of RAIL stabilizes the thiol-disulfide balance and activates HSP70-dependent mechanisms of endogenous neuroprotection.

Keywords: chronic cerebral ischemia, thiol-disulfide system, HSP₇₀, neuroprotection, IL-1b antagonist (RAIL), intranasal gel