

Оцінка ефективності медикаментозної нейропротекції після експериментальної пренатальної гіпоксії

І.Ф. Бєленічев¹, О.Г. Алієва¹, Л.М. Гуніна², Н.В. Бухтіярова¹

¹Запорізький державний медичний університет; e-mail: aliyeva1eg@gmail.com

²Національний університет фізичного виховання і спорту України, Київ

Вивчали вплив препаратів ангіоліну, тіотриазоліну, тамоксифену, глутаредоксину, цереброкуруну, мілдронату, нікомексу, L-аргініну, транскрипційного фактора теплового шоку 1 (HSF-1) та референсного препарату пірацетаму на молекулярні маркери нейродеструкції/нейропротекції в моделі хронічної гемічної пренатальної гіпоксії (ПГ) для експериментального обґрунтування перспективності подальшого вивчення цих засобів як компонентів комплексного лікування пренатального гіпоксичного ураження ЦНС. Із використанням методу імуноферментного аналізу було вивчено вміст білка теплового шоку HSP70, матриксної металопротеїнази-8 (МПП-8) і нітротирозину у плазмі крові щурів на 30-ту та 60-ту добу життя після пренатальної гіпоксії (ПГ). Встановлено, що хронічна ПГ призводить до підвищення вмісту нітротирозину, MMP-8 та пригнічення синтезу HSP70, що свідчить про порушення механізмів регуляції процесів нейропротекції/нейродеструкції. Курсові введення досліджуваних препаратів збільшували вміст HSP70 у плазмі крові тварин та зменшували концентрацію нітротирозину та МПП-8 з пролонгованим ефектом. Цереброкурин (150 мг/кг), ангіолін (50 мг/кг), HSF-1 (50 мг/кг) і глутаредоксин (200 мкг/кг) найбільш активно впливали на показники молекулярних маркерів, що вивчалися, тому можуть розглядатися як перспективні нейропротективні засоби в комплексній терапії після ПГ.

Ключові слова: пренатальна гіпоксія; центральна нервова система; нейропротекція; HSP70; модулятори HSP70.

ВСТУП

У розвитку церебральної недостатності у дітей, які перенесли пре- та перинатальну гіпоксію, ключову роль відіграють процеси нейродеструкції, пов'язані з активацією трансмітерного аутокоїдозу, оксидативного та нітрозативного стресу та порушення енергетичного метаболізму на тлі дисфункції мітохондрій [1, 2]. В експерименті та клінічній практиці продемонстровано пряму залежність концентрації низки нейроспецифічних білків та антитіл до них, молекулярних маркерів оксидативного стресу та мітохондріальної дисфункції у крові новонароджених від тяжкості клінічного стану [3–5]. Єдиними нейромолекулами, які здатні протистояти механізмам нейродеструкції, вважають нейротрофічні фактори та білки теплового шоку, а також фактори, індуковані гіпоксією © І.Ф. Бєленічев, О.Г. Алієва, Л.М. Гуніна, Н.В. Бухтіярова

[6, 7]. Дисфункція синтезу фактора росту нервів (NGF), мозкового нейротрофічного фактора (BDNF) та нейротрофіну-3 може сприяти мозковому розвитку з ослабленою нейропластичністю, що призводить до формування церебральної недостатності у дітей, які перенесли пре- та перинатальну гіпоксію [5]. Також даними доклінічних досліджень доведено нейропротективну роль білка теплового шоку (heat shock protein) HSP70 та фактора, що індукується гіпоксією (HIF-1a), в умовах церебральної ішемії та гіпоксії [8, 9]. Встановлено пряму залежність між концентрацією HSP70, ступенем неврологічних порушень та вмістом специфічних маркерів нейродеструкції. Показано, що низькі концентрації HSP70 сприяють прогресу нейродеструкції. Крім того, церебральна ішемія супроводжується збільшенням вмісту в крові запальних медіаторів, які посилюють

судинну проникність (інтерлейкін-1 β , метаболіти NO, серинові протеази, продукти окисної модифікації білка). Є окремі дані про зсуви складових тіол-дисульфідної системи при церебральній ішемії та підвищенні в крові її окиснених інтермедіатів [3].

До цього часу немає єдиної думки про етапну комплексну терапію постгіпоксичних порушень ЦНС. Дані експериментальних та клінічних досліджень є нечисленними та суперечливими. Тому виявлення нових структурних, молекулярно-біохімічних особливостей постгіпоксичних порушень ЦНС у новонароджених та розробка на цій основі таргетної нейропротекції становить науковий інтерес. Збільшення вмісту ендogenous глутатіону (GSH) за допомогою застосування фармакологічних агентів при ішемічній нейродеструкції може бути новим напрямком нейропротекції та лікування мозкових інсультів [8, 10, 11]. Це розширює уявлення про участь у сигналітеті нейроапоптозу глутатіону та його ролі в інтимних механізмах ендogenous нейропротекції.

У зв'язку з цим перспективним напрямком нейропротекції після пренатальної гіпоксії може бути застосування засобів, що активують GSH/HSP70-залежні механізми ендogenous нейропротекції. У цьому відношенні становлять інтерес такі лікарські препарати, як ангіолін, тіотриазолін, тамоксифен, глуторедоксин, цереброкурин, які довели свою участь у регуляції експресії HSP70 безпосередньо або внаслідок впливу на глутатіонову ланку тіол-дисульфідної системи в умовах моделювання ішемії головного мозку [8, 10–12]. Також цікаво оцінити HSP70-механізм нейропротективної дії L-аргініну, мілдронату, нікомексу та пірацетаму, які мають різні механізми цитопротективної та протиішемічної дії [8].

Мета нашої роботи – дослідити вплив деяких модуляторів HSP70 на молекулярні маркери нейродеструкції/нейропротекції в умовах експериментальної пренатальної гіпоксії (ПГ).

МЕТОДИКА

Експеримент був проведений на 50 аутбредних білих нелінійних самицях та 10 самцях щурів масою 220–240 г, віком 4,5 міс, отриманих з розплідника ДУ «Інститут фармакології та токсикології АМН України», а також потомстві цих тварин. Щурів утримували в стандартних умовах віварію. Дослідження виконували відповідно до національних «Спільних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001), погоджених із положенням 2010/63EU Ради Європейського парламенту та Ради із захисту тварин, які використовуються в наукових цілях (Council Directive 2010/63EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes).

В експерименті було використано модель хронічної гемічної нітритіндукованої ПГ, яку відтворювали щоденним внутрішньоочеревинним введенням розчину нітритру натрію вагітним самицям щурів з 16-го по 21-й день вагітності у дозі 50 мг/кг [13]. Контрольні вагітні самиці отримували фізіологічний розчин у тому самому режимі.

При підборі дозування керувалися інструкціями до застосування препаратів та даними наявних у літературі досліджень [8, 12, 14–16]. Було обрано такі лікарські препарати, які мають експериментально доведену здатність модулювати експресію HSP70:

1. Тіотриазолін (морфоліній 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіооцтової кислоти; 2,5%-й розчин для ін'єкцій; (Корпорація «Артеріум», Україна), метаболітотропний кардіопротектор та антиоксидант. Є дані, що препарат збільшує експресію HSP70 в міокарді при ішемії, хронічній серцевій недостатності та алкогольному ураженні серця [14].

2. Тамоксифен ((Z)-2-[4-(1,2-дифеніл-1-бутеніл) феноксі]-N,N-діметилетанамін (у вигляді цитрату); таблетки («Orion Corporation», Фінляндія), на їх основі *ex tempore* на

кафедрі технології лікарських засобів ЗГМУ готували інтраназальний гель (із вмістом активної речовини 1 мг/мл); у низьких дозах він є агоністом β -естрогенових рецепторів, здатний підвищувати концентрацію HSP70 у мітохондріях та цитозолі головного мозку та міокарда при гострій ішемії внаслідок регуляції механізмів, в які залучено активні форми кисню (АФК) та відновлений глутатіон (АФК/GSH-залежні механізми) [15, 16].

3. Ангіолін ([*(S)*-2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат; (НВО «Фарматрон», Україна) – протиішемічний та ендотеліопротективний засіб; підвищує експресію HSP70 у мітохондріях та цитозолі головного мозку та міокарда при гострій та хронічній ішемії, алкогольні хвороби тощо. Також у відповідь на ішемію нормалізує експресію гена раннього реагування (*c-fos*) та васкулоендотеліального фактора росту (VEGF) [8].

4. Глутаредоксин («Sigma Aldrich», США). Цей тіоловий фермент впливає на GSH-залежні механізми експресії HSP70 у мітохондріях та цитозолі головного мозку при гострій церебральній ішемії [8].

5. Цереброкурин (розчин для ін'єкцій; «НІР», Україна). Препарат містить нейропептиди, білки S-100, рилін, NGF (не менше як 2 мг/мл) та амінокислоти. Він проявляє виражену нейропротективну дію, підвищує пластичність нейронів, стимулює експресію транскрипційних факторів, а також захисних білків, у тому числі, HSP1 (heat shock transcription factor 1 – білок, який кодується однойменним геном) [12].

Також для оцінки можливого ефекту було застосовано препарати з потенційною нейропротективною дією:

L-аргінін (42%-й розчин для ін'єкцій у флаконі, торгова назва тівортін, («Юрія-Фарм», Україна) – прекурсор NO, знижує вираженість порушень у нітроксидергічній системі при ішемії, виявляє ендотеліотропну та антиоксидантну дію [17].

Нікомекс (мексидол; 2-етил-6-метил-

3-гідроксипіриду сукцинат, розчин для ін'єкцій із вмістом активної речовини 50 мг/мл; («Лекхім-Харків», Україна). Це антиоксидантний засіб з нейропротективними властивостями, має здатність впливати на механізми ішемічної нейродеструкції, в яких беруть безпосередню участь АФК (АФК-залежні механізми) [18, 19].

Мілдронат (2-(2-карбоксиетил)-1,1,1-триметилгідрозин; 10%-й розчин для ін'єкцій в ампулах; (АТ «Grindex», Латвія). Препарат нормалізує енергетичний обмін, виявляє мітопротективну дію. В умовах гострої ішемії органів та тканин цей засіб підвищує експресію низки генів, що кодують ферменти ліпідного обміну. Відомо, що мілдронат зможе застосовуватися у комплексній терапії фетоплацентарної недостатності [5, 20].

HSF-1 (рекомбінантний, («Sigma Aldrich», США), – основний фактор транскрипції для білків теплового шоку в регуляції відповіді клітин на тепловий шок, а також на дію багатьох інших стресових факторів, таких як гіпоксичні умови та вплив токсичних речовин. HSF1 активує гени багатьох цитопротекторних білків, що беруть участь у реакціях теплового шоку, репарації ДНК, детоксикації [3].

Як референс-препарат було відібрано пірацетам (200 мг/мл, «Фармак», Україна). Пірацетам (2-оксо-1-піролідин ацетамід) – ноотропний засіб з вираженою протиішемічною дією [21]. Його вибір як референсного препарату зумовлений тим, що результатами доклінічних досліджень досить повно доведено молекулярно-біохімічний механізм ноотропної, нейропротективної та протиішемічної дії цього лікарського засобу та існує доказова база його клінічної ефективності [22]. Пірацетам включений до протоколів ведення хворих з гострими порушеннями мозкового кровообігу, черепно-мозковими травмами, а також з фетоплацентарною недостатністю та пренатальною енцефалопатією, в Україні, країнах Євросоюзу та США як базовий засіб нейропротекції [23].

Потомство (120 новонароджених щурів) було поділено на рівні за кількістю (по 10 тварин) групи: 1-ша група – здорові тварини від самиць з фізіологічно нормальною вагітністю, яким вводили фізіологічний розчин (5 мкл/г); 2-га група (контроль) – після ПГ, яким також щодня вводили фізіологічний розчин (5 мкл/г). Тварини з потомства щурів після ПГ увійшли до 3-ї – 12-ї груп, залежно від нейропротектора, що застосовували щодня внутрішньоочеревинно з 1-ї по 30-ту добу життя. Відповідно 3-тю групу склали тварини, яким вводили тіотриазолін (50 мг/кг); 4-ту групу – тамоксифен (0,1 мг/кг) інтраназально; 5-ту групу – ангіолін (50 мг/кг); 6-ту групу – глутаредоксин (200 мкг/кг); 7-му групу – цереброкурин (150 мкл/кг); 8-му групу – L-аргінін (200 мг/кг); 9-ту групу – нікомекс (100 мг/кг); 10-ту групу – мілдронат (50 мг/кг); 11-ту групу – HSF-1 (50 мг/кг); 12-ту групу – пірацетам (500 мг/кг). При підборі дозування керувалися інструкціями до застосування препаратів та даними попередніх досліджень [8, 12, 14–16].

Щурів виводили з експерименту на 30-ту та 60-ту доби життя під тіопенталовим наркозом (40 мг/кг). Для досліджень кров забирали з черевної артерії. Концентрації білка теплового шоку HSP70, нітротирозину та молекулярного маркера ураження центральної нервової системи матриксної металопротеїнази-8 (MMP-8) у плазмі крові визначали методом твердофазного імуноферментного аналізу ELISA із використанням тест-систем ELISA Kit. Для дослідження вмісту HSP70 (нг/мл) використовували тест-систему «AMP'D HSP70 high sensitivity» («Enzo», Швеція), а вміст MMP-8 (нг/мл) – тест-системи «Thermo Fisher Scientific» (Catalog#EHMMP8). Вміст нітротирозину (нмоль/мл) – із застосуванням тест-системи «Hycult Biotech» (Cat. No HK 501-02).

Статистичну обробку одержаних результатів проведено з використанням пакетів прикладних програм Statistica® для Windows 6.0 (StatSoft Inc., No AXXR712D833214-

FAN5), а також SPSS 16.0, Microsoft Office Excel 2010. У разі нормального розподілу достовірність міжгрупових відмінностей встановлювали з допомогою параметричного критерію t Стьюдента. Коли ж результати не відповідали законам нормального розподілу, порівняльний аналіз проводили за допомогою непараметричного U-критерію Манна-Вітні. Для порівняння незалежних змінних у більш ніж двох вибірках застосовували дисперсійний аналіз (ANOVA) при нормальному розподілі або критерії Краскела-Уолліса для розподілу, відмінного від нормального. Для всіх видів аналізу статистично значущими вважали відмінності при $P < 0,05$ (надійність 95%).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Після моделювання внутрішньоутробної гіпоксії було встановлено стійке підвищення вмісту нітрозину в крові одномісячних тварин у 5,5 раза, а у двомісячних – в 3,8 раза (табл. 1; 2). Отримані результати відповідають концепції пренатального пошкодження ЦНС, що відводить важливу роль оксидативному і нітрозативному стресу при пошкодженні нейронів у новонароджених, які зазнали дії внутрішньоутробної гіпоксії [5, 7]. Відомо, що гіперпродукція АФК і цитотоксичних форм монооксиду азоту (NO) на тлі антиоксидантної недостатності внаслідок окиснювальної модифікації білкових структур рецепторів, іонних каналів нейрона, порушення механізмів зворотного захоплення трансмітерів призводить до стійких порушень вищих функцій ЦНС (пам'ять, увага, здатність до навчання, аналіз отриманої інформації) у дітей, які перенесли ПГ [8]. Надлишок АФК і NO в антенатальному періоді може спричинити формування первинної мітохондріальної дисфункції, порушення енергетичного метаболізму головного мозку, низької біодоступності субстратів окиснення, енергодефіциту і, як правило, трансмітерний аутокоїдоз, ініціювання реакцій апоптозу та фероптозу тощо [5].

Слід відмітити стійке зниження експресії білка HSP70 після ПГ у одномісячних щурів у 5,6 раза, а у двомісячних – у 3,44 раза (див. табл. 1; 2). Раніше було встановлено, що ПГ призводить до пригнічення експресії мРНК HSP70 у сенсомоторній корі, а також до зниження концентрації HSP70 у цитозолі та мітохондріях головного мозку експериментальних тварин. Автори дійшли висновку, що ПГ викликає внутрішньоутробне програмування гена *hsp70*, котре супроводжується пригніченням його реакції на тепловий стрес та гальмування ендогенної цитопротекції у більш пізньому віці. Також було встановлено здатність HSP70 посилювати життєздатність нейронів в умовах гіпоксії та факт односпрямованої зміни вмісту HSP та HIF-білків у тканинах головного мозку щурів після ПГ. Зважаючи на ці дані, можна припустити, що HSP70 бере участь у регуляції сигнальних шляхів відповіді клітини на гіпоксичний стрес на рівні регуляції стабільності HIF-білка [8, 24].

Сімейство білків теплового шоку HSPs (heat shock proteins) вважають одним із найбільш вивчених факторів цитопротекції [25].

Вони відіграють роль внутрішньоклітинних шаперонів, що підтримують протеостаз клітин у нормі та у різних стресових умовах (гіпертермія, гіпоксія, оксидативний стрес, радіація тощо). Найбільший інтерес викликає білок HSP70 як важливий компонент системи ендогенної цито- та нейропротекції, який забезпечує процеси фолдингу, холдингу та транспорту синтезованих білків, а також їх деградацію як в умовах нормоксії, так й при стресіндукованій денатурації [21]. У відповідь на стрес, ішемію, гіпоксію тощо різко зростає вміст HSP70. При цьому його найбільша концентрація спостерігається у життєво важливих частинах клітин, а саме, ядерному та навколоядерному просторах, у мітохондріях, в ендоплазматичному ретикулумі, що свідчить про важливу роль HSP70 у захисті клітин від загибелі. У процесі відновлення роботи ядерних прерибосом концентрація HSP70 зменшується в ядрі клітин та підвищується – в цитоплазмі. Таким чином, вміст цього білка можна розглядати як маркер клітинного та тканинного пошкодження.

Гіперпродукція HSP70 у клітинах пригнічує розвиток аутофагії як альтернативного,

Таблиця 1. Вміст маркерів пошкодження центральної нервової системи у крові тварин після пренатальної гіпоксії (ПГ) та курсового застосування лікарських засобів (30-та доба життя; $M \pm m$, $n = 10$)

Група тварин і застосований препарат	Матриксна металопротеїназа-8, нг/мл	HSP70, нг/мл	3-нітротирозин, нмоль/мл
Інтактні тварини	0,64 ± 0,07	14,42 ± 0,21	4,5 ± 0,82
ПГ (контрольна група)	37,0 ± 1,29**	2,57 ± 0,12**	23,7 ± 1,23**
ПГ і тіотриазолін	3,6 ± 0,13*,**	2,27 ± 0,12**	14,1 ± 1,18*,**
ПГ і тамоксифен	3,42 ± 0,13*,**	4,2 ± 0,16*,**	18,2 ± 0,88*,**
ПГ і ангіолін	1,13 ± 0,07*,**	5,37 ± 0,17*,**	10,3 ± 0,87*,**
ПГ і глутаредоксин	1,63 ± 0,07*,**	5,03 ± 0,10*,**	9,22 ± 0,78*,**
ПГ і цереброкурин	1,83 ± 0,08*,**	6,63 ± 0,19*,**	10,5 ± 1,34*,**
ПГ і L-аргінін	2,43 ± 0,14*,**	5,76 ± 0,19*,**	18,4 ± 1,12*,**
ПГ і нікомексу	4,5 ± 0,15*,**	6,1 ± 0,18*,**	17,2 ± 1,12*,**
ПГ і HSF-1	1,2 ± 0,09*,**	6,07 ± 0,28*,**	10,2 ± 0,88*,**
ПГ і мілдронату	3,29 ± 0,13*,**	3,73 ± 0,15**	20,2 ± 1,85**
ПГ і пірацетаму	1,73 ± 0,14*,**	2,07 ± 0,17*,**	20,2 ± 1,21**

Примітки: тут і в табл. 2 *P < 0,05 відносно контролю; **P < 0,05 відносно значень інтактної групи

Таблиця 2. Вміст маркерів пошкодження центральної нервової системи у крові тварин після пренатальної гіпоксії (ПГ) та курсового застосування лікарських засобів (60-та доба життя; $M \pm m$, $n = 10$)

Група тварин і застосований препарат	Матриксна металопротеїназа-8, нг/мл	HSP70, нг/мл	3-нітротирозин, нМ/мл
Інтактні тварини	0,99 ± 0,06	14,9 ± 0,37	4,8 ± 0,77
ПГ (контрольна група)	7,3 ± 0,12**	4,33 ± 0,11**	18,2 ± 1,65**
ПГ і тіотриазолін	4,73 ± 0,18*,**	6,63 ± 0,13*,**	9,47 ± 1,14*,**
ПГ і тамоксифен	2,7 ± 0,13*,**	3,07 ± 0,10**	12,1 ± 1,07*,**
ПГ і ангіолін	2,5 ± 0,10*,**	8,07 ± 0,15*,**	6,23 ± 0,76*
ПГ і глутаредоксин	1,5 ± 0,091*	7,87 ± 0,19*,**	6,8 ± 0,67*
ПГ і цереброкурин	1,47 ± 0,10*,**	8,17 ± 0,22*,**	5,2 ± 0,62*
ПГ і L-аргінін	5,00 ± 0,28*,**	4,5 ± 0,19**	17,7 ± 1,35**
ПГ і нікомексу	2,73 ± 0,16*,**	3,23 ± 0,14**	11,2 ± 1,12*,**
ПГ і HSF-1	0,15 ± 0,02*,**	7,0 ± 0,15*,**	5,7 ± 0,47*
ПГ і мілдронату	0,75 ± 0,08*,**	6,33 ± 0,13*,**	16,4 ± 1,42**
ПГ і пірацетаму	7,08 ± 0,24**	3,5 ± 0,10**	15,4 ± 1,22*,**

більш «радикального» механізму клітинної відповіді на стрес [8, 25]. Літературні дані останніх років доводять пряму цитопротекторну дію HSP70, яка реалізується регулюванням процесів апоптозу та некрозу клітин, причому, він гальмує мітохондріальний та цитоплазматичний шляхи апоптозу. Так, HSP70 пригнічує перехід прокаспазу 9 в активну форму каспази 9 й порушує формування апоптосоми у цитоплазмі клітин. На тлі гіперекспресії HSP70 підвищується вміст антиапоптотичного білка Bcl-2, що перешкоджає виходу цитохрому з мітохондрій, та транслокації фактора, який індукуює апоптоз (AIF) в ядрі, попереджуючи апоптоз клітин. Білок HSP70 пригнічує TNF α -індукований апоптоз, а також розвиток Fas- та TRAIL- (TNF – related apoptosis-inducing ligand)-опосередкований апоптоз у різних типах клітин [25]. Таким чином, однією з терапевтичних стратегій для зменшення ураження ЦНС, що розвивається після ПГ, може бути нормалізація експресії HSP70.

Слід відмітити стійке та різке – у 57,8 раза – підвищення вмісту MMP-8 у крові в одномісячних щурів після внутрішньоутробної гіпоксії, а у двомісячних – у 7,37 раза (див.

табл. 1; 2), причому концентрація MMP-8 корелювала з постнатальним віком. MMP-8 є ферментом з молекулярною масою 75 кДа, який переважно експресується нейтрофілами. Вона є унікальним членом сімейства MMP (MMPs) через її виняткову експресію при нейрозапаленні [26], активується переважно прозапальними цитокінами, але, можливо, і бактеріальними протеазами за допомогою так званого «перемикача цистеїну», а також через утворення вільних радикалів. ПГ викликає аномальне зростання розмірів серця та розумову відсталість у потомства, а зміна активності MMP відіграє вирішальну роль у ремоделюванні тканин як серця, так і мозку [27]. Повідомлялося, що гіпоксія плоду призводить до загальної тенденції збільшення активності MMP-2, MMP-8 і MMP-9 під час фетального та неонатального періодів. ПГ стимулює утворення колагену за допомогою АФК або TGF- β , який може індукувати експресію генів профіброгенів, включаючи ті, що кодують колаген. MMP та ендогенні тканинні інгібітори металопротеїназ (TIMPs) можуть регулюватися на рівні транскрипції за допомогою епігенетичних механізмів (наприклад, метилювання ДНК та модифікація

гістонів) у відповідь на гіпоксію. MMP призводять до деструкції молекули колагену і зменшують його відкладення в тканинах. MMP-8 розглядається як перспективна мішень для нейропротекції. Вміст та, відповідно, активність MMPs у незрілому мозку підвищується під дією ПГ або неонатальної гіпоксії/ішемії, оскільки вони є основними агентами, що беруть участь у руйнуванні гематоенцефалічних бар'єрів після гіпоксичного впливу. Підвищення активності MMP-8 в амніотичній рідині пов'язане з несприятливим неонатальним результатом, зокрема, хронічним захворюванням легень, ураженням головного мозку [5].

Введення досліджуваних препаратів протекторної дії протягом 30 діб після народження експериментальним тваринам, що перенесли ПГ внутрішньоутробно, призводило до зниження різного ступеня та достовірності в плазмі крові концентрації нітротирозину та активності MMP-8 на тлі збільшення концентрації HSP70; ці зміни утримувалися й в наступні 30 діб (на 60-ту добу життя). Найбільш вираженою активністю протягом 30 і 60 діб життя тварин мали тіотриазолін, ангіолін, цереброкурин, глутаредоксин і HSF-1. Інші препарати виявляли ефект тільки відразу після закінчення прийому, а потім протягом наступних 30 діб їх захисна дія зменшувалася. Так, введення ангіоліну підвищувало вміст HSP70 вдвічі у одномісячних тварин і на 86% – у двомісячних ($P < 0,05$) на тлі зниження вмісту нітротирозину в 2,3 та 2,9 рази ($P < 0,05$) відповідно, та вмісту MMP-8 у 32,7 та 2,9 рази ($P < 0,05$) відповідно через місяць та 2 міс після народження тварин, які перенесли ПГ. Ангіолін виявляє властивості скавенджерів АФК і NO та позитивно впливає на експресію генів, що кодують синтез антиоксидантних ферментів супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази, здійснює регуляцію АФК/GSH-залежних механізмів експресії HSP70, сприяє підвищенню біодоступності

NO [9]. В умовах гіпоксії він здатний запускати і підтримувати роботу малат-аспартатного механізму внаслідок підвищення синтезу HSP і HIF та збільшувати продукцію АТФ, а також, за рахунок залишку L-лізину, що входить до складу цього препарату, підвищує афінитет ГАМК-рецепторів і знижує ексайтотоксичність [8, 24].

Введення пірацетаму не чинило помітного впливу на вміст HSP70 та нітротирозину в крові, але знижувало концентрацію MMP-8 у крові одномісячних тварин у 21 раз. Пірацетам відіграє особливу роль у регуляції обмінних процесів та кровообігу мозку плоду, що зумовлює можливість його використання для лікування наслідків ПГ у тканинах головного мозку. Препарат за умов гіпоксії підвищує синтез АТФ в анаеробних реакціях [28], але застосування його у дітей віком до року на тлі гіпоксії у ЦНС може спровокувати судомну реакцію та посилити прояви лактат-ацидозу [5]. Описано антиоксидантні властивості препарату, спрямовані на гальмування окисної модифікації білка [23, 24].

L-аргінін демонстрував ефективність (за впливом на досліджувані показники) лише у період курсу введення. Будучи прекурсором NO, він виявляє ендотеліопротективні, вазодилаторні та антиоксидантні властивості, що забезпечують йому певну ефективність при загрозі невиношування, затримці росту плоду та фетоплацентарній недостатності [5, 29]. Однак, як демонструють дані попередніх досліджень, відновлення продукції NO не впливає на експресію HSP70, хоча і є дослідження про NO-регуляцію вмісту HSP70 [3]; можливо, це пов'язано з його низькою біодоступністю при ішемії-гіпоксії та дефіциті відновлених тіольних сполук [8]. Також у L-аргініну нами було виявлено нестійкий самостійний антиоксидантний ефект.

Інтерес викликають результати застосування при ПГ антиоксидантів з цитопро-тективною дією – нікомексу та тіотриазоліну, які мали вплив на досліджувані показники як

у період введення, так і через 30 діб після закінчення курсу. Нікомекс здатний гальмувати окиснювальну модифікацію макромолекул, виявляє мембраностабілізуючі властивості, протиішемічний ефект, що пов'язаний з мітопротекцією та впливом на сукцинатоксидазний шунт [18]. Препарат діє на афінитет ГАМК у церебральних судинах і нейронах [8]. У цьому дослідженні було встановлено досить помірні його антиоксидантні властивості, а також відсутність вираженого впливу на експресію HSP70, що підтверджується й даними інших дослідників [19]. Тіотриазолін за рахунок особливості структури своєї молекули є сквенджером NO і АФК, регулює експресію NF- κ B, що може забезпечувати як значний антиоксидантний ефект, так й зниження активності MMP-8. Механізм впливу препарату на експресію HSP70 досить добре описаний у низці праць і пов'язаний із SH/SS-регуляцією активності транскрипційних факторів [14]. Тіотриазолін ефективно коригує дискоординовані зміни функціонування циклу Кребса, що виникають в умовах тканинної гіпоксії, за здатністю перетворення лактату в піруват та підвищення вмісту сукцинату, тіотриазолін перевершує референсний препарат пірацетам у 2-3 рази, сприяючи переходу некомпенсованого метаболічного ацидозу в компенсований [8].

Цереброкурин викликав збільшення концентрації HSP70 у крові тварин як у період введення, так і через 30 діб після закінчення курсу (у 2,5 рази і на 89% відповідно). Вміст нітротирозину через 30 діб після курсового введення препарату наближався до значень інтактної групи. Курсове введення цереброкуруну призводило до зниження в 20 разів вмісту MMP-8, і через 30 діб після припинення курсу концентрація цього маркера була нижчою від контрольних значень на 80%. Виявлені нами властивості цереброкуруну не суперечать даним інших дослідників, якими показана висока антиоксидантна активність препарату, що спрямована на підвищення експресії Мп-

СОД, нейропротективної та протиішемічної активності, що реалізується внаслідок прямої мітопротекції, активації синтезу HSP та HIF-білків й опосередкованої ними в умовах гіпоксії/ішемії активації компенсаторних шунтів енергії [6, 8].

Застосування тамоксифену підвищувало концентрації HSP70 та знижувало нітротирозин та ММЗ-8 як у період введення, так і через 30 діб після закінчення курсу лікування. Нейропротективна активність тамоксифену зумовлена, на нашу думку, активацією β -естрогенових рецепторів головного мозку та подальшим від'єднанням від останніх HSP70. Механізм цієї взаємодії пояснюється здатністю останнього утворювати комплекси з естрогеновими рецепторами, не пов'язаними з естрогенами, для підтримки їх у неактивному стані [15]. Тамоксифен забезпечує входження HSP70 всередину мітохондрії та мітопротективну дію, посилює експресію HSP70 внаслідок стимулюючого впливу на білковий фактор транскрипції – фактор теплового шоку (HSF) [8]. Препарат виявляє самостійну антиоксидантну дію через підвищення вмісту внутрішньомітохондріального глутатіону [16].

Введення мілдронату призводило до підвищення концентрації HSP70 та зниження вмісту ММЗ-8 як у період введення, так і через 30 діб після закінчення курсу лікування, не впливаючи при цьому на вміст нітротирозину. Мілдронат є інгібітором біосинтезу, транспорту та реабсорбції L-карнітину, запобігає накопиченню токсичних ацилкарнітинів у ішемізованій тканині та зміщує метаболізм клітин у бік підвищеного споживання глюкози, що є сприятливим при ішемічних станах. Препарат компенсаторно збільшує активність ацил-КоА-синтетази та карнітинпальмітоїлтрансферази I у мітохондріях, а також пероксисомальне окиснення жирних кислот [20], може збільшувати продукцію NO в ішемізованому міокарді та головному мозку за допомогою модифікації

пулів ефірів γ -бутиробетаїну [30], але ці механізми не забезпечують мілдронату вплив на експресію HSP70 та антиоксидантну дію.

Глутаредоксин, також відомий як тіолтрансфераза, є одним з найбільш значущих ферментів у процесах відновлення дисульфідів та деглутатіонілювання. В умовах окиснювального стресу він бере участь у процесі S-глутатіонілювання, водночас при зниженні вираженості окисдативного стресу каталізує реакцію деглутатіонілювання [6]. Глутаредоксин здійснює GSH-залежний протекторний вплив від подальшого окиснення сульфенової кислоти (Cys-SOH), що утворилася в результаті окиснення залишків цистеїну, в сульфіннову (Cys-SO₂H) та її відновлення, а також відновлення в білках внутрішньо- та міжмолекулярних дисульфідних зв'язків (-S-S-), підтримуючи редокс-активний стан ТДС. Дефіцит глутаредоксину призводить до порушення рівноваги SH/SS та режиму глутатіонілювання специфічних регуляторних білків, що спричинює зниження адаптаційних спроможностей клітини та ініціювання апоптозу [8]. Білки, що містять тіоли, є досить поширеними в клітинах; до них належать ферменти енергетичного обміну, ферменти сигнальних каскадів, чинники транскрипції (NF- κ B, HIF1 α , AP1). Введення глутаредоксину тваринам після ПГ призводило до підвищення концентрації HSP70 у плазмі крові на 95% в одномісячних та на 82% – у двомісячних тварин. Вміст нітротирозину на 30-ту та 60-ту добу був у 2,67 раза нижчим за показники контрольної групи. Також відзначалося стійке зниження концентрації MMP-8 – у 22,7 раза в одномісячних та на 79% – у двомісячних тварин. Відомо, що нейропротективна активність глутаредоксину в умовах гострої експериментальної ішемії головного мозку спрямована на активацію GSH-залежних ланок ендogenous нейропротекції. В наших попередніх працях показано, що цей ферментний засіб підвищує експресію мРНК

HSP70, HIF-1 α і HIF-3 α за умов гострої експериментальної ішемії головного мозку [8, 16].

HSF-1 є головним регулятором системи HSP, крім того, він бере участь в експресії багатьох генів у нормальних умовах життєдіяльності клітини та регулює процеси метаболізму вуглеводів, сплайсингу РНК, апоптозу, убіквітинілювання й деградації білків, детоксикації, транспорту малих молекул і внутрішньоклітинного сигналіну [21]. Виявлена його здатність захищати нейрони через HSP-незалежні механізми, при цьому HSF-1 не потребує попередньої тримеризації для виконання нейропротекторної функції [8]. Курсове введення HSF-1 збільшує концентрацію HSP70 у крові тварин після ПГ у 2,4 раза через місяць та на 61% через 2 міс життя при зниженні вмісту нітротирозину у 2,3 та 3,2 раза відповідно. Концентрація MMP-8 після застосування HSF-1 є нижчою за контроль у 30,8 раза у одномісячних тварин, а у 48 разів – у двомісячних, що є найменшим значенням вмісту цього ферменту серед результатів усіх груп спостереження. Відомо, що HSF-1 реалізує нейропротективну дію внаслідок активації ланок ендogenous нейропротекції – підсилення експресії мРНК HSP70, мРНК HIF-1 α , мРНК HIF-3 α , підвищення вмісту HSP70, що призводить до пригнічення окисдативного і нітрозативного стресів, до TNF α -індукованого апоптозу, а також розвитку Fas- і TRAIL-опосередкованого апоптозу. HSF-1 також усуває мітохондріальну дисфункцію внаслідок HSP70/GSH-залежних механізмів при церебральній ішемії [6, 8, 25].

ВИСНОВКИ

1. Хронічна ПГ призводить до підвищення вміст нітротирозину, MMP-8 та пригнічення синтезу HSP70, що свідчить про порушення механізмів регуляції процесів нейропротекції/нейродеструкції.

2. Введення лікарських препаратів пірацетаму, ангіоліну, тіотриазоліну, нікомексу,

L-аргініну, глутаредоксину, тамоксифену, мілдронату, HSF-1, цереброкуруину з 1-ї по 30-ту добу життя щурів після дії хронічної ПГ впливає по-різному на зміни вмісту нітритирозину, MMP-8 і HSP70, що свідчить про наявність у цих лікарських засобів нейропротективних властивостей.

3. Найбільш перспективними з точки зору нейропротекції в умовах моделювання хронічної ПГ є цереброкурин, ангіолін, HSF-1 та глутаредоксин, які перевершують інші досліджувані препарати за вираженістю впливу на показники, що вивчалися.

4. Отримані результати є експериментальним обґрунтуванням для подальшого вивчення досліджуваних препаратів, особливо ангіоліну та цереброкуруину, як перспективних нейропротективних засобів в комплексній терапії уражень ЦНС після хронічної ПГ у новонароджених.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.

I.F. Belenichev¹, O.G. Aliyeva¹, L.M. Gunina², N.V. Bukhtiyarova¹

EVALUATION OF THE EFFICIENCY OF THE NEUROPROTECTIVE DRUGS AFTER PRENATAL HYPOXIA

¹Zaporizhzhia State Medical University;

²National University of Physical Education and Sport of Ukraine, Kyiv;

e-mail: aliyeval@gmail.com

We studied the effect of angiolin, thiotriazoline, tamoxifen, glutaredoxin, cerebrocurin, mildronate, nicomex, L-arginine, HSF-1, and the reference drug piracetam on molecular markers of neurodestruction/neuroprotection in a model of chronic hemic prenatal hypoxia (PH) for experimentally substantiate the prospects for further study of these drugs as components of complex treatment of central nervous system damage at prenatal hypoxic. The concentration of HSP70, metalloproteinase-8 (MPP-8), and nitrotyrosine in the blood plasma of rats on days 30 and 60 after PH was studied by enzyme immunoassay.

It has been established that chronic PH leads to an increase in the concentration of nitrotyrosine, MMP8, and inhibition of the synthesis of HSP70, which indicates a violation of the mechanisms of neuroprotection/neurodestruction processes regulation. Course injections of the studied preparations led to an increase in the level of HSP70 in the blood serum of animals and a decrease in the concentration of nitrotyrosine and MPP-8 with a prolonged effect. Cerebrocurin (150 mg/kg), Angiolin (50 mg/kg), HSF-1 (50 mg/kg) and Glutaredoxin (200 µg/kg) most actively affected the parameters of the studied molecular markers, so they can be considered as promising neuroprotective agents means in complex therapy after PH. Key words: experimental prenatal hypoxia; central nervous system; neuroprotection; HSP70; HSP70 modulators.

REFERENCES

1. Li B, Concepcion K, Meng X, Zhang L. Brain-immune interactions in perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Neurobiology*. 2017;159:50-68.
2. Zhang X, Peng K, Zhang X. The function of the NMDA receptor in hypoxic-ischemic encephalopathy. *Front Neurosci*. 2020;14:567-665.
3. Zhao M, Zhu P, Fujino M, Zhuang J, Guo H, Sheikh IA, et al. Oxidative stress in hypoxic-ischemic encephalopathy: molecular mechanisms and therapeutic strategies. *Int J Mol Sci*. 2016;17(12):2078.
4. Mutinati M, Pantaleo M, Roncetti M, Piccinno M, Rizzo A, Sciorsci RL. Oxidative stress in neonatology. A review. *Report Domest Anim*. 2014;49:7-16.
5. Sazontova TG, Anchishkina NA, Zhukova, AG, Bedareva IV, Pylaeva EA, Kriventsova NA, et al. The role of reactive oxygen species and redox signaling in adaptation to changes in oxygen content. *Physiol J*. 2008; 54(2): 18-32.
6. Belenichev IF, Gorbacheva SV, Demchenko AV, Bukhtiyarova NV. The thioldisulfide balance and the nitric oxide system in the brain tissue of rats' subjected to experimental acute impairment of cerebral blood flow: the therapeutic effects of nootropic drugs. *Neurochem J*. 2014;1(8):24-7.
7. Trnski S, Nikolić B, Ilic K, Drlje M, Bobic-Rasonja M, Darmopil S, et al. The signature of moderate perinatal hypoxia on cortical organization and behavior: altered PNN-parvalbumin interneuron connectivity of the cingulate circuitries. *Front Cell Dev Biol*. 2022;10:810-980.
8. Belenichev IF, Mazur IA, Kucherenko LI, Nagornaya EA, Gorbacheva SV, Bidnenko AS. The molecular and ultrastructural aspects of the formation of mitochondrial dysfunction in the modeling of chronic cerebral ischemia: The mitoprotective effects of Angiolin. *Neurochem J*. 2016;10 (2):131-6.
9. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol*. 2014;24(10):R453-62.
10. Burlaka BS, Belenichev IF, Ryzhenko OI, Ryzhenko VP, Aliyeva OG, Makyeyeva LV, et al. The effect of intranasal

- administration of an IL-1b antagonist (RAIL) on the state of the nitroxydergic system of the brain during modeling of acute cerebrovascular accident. *Pharmacia*. 2021;8(68):665-70.
11. Gonchar OA, Mankovska IN. Mitochondrial thiol-disulfide system under acute hypoxia and hypoxic-hyperoxic adaptation. *Ukr Biochem J*. 2014;1(86):93-100.
 12. Chekman IS, Belenichev IF, Demchenko AV, Bobrova VI, Gorchakova NA, Kucherenko LI, Bukhtiyarova NV. Nootropics in complex therapy of chronic brain ischemia. *Sci Innovat*. 2014;10(4):61-75. [Ukrainian].
 13. Aliyeva OG. The effect of chronic prenatal hypoxia on the postnatal development of the CA1 zone of the rat brain hippocampus. Proceedings of the International scientific conference "New trends and unsolved issues in medicine"; 2022 Jul 29-30; Riga, Latvia: Baltija Publ; 2022;238-42.
 14. Belenichev IF, Vizir VA, Mamchur VI, Kuryata AV. The place of thiotriazolone in the gallery of modern metabolotropic drugs. *Zaporozh Med J*. 2019;21(112):118-28. [Ukrainian].
 15. Belenichev IF, Odnokoz OV, Pavlov SV, Belenicheva OI, Polyakova EN. The neuroprotective activity of tamoxifen and tibolone during glutathione depletion *in vitro*. *Neurochem J*. 2012;6:202-12.
 16. Pavlov SV, Belenichev IF. Molecular and biochemical aspects of the neuroprotective effect of the selective estrogen receptor modulator tamoxifen in a model of acute cerebral ischemia. *Neurochem J*. 2014;8(1):28-32.
 17. Ranjbar K, Nazem F, Nazari A. Effect of exercise training and L-arginine on oxidative stress and left ventricular function in the post-ischemic failing rat heart. *Cardio-vascul Toxicol*. 2016;16(2):122-9.
 18. Khaydarova DK, Khodjyeva DT, Bobokulov GD. Optimization of neuroprotective therapy of ischemic stroke in the acute period. *Eur J Mol Clin Med*. 2020;7(3):3720-3.
 19. Kolomiychenko SO, Chabanovych NB, Solovyan IV, Rozuvan OV. The use of the domestic drug Nikomex to reduce post-narcotic depression. *Pract Phys*. 2019;8(1):50-2.
 20. Berlato DG, Bairros AV. Meldonium: Pharmacological, toxicological, and analytical aspects. *Toxicol Res Appl*. 2020;4:1-18.
 21. Baird NA, Turnbull DW, Johnson EA. Induction of the heat shock pathway during hypoxia requires regulation of heat shock factor by hypoxia-inducible factor-1. *J Bio Chem*. 2007;281(50):38675-81.
 22. Sanossian N, Saver J. Neuroprotection for acute brain ischemia. Stroke prevention and treatment: An evidence-based approach. Cambridge: Cambridge Univ Press; 2020. p. 214-38.
 23. Winblad B. Piracetam: a review of pharmacological properties and clinical use. *CNS Drug Rev*. 2005;11:169-82.
 24. Belenichev, EG Aliyeva, OM Kamyshny, NV Bukhtiyarova, VP Ryzhenko, NO Gorchakova. Pharmacological modulation of endogenous neuroprotection after experimental prenatal hypoxia IF. *Neurochem J*. 2022;16(1):68-75.
 25. Kim JY, Barua S, Huang MY, Park J, Yenari MA, Lee JE. Heat shock protein 70 (HSP70) induction: Chaperonotherapy for neuroprotection after brain injury. *Cells*. 2020;2(9):2020.
 26. Tong W, Zhang L. Fetal hypoxia and programming of matrix metalloproteinases. *Drug Discovery Today*. 2012;17(3-4):124-34.
 27. Lodge KM, Cowburn AS, Li W, Condliffe AM. The impact of hypoxia on neutrophil degranulation and consequences for the host. *Int J Mol Sci*. 2020;21(4):1183.
 28. Keil U, Scherping I, Hauptmann S, Schuessel K, Eckert A, Müller WE. Piracetam improves mitochondrial dysfunction following oxidative stress. *Br J Pharmacol*. 2006;147(2):199-208.
 29. Hirfanoglu I, Turkyilmaz C, Turkyilmaz Z, Onal E, Soylemezoglu F, Karabulut R, Atalay Y. Neuroprotective effect of L-arginine in a neonatal rat model of hypoxic-ischemia. *Int J Neurosci*. 2019;11(129):6794.
 30. Demir D, Bektasoglu PK, Koyuncuoglu T, Kandemir C, Akakind D, Yüksel M, Çelikoglu E, Yegen BÇ, Gürer B. Neuroprotective effects of mildronate in a rat model of traumatic brain injury. *Injury*. 2019;10(50):1586-92.

*Матеріал надійшов
до редакції 05.10.2022*