

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ  
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА  
«ІНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ»

**БІЛА ЮЛІЯ ВОЛОДИМИРІВНА**

УДК 615.21: 616.831-005.4-092.9

**ФАРМАКОЛОГІЧНА МОДУЛЯЦІЯ NSP70 – ОПОСЕРЕДКОВАНИХ  
МЕХАНІЗМІВ НЕЙРОПРОТЕКЦІЇ В УМОВАХ ЦЕРЕБРАЛЬНОЇ ІШЕМІЇ**

14.03.05 - фармакологія

Автореферат  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ – 2020

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Запорізькому державному медичному університеті, м. Запоріжжя.

**Науковий керівник:** доктор біологічних наук, професор  
**Бленічев Ігор Федорович**,  
Запорізький державний медичний університет,  
м. Запоріжжя, завідувач кафедри фармакології та  
медичної рецептури

**Офіційні опоненти:** доктор медичних наук, професор  
**Супрун Еліна Владиславівна**,  
Інститут підвищення кваліфікації спеціалістів  
фармації Національного фармацевтичного  
університету МОЗ України, м. Харків, професор  
кафедри загальної фармації та безпеки ліків

доктор медичних наук, доцент  
**Нефьодов Олександр Олександрович**,  
Державний заклад «Дніпропетровська медична  
академія Міністерства охорони здоров'я  
України», м. Дніпро, професор кафедри загальної  
та клінічної фармації

Захист відбудеться «08» липня 2020 р. о 13-00 годині, на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.550.01 при ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», за адресою: 03057, м. Київ, вул. Антона Цедіка, 14.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», за адресою: 03057, м. Київ, вул. Антона Цедіка, 14.

Автореферат розісланий «   » \_\_\_\_\_ 2020 року.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради Д 26.550.01,  
кандидат біологічних наук

І.В. Данова

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Проблема інсультів в країнах Євросоюзу, Північної Америки і Японії продовжує залишатися достатньо актуальною [Мищенко Т.С., 2017; Thrift A.G. et al, 2017]. Незважаючи на певні успіхи, що були досягнуті в лікуванні мозкових інсультів, і великий арсенал засобів (тромболітики, антикоагулянти, первинні та вторинні нейропротектори, ноотропи та ін.) – ця проблема залишається все ще достатньо актуальною [Зозуля І.С. та співавт., 2015; В. Norrving et al., 2019]. Відомо, що в основі механізмів пошкодження нейронів лежить оксидативний стрес, що індукується «глутаматною ексайтотоксичністю» і гіперпродукцією NO, на фоні зниження функціональної активності антиоксидантної системи, мітохондріальної дисфункції, енергодефіциту, вивільнення з мітохондрій проапоптичних білків і ініціації нейроапоптозу [Беленічев І.Ф., 2014-2019; Khoshnam. S.E. et al., 2017].

В даний час розглядається роль ендогенної нейропротекції і її інтермедіата – HSP<sub>70</sub> в регуляції механізмів виживання нейронів в умовах церебральної ішемії. HSP<sub>70</sub> виконує шаперону функцію і приймає участь в регуляції процесів росту, розвитку, переносу генетичного матеріалу, сигнальній передачі, клітинній загибелі [Mauger M.P., 2013; Гарбуз Д.Г. та співавт., 2019]. Нейропротективні властивості HSP<sub>70</sub> були підтверджені на різноманітних моделях ішемічних пошкоджень *in vitro* та *in vivo* [Yenari M.A., 2013; Горбачова С.В. та співавт., 2017; Kim J.Y., 2018]. Нейропротективний ефект HSP<sub>70</sub> в умовах ішемії пояснюється його прямою антиапоптичною, антиоксидантною активністю, впливом на тіол-дисульфідну систему головного мозку [Павлов С.В., 2016; Беленічев І.Ф., 2017]. Існують роботи, які присвячені вивченню позитивного впливу HSP<sub>70</sub> на енергетичний метаболізм головного мозку в умовах церебральної ішемії, що реалізується за рахунок прямої мітопротективної дії, а також шляхом підвищення продукції АТФ в компенсаторних цитозольно-мітохондріальних шунтах [Беленічев І.Ф., Павлов С.В., 2014-2019]. HSP<sub>70</sub> стабілізує і пролонгує час «життя» HIF-1 $\alpha$ , який, в свою чергу, активує і регулює роботу малат-аспартатного човникового механізму [Беленічев І.Ф., Павлов С.В., 2014-2019; Madan E. et al., 2019]. Встановлено, що рівень експресії HSP<sub>70</sub> в головному мозку визначає виразність неврологічних порушень при моделюванні ГПМК у лабораторних тварин [Беленічев І.Ф., 2014-2019; Горбачова С.В., 2015].

Таким чином, розробка нових підходів до нейропротекції шляхом створення засобів – позитивних модуляторів HSP<sub>70</sub> є важливим завданням сучасної фармакології. Особливий інтерес в цьому відношенні представляють засоби, що мають високий нейропротективний потенціал - тамоксифен [Belenichev I. F., 2014], мелатонін [Carloni S., 2016], глутамін [Luo L. L. et al., 2019] і фактор теплового шоку-1 (HSF-1). Однак, механізми нейропротективної дії тамоксифену, глутаміну і мелатоніну до кінця не вивчені, також невідомі їх HSP<sub>70</sub>-залежні ланки, а нейропротективна дія

HSF-1 взагалі не вивчалась. Наведені дані і визначають актуальність даного дослідження.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертація виконана відповідно до плану наукових досліджень Запорізького державного медичного університету і є фрагментом науково-дослідних робіт кафедри фармакології та медичної рецептури ЗДМУ «Молекулярно-біохімічні механізми формування мітохондріальної дисфункції нейронів головного мозку за умов гострої церебральної ішемії: нові мішені для нейропротекції» (№ держ. реєстрації 0113U000797; 2013-2015 рр.) та «HSP<sub>70</sub>/HIF-1 $\alpha$ -опосередковані механізми ендогенної нейропротекції: розробка підходів до її фармакологічної регуляції» (№ держ. реєстрації 0117U000658; 2017-2020 рр.).

**Мета і задачі дослідження.** Експериментальне обґрунтування використання тамоксифену, мелатоніну, глутаміну та HSF-1 в терапії гострого порушення мозкового кровообігу шляхом встановлення їх впливу на молекулярні HSP<sub>70</sub>-опосередковані механізми формування ланок нейро-деструкції та ендогенної нейропротекції в умовах церебральної ішемії.

Для реалізації поставленої мети необхідно було вирішити наступні задачі:

1. Визначити середньоєфективну дозу HSF-1 на моделі церебральної ішемії.
2. Дослідити нейропротективну дію тамоксифену, мелатоніну, глутаміну та HSF-1 *in vitro* при додаванні токсичних доз глутамату по впливу на показники АФГ, КФГ, СОД, глутатіону відновленого, глутатіонредуктази, глутатіонтрансферази, HSP<sub>70</sub>.
3. Вивчити вплив тамоксифену, мелатоніну, глутаміну та HSF-1 на морфо-функціональні показники нейронів сенсомоторної кори і вираженість неврологічного дефіциту у експериментальних тварин в гострому періоді ГПМК.
4. Дослідити дію тамоксифену, мелатоніну, глутаміну та HSF-1 на рівень маркерів оксидативного і нітрозативного стресу (супероксиддисмутази, АФГ, КФГ, нітротирозину) і активність показників тіолдисульфідної системи (глутатіону відновленого, глутатіону окисненого, глутатіонредуктази, глутатіонтрансферази) при експериментальному ГПМК.
5. Вивчити дію тамоксифену, мелатоніну, глутаміну та HSF-1 на функціональну активність мітохондрій (ступінь відкриття мітохондріальної пори і мембранний потенціал), енергетичний обмін (АТФ, АДФ, АМФ, ЕЗ, ЕП, ІФ, ТКД, лактат, піруват, малат, малатдегідрогеназа) головного мозку тварин з ГПМК.
6. Визначити роль тамоксифену, мелатоніну, глутаміну та HSF-1 в механізмах ендогенної нейропротекції за впливом на синтез білку HSP<sub>70</sub>, експресію мРНК HSP<sub>70</sub>, мРНК Hif-1 $\alpha$  і Hif-3 $\alpha$  в тканинах головного мозку експериментальних тварин при ГПМК.

*Об'єкт дослідження:* HSP<sub>70</sub>-опосередковані механізми ендогенної нейропротекції/нейродеструкції головного мозку при гострому порушенні мозкового кровообігу.

*Предмет дослідження:* корекція порушень механізмів ендогенної нейропротекції в умовах гострої ішемії головного мозку за допомогою тамоксифену, мелатоніну, HSF-1 і глутаміну.

*Методи дослідження:* фармакологічні, біохімічні, морфометричні, імуноферментні, молекулярно-генетичні, математичної статистики і системного аналізу.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Встановлено, що нейропротективна дія тамоксифену, мелатоніну, HSF-1 і глутаміну спрямована на підвищення в ішемізованому головному мозку концентрації ендогенного нейропротектора – білку теплового шоку 70 кДа (HSP<sub>70</sub>), який призводить до підсилення компенсаторно-приспосувальних механізмів стійкості нейронів до ішемії.

Вперше встановлено, що введення тамоксифену, мелатоніну, HSF-1 і глутаміну в дослідах *in vitro* підвищує концентрацію HSP<sub>70</sub>, а в умовах гострої експериментальної ішемії головного мозку підвищує експресію мРНК HSP<sub>70</sub>, Hif-1 $\alpha$  і Hif-3 $\alpha$  і концентрацію білку HSP<sub>70</sub>.

Встановлено, що курсове введення тамоксифену, мелатоніну, HSF-1 і глутаміну нормалізує енергетичний метаболізм ішемізованого головного мозку за рахунок позитивної модуляції HSP<sub>70</sub>/HIF-1 $\alpha$ -залежних механізмів активації і регуляції малат-аспартатного човникового механізму.

Встановлено, що тамоксифен, мелатонін, HSF-1 і глутамін обмежують деструктивний вплив оксидативного і нітрозативного стресу в ішемізованому головному мозку за рахунок HSP<sub>70</sub>/GSH – залежних механізмів активації антиоксидантної системи.

Вперше встановлено, що курсове введення тамоксифену, мелатоніну, HSF-1 і глутаміну підвищує щільність нейронів сенсомоторної зони кори, гальмує нейроапоптоз, підвищує вміст РНК в нейронах сенсомоторної зони кори і, як наслідок, зменшує прояви неврологічних і когнітивних порушень у експериментальних тварин.

Новизна досліджень підтверджена патентом України на корисну модель №128150 «Спосіб фармакологічної модуляції ендогенної нейропротекції в експерименті».

**Практичне значення одержаних результатів.** На підставі проведених досліджень експериментально обґрунтована фармакологічна модуляція експресії HSP<sub>70</sub> як перспективний напрямок нейропротекції в умовах гострого порушення мозкового кровообігу.

Отримані дані є експериментальним обґрунтуванням для застосування тамоксифену, мелатоніну і глутаміну в комплексній терапії гострого порушення мозкового кровообігу в якості засобів первинної (спрямованої на зменшення глутаматної ексайтотоксичності) і вторинної (спрямованої на зниження нейроапоптозу, нормалізацію енергетичного метаболізму) нейропротекції.

Експериментальні дані обґрунтовують перспективу подальших досліджень HSF-1 з метою створення на його основі лікарського засобу з нейропротективною дією.

Експериментально встановлені механізми дії модуляторів HSP<sub>70</sub> можуть сприяти створенню нового покоління ефективних лікарських препаратів, які надають спрямований вплив на ключові ланки-мішені механізмів ендогенної нейропротекції в умовах гострого порушення мозкового кровообігу.

Результати досліджень впроваджені в навчальну та наукову роботу кафедр фармакології Запорізького державного медичного університету, Державного закладу "Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України", Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету Міністерства охорони здоров'я України, Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця, Буковинського державного медичного університету, Харківського національного медичного університету.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертація є особистою науковою працею автора. Робота виконана на базі Навчального медико-лабораторного центру Запорізького державного медичного університету (начальник – д.мед.н., професор Абрамов А.В.) та на кафедрі фармакології та медичної рецептури (завідувач – д.б.н., професор Беленічев І.Ф.). Разом з науковим керівником визначено мету і завдання дослідження, розроблено методичні підходи для виконання експериментальної частини дисертації. Дисертантом самостійно проведено патентно-інформаційний пошук, освоєна і відтворена модель гострого порушення мозкового кровообігу по типу ішемічного інсульту. Самостійно виконана оцінка нейропротективної активності модуляторів HSP<sub>70</sub>: тамоксифену, мелатоніну, HSF-1 і глутаміну в умовах гострого порушення мозкового кровообігу. Дисертантка самостійно провела біохімічні, хроматографічні дослідження з вивчення показників оксидативного і нітрозативного стресу, енергетичного метаболізму, стану тіол-дисульфідної системи головного мозку в умовах гострого порушення мозкового кровообігу, а також всі морфометричні дослідження, провела статистичну обробку отриманих даних, узагальнила і проаналізувала результати досліджень, сформулювала висновки.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення та висновки дисертаційної роботи оприлюднені та обговорені на Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2014» (Запоріжжя, 2014); Восьмій національній науково-практичній конференції з міжнародною участю «Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека» (Смоленск, 2014); Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2015» (Запоріжжя, 2015); Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів «Здобутки теоретичної медицини в практику охорони здоров'я – 2016» (Запоріжжя, 2016);

Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2016» (Запоріжжя, 2016); Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю пам'яті професора В.В. Дунаєва «Фундаментальні та клінічні аспекти фармакології» (Запоріжжя, 2016); Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2017» (Запоріжжя, 2017); V-му Національному з'їзді фармакологів України (Запоріжжя, 2017); Міжнародній науково-практичній конференції «Теоретичні та практичні аспекти розвитку науки і освіти» (Львів, 2020).

**Публікації.** За результатами досліджень опубліковано 17 наукових робіт, у тому числі 6 статей у фахових журналах, 3 з яких реферуються міжнародними науково метричними базами даних РІНЦ, Index Copernicus, International Google Scholar, Ulrich`s Periodical Directory, 10 тез у матеріалах з'їздів, конгресів та конференцій з міжнародною участю. Одержано 1 патент України.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота викладена на 166 сторінках друкованого тексту та складається з анотацій, списку друкованих праць, основної частини, яка включає вступ, огляд літератури, опис матеріалів і методів дослідження, 3 розділи власних досліджень, аналіз та узагальнення результатів, висновки, список використаних джерел та додатки. Робота проілюстрована 13 рисунками, 22 таблицями. Список використаних джерел містить 245 найменувань, з них - 124 кирилицею та 121 латиницею.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Матеріали і методи.** Експериментальна частина роботи була виконана на 250 статевозрілих щурах лінії Вістар масою 180-230 г, 40 чотирьохтижневих щурятах. Експериментальні тварини були отримані з ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України». Тривалість карантину (акліматизаційного періоду) для всіх тварин становила 14 днів. Тварин, які не відповідають критеріям, було виключено з дослідження під час карантину. Усі досліди проводили у відповідності до законодавства України [Закон України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» / Відомості Верховної Ради України. – 2006. - № 27. – С. 230], правил Європейської Конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних дослідженнях та з іншою науковою метою [European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Council of Europe, Strasbourg, 1986. – 53 p.]. Протоколи досліджень і їх результати затверджені рішенням Комісії з біоетики ЗДМУ (протокол № 4 від 5 березня 2019 р.). Всі експерименти проведені на базі Навчального медико-лабораторного центру ЗДМУ, атестованому МОЗ України (свідоцтво про реєстрацію № 033/18 від 26.12.2018 р., чинне до 25.12.2023 р.).

Відтворення гострого порушення мозкового кровообігу (ГПМК) у

тварин проводили шляхом двосторонньої незворотної оклюзії загальних сонних артерій під тіопенталовим наркозом (40 мг/кг) [Чекман І.С., 2016]. Щодня протягом 4 діб (гострий період церебральної ішемії) оцінювали тяжкість неврологічних розладів у балах за шкалою stroke-index [С.Р. McGraw, 1977; Чекман І.С. та співавт., 2016], реєстрували загибель та розраховували відсоток летальності тварин в усіх експериментальних групах.

Досліджувані препарати вводили у вигляді суспензії, стабілізованої Твін-80 (PANREAS, Іспанія) за допомогою металевого зонду одразу після виходу тварин з наркозу, 1 раз на добу протягом усього експерименту – тамоксифен (ТОВ Фармацевтична компанія «Здоров'я»), 1 мг/кг; мелатонін (ПАТ «Київський вітамінний завод»), 5 мг/кг; глутамін (Sigma-Aldrich, США), 25 мг/кг. Препарат порівняння пірацетам (ЗАТ НВЦ «Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод») вводили за тією ж схемою у дозі 500 мг/кг [Беленічев І.Ф., 2006]. ЕД<sub>50</sub> фактору теплового шоку-1 (HSF-1) (Sigma-Aldrich, США) (200 мкл/кг) визначали експериментально на моделі гострої церебральної ішемії (200 мкл/кг). Контрольна та умовнооперована група тварин одержувала фізіологічний розчин з додаванням Твіну-80. Тварин виводили з експерименту під тіопенталнатрієвим наркозом (40 мг/кг). Для лабораторних досліджень головний мозок (кора великих півкуль та гіпокамп) подрібнювали в рідкому азоті до порошкоподібного стану і гомогенізували в 10-кратному об'ємі середовища при (+2°C), що містить (в ммольях): сахарози – 250, трис-НСІ-буферу – 20, ЕДТА – 1 (рН 7,4). Цитоплазматичну і мітохондріальну фракції виділяли методом диференційного центрифугування за Weinbach [Сереброва В.Ю., 2008; Чекман І.С. та співавт., 2016] на рефрижераторній центрифугі «Sigma 3-30к» (Німеччина) при 14000 g 20 хв при +4°C. До проведення лабораторних досліджень отриманий матеріал зберігали при температурі -70°C. Відтворення нейродеструкції *in vitro* проводили шляхом внесення в нейрональну суспензію токсичних доз глутамату 100 мкмоль/л (моделювання глутаматної ексайтотоксичності), з подальшою інкубацією протягом 60 хвилин при 37°C [Чекман І.С. та співавт., 2016]. Досліджувані препарати: мелатонін, глутамін, тамоксифен та HSF-1 вносили в нейрональну суспензію в дозі 10<sup>-5</sup>М за 15 хвилин до додавання токсичного агенту [Губський Ю.І., 2002; Чекман І.С. та співавт., 2016]. Оцінку показників енергообміну тканин головного мозку визначали за вмістом аденілових нуклеотидів (АТФ, АДФ, АМФ) методом тонкошарової хроматографії [Чекман І.С., 2016]. Направленість та інтенсивність гліколізу оцінювали спектрофотометрично за рівнем пірувату (метод Умбрайт) та лактату (метод Хохорста); активність окиснення в циклі трикарбонових кислот – за вмістом малату (метод Хохорста) і активністю НАД-залежної малатдегідрогенази [Чекман І.С. та співавт., 2016]. Функціональний стан мітохондрій оцінювали фотометрично на спектрофотометрі Libra S32PC по відкриванню мітохондріальної пори (МП) та мітохондріальному

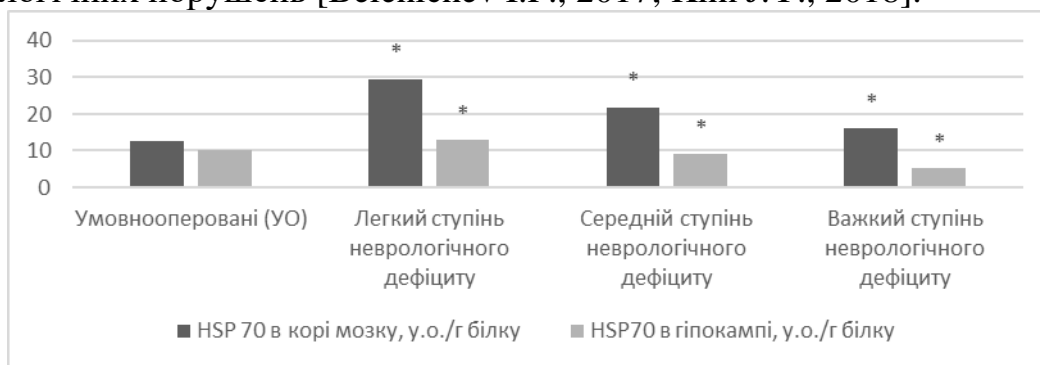


трансмембранному потенціалу ( $\Psi$ ) [Чекман І.С. та співавт., 2016]. Для з'ясування глибини патологічного процесу і ступеню розвитку оксидативного стресу в тканині головного мозку визначали вміст продуктів окислювальної модифікації білку (ОМБ) за реакцією взаємодії окислених амінокислотних залишків із 2,4-динітрофенілгідразином (2,4-ДНФГ) (Чекман І.С. та співавт., 2016). Стан тіол-дисульфідної системи головного мозку оцінювали за вмістом відновленого глутатіону (GSH) та окисненого глутатіону (GSSG) флуориметрично з орто-фталевим ангідридом на флуориметрі Quantech [Чекман І.С. та співавт., 2016]. Активність глутатіонредуктази (GR) і глутатіонтрансферази (GST) вимірювали спектрофотометрично [Чекман І. С. та співавт., 2016] на спектрофотометрі Libra S32PC. Визначення активності супероксиддисмутази проводили спектрофотометрично [Чеварі С.І. 1988; Чекман І.С. та співавт., 2016]. Нітротирозин визначали методом твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA) на повноплашковому імуноферментному аналізаторі (SIRIO S, Італія) з використанням тест-систем «Nitrotyrosine ELISA Kit» («HyCult biotechnology» (Cat. № НК 501-02). Вміст HSP<sub>70</sub> білку в тканинах мозку визначали методом Вестерн-блот аналізу, а також за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA) на повноплашковому імуноферментному аналізаторі (SIRIO S, Італія) з використанням тест-систем AMP'D® HSP70 high sensitivity ELISA kit, Enzo (Швеція). Для оцінки рівня експресії мРНК Hsp<sub>70</sub>, Hif-1 $\alpha$ , Hif-3 $\alpha$  використовували метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ЗТ-ПЛР) ампліфікатор CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США). Визначення загального білку проводили за методом Лоури [Lowry et al., 1951].

Для дослідження морфофункціонального стану нейронів на ротаційному мікротомі виготовляли зрізи IV-V слоїв сенсомоторної зони фронтальної кори товщиною 5 мкм. Зрізи депарафінували і фарбували галоціанінхромовими галунами по Ейнарсону для специфічного виявлення РНК. Морфометричні дослідження проводили на мікроскопі Axioskop (Zeiss, Германія). Статистична обробка даних наукових досліджень проводилась з використанням пакету програм «STATISTICA® for Windows 6.0». Перед застосуванням статистичних критеріїв проводилась перевірка гіпотези про нормальність розподілу випадкових величин (за критерієм Shapiro-Wilk). За умов нормального розподілу, встановлення достовірності міжгрупових відмінностей по отриманим даним експериментів проводилося за допомогою параметричного t-критерію Стьюдента. У випадку, коли дані не відповідали законам нормального розподілу, порівняльний аналіз проводили за допомогою непараметричного U-критерію Мана-Уїтні. Порівняння груп за якісною ознакою проводили за допомогою критерію  $\chi^2$  з аналізом таблиць спряженості. Для порівняння незалежних змінних у більш ніж двох вибірках застосовували дисперсійний аналіз (ANOVA) при нормальному розподілі, або критерій – Kruskal-Wallis для розподілу, відмінного від нормального. Для

аналізу закономірностей зв'язку між окремими показниками проведений кореляційний аналіз за допомогою коефіцієнта кореляції Пірсона або Спірмена. Для всіх видів аналізу статистично значущими вважали відмінності  $p < 0,05$  (95%).

**Результати дослідження та їх обговорення.** Встановлено тісний зворотній кореляційний зв'язок між тяжкість неврологічного дефіциту і концентрацією HSP<sub>70</sub> як в корі головного мозку (коефіцієнт Пірсона  $r = -0,91$ ), так і в гіпокампі (коефіцієнт Пірсона  $r = -0,81$ ) тварин з ГПМК. Встановлено, що гіпокамп більш чутливий до ішемічного пошкодження, оскільки в нейронах цієї області спостерігалось виражене зниження концентрації HSP<sub>70</sub> порівняно з зоною кори, де рівень білку шаперону 70 помірно підвищувався в залежності від ступеня неврологічного дефіциту (рис. 1). Білки теплового шоку HSP<sub>70</sub> є невід'ємними учасниками механізмів ендогенної нейропротекції, оскільки на тлі їх дефіциту спостерігається інтенсифікація процесів нейродеструкції і розвиток незворотних неврологічних порушень [Belenichev I.F., 2017; Kim J.Y., 2018].



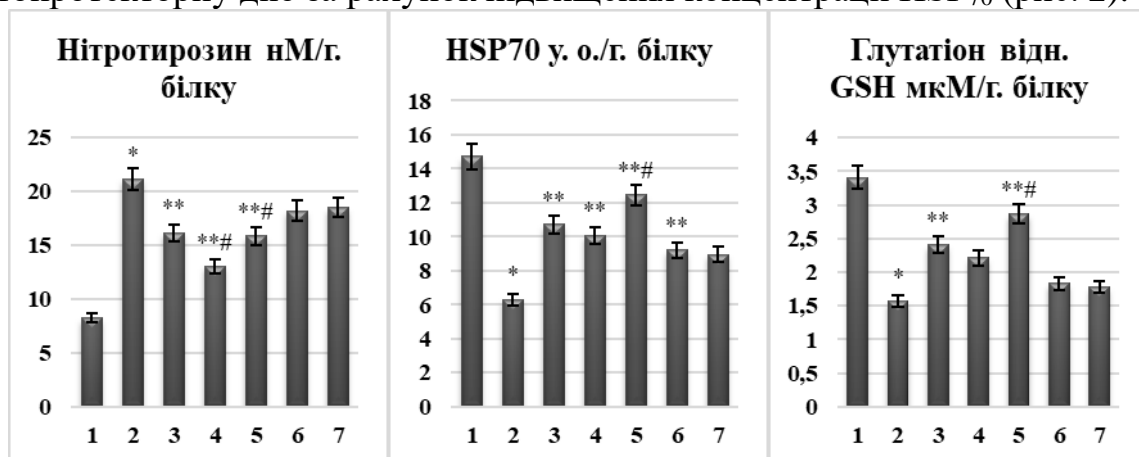
Примітка: \* -  $p < 0,05$  відносно УО.

Рис. 1. Рівень HSP<sub>70</sub> в цитозольній фракції кори мозку і гіпокампу щурів з моделюванням гострого порушення мозкового кровообігу ( $M \pm m$ ), ( $n=10$ ), (4 доба).

В ході роботи на моделі гострої церебральної ішемії встановлена середньоефективна доза фактору теплового шоку HSF-1, що становить 200 мкл/кг.

Для попереднього підтвердження нейропротективної дії досліджуваних препаратів були проведені дослідження *in vitro* на моделі глутаматної ексайтотоксичності, відтвореної шляхом внесення токсичних доз глутамату (100 мкМ) в нейрональну суспензію. Встановлено, що за даних умов спостерігається накопичення маркерів оксидативного стресу (АФГ і КФГ в 3,4 ( $p < 0,05$ ) і 3,5 ( $p < 0,05$ ) рази, нітротирозину на 156,7% ( $p < 0,05$ ) більше відносно інтактної суспензії нейронів), з одночасним зменшенням концентрації ендогенного нейропротектора HSP<sub>70</sub> на 57,2% ( $p < 0,05$ ) і пригніченням ТДС (GSH, GR і GST зменшувались на 54% ( $p < 0,05$ ), 35,7% ( $p < 0,05$ ) і 36,7% ( $p < 0,05$ )) (рис. 2). Був встановлений прямий тісний кореляційний зв'язок між концентрацією білку-шаперону 70 і GSH (коефіцієнт Спірмена  $r=0,92$ ).

Попереднє внесення досліджуваних препаратів в нейрональне середовище призводило до достовірного ( $p < 0,05$ ) підвищення рівня HSP<sub>70</sub> (HSF-1 на 97,6%, тамоксифен на 70,2%, мелатонін на 60%, глутамін на 46%), підвищення рівня GSH (HSF-1 на 82,2%, тамоксифен на 53,5%, мелатонін на 40,8%, глутамін на 16,6%) і активації роботи GR і GST (HSF-1 на 45,4 і 43,5%, тамоксифен на 20,7 і 19,5%, мелатонін на 16,7 і 26,4%, глутамін на 10,5 і 14,3%), як наслідок розвиток оксидативного стресу значно гальмувався, про що свідчить зниження рівню нітротирозину (HSF-1 на 25,1%, тамоксифен на 23,6%, мелатонін на 38,3%, глутамін на 13,9%) (рис. 2). Таким чином, встановлено, що досліджувані препарати при моделюванні глутаматної ексайтотоксичності в суспензії нейронів *in vitro* виявляють цитопротекторну дію за рахунок підвищення концентрації HSP<sub>70</sub> (рис. 2).



Примітки:

$p$  – рівень статистичної значущості при порівнянні вибірок за допомогою дисперсійного аналізу ANOVA (тест Тьюкі): \* –  $p < 0,05$  відповідно до інтактної групи, \*\* –  $p < 0,05$  відповідно до контрольної групи, # –  $p < 0,05$  відповідно до групи, яка отримувала мексидол.

1) Інтактна нейрональна суспензія; 2) Контрольна нейрональна суспензія з внесенням глутамата (100 мкМ); 3) Нейрональна суспензія з внесенням глутамата (100 мкМ) + тамоксифен ( $10^{-5}$ ); 4) Нейрональна суспензія з внесенням глутамата (100 мкМ) + мелатонін ( $10^{-5}$ ); 5) Нейрональна суспензія з внесенням глутамата (100 мкМ) + HSF-1 ( $10^{-5}$ ); 6) Нейрональна суспензія з внесенням глутамата (100 мкМ) + глутамін ( $10^{-5}$ ); 7) Нейрональна суспензія з внесенням глутамата (100 мкМ) + мексидол ( $10^{-5}$ ).

Рис 2. Рівень нітротирозину, HSP<sub>70</sub> та глутатіону відновленого в умовах моделювання глутаматної ексайтотоксичності *in vitro* і на фоні фармакологічної корекції (60 хв. спостереження), ( $M \pm m$ ), ( $n=10$ ).

Останніми роками багаточисельні роботи присвячені важливості HSP<sub>70</sub> в якості регулюючого агента в механізмах ендогенної нейропротекції. Встановлено, що HSP<sub>70</sub> регулює глутатіонову ланку тіол-дисульфідної системи, підвищує рівень відновленого глутатіону, обмежує продукцію ONOO<sup>-</sup>, інгібує стрес-кінази JNK [Беленічев І.Ф., 2014; Sun L., 2015]. HSP<sub>70</sub> безпосередньо бере участь в термінових механізмах пристосування нейронів до гіпоксії, перемикаючи енергетичні процеси на компенсаторні цитозольно-мітохондріальні шунти [Беленічев І.Ф., 2014]. Також HSP<sub>70</sub> разом з

глутатионом здатний знижувати гіперзбудливість глутаматних NMDA-рецепторів за рахунок відновлення red/ox чутливих ділянок і, тим самим, зменшувати прояви трансміттерного аутокоїдозу [Беленічев І.Ф., Горбачева С.В, 2017].

В дослідженнях *in vivo* встановлено, що в результаті ГПМК відбувається пригнічення роботи ланок ендогенної нейропротекції – знижується рівень HSP<sub>70</sub> в цитозольній фракції в 9,7 рази ( $p < 0,05$ ) і в мітохондріальній фракції в 3,2 рази ( $p < 0,05$ ) відносно УО групи. Курсове призначення тваринам з ГПМК досліджуваних препаратів призводить до збільшення рівня білку HSP<sub>70</sub> в головному мозку - як в цитозольній фракції (HSF-1 в 11,3 ( $p < 0,05$ ), тамоксифен в 5,1 ( $p < 0,05$ ), мелатонін в 2,6 ( $p < 0,05$ ), глутамін в 1,5 рази), так і в мітохондріальній фракції (HSF-1 в 2,6 ( $p < 0,05$ ), тамоксифен в 1,5 ( $p < 0,05$ ), мелатонін в 1,2, глутамін в 1,1 рази) відносно контролю (табл. 1).

Таблиця 1

Концентрація білку теплового шоку HSP<sub>70</sub> в головному мозку щурів на 4 добу церебральної ішемії і на фоні фармакологічної корекції модуляторами системи HSP<sub>70</sub>, (M±m), (n=10).

Група тварин	HSP <sub>70</sub> , цитозольна фракція, нг/мл	HSP <sub>70</sub> , мітохондріальна фракція, нг/мл
1	2	3
Умовнооперовані тварини (УО)	16,83±0,64	8,60±0,58
Тварини з ГПМК	1,73±0,11 <sup>y</sup>	2,72±0,19 <sup>y</sup>
Тварини з ГПМК + тамоксифен	8,81±0,51 <sup>y**#</sup>	4,15±0,20 <sup>y**#</sup>
Тварини з ГПМК + мелатонін	4,55±0,27 <sup>y**#</sup>	3,3±0,19 <sup>y</sup>
Тварини з ГПМК + HSF-1	19,50±1,05 <sup>y**#</sup>	7,08±0,23 <sup>y**#</sup>
Тварини з ГПМК + глутамін	2,61±0,16 <sup>y</sup>	3,01±0,17 <sup>y</sup>
Тварини з ГПМК + пірацетам	2,24±0,17 <sup>y</sup>	2,80±0,19 <sup>y</sup>

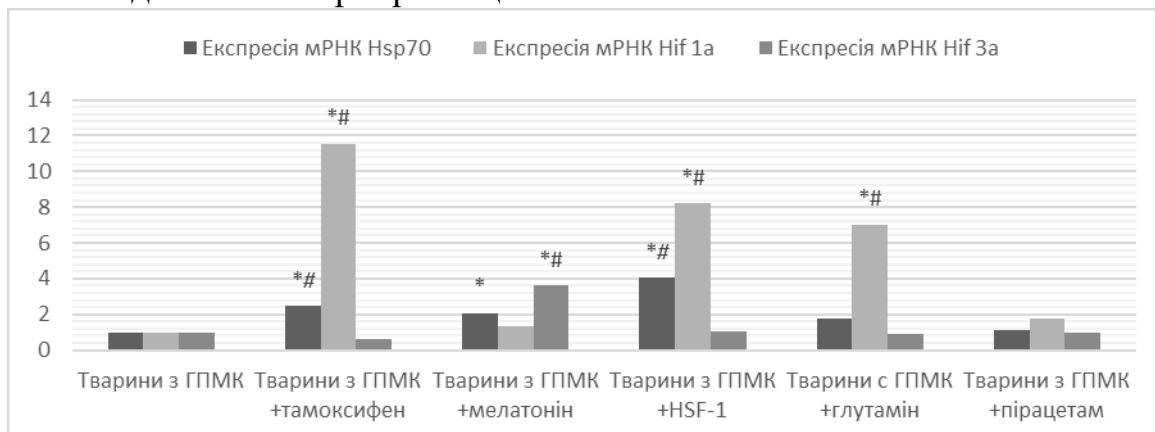
Примітка: *p* – рівень статистичної значущості при порівнянні вибірок за допомогою дисперсійного аналізу ANOVA (тест Тьюкі), *y* –  $p < 0,05$  відповідно до УО, \*\* –  $p < 0,05$  відповідно до контрольної групи, # –  $p < 0,05$  відповідно до групи, яка отримувала пірацетам.

В результаті дослідження встановлено, що ГПМК викликає пригнічення експресії в цитозольній фракції головного мозку мРНК HSP<sub>70</sub> в 3,2 рази ( $p < 0,05$ ), мРНК Hif-1 $\alpha$  в 1,5 рази ( $p < 0,05$ ) і мРНК Hif-3 $\alpha$  в 1,3 рази ( $p < 0,05$ ) відносно УО (рис. 3).

Курсове введення досліджуваних препаратів призводило до активації експресії генів в цитозолі головного мозку експериментальних тварин – мРНК HSP<sub>70</sub> (HSF-1 в 4,1 ( $p < 0,05$ ), тамоксифен в 2,5 ( $p < 0,05$ ), мелатонін в 2,1, глутамін в 1,7 рази), мРНК Hif-1 $\alpha$  (HSF-1 8,2 ( $p < 0,05$ ), тамоксифен в 11,6 ( $p < 0,05$ ), глутамін в 7,0 рази ( $p < 0,05$ )) і мРНК Hif-3 $\alpha$  (мелатонін в 3,6 рази ( $p < 0,05$ )) відносно контрольної групи (рис. 3).

Роботами Лук'янової Л. Д. (2013) і Dery M. A. (2015) показано, що активація в умовах ішемії генів, що кодують синтез білку HIF-1 (особливо його субодиниці HIF-1 $\alpha$ ), забезпечує експресію гену еритропоетину і ще

приблизно 60 генів, продукти яких беруть участь в таких процесах, як проліферація, апоптоз, ангиогенез, робота антиоксидантної системи (особливо її ферментативної ланки) і має важливе значення в реалізації механізмів ендогенної нейропротекції.



Примітка:  $p$  – рівень статистичної значущості при порівнянні вибірок за допомогою критерію  $t$ -Ст'юдента, \* –  $p < 0,05$  відносно контролю, # –  $p < 0,05$  відносно групи, яка отримувала пірацетам.

Рис 3. Рівень експресії мРНК HSP<sub>70</sub>, мРНК Hif-1 $\alpha$  та мРНК Hif-3 $\alpha$  в головному мозку щурів на 4 добу церебральної ішемії і на фоні фармакологічної корекції модуляторами системи HSP<sub>70</sub>, ( $M \pm m$ ), ( $n=10$ )

Вплив досліджуваних засобів на HSP<sub>70</sub>-опосередковані механізми ендогенної нейропротекції призводить до підвищення активності АО-ферментів і пригнічення реакцій оксидативного стресу. Так, HSF-1, тамоксифен, мелатонін, глутамін зменшують ( $p < 0,05$ ) рівень АФГ і КФГ в цитозолі гомогенату головного мозку щурів з ГПМК в діапазоні від 22,5/28,7% до 32,5/35,3%, а також концентрацію нітротирозину від 60% до 69,9% ( $p < 0,05$ ). Найбільш активно гальмував накопичення АФГ/КФГ мелатонін, зниження ніротирозину під впливом HSF-1 було найбільше. Введення досліджуваних препаратів призводило до підвищення активності СОД в цитозолі гомогенату головного мозку від 41,8% до 84,7%. Найбільш активним по відношенню до СОД виявився мелатонін (табл. 2).

Досліджувані препарати позитивно впливали на показники ТДС в головному мозку тварин з ГПМК. Введення експериментальним тваринам HSF-1, тамоксифену, мелатоніну, глутаміну підвищували ( $p < 0,05$ ) рівень GSH в 4,1, 3,6, 3,3, 3,1 рази відповідно, а також зменшували ( $p < 0,05$ ) концентрацію GSSG в 2,3, 1,8, 1,6, 1,5 рази відповідно (табл. 2).

За ступенем збільшення ( $p < 0,05$ ) активність GR і GST препарати розташувались наступним чином – HSF-1 в 3,4 і 1,6 рази, тамоксифен в 2,7 і 1,4 рази, мелатонін в 2,5 і 1,5 рази, глутамін в 2,3 і 1,3 рази відносно контрольної групи. (табл. 2)

Антиоксидантна система відіграє важливу роль в підтримці клітинного гомеостазу і приймає участь в реалізації механізмів ендогенної нейропротекції. СОД в умовах ішемії, регулюючи урівень АФК, гальмує механізми

ініціації апоптозу і підвищує шанси нейрону на виживання [Пушкіна Т. А., 2016; Surai P., 2016].

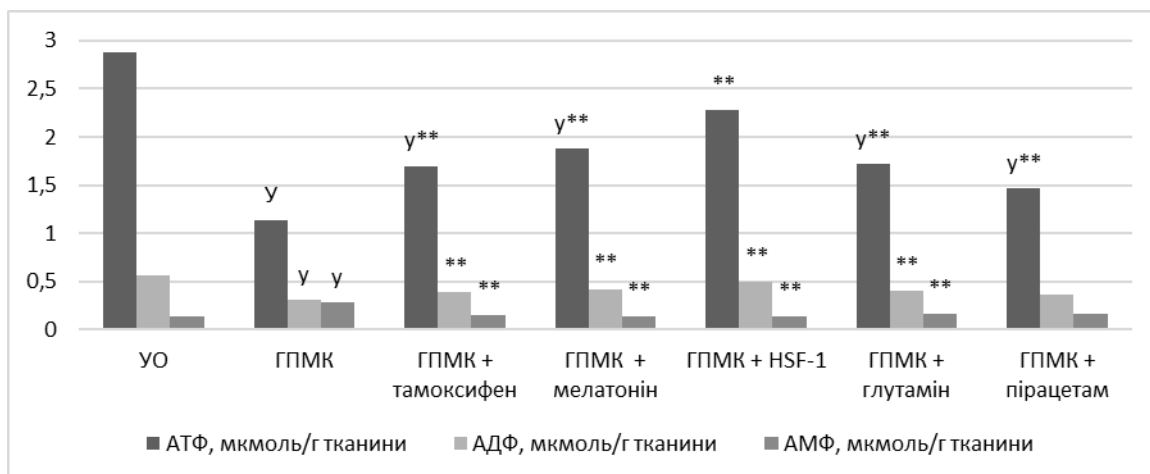
Таблиця 2

Рівень нітротирозину, активність супероксиддисмутази та стан тіол-дисульфидної системи в цитозольній фракції кори головного мозку щурів на 4 добу церебральної ішемії і на фоні введення модуляторів системи HSP<sub>70</sub> (M±m), (n=10).

Групи	GSH мкмоль/г білку	GR мкмоль/хв*г білку	Нітротирозин, нмоль/г білку	СОД, у.о./мг білку/хв
Умовнооперовані УО	5,49±0,38	26,84±1,87	10,19± 0,80	135,92± 12,20
ГПМК	1,23±0,12 <sup>y</sup>	7,37±0,72 <sup>y</sup>	66,59± 13,1 <sup>y</sup>	64,83± 5,29 <sup>y</sup>
ГПМК+тамоксифен	4,37±0,38**	20,02±1,54**	20,39± 0,96**	97,4± 8,22
ГПМК+мелатонін	4,06±0,31**	18,16±1,52**	22,4± 1,91**	119,72± 9,18**
ГПМК+HSF-1	4,99±0,38**	24,79±2,25**	20,04± 1,77**	96,98± 8,49
ГПМК+глутамін	3,85±0,34**	17,26±1,38**	26,63± 2,47**	91,91± 6,56
ГПМК+пірацетам	3,61±0,33	13,63±1,60**	24,46± 2,13**	100,20± 8,18

Примітки: *p* – рівень статистичної значущості при порівнянні вибірок за допомогою дисперсійного аналізу ANOVA (тест Тьюкі), *y* – *p* < 0,05 відповідно до УО, \*\* – *p* < 0,05 відповідно до контрольної групи, # – *p* < 0,05 відповідно до групи, яка отримувала пірацетам.

Досліджувані засоби здатні підвищувати активність СОД, можливо, як за рахунок HIF-1 $\alpha$  - підвищення її експресії, так і за рахунок запобігання окисної модифікації її структури. В останньому випадку ефект реалізується опосередковано через експресію HSP<sub>70</sub> (відновлення пошкоджених ділянок білків), або за рахунок прямих антиоксидантних властивостей молекул досліджуваних засобів. Добре відомі властивості скавенджерів АФК і NO мелатоніну [Alghamdi B. S., 2018] і тамоксифену [Беленічев І. Ф., Павлов С. В., 2012]. У даній роботі складно оцінити внесок кожного конкретного механізму у прояві антиоксидантного ефекту. Важливою ланкою антиоксидантної дії також став позитивний вплив на систему глутатіону, що має важливе значення не тільки в роботі антиоксидантної системи нейрону, але й у механізмах ендогенної нейропротекції, а саме в зменшенні гіперзбудливості NMDA-рецепторів [Горбачова С.В., 2017].



Примітка: *y* -  $p < 0,05$  відносно УО, \*\* -  $p < 0,05$  відносно контролю.

Рис. 4. Вміст аденілових нуклеотидів в головному мозку щурів на 4-ту добу церебральної ішемії і на фоні фармакологічної корекції модуляторами системи HSP<sub>70</sub>, (M±m), (n=10)

Відтворення ГПМК призводить до типових порушень енергетичного метаболізму головного мозку – формування вторинної мітохондріальної дисфункції (падінні трансмембранного потенціалу мітохондрій (Ψ) в 4 рази ( $p < 0,05$ ) на фоні підвищення відкриття мітохондріальної пори (mPTP) в 3,2 рази ( $p < 0,05$ ) відносно УО тварин) (табл. 3), і розвитку енергодефіциту (зниження АТФ і АДФ на 60,8% ( $p < 0,05$ ) і 45,2% ( $p < 0,05$ ), зростання АМФ на 104,4% ( $p < 0,05$ )) (рис. 4). Відповідно порушується рівновага основних енергетичних показників – ЕЗ, ЕП, ІФ і ТКД (табл. 3). Також реєстрували порушення в циклі Кребса контрольної групи, що виражались в підвищенні рівня недоокисленого лактату на 130,1% ( $p < 0,05$ ), на фоні зниження рівня пірувату і малату на 56,6% ( $p < 0,05$ ) і 55,6% ( $p < 0,05$ ) і пригніченні активності НАД-МДГмх на 63,2% ( $p < 0,05$ ) відносно УО (табл. 3).

Курсове введення модуляторів білку HSP70 тамоксифену, HSF-1, мелатоніну, глутаміну знижувало прояви мітохондріальної дисфункції, що підтверджувалось в підвищенні трансмембранного заряду мітохондрій в діапазоні від 1,9 ( $p < 0,05$ ) до 3,5 ( $p < 0,05$ ) разів і зменшені швидкості відкриття мітохондріальної пори в діапазоні від 1,5 ( $p < 0,05$ ) до 2,5 разів ( $p < 0,05$ ) відносно контролю. Введення досліджуваних препаратів сприяло відновленню енергопродукуючої функції мітохондрій і врівноваженню енергетичного співвідношення ЕЗ, ЕП, ІФ і ТКД. За ступенем підвищення рівнів АТФ-АДФ препарати розмістились наступним чином: HSF-1 – на 101,8-58,1% ( $p < 0,05$ ), мелатонін на 66,4-36,5% ( $p < 0,05$ ), глутамін на 52,2-29% ( $p < 0,05$ ), тамоксифен на 50,4-26,5% ( $p < 0,05$ ). Пірацетам достовірно ( $p < 0,05$ ) підвищував тільки рівень АТФ на 30%. (табл. 3)

Таблиця 3

Оцінка функціональної активності мітохондрій та параметрів вуглеводного-енергетичного обміну в головному мозку щурів на 4-ту добу церебральної ішемії і на фоні фармакологічної корекції модуляторами системи HSP70, (M±m), (n=10)

Група тварин	Циклоспорин-А-чутливе поглинання, у.о.	Мембранний заряд, сафронін –О, Ψ	Лактат, мкмоль/г тканини	Малат, мкмоль/г тканини	НАД-МДГмх, мкмоль/г тканини/хв
Умовнооперовані тварини (УО)	1,37±0,12	0,23±0,012	2,76±0,185	0,27±0,022	1,56±0,118
Тварини з ГПМК	0,43±0,04 <sup>y</sup>	0,058±0,005 <sup>y</sup>	6,35±0,436 <sup>y</sup>	0,12±0,009 <sup>y</sup>	0,58±0,079 <sup>y</sup>
Тварини з ГПМК +тамоксифен	0,746±0,06**	0,17±0,011**	4,63±0,203**	0,21±0,018**	1,21±0,103**
Тварини з ГПМК +мелатонін	1,086±0,09**	0,202±0,01**	4,21±0,203**	0,21±0,014**	1,28±0,082**
Тварини з ГПМК +HSF-1	0,835±0,082**	0,158±0,01**	3,16±0,206**	0,28±0,016**	1,53±0,123**
Тварини с ГПМК +глутамін	0,643±0,055**	0,112±0,013**	5,3±0,275	0,18±0,023**	0,97±0,09**
Тварини с ГПМК +пірацетам	0,497±0,055	0,103±0,011**	8,17±0,61**	0,16±0,019	0,69±0,097

Примітка:  $y - p < 0,05$  відносно УО, \*\* –  $p < 0,05$  відносно контролю.

Призначення досліджуваних препаратів мало позитивний вплив на відновлення роботи циклу Кребса і активації енергетично більш продуктивних систем, зокрема, за рахунок малат-аспартатного шунта. Так, введення модуляторів HSP<sub>70</sub> знижувало рівень лактату: HSF-1 на 50,2% ( $p < 0,05$ ), мелатонін на 33,7% ( $p < 0,05$ ), тамоксифен на 27,1% ( $p < 0,05$ ) відносно контрольної групи. Паралельно відмічалось достовірне ( $p < 0,05$ ) підвищення рівня пірувату (HSF-1 на 108,7%, мелатонін на 65,2%, тамоксифен на 47,8%) і малату (HSF-1 на 133,3%, мелатонін і тамоксифен на 75%). Введення глутаміну достовірно ( $p < 0,05$ ) підвищувало вміст лише малату на 50%. Референс-препарат пірацетам навпаки провокував лактат-ацидоз, про що свідчить підвищення вмісту лактату на 28,7% ( $p < 0,05$ ) відносно контрольної групи. Всі досліджувані засоби достовірно ( $p < 0,05$ ) відновлювали активність НАД-МДГмх, лідируючу позицію займав HSF-1, на фоні введення якого активність НАД-МДГмх зростала в 2,7 ( $p < 0,05$ ) рази відносно контролю (табл. 3). Підвищення активності НАД-МДГмх в мітохондріях головного мозку тварин з ГПМК, які отримували модулятори HSP<sub>70</sub> відбувалося на фоні підвищення у них рівня малату, що свідчить про активацію під дією цих препаратів компенсаторного малат-аспартатного човникового механізму. Позитивний енерготропний ефект досліджуваних препаратів пояснюється їх впливом на експресію HSP<sub>70</sub>. HSP<sub>70</sub> приймає участь в механізмах активації і регуляції роботи малат-аспартатного механізму транспорту відновлених еквівалентів в мітохондріях. Відомо, що HSP<sub>70</sub>, «продовжує» дію HIF-1 $\alpha$ , яка експресується у відповідь на формування ішемії головного мозку, а також HSP<sub>70</sub> самостійно підтримує експресію активності НАД-МДГмх, тим самим довгостроково підтримуючи активність малат-аспартатного човникового механізму [Беленічев І. Ф., 2014-2019]. Доведена і пряма мітопротективна активність HSP<sub>70</sub>, що реалізується за рахунок «випрямлення» білкових ділянок мітохондріальної пори [Беленічев І. Ф., Павлов С. В., 2014-2018].

Моделювання ГПМК на 4 добу експерименту приводило до зменшення щільності і площі тіл нейронів на 37,9% ( $p < 0,05$ ) і 32,2% ( $p < 0,05$ ), рівень РНК



в нейронах зменшувався на 35,1% ( $p < 0,05$ ) відносно умовнооперованих тварин. Паралельно спостерігалось значне зростання щільності і частини апоптотичних клітин в 4,6 і 6,0 рази ( $p < 0,05$ ) відповідно відносно УО групи, що свідчить про активацію процесів некрозу і апоптозу (табл. 4).

На фоні введення досліджуваних препаратів спостерігається відновлення морфо-функціональних показників нейронів. Так, HSF-1, мелатонін, тамоксифен і глутамін збільшували щільність нейронів (на 63,9 ( $p < 0,05$ ), 56,9 ( $p < 0,05$ ), 24,6 і 22,5%) і площу нейронів (на 32,8, 31,2, 6,7 і 5,6%) відповідно по відношенню до контролю. Вміст РНК в нейронах достовірно збільшували HSF-1 на 91,7%. ( $p < 0,05$ ), мелатонін на 40,7% ( $p < 0,05$ ), тамоксифен на 34,3%, глутамін на 14,4% відносно контролю. Введення референс-препарату виявляло позитивний вплив на стан нейронів, який не мав достовірного підґрунтя (табл. 4).

Найбільш виражену цитопротективну дію виявляв HSF-1, який достовірно ( $p < 0,05$ ) зменшував щільність і долю апоптотичних клітин в 2,7 і 3,4 рази відносно контролю. Призначення мелатоніну знижувало щільність апоптотичних клітин в 2,1 ( $p < 0,05$ ) рази, тамоксифену – в 1,7 ( $p < 0,05$ ) рази, глутаміну – в 1,6 ( $p < 0,05$ ) рази, пірацетаму – в 1,2 рази відносно контрольної групи. Доля апоптотично змінених клітин також мала тенденцію до зниження під впливом всіх досліджуваних препаратів: мелатонін в 2,4 рази, тамоксифен в 2,0 рази, глутамін в 1,9 рази, пірацетам в 1,3 рази відносно контролю. (табл. 4)

Таблиця 4

Оцінка морфофункціональних показників нейронів IV-V шарів сенсомоторної зони кори головного мозку щурів на 4-ту добу церебральної ішемії і на фоні фармакологічної корекції модуляторами системи  $HSP_{70}$ , ( $M \pm m$ ), ( $n=10$ )

Група тварин	Щільність нейронів (нейрон/мм <sup>2</sup> )	Площа нейронів (мкм <sup>2</sup> )	Вміст РНК (Еош)	Щільність апоптотичних і деструктивних клітин на 1 мм <sup>2</sup>	Доля апоптотичних клітин, %
Умовнооперовані	1319,8±22,23	443,95±10,27	7,61±0,13	33,7±7,67	4,07±1,07
ГПМК	819,6±67,04 <sup>y</sup>	301,18±10,35 <sup>y</sup>	4,32±0,08 <sup>y</sup>	156,9±24,11 <sup>y</sup>	24,37±3,77 <sup>y</sup>
ГПМК+тамоксифен	1018,5±73,26	321,49±7,06	5,8±0,103	93,65±23,39**	12,01±2,69**
ГПМК+мелатонін	1286,1±66,98	395,52±11,25	6,08±0,11**	72,9±19,74**	9,99±2,1**
ГПМК+HSF 1	1343,3±20,53**	400,05±10,12	8,28±0,15**	58,75±20,45**	7,11±1,96**
ГПМК+глутамін	1004,4±68,63	318,11±7,93	4,942±0,102	100,1±26,33**	12,50±2,54**
ГПМК+пірацетам	870,95±49,83	312,733±9,77	4,54±0,11	134,4±21,95**	18,20±2,54

Примітка:  $y - p < 0,05$  відносно УО, \*\* –  $p < 0,05$  відносно контролю.

Призначення тваринам з ГПМК досліджуваних препаратів достовірно ( $p < 0,05$ ) знижувало летальність (HSF-1 на 50,8%, мелатонін 46,4%, тамоксифен 41,2% і глутамін 32,5%) і прояви неврологічного дефіциту (HSF-1 на 41,4%, мелатонін 37,9%, тамоксифен 29,8% і глутамін 16,2%) на 4-ту добу експерименту. Пірацетам також знижував летальність (на 24,6%) і неврологічний дефіцит (на 14%) тварин, але поступався досліджуваним препаратам.

Таким чином, встановлено, що HSF-1, мелатонін, тамоксифен і глутамін виявляють значну нейропротективну дію при ГПМК, яка полягає в підвищенні експресії фактору ендогенної цито- і нейропротекції HSP<sub>70</sub>, активації ферментативної (СОД, GR, GST) і неферментативної (GSH) ланки антиоксидантної системи, зниженні рівня маркерів оксидативного і нітрозативного стресу (АФГ, КФГ, нітротирозин), активації малат-аспартатного човникового механізму, підвищенні енергетичного потенціалу нейрону, підвищенні РНК і зниженні кількості деструктивних і апоптичних нейронів. Механізм дії препаратів обумовлений модуляцією HSP-залежних механізмів ендогенної нейропротекції, підвищенням рівня HSP<sub>70</sub>, запуском через HIF-1 компенсаторних механізмів синтезу АТФ, підвищенням транскрипції, зменшенням окисного пошкодження білків і підвищенням їх активності і гальмуванням нейроапоптозу [Belenichev I.F., 2014].

Отримані результати є експериментальним обґрунтуванням для застосування мелатоніну, тамоксифену і глутаміну в комплексній терапії мозкових інсультів в якості засобів первинної та вторинної нейропротекції. Отримані дані обґрунтовують перспективу подальших досліджень HSF-1 з метою створення на його основі лікарського засобу з нейропротективною дією.

## ВИСНОВКИ

Вперше в дисертаційній роботі наведено нове вирішення актуальної задачі – підвищення ефективності лікування мозкових інсультів шляхом застосування в якості нейропротекторів препаратів - модуляторів експресії білку теплового шоку HSP<sub>70</sub> – тамоксифену, мелатоніну, глутаміну і, особливо, HSF-1.

1. Попереднє внесення в суспензію нейронів тамоксифену, мелатоніну, глутаміну і HSF-1 ( $10^{-5}$ М) з подальшим моделюванням глутаматної ексайтотоксичності *in vitro* призводило до зниження маркерів ушкодження нейронів - зниження ( $p<0,05$ ) АФГ (26,1-50,8%), КФГ (19,1-49,5%), нітротирозину (13,9-38,3%), глутатіону окисленого (в 1,1-2,2 рази) і підвищення супероксиддисмутази (22,69-36,45%), HSP<sub>70</sub> (на 46-97,6%), глутатіону відновленого (на 6,6-82,2%), активності глутатіонредуктази (на 10,5-45,4%) і глутатіон-S-трансферази (на 14,3-43,5%).

2. Призначення тваринам з ГПМК тамоксифену (1 мг/кг, в/шл.), мелатоніну (5 мг/кг, в/шл.), глутаміну (25 мг/кг, в/шл.) і HSF-1 (200 мкл/кг, в/черев.) призводить до підвищення ( $p<0,05$ ) концентрації HSP<sub>70</sub> цит. (в 1,5-11,3 рази) і HSP<sub>70</sub> міт. (в 1,1-2,6 рази), експресії мРНК HSP<sub>70</sub> (в 1,7-4,1 рази), мРНК HIF-1 $\alpha$  (в 7-11,6 рази), і мРНК HIF-3 $\alpha$  (мелатонін в 3,6 рази), що беруть участь в механізмах ендогенної нейропротекції.

3. Курсове застосування досліджуваних препаратів призводить до зменшення інтенсивності оксидативного і нітрозативного стресів в головному мозку – до зниження АФГ (22,5-32,5%), КФГ (28,7-35,3% ( $p<0,05$ )) і нітротирозину (60-69,9% ( $p<0,05$ )) на тлі підвищення активності

супероксиддисмутази (на 41,8-84,7% ( $p < 0,05$ )) і ферментативної та неферментативної ланки тиол-дисульфідної системи: підвищення ( $p < 0,05$ ) рівня глутатіону відновленого в 3,1-4,1 рази, активності глутатіонредуктази в 2,3-3,4 рази ( $p < 0,05$ ), глутатіон-S-трансферази в 1,3-1,6 рази, на тлі зниження глутатіону окисленого в 1,5-2,3 рази.

4. На тлі застосування модуляторів HSP70 відбувається нормалізація функціональної активності мітохондрій (зниження ( $p < 0,05$ ) швидкості відкриття пори (в 1,5-2,5 рази) і підвищення ( $p < 0,05$ ) заряду мембрани (в 1,9-3,5 рази), поліпшується енергетичний обмін головного мозку тварин з ГПМК за рахунок активації аеробної продукції енергії – підвищується рівень АТФ (на 50,4-101,8% ( $p < 0,05$ )), малату (на 50-133,3% ( $p < 0,05$ )), активність НАД-МДГмх (в 1,7-2,7 рази), знижується рівень лактату (на 27,1-50,2%).

5. Призначення тваринам з ГПМК тамоксифену, мелатоніну, глутаміну і HSF-1 призводить до збільшення щільності (на 22,5-63,9%) і площі тіл нейронів (на 5,6-32,8%), підвищення вмісту РНК в нейронах (на 34,3-91,7% ( $p < 0,05$ )), зменшення щільності апоптично змінених нейронів (в 1,6-2,7 рази), до зниження ( $p < 0,05$ ) летальності на 50,8, 46,4, 41,2 і 32,5%, а також до зменшення неврологічних порушень на 16,2-41,4% на 4-ту добу експерименту.

6. В результаті експериментальних досліджень встановлено, що найбільш активним серед модуляторів HSP<sub>70</sub> є HSF-1, який перевищує інші досліджувані препарати за рівнем підвищення експресії мРНК Hsp70, мРНК Hif-1 $\alpha$ , і концентрації білку HSP<sub>70</sub>, що зменшує прояви нейроапоптозу і підвищує виживання тварин. В основі нейропротективної дії тамоксифену, мелатоніну, глутаміну і, особливо, HSF-1 в умовах ГПМК лежить позитивна модуляція HSP70-залежних механізмів ендогенної нейропротекції, яка реалізуються шляхом активації компенсаторно-приспосувальних реакцій, що підвищує резистентність головного мозку до ішемії.

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

1. Беленичев И.Ф., Биля Ю.В. Анализ взаимосвязи неврологических нарушений, нитрозирующего стресса и концентрации HSP<sub>70</sub> в головном мозге животных при моделировании острого нарушения мозгового кровообращения. *Вісник проблем біології і медицини*. 2016. Вип. 3, Т. 1 (131). С. 60-65. (Особистий внесок дисертанта: виконання частини експериментальних досліджень, узагальнення результатів, підготовка статті до публікації).

2. Беленичев И.Ф., Биля Ю.В. Взаимосвязь между концентрацией HSP<sub>70</sub>, активностью тиол-дисульфидной системы и степенью неврологических нарушений при моделировании острой церебральной ишемии. *Вісник проблем біології і медицини*. 2017. Вип. 1 Т. 1 (135). С. 86-91. (Особистий внесок дисертанта: виконання частини експериментальних досліджень, узагальнення результатів, підготовка статті до публікації).

3. Біла Ю.В., Беленичев И.Ф., Камышный А.М. Особенности нарушения экспрессии Hif-1 $\alpha$  и Hif-3 $\alpha$  в условиях острого нарушения мозгового кровообращения и на фоне применения модуляторов HSP<sub>70</sub>. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2018. №. 3(59). С. 3-9. (Особистий внесок дисертанта: виконання частини експериментальних досліджень, узагальнення результатів, підготовка статті до публікації).

4. Belenichev I.F., Bila Yu.V., Kamyshniy A.M. Study of the Expression Pattern of mRNA HSP<sub>70</sub> and the Level of HSP<sub>70</sub> Protein in Experimental Subtotal Ischemia and in the Contrast of Pharmacological Correction of HSP<sub>70</sub> Modulators. *Biological Markers and Guided Therapy*. 2018. V. 5, №1. P. 75-84. (Особистий внесок дисертанта: виконання частини експериментальних досліджень, узагальнення результатів, переклад і підготовка статті до публікації).

5. Беленичев И.Ф., Біла Ю.В. Антиоксидантные свойства модуляторов HSP<sub>70</sub> в условиях церебральной ишемии. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2018. Т.6 (61). С. 27-33. (Особистий внесок дисертанта: виконання частини експериментальних досліджень, узагальнення результатів, підготовка статті до публікації).

6. Belenichev I.F., Bila Yu.V. The Effect of the Heat Shock Protein HSP<sub>70</sub> Modulators on the Energy Metabolism of the Rats Brain in Acute Cerebral Ischemia. *Biological Markers and Guided Therapy*. 2019. V. 6, №1. P. 51-62. (Особистий внесок дисертанта: виконання частини експериментальних досліджень, узагальнення результатів, переклад і підготовка статті до публікації).

7. Патент на корисну модель № 128150, Україна, МПК А61К 38/00 (2018.01), А61Р 25/00 (2018.01). Спосіб фармакологічної модуляції ендогенної нейропротекції в експерименті / І. Ф. Беленічев, Ю. В. Біла, Н. В. Бухтиярова, О. Ю. Розуменко; заявник Запорізький державний медичний університет - №201801627, заявл. 19.02.2018, опубл. 10.09.2018 бюл. №17 (Особистий внесок дисертанта: проведення експерименту, статистична обробка отриманих даних).

8. Біла Ю.В., Беленичев И.Ф., Полякова Е.Н. HSP<sub>70</sub> – опосредованные механизмы реализации эндогенной нейропротекции. *Сучасні аспекти медицини і фармації* .- 2014: матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених і студентів з міжнародною участю, м. Запоріжжя, 15-16 травня 2014. м. Запоріжжя, вид-во: ЗДМУ, 2014. С. 5-6.

9. Біла Ю.В., Беленичев И.Ф., Бухтиярова Н.В. Роль HSP<sub>70</sub> в регуляции глутатионового звена тиол-дисульфидной системы головного мозга. *Активные формы кислорода, оксида азота, антиоксиданты и здоровье человека*: материалы восьмой национальной научно-практической конференции с международным участием, г. Смоленск, 25-29 мая 2014. Смоленск, 2014. С. 23-24.

10. Біла Ю.В., Беленичев И.Ф., Моргунова С.А.  $\beta$ -ER-модуляція рівня HSP<sub>70</sub> и нейроапоптоза при депривации системного рівня відновленого глутатіона *in vitro*. Матеріали XI Українського

біохімічного конгресу, м. Київ, 6-10 жовтня 2014. The Ukrainian Biochemical Journal. м. Київ, вид-во: КНУ ім. Т. Шевченка, 2014. Т. 86, №5. С. 128-129.

11. Біла Ю.В. Влияние мелатонина на уровень HSP<sub>70</sub> и показатели оксидативного стресса в условиях экспериментальной церебральной ишемии. *Сучасні аспекти медицини і фармації – 2015*: матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених і студентів з міжнародною участю, м. Запоріжжя, 14-15 травня 2015. м. Запоріжжя, вид-во: ЗДМУ, 2015. С. 7

12. Біла Ю. В., Беленичев И. Ф. Нейропротективные свойства HSP70 при экспериментальной церебральной ишемии. *Здобутки теоретичної медицини – в практику охорони здоров'я – 2016*: матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених та студентів, м. Запоріжжя, 24-25 березня 2016. м. Запоріжжя, вид-во: ЗДМУ, 2016. С. 52.

13. Біла Ю.В., Гайсинский В.В. Содержание HSP<sub>70</sub> и нитротирозина в коре и гиппокампе головного мозга крыс при острой церебральной ишемии. *Сучасні аспекти медицини і фармації – 2016*: матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених і студентів з міжнародною участю, м. Запоріжжя, 12-13 травня 2016. м. Запоріжжя, вид-во: ЗДМУ, 2016. С. 14.

14. Беленичев И.Ф., Біла Ю.В., Моргунова С.А. Роль эндогенного нейропротектора HSP<sub>70</sub> в формировании неврологического дефицита и выраженности нитрозирующего стресса при моделировании острой церебральной ишемии. *Фундаментальні та клінічні аспекти фармакології – 2016*: матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, пам'яті професора В.В. Дунаєва, м. Запоріжжя, 24-25 листопада 2016. м. Запоріжжя, вид-во: ЗДМУ, 2016. С. 27-28.

15. Біла Ю.В., Беленичев И.Ф. Анализ состояния тиол-дисульфидной системы и концентрации HSP70 в коре и гиппокампе мозга при моделировании острой церебральной ишемии. *Сучасні аспекти медицини і фармації – 2017*: матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю, присвячена дню науки, м. Запоріжжя, 11-12 травня 2017. м. Запоріжжя, вид-во: ЗДМУ, 2017. С. 9.

16. Беленичев И.Ф., Біла Ю.В. HSP70-опосредованная модуляция механизмов эндогенной нейропротекции: возможные перспективы применения в лечении мозговых инсультов. V Національний з'їзд фармакологів України, м. Запоріжжя, 18-20 жовтня 2017. м. Запоріжжя, 2017. С. 4.

17. Біла Ю. В. / Вивчення нейропротективної активності модуляторів системи HSP70 в досліджах in vitro. *Теоретичні та практичні аспекти розвитку науки і освіти*: матеріали міжнародної науково-практичної конференції, м. Львів, 22-23 січня, 2020. м. Львів, 2020. С. 5-6.

## АНОТАЦІЯ

**Біла Ю. В. Фармакологічна модуляція HSP70 – опосередкованих механізмів нейропротекції в умовах церебральної ішемії. – Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія. – ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», Київ, 2020.

В дисертаційній роботі були дослідженні молекулярно-біохімічні механізми нейропротективної дії тамоксифену, мелатоніну, HSF-1 і глутаміну, які спрямовані на підвищення концентрації білку теплового шоку HSP<sub>70</sub> в ішемізованому мозку. Внаслідок підвищення рівня HSP<sub>70</sub> спостерігається підсилення стійкості нейронів до ішемічних пошкоджень в дослідах *in vitro* і *in vivo*. Досліджувані препарати: тамоксифен, мелатонін, HSF-1 і глутамін реалізують нейропротективну дію за рахунок активації ланок ендогенної нейропротекції – підсилення експресії мРНК HSP<sub>70</sub>, мРНК Hif-1 $\alpha$ , мРНК Hif-3 $\alpha$ , підвищення рівня HSP<sub>70</sub>. Призначення досліджуваних препаратів гальмує розвиток оксидативного і нітрозативного стресу, а також усуває мітохондріальну дисфункцію за рахунок HSP<sub>70</sub>/GSH-залежних механізмів активації антиоксидантної системи. Встановлено, що усунення енергетичного дефіциту на фоні лікування досліджуваних препаратами спостерігається за рахунок позитивної модуляції HSP<sub>70</sub>/HIF-1 $\alpha$ -залежних механізмів регуляції малат-аспартатного човникового механізму енергопродукції. На фоні призначення тамоксифену, мелатоніну, HSF-1 і глутаміну спостерігається зменшення проявів нейродеструктивних пошкоджень структур головного мозку, підвищується щільність нейронів сенсомоторної зони кори, гальмується нейроапоптоз, підвищується вміст РНК в нейронах сенсомоторної зони кори і, як наслідок, зменшуються прояви неврологічних і когнітивних порушень у експериментальних тварин. Досліджувані препарати достовірно підвищують виживання тварин з експериментальною церебральною ішемією.

**Ключові слова:** церебральна ішемія, нейропротекція, тамоксифен, мелатонін, HSF-1, глутамін, модулятори HSP<sub>70</sub>, HIF-1, мРНК Hsp70, антиоксидантна система.

## SUMMARY

**Bila Yulia. Pharmacological modulation of HSP<sub>70</sub>-mediated mechanisms of neuroprotection in cerebral ischemia. - Manuscript.**

Thesis to obtain the academic degree of Candidate of Biological Sciences in speciality 14.03.05 – pharmacology. - State enterprise "Institute of Pharmacology and Toxicology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kyiv - 2020.

Molecular-biochemical mechanisms of the neuroprotective action of tamoxifen, melatonin, HSF-1 and glutamine, aimed at increasing the concentration

of heat shock protein HSP<sub>70</sub> in the ischemic brain, were investigated in the thesis. Increasing the HSP<sub>70</sub> level results in an increase in the resistance of neurons to ischemic damage in *in vitro* and *in vivo* experiments. The investigated drugs: tamoxifen, melatonin, HSF-1 and glutamine have neuroprotective effect through activation of endogenous neuroprotection units - increased expression of HSP<sub>70</sub> mRNA, Hif-1  $\alpha$  mRNA, Hif-3  $\alpha$  mRNA, and increased HSP<sub>70</sub> level. It is found that the elimination of energy deficit on the background of treatment with the studied drugs is observed due to the positive modulation of HSP<sub>70</sub>/HIF-1 $\alpha$  - dependent mechanisms of regulation of malate-aspartate shuttle mechanism of energy production. Tamoxifen, melatonin, HSF-1 and glutamine on *in vitro* model of glutamate excitotoxicity inhibited the rate of development of oxidative stress and the accumulation of markers of protein degradation of AFG (26,1-50,8%), KFG (19,1-49,5%) and nitrotyrosine (13,9-38,3%) against the background of the increase of the HSP<sub>70</sub> concentration (46-97,6%) and the level of GSH (6,6-82,2%) and increased activity of glutathione-specific enzymes (GR 10,5-45,4%, GST 14,3-43,5%). *In vitro* experiments showed that there was a close direct relationship between the concentration of GSH and HSP<sub>70</sub>, as well as the inverse relationship between the level of nitrotyrosine and the concentration of HSP<sub>70</sub>. *In vivo* experiments in the acute cerebral ischemia model showed characteristic manifestations of ischemic damage: oxidative and nitrosative stresses growth, a decrease in the concentration of endogenous neuroprotector HSP<sub>70</sub> decrease in GSH level, inhibition of GR, GST activity, increasing energy deficit. Tamoxifen, melatonin, HSF-1, and glutamine leads recovering of endogenous neuroprotection units - the HSP<sub>70</sub> level increased in the cytosolic fraction 1,5-11,3 times ( $p < 0.05$ ), in the mitochondrial fraction 1,1-2,6 times ( $p < 0,05$ ), Hsp70 gene expression increased 1,7-4,1 times ( $p < 0.05$ ), Hif-1 $\alpha$  mRNA expression 7,0-11,6 times ( $p < 0.05$ ), Hif-3 $\alpha$  mRNA 3,6 times ( $p < 0.05$ ) (in the group with melatonin). Activation of endogenous mechanisms of neuroprotection restored the work of thiol-disulfide antioxidant system - GSH level increased 3,1-4,1 times ( $p < 0.05$ ), activity of GR and GST increased 2.3-3.4 times ( $p < 0.05$ ) and 1.3-1.6 times ( $p < 0.05$ ) respectively, relative to the control group of animals. Therapy with tamoxifen, melatonin, HSF-1 and glutamine for 4 days significantly inhibited the progress of oxidative and nitritative stresses, as evidenced by a decrease in the level of AFG/KFG in the range from 22.5/28.7% to 32.5/35,3%, and nitrotyrosine concentration from 60% to 69.9% ( $p < 0.05$ ). At the same time, the drugs increased the activity of SOD from 41,8% to 84,7% ( $p < 0.05$ ).

Tamoxifen, melatonin, HSF-1, and glutamine restored the energy metabolism of brain cells and reduced the manifestations of mitochondrial dysfunction. Thus, the mitochondrial membrane charge increased from 1.9 to 3.5 times ( $p < 0.05$ ), and the rate of opening of the mitochondrial pore decreased in the range from 1,5 to 2,5 times ( $p < 0.05$ ). The investigated drugs increased the level of ATP (by 50.4-101.8% ( $p < 0.05$ )) against the background of a decrease in AMP (by 42.9-53.6% ( $p < 0.05$ )). An increase in the level of malate (75-133.3% ( $p < 0.05$ )) and pyruvate (47.8-108.7% ( $p < 0.05$ )) was observed against the background of a decrease in lactate concentration (27.1-50.2%).

Tamoxifen, melatonin, HSF-1, and glutamine therapy improved the morphofunctional status of ischemic brain cells of experimental animals. Thus, HSF-1, melatonin, tamoxifen and glutamine significantly ( $p < 0.05$ ) increased neuronal density (by 63.9, 56.9, 24.6 and 22.5%) and area neurons (by 32.8, 31.2, 6.7, and 5.6%). The content of RNA in neurons significantly ( $p < 0.05$ ) increased HSF-1 by 91.7%, melatonin by 40.7% and tamoxifen by 34.3% relative to control. The most pronounced cytoprotective effect has HSF-1, which significantly ( $p < 0.05$ ) reduces the density and proportion of apoptotic cells by 2.7 and 3.4 times relative to the control. The appointment of melatonin reduces the density of apoptotic cells by 2.1 ( $p < 0.05$ ) times, tamoxifen - 1.7 ( $p < 0.05$ ) times, glutamine - 1.6 ( $p < 0.05$ ) times, piracetam - 1.2 ( $p < 0.05$ ) times relative to the control group.

Investigated drugs significantly ( $p < 0.05$ ) reduced mortality (HSF-1 by 50.8%, melatonin 46.4%, tamoxifen 41.2% and glutamine 32.5%) and manifestations of neurological deficiency (HSF-1 by 41.4%, melatonin 37.9%, tamoxifen 29.8% and glutamine 16.2%) on the 4th day of the experiment. Piracetam also reduced mortality (by 24.6% ( $p < 0.05$ )) and neurological deficits (by 14%) of animals, but was inferior to the studied drugs. The most pronounced modulating activity against HSP70 was found by HSF-1. It was first established that the studied HSP70 modulators - tamoxifen, melatonin, HSF-1 and glutamine under conditions of acute experimental cerebral ischemia increase the expression of HSP<sub>70</sub>, HIF-1 $\alpha$  and HIF-3 $\alpha$  mRNA.

**Key words:** cerebral ischemia, neuroprotection, tamoxifen, melatonin, HSF-1, glutamine, HSP<sub>70</sub> modulators, HIF-1, HSP<sub>70</sub> mRNA, antioxidant system.

## АННОТАЦИЯ

**Биля Ю. В. Фармакологическая модуляция HSP<sub>70</sub>-опосредованных механизмов нейропротекции в условиях церебральной ишемии. – Рукопись.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.05 - фармакология. - ГУ «Институт фармакологии и токсикологии АМН Украины», Киев, 2020.

В диссертационной работе были исследованы молекулярно-биохимические механизмы нейропротективного действия тамоксифена, мелатонина, HSF-1 и глутамина, направленные на повышение концентрации белка теплового шока HSP<sub>70</sub> в ишемизированном мозге. Вследствие повышения уровня HSP<sub>70</sub> наблюдается усиление устойчивости нейронов к ишемическому повреждению в опытах *in vitro* и *in vivo*. Исследуемые препараты: тамоксифен, мелатонин, HSF-1 и глутамин реализуют нейропротективное действие за счет активации звеньев эндогенной нейропротекции - усиления экспрессии мРНК HSP<sub>70</sub>, мРНК Hif-1 $\alpha$ , мРНК Hif-3 $\alpha$ , повышения уровня HSP<sub>70</sub>. Назначение исследуемых препаратов тормозит развитие оксидативного и нитрозативного стресса, а также устраняет митохондриальную дисфункцию за счет HSP<sub>70</sub>/GSH-зависимых



механизмов активации антиоксидантной системы. Установлено, что устранение энергетического дефицита на фоне лечения исследуемыми препаратами происходит за счет положительной модуляции HSP<sub>70</sub>/HIF-1 $\alpha$ -зависимых механизмов регуляции малат-аспартатного челночного механизма энергопродукции. На фоне назначения тамоксифена, мелатонина, HSF-1 и глутамината наблюдается уменьшения проявлений нейродеструктивных повреждений структур головного мозга, повышается плотность нейронов сенсомоторной зоны коры, тормозится нейроапоптоз, повышается содержание РНК в нейронах сенсомоторной зоны коры и, как следствие, уменьшаются проявления неврологических и когнитивных нарушений у экспериментальных животных. Исследуемые препараты достоверно повышают выживаемость животных с экспериментальной церебральной ишемией.

**Ключевые слова:** церебральная ишемия, нейропротекция, тамоксифен, мелатонин, HSF-1, глутамин, модуляторы HSP<sub>70</sub>, HIF-1, мРНК HSP<sub>70</sub>, антиоксидантная система.

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АДФ	– аденозиндифосфат
АМФ	– аденозинмонофосфат
АТФ	– аденозинтрифосфат
АФГ	– альдегідфенілгідрозони
ГПМК	– гостре порушення мозкового кровообігу
ЕД50	– середньоефективна доза
ЕЗ	– енергетичний заряд
ЕП	– енергетичний потенціал
ЗТ-ПЛР	– полімерна ланцюгова реакція в реальному часі
ІФ	– індекс фосфорилування
КФГ	– кетонфенілгідрозони
мРНК	– матрична рибонуклеїнова кислота
НАД-МДГ <sub>мх</sub>	– НАД-залежна малатдегідрогеназа мітохондріальна
ОМБ	– окиснювальна модифікація білків
СОД	– супероксиддисмутаза
ТКД	– термодинамічний контроль дихання
УО	– умовнооперовані
GR	– глутатіонредуктаза
GSH	– глутатіон відновлений
GSSH	– глутатіон окиснений
GST	– глутатіонСтрансфераза
HIF-1 $\alpha$	– фактор, індукований гіпоксією 1-альфа
HIF-3 $\alpha$	– фактор, індукований гіпоксією 3-альфа
HSF-1	– фактор теплового шоку-1
HSP70	– білки теплового шоку з молекулярною масою 70 кДа
NMDA	– N-метил-D-аспартат
NO	– оксид нітрогену (II)
ONOO <sup>-</sup>	– пероксинітрит
$\beta$ -ER	– бета-естрогеновий рецептор