

*И.Ф.Беленичев, д.м.н., С.В.Павлов, Ю.И. Губский \*,  
член-корр.АМН Украины, Е.Л. Левицкий \*, д.б.н.,  
Л.П.Бабенко\**

## **ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНОГО ХИНАЗОЛИНА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ РАННЕГО РЕАГИРОВАНИЯ, ПРОЦЕССЫ СВОБОДНО- РАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ В ТКАНЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ**

*Запорожский государственный медицинский университет,  
г.Запорожье,*

*\*Институт фармакологии и токсикологии АМН Украины, г.Киев*

**С**тресс — типовая адаптационная реакция организма на воздействия окружающей среды. Его определяют как совокупность неспецифических биохимических, физиологических, и психологических реакций организма в ответ на действие стрессорного агента. При стрессе наблюдается активация симпатико-адреналовой системы, что сопровождается развитием гипергликемии, а также повышением артериального давления, увеличением частоты сердечных сокращений и другими вегетативными реакциями [1]. Чрезмерная активация симпатико-адреналовой системы может явиться фактором риска развития артериальной гипертензии, ишемической болезни сердца, сахарного диабета и других заболеваний. Поэтому поиск высокоэффективных стресспротекторов является актуальной проблемой медицины.

Известно, что в патогенезе стресса лежит гиперпродукция активных форм кислорода (АФК) биоэнергетическими и нейрохимическими системами головного мозга [2]. Под действием АФК в клетке происходит активация экспрессии редокс-чувствительных генов, многие из которых необходимы для за-

щиты клеток от токсических эффектов окислительного стресса. Так, при нормальной концентрации кислорода в окружающей клетку среде (нормоксия) под действием АФК происходит, в основном, активация с-Jun, ATF-2- факторов транскрипции, а в условиях окислительного стресса — преимущественно факторов JunB и с-Fos. Активация именно этих факторов транскрипции в условиях гиперпродукции АФК объясняется тем, что JunB и с-Fos содержат в своих ДНК-связывающих доменах высокочувствительные к АФК остатки цистеина -Cys 252, Cys154, Cys61. Окисление их SH-групп приводит к обратной инактивации AP-1 и NF-kB. Эти данные подтверждаются исследованиями других авторов, которые показали, что эмоциональный стресс усиливает у крыс экспрессию с-Fos в различных структурах мозга [3].

По ряду причин мозг высоко чувствителен к окислительному стрессу. Мозг занимает первое место среди тканей по количеству потребляемого кислорода на единицу веса; этот уровень так велик, что превращение в супероксидный радикал только 0,1% метаболизируемого нейронами кислорода может ока-

заться токсичным для него [4, 5]. При этом в мозге почти не обнаруживаются каталазы и сравнительно мало глутатион-зависимых ферментов, а содержание витаминов Е гораздо ниже, чем в скелетных мышцах и печени. Таким образом, антиоксидантная система мозга имеет сравнительно небольшой запас прочности. Дефицит антиоксидантных систем в сочетании с легкостью развития экзайотических механизмов в мозге очень опасен для функциональной активности нейронов [6].

Нашими предыдущими исследованиями показана высокая антиоксидантная и церебропротективная активность производного хиназолина ПК 66 [7-9]. В связи с возможной антистрессорной ролью ПК 66 целью настоящего исследования было:

- определить его влияние на устойчивость крыс к хроническому иммобилизационному стрессу (ХИС), проанализированную по показателям их поведения в тесте "открытое поле";
- изучить антиоксидантную активность ПК 66 в условиях ХИС по следующим показателям: степень окислительной модификации ДНК, белков, а также по накоплению стабильных метаболитов NO, уровень активности NO-синтазы в головном мозге;
- провести анализ действия ПК 66 на экспрессию раннего гена с-Fos в паравентрикулярном ядре гипоталамуса крыс, перенесших ХИС.

### **Материалы и методы**

Эксперименты проведены на 30 крысах-самцах линии Вистар массой  $210 \pm 5,2$  г в возрасте 6 мес. Животные были распределены в следующие экспериментальные группы:

1 группа (n=10)- интактная; 2 группа (n=10)- контрольная (ХИС); 3 группа (n=10)-ХИС + ПК 66-10 мг/кг per os.

ХИС моделировали двухчасовой иммобилизацией на протяжении 10 дней [10]. Спустя 2 ч после последнего стрессирования у крыс проводили тест "открытое поле", изучали следующие параметры: горизонтальная, вертикальная активность, количество дефекаций. Поведение животных в открытом поле исследовали в течение 3 мин [11].

После проведения теста крыс де-

капитировали под тиопенталовым наркозом (40 мг/кг). В гомогенате головного мозга определяли продукты окислительной модификации белков (ОМБ) по реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков с 2,4-динитрофенилгидразом (2,4-ДНФГ) с образованием альдегидфенилгидразонов (АФГ), кетонфенилгидразонов (КФГ) [12]. Стабильные метаболиты NO определяли методом Грисса [13]. NO-синтазу определяли флуорометрически по убыли НАДФа в реакционной системе [14]. Степень окислительной модификации ДНК определяли хроматографически по концентрации экскреции 8-гидроксигуанина в моче [15].

Идентификацию клеток, содержащих белок Fos, проводили гистохимически. Автоматизированный подсчет и выделение Fos-позитивных нейронов осуществляли при помощи системы компьютерного анализа изображения Vidas 386.

#### Результаты исследования и их обсуждение

Исследования по поведенческим показателям теста "открытое поле" показали, что ХИС характеризуется изменением двигательной активности (табл.1) — снижение горизонтальной активности в 34,2 раза; вертикальной- в 11,4 раза. Введение крысам ПК 66 по отношению к контрольной группе животных повышала двигательную активность ( $p < 0,05$ ).

Исследование состояния антиоксидантной системы показали, что в условиях ХИС окислительной модификации подвергаются белковые молекулы. Так, концентрация АФГ и КФГ в контрольной группе животных превышала таковые показатели интактной группы в 1,55 и 1,58 раз, соответственно. Введение ПК 66, (табл.2) существенно снижало концентрацию

маркеров ОМБ. Окислительная модификация белков, по нашему мнению, приводит к снижению функции белков в цепи переносчиков электронов, активности АТФ-азы, избирательности действия транспортных пор. Изменение Red/Ox - потенциала митохондриальной мембраны может приводить к дисфункции каскада дыхательной цепи нейрональной клетки. Вышеперечисленные изменения, в конечном итоге, обуславливают нарушения секреторной, инкреторной, транспортной функции нейрона, и как следствие, развитие когнитивного дефицита [16].

ОМБ играет ключевую роль в молекулярных механизмах окисли-

тельного стресса и является пусковым механизмом окислительной деструкции ДНК клетки [16]. Окислительная модификация ДНК приводит к образованию 8- гидроксигуанина (8-ГГ), который оказывает выраженное цитотоксическое действие, важнейшим последствием которого является искажение молекулярно- биологических процессов в клетке- репликации и транскрипции. Данные факты согласуются с нашими исследованиями. Из рисунка видно, что ХИС сопровождается значительным повышением концентрации в моче 8-ГГ. Введение ПК 66 в некоторой степени влияло на данные процессы, снижая со-

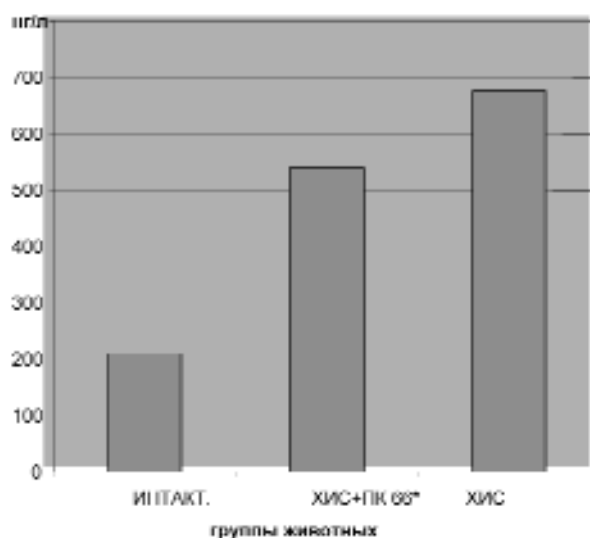


Рисунок. Концентрация 8-ГГ в моче в условиях ХИС.  
\* -  $p < 0,05$  по отношению к контролю

Таблица 2

#### Степень окислительной модификации белков (у.е./мг белка) в головном мозге крыс в условиях ХИС

Группы животных	АФГ	КФГ
Интактная	0,835 ± 0,046	0,565 ± 0,027
ХИС контроль	2,390 ± 0,162	2,149 ± 0,168
ПК66+ХИС	1,359 ± 0,159*	1,125 ± 0,235*

Таблица 1

#### Влияние ХИС на обучение и память животных

Серии животных	Количество горизонтальных движений	Количество вертикальных движений	Количество заглядываний	Количество дефекаций
Интактные	45,5 ± 2,31	15,2 ± 0,76	5,4 ± 0,76	2,21 ± 0,12
ХИС контроль	11,3 ± 2,8	3,8 ± 0,35	1,5 ± 0,05	3,4 ± 0,11
ПК 66 10 мг/кг + ХИС	28,9 ± 2,5*	10,2 ± 0,78*	2,8 ± 0,1*	2,85 ± 0,17*

Примечание: в этой и последующих таблицах \* -  $p < 0,05$  по отношению к контролю

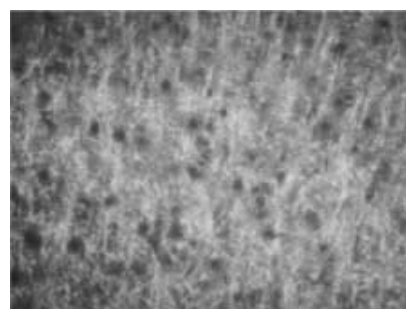
держания 8-ГГ, не приводя, однако, к норме.

В последнее время появились работы, в которых убедительно доказана роль NO в патогенезе нейродегенеративных заболеваний. Существенную роль в гиперпродукции NO принадлежит индуцибельной NO-синтазе, которая экспрессируется под действием факторов транскрипции- JunB; c-Fos; AP-1 [17].

Результаты, полученные при определении стабильных метаболитов NO, свидетельствуют, что их накопление при ХИС протекает на фоне повышения активности NO-синта-



**Фото 1.** Флюоресценция Fos-позитивных нейронов в паравентрикулярном ядре гипоталамуса интактной группы животных. об. х 100



**Фото 2.** Флюоресценция Fos-позитивных нейронов в паравентрикулярном ядре гипоталамуса контрольной группы животных. об. х 100

Таблица 3

**Концентрация стабильных метаболитов NO, уровень активности NO-синтазы в головном мозге животных, подвергшихся ХИС**

Серии животных	NO, мкМ/л	NO-синтаза, нмоль/мг белка/мин
Интактные	5,535 ± 0,561	9,439 ± 4,202
ХИС контроль	19,590 ± 2,141	17,873 ± 4,516
ПК 66 10 мг/кг + ХИС	6,745 ± 0,478*	11,752 ± 5,244*

зы (табл.3). Соединение ПК 66 снижает концентрацию NO на 3,76% и на 5,3% активность NO-синтазы.

Данный эффект ПК66, по нашему мнению, является одним из ключевых механизмов его церебропротективного действия, так как от соотношения внутриклеточных концентраций NO и АФК зависит характер действия этого соединения на процессы, связанные с регуляцией апоптоза в нейрональной клетке. В условиях благоприятствующих накоплению пероксинитрита, NO стимулирует апоптоз, что связано прежде всего с активацией киназы JNK, факторов р53 и Вах, освобождением цитохрома с из митохондрий с последующей активацией каспаз [18].

Анализ показал, что число Fos-позитивных нейронов в паравентрикулярном ядре гипоталамуса у крыс с ХИС был выше ( $p < 0,01$ ), чем у крыс интактной группы. Введение ПК 66 в дозе 10 мг/кг привело

к снижению ( $p < 0,01$ ) числа Fos-позитивных нейронов в паравентрикулярном ядре гипоталамуса по сравнению с контрольной группой животных (фото 1 - 3).

Таким образом, результаты проведенных нами исследований свидетельствуют о том, что ПК 66 оказывает значительное влияние на различные показатели устойчивости крыс к ХИС.

ПК 66 выражено повышает поведенческую активность животных в открытом поле. В условиях антиоксидантной недостаточности, развивающейся при ХИС, ПК 66 снижал степень окислительной модификации ДНК, белков, а также концентрацию стабильных метаболитов NO.

Введение ПК 66 изменяло у крыс выраженность экспрессии раннего гена c-Fos в нейронах паравентрикулярных ядер гипоталамуса. Область паравентрикулярного гипоталамуса является источником кортикотро-



**Фото 3.** Флюоресценция Fos-позитивных нейронов в паравентрикулярном ядре гипоталамуса животных, подвергшихся ХИС с введением ПК 66. об. х 100

пин- рилизинг фактора, который, как известно, вызывает усиление продукции АКТГ в гипофизе и, таким образом, активировать выброс стероидов в надпочечниках, что является ведущим звеном в эмоциональном стрессе. Активация ранних генов и, следовательно, увеличение количества Fos-позитивных нейронов в паравентрикулярном ядре является показателем активации данной структуры [19]. Кроме того, как показано выше, c-Fos играет существенную роль в экспрессии NO-синтазы и, как следствие, гиперпродукции стабильных метаболитов NO, которые являются цито- и геномотоксичными. Снижение под влиянием ПК66 экспрессии c-Fos при ХИС может являться одним из механизмов его антистрессорного действия.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Гойкова Л.А., Зорян Е.В., Анисимова Е.Н. Фармакологические методы коррекции стресса // Вопр. биол. медиц. и фарм. химии.- 2004.— №3.— С. 3-5.
2. Вьюшина А.В., Герасимова И.А., Флеров М.А. Перекисное окисление белков сыворотки крови у крыс, селектированных по скорости выра-
- ботки условного рефлекса активного избегания, в норме и при стрессе // Бюл. exper. биол. и медиц. — 2002. — Т. 133, №3. — С. 286-288.
3. Турнаев К.Т. Активные формы кислорода и регуляция экспрессии генов // Биохимия.— 2002.— Т.67, №3.— С. 339-352.
4. Halliwell B., Gutteridge J. Free Radicals in Biology and Medicine.— Oxford: Oxford University Press, 2007.—704 p.
5. Aruoma O., Halliwell B. eds Molecular Biology of Free Radicals in Human Diseases- St. Lucia, London: OCIA Int., 1999.— 345 p.
6. Болдырев А.А. Роль активных форм кислорода в жизнедеятельности нейрона // Усп. физиол. наук. —

- 2003.— Т.34, №3.— С.21-34.
7. *Шабельник К.П., Павлов С.В., Беленичев И.Ф.* Синтез, фізико-хімічні та біологічні властивості амідів (6-4-оксо-4Н-хіназолін-3-іл) алкіл(арил) карбонових кислот // *Фарм. журнал* — 2006.— №1.— С.54-63.
  8. *Павлов С.В., Беленичев І.Ф., Коваленко С.І.* Церебропротективна активність похідних 4-оксо-4Н-хіназолін-3-іл алкіл(арил) карбонових кислот в умовах гострого іммобілізаційного стресу // *Ліки* — 2005.— №5-6.— С.51-55.
  9. *Павлов С.В.* Церебропротективна активність производных 4-оксо-4Н-хіназолин-3-ил алкіл (арил) карбонових кислот в условиях острого иммобилизационного стресса. / *Тези ІІ Науково-практичної конференції молодих вчених та спеціалістів. "Актуальні проблеми фармакології та токсикології"* .— Киев, 2005.— С.45.
  10. *Стефанов А.В.* Доклинические исследования лекарственных веществ.—К.: ГФЦ МЗ Украины, 2000.— 540 с.
  11. *Дьюсбери Р.* Изучение поведения животных.— М.: Наука, 1980.— 376 с.
  12. *Halliwel B., Gutteridge J.* Free radical in Biology and Medicine.— Oxford: Clarendon Press, 1999.— 320 p.
  13. *Горбунов Н.В.* Активация образования окиси азота, опосредованная метаболитами глутаматными рецепторами в первичных культурах клеток — зерен мозжечка. // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* — 1995.— №7.— С.40-48.
  14. *Mellilo G., Taylor L.S., Brooks A.* // *J. Biol. Chem.*— 1997.— Vol. 272.— P. 12236-12243.
  15. *Sarsunova M., Schwarz V., Michaelec C.* // *Chromatografia na tenrych vrsstvach vo farmacie a v klinicreg biochemii.*—Praga: Vydavatelstvo Osveta, 1980.—621p.
  16. *Губський Ю.І., Беленичев І.Ф., Павлов С.В.* Токсические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях // *Совр. пробл. токсикол.*— 2005.— №3.— С.20-26.
  17. *Беленичев І.Ф., Левицький Е.Л., Губський Ю.І.* Антиоксидантна система захисту організму// *Совр. пробл. токсикол.*— 2003.— №2.— С.32-38.
  18. *Mikava S., Kinouchi H., Kami H. et al.* Attenuation of acute and chronic damage following traumatic brain injury in copper, zinc-superoxide dismutase transgenic mice // *J. Neurosurg.* — 1996.— V. 85.— P. 885-891.
  19. *Коплик Е.В., Мещеряков А.Ф., Перцов С.С. и др.* Влияние дипептида вилонина на устойчивость крыс к эмоциональному стрессу // *Рос. физиол. журн.* — 2002.— Т.88, №11.— С. 1440-1452.

*І.Ф.Беленичев, С.В.Павлов, Ю.І. Губський,  
Є.Л. Левицький, Л.П.Бабенко*

**ВПЛИВ ПОХІДНОГО ХІНАЗОЛІНА НА ЕКСПРЕСІЮ ГЕНІВ РАНЬОГО РЕАГУВАННЯ, ПРОЦЕСИ ВІЛЬНО-РАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕННЯ У ТКАНИНАХ ГОЛОВНОГО МОЗКУ В УМОВАХ ХРОНІЧНОГО ІММОБІЛІЗАЦІЙНОГО СТРЕСУ**

Досліджені ефекти похідного хіназоліна на показники стійкості білих шурів до хронічного стресу у тесті "відкрите поле", експресію генів раннього реагування та показники процесів вільно-радикального окислення у головному мозку. Показано, що сполука ПК 66 підвищувала рухову активність, знижувала накопичення продуктів окисної модифікації білків, стабільних метаболітів NO, а також активність NO-синтази у шурів, що зазнали стрес. ПК 66 також зменшувала кількість Fos-позитивних клітин у паравентрикулярному ядрі гіпоталамуса.

*I.F.Belenichev, S.V.Pavlov, Yu.I.Gubsky,  
E.L. Levitsky, L.P.Babenko*

**EFFECT OF DERIVATIVE QUINAZOLINE ON EXPRESSION OF EARLY RESPONSE GENES, PROCESSES OF FREE-RADICAL OXIDATION IN BRAIN TISSUE IN CONDITION OF CHRONIC IMMOBILIZING STRESS**

The present article contains investigated effects of derivative quinazoline (PK66) on factors of rat resistance to chronic stress within "open field" test, as well as analysis of expression of early response genes and factors of free-radical oxidation in brain. It is demonstrated, that the compound PK66 increases the moving activity and reduces the accumulation of oxide modification product of proteins, NO stable metabolites and NO-synthase activity of stressed rats. Also, PK66 reduces the quantity of Fos-positive cells in paraventricular hypothalamus nucleus.