

На правах рукописи

ХУДИК
Кирилл Александрович

**СОМНОГЕННЫЕ, ТЕРМОРЕГУЛЯТОРНЫЕ И
ПРОТИВОСУДОРОЖНЫЕ ЭФФЕКТЫ БЕЛКОВ ТЕПЛОВОГО
ШОКА 70 КДА**

03.00.13 – Физиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2009

Работа выполнена в лаборатории сравнительной термофизиологии
Учреждения Российской академии наук Института эволюционной физиологии и
биохимии им. И.М. Сеченова РАН

Научный руководитель: доктор биологических наук
Пастухов Юрий Федотович

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук
Оганесян Генрих Амазаспович

доктор биологических наук, профессор,
Марков Александр Георгиевич

Ведущее научное учреждение: **Учреждение Российской академии
медицинских наук Научно-
исследовательский институт
экспериментальной медицины СЗО РАМН**

Защита диссертации состоится «10» ноября 2009 года в 11 часов на заседании диссертационного совета (Д 002.127.01) при Учреждении Российской академии наук Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН по адресу: 194223, г. Санкт-Петербург, пр. М. Тореза, 44

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (194223, г. Санкт-Петербург, пр. М. Тореза, 44).

Автореферат разослан «_____» _____ 2009 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор

М.Н. Маслова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Белки теплового шока семейства Heat Shock Proteins 70 kDa (HSP70) осуществляют протективную функцию во всех живых организмах - от археобактерий до человека. Аминокислотная последовательность Hsp70 человека и *Escherichia coli* идентична на 47%, что подтверждает мнение Е.М. Крепса об исключительно консервативной природе эволюционного процесса, сохраняющего наиболее удачные биохимические перестройки от древних жизненных форм до современных организмов [Крепс, 1972]. Реализация защитной и многих других функций Hsp70 зависит от шаперонной активности [Ellis, 1987]. Под шаперонной активностью понимается способность узнавать и складывать вновь синтезированные полипептидные цепи в активные молекулы белков и восстанавливать нарушенную структуру белков [Маргулис, Гужова, 2000, 2009].

Экспрессия HSP70 выявлена у организмов, находящихся на разных ступенях эволюции, примерно при 100 видах повреждающих воздействий, в том числе после пролонгирования бодрствования или депривации сна [Маслова, 2005; Пастухов, Екимова, 2005]. В 2000-2009 гг показано, что депривация покоя или сна приводит к нарушению конформации белков и повышению экспрессии HSP70 и других шаперонов в мозге [Tononi, Cirelli 2001 - 2005; Naidoo et al., 2005, 2008; Cirelli, 2009 и др.]. Высказываемая рядом авторов гипотеза об участии шаперонов в биогенезе белка и восстановительной функции сна недостаточно обоснована [Terao et al., 2003, 2006], поскольку установлено, что проявления защитных эффектов шаперонов зависят не от их экспрессии, а от накопления их в клетках [Гужова, Маргулис, 2000]. Эти работы не позволяют сделать вывод, способны ли сами шапероны вызывать изменения основных характеристик сна (временных, спектральных, сомато-висцеральных). Чтобы ответить на этот вопрос, необходимо изучить изменения характеристик сна при повышении уровня HSP70 в мозге. Определенные основания для такого анализа имеются – показано, что Hsp70 в условиях *in vitro* способен проникать в клетки невральное происхождения [Guzhova et al., 1998, 2001], а после введения Hsp70 в ликвор крысам и голубям он проникает в паренхиму мозга и колокализуется с везикулярным белком синаптофизин в структурах мозга, ответственных за регуляцию сна и висцеральных функций [Екимова и др., 2008, 2009].

Данные об эффектах умеренного теплового стресса (теплового прекондиционирования), вызывающего массивную экспрессию HSP70 в нейронах, глии и синаптических элементах [Chen, Brown, 2007], внесли весомый вклад в представление о высоком терапевтическом потенциале HSP70 при ишемии мозга, сердца, печени, трансплантации органов, тепловом ударе, сепсисе, язвенной болезни, инфекционных, злокачественных и нейродегенеративных заболеваниях [Pockley, 2001; Андреева, 2002; Lee et al., 2006; Holzer et al., 2007 и др.]. Основная задача, которая решалась в этих работах, – это реализация протективной функции HSP70 и получение данных о повышении устойчивости

модельных клеточных систем и животных к повреждающим факторам. Изменения показателей терморегуляции остались не изученными.

В приведенном перечне отсутствуют модели эпилепсии как одного из наиболее распространенных заболеваний центральной нервной системы. Только у 40-50% больных эпилепсией отмечаются положительные эффекты медикаментозного лечения, в связи с чем приоритетной задачей является поиск веществ, содержащихся в мозге и обладающих нейропротективными свойствами. Первые данные о противосудорожных эффектах были получены при центральных микроинъекциях Hsp70 и после теплового прекондиционирования у крыс линии Вистар в модели судорог, вызванных введением N-метил, D-аспарагиновой кислоты (NMDA); высказана гипотеза об усилении тормозных процессов при повышении уровня Hsp70 в мозге [Пастухов, Екимова, 2005]. Большая социальная значимость эпилепсии определила разработку наследственных моделей этого заболевания у животных как наиболее перспективных для выяснения молекулярных и генетических механизмов эпилептогенеза у человека. Противосудорожное действие HSP70 на моделях наследственной эпилепсии не исследовалось.

При исследовании центральных эффектов Hsp70, включающего два члена семейства HSP70, стресс-индуцибельный (Hsp70i) и конститутивный (Hsc70) белки, остается открытым вопрос о главном «виновнике» того или иного эффекта. Hsp70i и Hsc70 имеют сходные молекулярную структуру и биохимические функции [O'Malley et al., 1985]. Содержание Hsp70i при стрессе увеличивается в клетках глии, в нейронах, в пре- и пост-синаптических элементах, тогда как содержание Hsc70 в нервной ткани млекопитающих высокое в не стрессовых условиях и не возрастает после стресса [Chen, Brown, 2007]. Однако при стрессе Hsc70 перемещается в области, где много синаптических контактов и поэтому предполагается, что оба шаперона обладают протективным действием. Изучение сомногенных, терморегуляторных и противосудорожных эффектов Hsp70i и Hsc70 не проводилось.

Цель исследования – выяснить, какой из белков теплового шока семейства HSP70 (стресс-индуцибельный Hsp70i и/или конститутивный Hsc70) обладает центральным действием на характеристики состояний сна и бодрствования и терморегуляции у голубей и крыс, а также на поведенческие показатели судорожной активности у крыс с наследственной формой аудиогенной эпилепсии.

Задачи исследования:

1. Сравнить изменения характеристик сна и бодрствования и показателей терморегуляции у голубей и крыс при центральном действии Hsp70, состоящего из двух членов семейства HSP70 (Hsp70i и Hsc70).
2. Выяснить, с каким из членов семейства HSP70 - Hsp70i и/или Hsc70 связаны сомногенные и терморегуляторные эффекты Hsp70.
3. Сопоставить изменения поведенческих показателей аудиогенного судорожного припадка у крыс линии Крушинского-Молодкиной

с наследственной эпилепсией при центральном действии Hsp70 и входящего в его состав Hsp70i.

4. Определить влияние кратковременного теплового прекондиционирования на содержание Hsp70i в структурах головного мозга, а также на поведенческие показатели аудиогенного судорожного припадка у крыс с наследственной эпилепсией.

Научная новизна

Впервые установлено, что Hsp70 вызывает у голубей и крыс увеличение общего времени медленного сна за счет прироста длительности эпизодов, для которых характерно отсутствие изменений мощности спектра электроэнцефалограммы и значительное снижение температуры мозга. Впервые выяснено, что стресс-индуцибельный белок Hsp70i вызывает увеличение медленного сна и снижение температуры мозга и сократительной активности мышц, идентичные эффектам Hsp70, состоящего из двух членов семейства HSP70, Hsp70i и конститутивного Hsc70; Hsc70 не влияет на изученные показатели. Впервые выявлено, что Hsp70i вызывает уменьшение длительности аудиогенных тонических судорог у крыс линии Крушинского-Молодкиной, сходное с действием Hsp70. Впервые показано, что тепловое прекондиционирование не влияет на тонические судороги, но значительно увеличивает латентный период судорог у крыс с наследственной эпилепсией, что совпадает по срокам с повышением содержания Hsp70i в структурах головного мозга, участвующих в инициации аудиогенных судорог.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Белок теплового шока Hsp70 обладает сомногенным и терморегуляторным действием: увеличение его содержания в головном мозге (путем микроинъекций в ликвор) у голубей и крыс приводит к увеличению «естественного» медленного сна и характерному для него снижению мышечной активности и температуры мозга.
2. Белок теплового шока Hsp70 обладает противосудорожным действием у крыс линии Крушинского-Молодкиной с наследственной формой аудиогенной эпилепсии, для которой характерно преобладание возбуждающих процессов в ЦНС: повышение содержания Hsp70 в мозге вызывает уменьшение опасных для жизни тонических судорог (после его микроинъекций в ликвор) или увеличение в 3 раза латентного периода аудиогенного судорожного припадка (после теплового прекондиционирования).
3. В реализацию сомногенных, терморегуляторных и противосудорожных эффектов Hsp70 и противосудорожных эффектов теплового прекондиционирования вовлечен преимущественно стресс-индуцибельный член семейства HSP70.

Теоретическая и практическая значимость

Исследование имеет фундаментальное значение для понимания роли белков теплового шока семейства 70 кДа в модуляции жизненно важных функций организма теплокровных животных. Выявленное в исследовании увеличение естественного медленного сна и сопряженного с ним физиологического снижения активности мышц и температуры мозга, свидетельствует о роли молекулярных шаперонов в усилении тормозных процессов в ЦНС; эти данные могут служить основанием для апробации в клинике различных физических способов пре кондиционирования (лечебных тепловых, гипоксических воздействий, мышечных нагрузок) и лекарственных средств, увеличивающих экспрессию и содержание в мозге и других тканях шаперонов, при лечении инсомний и нарушений сна, вызванных стрессом или сопровождающих другие заболевания. При изучении наследственной эпилепсии у крыс линии Крушинского-Молодкиной получены данные о значительном уменьшении наиболее опасных для жизни тонических судорог при увеличении содержания в мозге экзогенного стресс-индуцибельного белка Hsp70i и об увеличении в 3 раза латентного периода начала аудиогенного судорожного припадка после кратковременного теплового воздействия, совпадающем по срокам с увеличением содержания эндогенного Hsp70i в структурах головного мозга, участвующих в инициации судорог. Данные свидетельствуют о вовлечении шаперона Hsp70i в механизмы развития судорог при наследственной эпилепсии, рассматриваемой в качестве перспективной модели для выяснения эндогенных молекулярных и генетических механизмов эпилептогенеза у человека. Эти результаты могут найти применение при разработке методов коррекции судорожной активности путем повышения экспрессии и содержания в мозге шаперонов. Полученные в работе данные могут быть использованы в курсах лекций по физиологии для студентов биологических и медицинских факультетов университетов и медицинских институтов.

Апробация работы

Результаты исследования доложены и обсуждены на 6-й и 10-й Всероссийских конференциях молодых ученых «Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2004, 2008), Всероссийской конференции молодых исследователей «Физиология и медицина» (Санкт-Петербург, 2005), 4-й и 6-й Всероссийских конференциях «Актуальные проблемы сомнологии» (Москва, 2004, Санкт-Петербург, 2008), на 3-й и 4-й Всероссийских школах-конференциях (с международным участием) «Sleep as a window to the world of wakefulness» (Ростов-на-Дону, 2005, Москва, 2007), на 8-й, 9-й, 10-й, 11-й и 12-й Международных конференциях «Stress and behavior» (Санкт-Петербург, 2004, 2005, 2007, 2008 и 2009), 3-й и 4-й Всероссийских конференциях (с международным участием) «Механизмы функционирования висцеральных систем» (Санкт-Петербург, 2003, 2005), на XIX и XX Съездах физиологического общества им. И.П. Павлова (Екатеринбург, 2004, Москва, 2007).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 22 работы, из которых статьи в рецензируемых журналах – 2, статьи в сборниках научных работ – 2, тезисы докладов – 18.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, трех глав, содержащих результаты исследования, обсуждения результатов, выводов и списка литературы, включающего 39 отечественных и 149 зарубежных источников. Работа изложена на 139 страницах машинописного текста, иллюстрирована 3 таблицами и 35 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Электрофизиологические опыты выполнены на 22 взрослых голубях (*Columba livia*) обоего пола, 15 крысах-самцах линии Вистар и 7 крысах-самцах линии Крушинского-Молодкиной (КМ). Поведенческие эксперименты по изучению судорожной активности проводились на 52 крысах линии КМ с наследственной формой аудиогенной эпилепсии. Операции проводили на животных под общим нембуталовым наркозом (30 мг/кг для голубей, 50 мг/кг для крыс, внутривенно) за 7-10 дней до начала экспериментов. Для введения фармакологических препаратов, вживляли проводящие канюли в 3-й желудочек мозга крысам (P0.8; L0; H6.5 в мм согласно атласу Paxinos, Watson, 1998) и голубям (A6.5; L0; H11 в мм согласно атласу Karten, Hodos, 1967).

Для идентификации состояний сна и бодрствования регистрировали электроэнцефалограмму (ЭЭГ), электроокулограмму, электромиограмму. Измерения мозговой и периферической температур проводились с помощью предварительно откалиброванных минитермисторов (model BetaTherm cat 2K7 MCD1, США). Для изучения сократительной активности мышц проводилась регистрация интегрированной электромиограммы. Для регистрации и анализа электрофизиологических параметров использовали компьютерные системы SASR 8800 (США) и Sagura (Германия). У голубей все провода от термисторов и электродов проводились подкожно к “рюкзачку” (15 г) на спине птицы, который закреплялся проволокой под каждым крылом. У крыс все провода шли к разъему, который размещался на голове и фиксировался самотвердеющей пластмассой Протакрил-М. Через подвижный коммутатор осуществлялось переключение сигналов на кабель, идущий к предварительному усилителю. Далее сигналы через блок аналоговой обработки и оцифровки поступали в компьютер для архивирования данных. Измерения температуры мозга и мощности спектра ЭЭГ рассчитывали отдельно для каждого состояния (бодрствование, дремота,

медленный и быстрый сон) за каждый час регистрации. Точность измерения температуры мозга составляла 0.01 °С.

Для экспериментов использовался препарат Hsp70, состоящий из смеси Hsp70i и Hsc70 в соотношении 3:2, полученный в лаборатории защитных механизмов клетки Института цитологии РАН. Hsp70 был выделен из тканевых лизатов красных (медленных) волокон тазобедренной мышцы быка, с использованием комбинации хроматографических процедур [Margulis, Welsh, 1991]. Степень очистки препаратов проверялась с помощью электрофореза в полиакриламидном геле и составляла не менее 99%. Hsc70 выделялся нами на базе Института Цитологии РАН из смеси Hsp70i и Hsc70, полученной из мозга быка. Рекомбинантный Hsp70i человека был получен в бакуловирусной системе экспрессии в Институте молекулярной биологии РАН. Hsp70, Hsc70, Hsp70i вводились в третий желудочек мозга в дозах 1.5, 6 и 10 мкг. Все препараты и контрольные растворы – физиологический раствор, фосфатный буфер и термоденатурированные (нагретые до 100°C в течение 2 мин) Hsp70, Hsc70 и Hsp70i вводились в объемах не более 1 мкл.

Судорожная активность у крыс линии КМ вызывалась звуком (интенсивность 50 дБ, частота 10 кГц), подаваемым с генератора и тестировалась по следующим характеристикам: латентный период, длительность гиперлокомоторной активности, называемой фазой дикого бега, тонических и клонических судорог. Тяжесть судорожного припадка оценивалась в баллах (от 0 до 5) по модифицированной шкале Крушинского [Крушинский, 1960]. После судорожного припадка у крыс линии КМ оценивались длительность и тяжесть атаксии и каталепсии. Для записи и анализа судорожной активности применялась система видеонаблюдения и компьютерной регистрации фирмы Logitech (Швейцария). Тепловое пре кондиционирование достигалось путем нагревания наркотизированных крыс (200 мг/кг оксибутирата и 25 мг/кг нембутала) в термостатируемой камере до ректальной температуры 41 °С в течение 5 мин. Судорожная активность крыс по описанным ранее параметрам тестировалась через 1-14 дней после теплового воздействия. Определение содержания Hsp70i в плазме крови проводилось с помощью модифицированного иммуноферментного анализа, а в структурах мозга – по методу Western-blotting с использованием моноклональных антител к Hsp70.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программы Statistica 6. При сравнении средних значений анализируемых показателей применялся дисперсионный анализ ANOVA (LSD тест) и непараметрический критерий Вилкоксона. Различия полученных результатов считались статистически достоверными при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Влияние белка теплового шока 70 кДа на характеристики состояний сна и бодрствования у голубей и крыс.

При анализе влияния Hsp70, состоящего из смеси Hsp70i и Hsc70, на состояния сна, бодрствования и дремоты, мы выявили сходные изменения у голубей и крыс линии Вистар. Отчетливое увеличение медленного сна при действии Hsp70 наблюдалось с первого часа после микроинъекции. В первой стадии темной фазы суток (первые 3 часа), характеризующейся быстрым снижением температуры мозга, прирост общего времени медленного сна у голубей составляет в среднем 16% ($p < 0.05$); эти изменения наблюдались и в стадии ночного плато температуры мозга (в 6-7 часы) (Рис. 1). За первые 4 часа после введения Hsp70 длительность медленного сна увеличилась на 36.5 мин ($p < 0.05$), а за 8 часов регистрации – на 61 мин ($p < 0.05$). При действии Hsp70 у голубей наблюдалось достоверное уменьшение общего времени быстрого сна и тенденция к снижению бодрствования и дремоты. За первые 4 часа после введения Hsp70 суммарная длительность бодрствования уменьшилась на 21 мин ($p > 0.05$), а длительность дремоты – на 13 мин ($p > 0.05$).

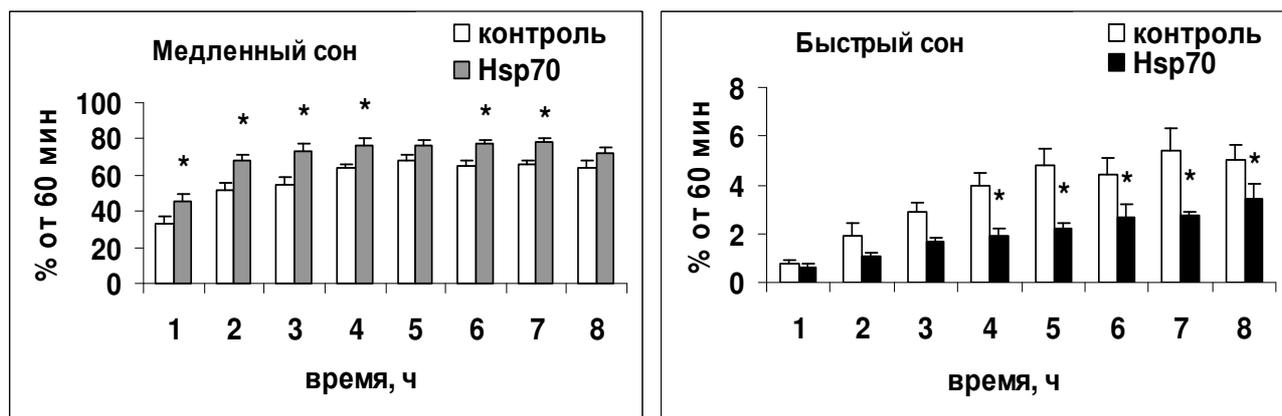


Рис. 1. Изменение общего времени медленного и быстрого сна у голубей после введения Hsp70 в 3-й желудочек мозга в дозе 1.5 мкг. Здесь и на последующих рисунках звездочками обозначены достоверные различия относительно контроля (введение фосфатного буфера): *- при $p < 0.05$, ** - при $p < 0.01$, *** при $p < 0.001$

После микроинъекций Hsp70 у крыс линии Вистар (Рис. 2) в первые 3 часа регистрации прирост медленного сна составил 20 % ($p < 0.05$). За первые 3 часа после введения Hsp70 суммарная длительность медленного сна увеличилась на 34.7 мин ($p < 0.05$), а за 8 часов регистрации – на 76 мин ($p < 0.05$). У крыс отмечена тенденция к уменьшению общего времени бодрствования, дремоты и быстрого сна. Введение контрольных растворов (физиологического раствора и фосфатного буфера), а также термоденатурированного Hsp70 у голубей и крыс не вызывало изменений временных характеристик состояний сна и бодрствования.

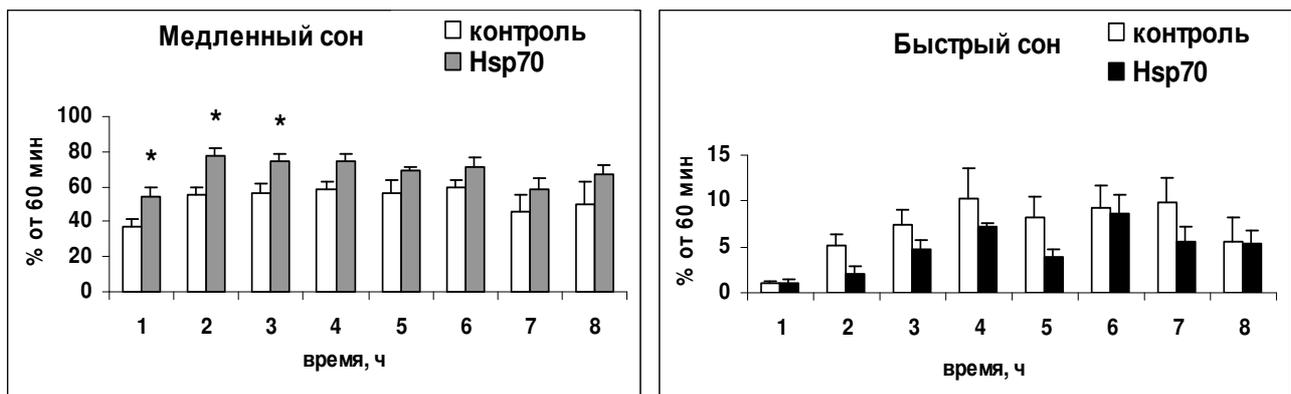


Рис. 2. Изменение общего времени медленного и быстрого сна у крыс линии Вистар после введения Hsp70 в 3-й желудочек мозга в дозе 1.5 мкг.

И у крыс, и у голубей после введения Hsp70 отмечалось увеличение длительности эпизодов медленного сна (в среднем на 35% ($p>0.05$) у голубей и 45% ($p>0.05$) у крыс), тогда как число эпизодов этого состояния либо не изменялось, либо уменьшалось. Это может означать, что в увеличение медленного сна значительный вклад вносит активация механизмов поддержания этого состояния. Быстрый сон у голубей уменьшался преимущественно за счет снижения числа эпизодов, что может свидетельствовать о подавлении механизмов запуска этого состояния.

Анализ спектральных характеристик ЭЭГ показал, что при введении Hsp70 крысам и голубям, несмотря на значительное увеличение медленного сна, не наблюдалось значимых изменений мощности спектра ЭЭГ в диапазоне 1-30 Гц по сравнению с результатами, полученными в контрольных опытах. По изменению мощности спектра ЭЭГ в дельта-диапазоне (0.75-4 Гц) можно судить о медленноволновой активности и, в определенной степени, об интенсивности сна [Franken et al., 1992]. Депривация сна и фармакологические препараты вызывают увеличение медленно-волновой активности ЭЭГ в дельта-диапазоне, которое рассматривается как последствие стресса или проявление токсического эффекта химических веществ [Deboer et al., 1994; Tobler et al., 2001]. Отсутствие изменений мощности спектра ЭЭГ в эпизодах медленного сна после микроинъекций Hsp70 свидетельствуют о проявлении физиологического сомногенного эффекта Hsp70.

Поскольку увеличение медленного сна у голубей и крыс наблюдалось при действии Hsp70, состоящего из смеси Hsp70i и Hsc70, встал вопрос, с каким из белков семейства HSP70 связано это сомногенное действие. Анализ временных характеристик состояний сна и бодрствования показал, что при действии Hsp70i в дозе 1.5 мкг наблюдался значительный прирост общего времени медленного сна у голубей и крыс линии КМ. За первые 3 часа после введения Hsp70i время медленного сна увеличилось на 20% ($p<0.05$) у голубей и 16% ($p<0.05$) у крыс по сравнению с контрольными значениями (Рис. 3). Прирост медленного сна происходил за счет увеличения длительности его эпизодов (в среднем на 45% ($p<0.05$) у голубей и 40% ($p<0.05$) у крыс). Со второго часа после микроинъекций Hsp70i у голубей отмечено уменьшение времени бодрствования; снижение

количества быстрого сна происходило с третьего часа регистрации. Выявлено уменьшение количества эпизодов бодрствования и быстрого сна, тогда как длительность эпизодов не изменялась. Микроинъекции Hsc70 не вызвали изменений исследуемых временных характеристик бодрствования, медленного и быстрого сна. Поскольку Hsp70i вызывает изменения характеристик состояний сна и бодрствования у голубей и крыс, в целом сходные по направлению и величине с действием Hsp70, состоящего из Hsp70i и Hsc70, предполагается, что именно со стресс-индуцибельным членом семейства HSP70 связано сомногенное действие Hsp70.

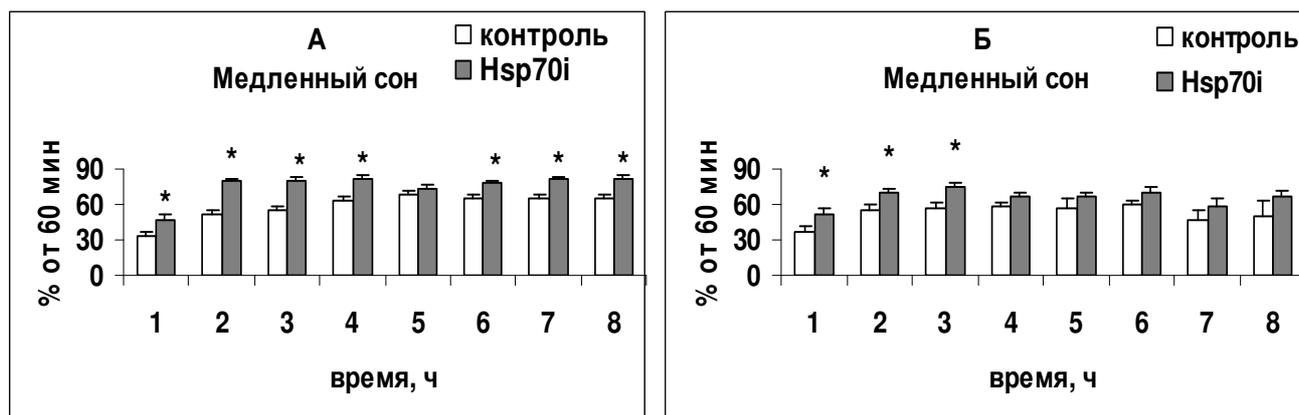


Рис. 3. Изменение общего времени медленного сна у голубей (А) и крыс линии КМ (Б) после введения Hsp70i в 3-й желудочек мозга в дозе 1.5 мкг.

Выявленные в наших опытах быстрое развитие и направленность эффектов Hsp70 после его введения в 3-й желудочек мозга позволяют предполагать, что ответственными за сомногенное действие Hsp70 могут быть структуры, тесно прилегающие к стенкам желудочка, а именно, один из «центров» регуляции медленного сна и его сомато-висцеральных компонентов – преоптическая область гипоталамуса. Блокада ГАМК(A)-рецепторов бикукуллином в вентролатеральной преоптической области гипоталамуса предотвращает увеличение медленного сна у голубей после введения Hsp70 [Пастухов, Екимова, 2005; Екимова, 2007]. По мнению авторов, эти данные свидетельствуют о возможном участии тормозных ГАМК(A)-ергических механизмов вентролатеральной преоптической области гипоталамуса в реализации сомногенных эффектов Hsp70.

2. Влияние белка теплового шока 70 кДа на терморегуляторные показатели у голубей и крыс

В контрольных условиях у голубей были выявлены более контрастные по сравнению с крысами изменения температуры мозга в суточном цикле; эти результаты согласуются с данными других исследователей [Rashotte et al., 1998; Пастухов и др., 2001]. Снижение температуры мозга в темную фазу суток у голубей достигало 2 °С. У крыс в светлую фазу снижение температуры мозга составляло 0.5 °С. Микроинъекции Hsp70 в ликворную систему мозга усиливали естественное снижение температуры мозга и вызывали дополнительное ее

уменьшение в среднем на $0.5 \pm 0.1^\circ\text{C}$ ($p < 0.05$) у голубей и $0.4 \pm 0.1^\circ\text{C}$ ($p < 0.05$) у крыс (Рис. 4), последнее мало зависело от различий в абсолютном уровне температуры мозга у крыс и голубей, скорости ее снижения и направления ее изменений в начале (снижение), в середине (нижнее плато) и в конце (повышение) темной фазы суток. Отмечены некоторые различия в эффектах Hsp70. У голубей наблюдалось достоверное уменьшение сократительной активности мышц и одновременно значимое снижение температуры мозга уже в первые часы после введения Hsp70. У крыс уменьшение уровня сократительной активности мышц происходило с первого часа после введения Hsp70, а снижение температуры мозга отмечалось с третьего часа регистрации. Судя по отсутствию существенных изменений температур кожи неоперенной части ноги у голубей и кожи хвоста у крыс, снижение температуры мозга при действии Hsp70 не связано, по-видимому, с усилением периферической вазодилатации и увеличением теплопотерь. Показано, что введение контрольных растворов (физиологического раствора и фосфатного буфера), а также термоденатурированного Hsp70 не вызывало изменений исследованных терморегуляторных показателей.

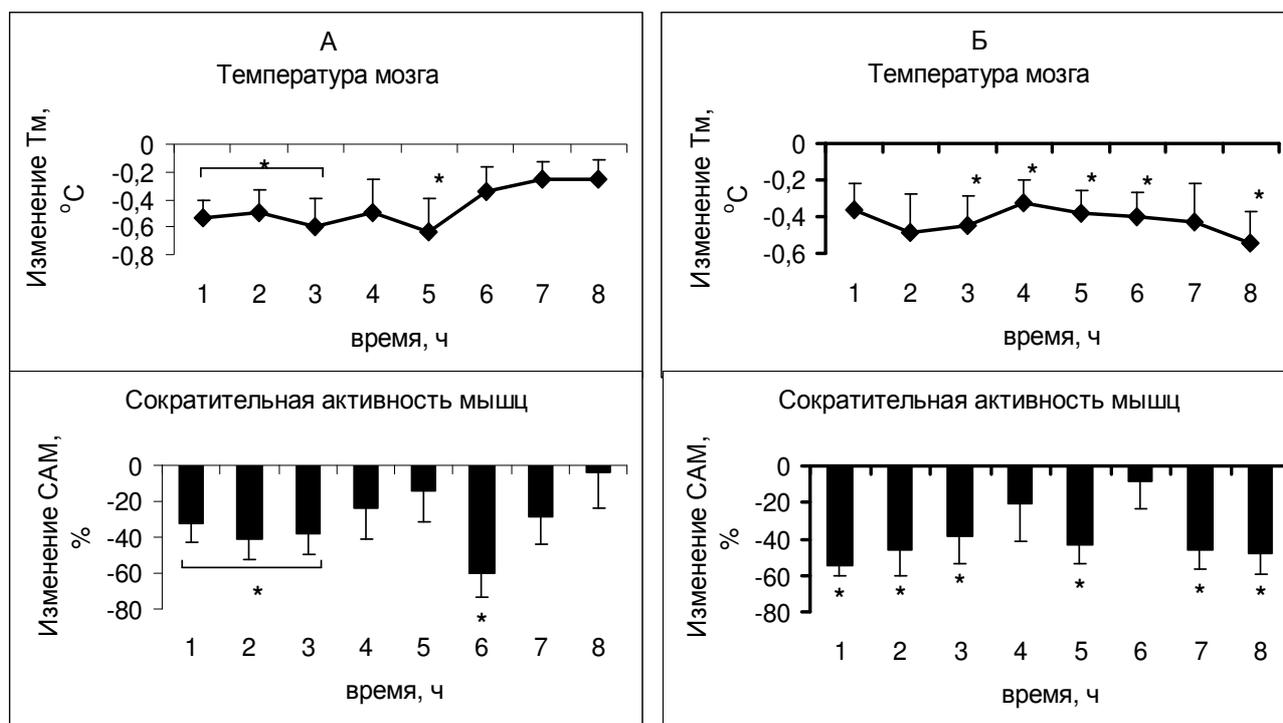


Рис. 4. Изменение температуры мозга (Тм) и сократительной активности мышц (САМ) у голубей (А) и крыс линии Вистар (Б) после введения Hsp70 в 3-й желудочек мозга в дозе 1.5 мкг. Результаты представлены по отношению к контролю (фосфатный буфер), обозначенному нулевой линией.

Ранее было установлено, что температура мозга у голубей и крыс повышается в большинстве эпизодов бодрствования и быстрого сна и отчетливо снижается в эпизодах медленного сна [Franken et al., 1992; Пастухов и др., 2001]. В данном исследовании показано, что микроинъекции Hsp70 у крыс вызвали дополнительное снижение температуры мозга в эпизодах медленного сна (в среднем на $0.5 \pm 0.03^\circ\text{C}$ ($p < 0.05$)) в течение 1-го, 4-го, 6-го и 7-го часов по

сравнению с контрольными значениями. Этот температурный эффект Hsp70 не соответствовал динамике увеличения средней длительности эпизодов и общего времени медленного сна, совпадение изменений этих показателей было обнаружено только в первый час после введения Hsp70. У голубей найдено более выраженное соответствие динамики снижения температуры мозга (на 0.4 ± 0.07 °C ($p < 0.05$)) в эпизодах медленного сна с динамикой возрастания длительности эпизодов и общего времени этого состояния при действии Hsp70. В эпизодах быстрого сна увеличение температуры мозга у крыс под влиянием Hsp70 было более значительным, чем у голубей. Этот факт может быть связан с тем, что при уменьшении общего времени быстрого сна, длительность эпизодов при действии Hsp70 у крыс остается в 51 раз больше, чем у голубей (в среднем за 8 часов).

Следовательно, уменьшение температуры мозга при действии Hsp70 у крыс и голубей проявляется в основном в эпизодах медленного сна, однако, согласование динамики снижения температуры мозга в первой половине темной фазы суток с инициируемым Hsp70 увеличением длительности эпизодов и общего времени медленного сна и уменьшением сократительной мышечной активности наиболее отчетливо определяется у голубей. Возможно, это связано с тем, что суточная динамика показателей терморегуляции и сна у голубей более контрастна по сравнению с крысами [Сазонов, Пастухов, 1985; Rashotte et al., 1998; Пастухов и др., 2001]. На фоне действия Hsp70 эти видовые различия сохраняются: снижение температуры мозга (на 2°C) в первой половине темной фазы суток у голубей значительно больше, чем в той же части светлой фазы суток у крыс (на 0.5°C), что согласуется с большей пропорцией медленного сна у голубей.

После введения Hsp70i голубям выявлено снижение сократительной мышечной активности и температуры мозга (Рис. 5). Снижение температуры кожи неоперенной части ноги свидетельствует о развитии периферической вазоконстрикции, направленной на компенсацию уменьшения уровня температуры мозга. Микроинъекции Hsc70 в 3-й желудочек мозга не вызывали значимых изменений температуры мозга, сократительной мышечной активности и периферической вазомоторной реакции по сравнению с контролем. Полученные данные свидетельствуют о том, что в терморегуляторные эффекты Hsp70, состоящего из смеси Hsp70i и Hsc70, основной вклад вносит стресс-индуцибельный член семейства HSP70.

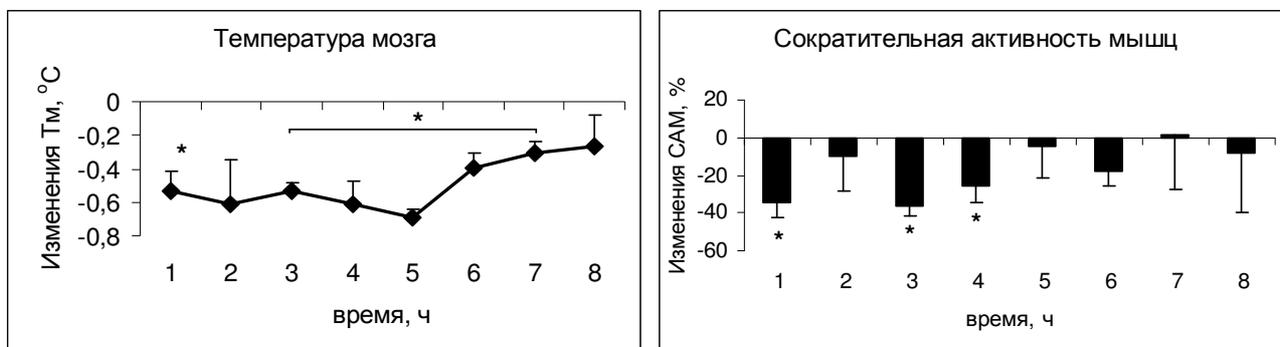


Рис. 5. Изменение температуры мозга (T_m) и сократительной активности мышц (САМ) у голубей после введения Hsp70i в 3-й желудочек мозга в дозе 1.5 мкг. Результаты представлены по отношению к контролю (фосфатный буфер), обозначенному нулевой линией.

3. Влияние белка теплового шока 70 кДа и теплового preconditionирования на показатели судорожной активности у крыс линии КМ с наследственной аудиогенной эпилепсией.

Известно, что при химически индуцированных судорогах у крыс и мышей возрастает экспрессия Hsp70, которая, однако, оказывается недостаточной для купирования последующих судорожных припадков [Ferrer et al, 2002; Ayala, Taria, 2008]. Выявленное в нашем исследовании отчетливое увеличение медленного сна и снижение терморегуляторных показателей у голубей и крыс при действии Hsp70, а также полученные ранее данные об участии ГАМК-ергических механизмов в регуляции сна и висцеральных функций [Екимова, Пастухов, 2005; Пастухов, Екимова, 2005] и противосудорожные эффекты теплового preconditionирования и Hsp70 при гиперактивации глутаматных рецепторов у крыс линии Вистар, не предрасположенных к наследственной эпилепсии, позволили предположить, что Hsp70 способен усиливать тормозные процессы в мозге не только в «норме», но и при повышении активности возбуждающих систем. Оставалось неизвестным, способен ли Hsp70 снизить тяжесть гиперлокомоторного возбуждения на модели наследственной аудиогенной эпилепсии, для которой характерно преобладание возбуждающих процессов в центральной нервной системе.

Для изучения механизмов эпилепсии выведено несколько линий крыс, генетически предрасположенных к аудиогенным судорогам: линии GEPR-3, GEPR-9, WAR [Ross, Coleman, 2000] и линия КМ, созданная в Московском Государственном Университете [Крушинский, 1960]. Крысы линии КМ с наследственной формой эпилепсии обладают высокой чувствительностью к аудиогенной стимуляции. Звуковая стимуляция (частотой 9 кГц, интенсивностью 50 дБ) вызывает у них интенсивный «одноволновой» судорожный припадок в 99% случаев. В исследовании установлено, что аудиогенные судороги у крыс линии КМ начинались с коротким латентным периодом (2 ± 1 с) и состояли из фазы дикого бега (длительностью 3.5 ± 1 с) и фазы клонико-тонических судорог (длительностью 17 ± 1 с) с наиболее выраженным тоническим компонентом (12 ± 1 с). По завершении судорожного припадка у крыс линии КМ наблюдалась атаксия (2 мин), характеризующаяся полной обездвиженностью и неспособностью к самостоятельной двигательной активности, и каталепсия (8-10 мин), сопровождающаяся замиранием животного в любой, даже неудобной для себя позе, и отсутствием реакции на внешние тактильные стимулы. Введение в 3-й желудочек мозга контрольных растворов (физиологический раствор, фосфатный буфер), а также термоденатурированного Hsp70 не изменяли характеристики судорожной активности и не влияли на тяжесть судорожного припадка и послесудорожных моторных изменений.

Через 2.5 часа после микроинъекций Hsp70 в 3-й желудочек мозга в дозе 6 мкг у крыс линии КМ не отмечалось изменений длительности латентного периода инициации аудиогенного судорожного припадка. Наблюдалось значимое снижение длительности дикого бега и клонико-тонических судорог по сравнению с контролем (Рис. 6А). Уменьшение длительности последнего компонента

судорожного припадка происходило за счет снижения длительности тонических судорог (на 28%, $p < 0.01$). Через 5 часов после введения Hsp70 в 3-й желудочек мозга в той же дозе были выявлены сходные по направлению и значению изменения компонентов аудиогенного судорожного припадка, как и через 2.5 часа после микроинъекций Hsp70. Микроинъекции Hsp70 в 3-й желудочек мозга в дозе 10 мкг через 2.5 и 5 часов вызывали значительное снижение длительности тонических судорог (на 37%, $p < 0.001$ и 54%, $p < 0.001$ соответственно) и общей длительности аудиогенного припадка (на 40%, $p < 0.001$), по сравнению с контролем (Рис. 6Б). Отмечено уменьшение тяжести аудиогенных судорог на 1 балл (с 5 до 4 баллов) спустя 5 часов после введения Hsp70. Изменений длительности латентного периода судорожного припадка, атаксии и каталепсии не выявлено.

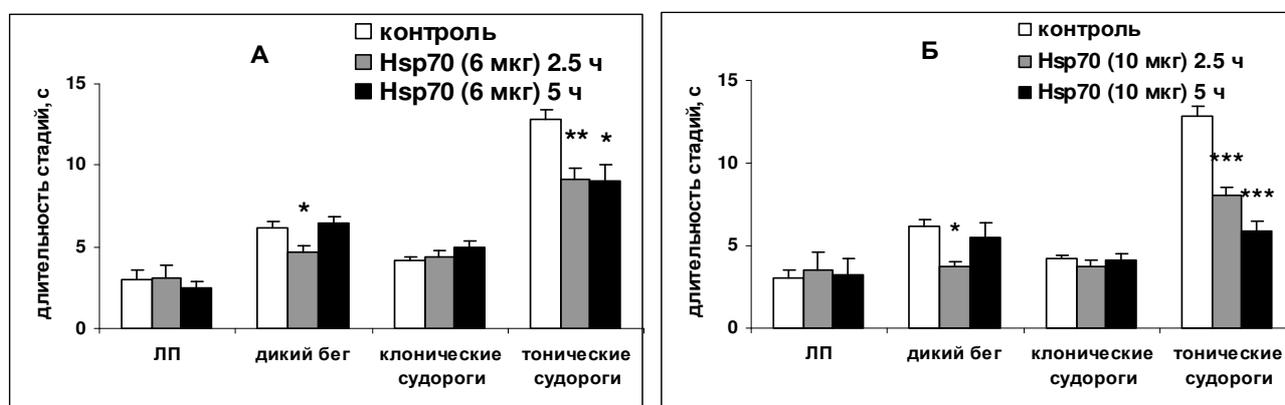


Рис. 6. Изменение длительности латентного периода (ЛП) и стадий судорожного припадка, вызванного аудиогенной стимуляцией у крыс линии Крушинского-Молодкиной после микроинъекций Hsp70 в 3-й желудочек мозга в дозе 6 мкг (А) и 10 мкг (Б).

Считается, что доминантный очаг генерации аудиогенных судорог локализован в ядрах нижних бугров четверохолмия. После микроинъекции NMDA в нижние бугры четверохолмия крысам линии Sprague-Dawley, они становились предрасположенными к аудиогенным судорогам [Faingold, Anderson, 1991]. В данном исследовании введение Hsp70 в 3-й желудочек мозга крысам линии КМ не влияло на длительность латентного периода судорожного припадка и, следовательно, на механизмы его инициации, однако снижало длительность и тяжесть тонических судорог. Предполагается, что в интенсивный судорожный припадок у крыс линии КМ могут быть вовлечены не только нижние бугры четверохолмия, но и другие структуры мозга, отвечающие за развитие клонических и тонических судорог [Семьянов, Годухин, 2001; Семиохина и др., 2006].

Микроинъекции Hsp70i (в дозе 6 мкг) в 3-й желудочек мозга крысам линии КМ вызывали изменения судорожной активности, аналогичные действию Hsp70, состоящего из Hsp70i и Hsc70 (Рис. 7). Hsp70i инициировал достоверное снижение длительности и тяжести тонической фазы ($p < 0.05$), но не влиял на латентный период судорожного припадка. Hsc70 не оказывал значимого действия

на компоненты аудиогенного судорожного припадка у крыс линии КМ. Мы предполагаем, что противосудорожные эффекты Hsp70 связаны с действием только Hsp70i.

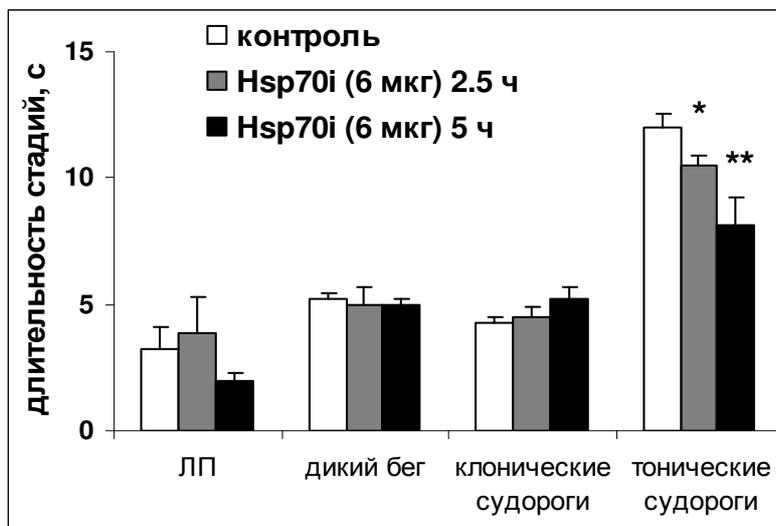


Рис. 7. Изменение длительности латентного периода (ЛП) и стадий судорожного припадка, вызванного аудиогенной стимуляцией у крыс линии Крушинского-Молодкиной после микроинъекций Hsp70i в 3-й желудочек мозга в дозе 6 мкг.

Применение щадящего теплового прекондиционирования (нагревание наркотизированного животного до ректальной температуры 40.5-41 °С в течение 5 мин) у крыс линии КМ вызывало значимое увеличение латентного периода судорог (в 2.2 раза, $p < 0.05$) через 2-7 дней с максимумом эффекта на 4-й день (в 2.8 раза, $p < 0.05$) после теплового воздействия (Рис. 8). Достоверные изменения длительности фаз дикого бега и клонико-тонических судорог не обнаружены.

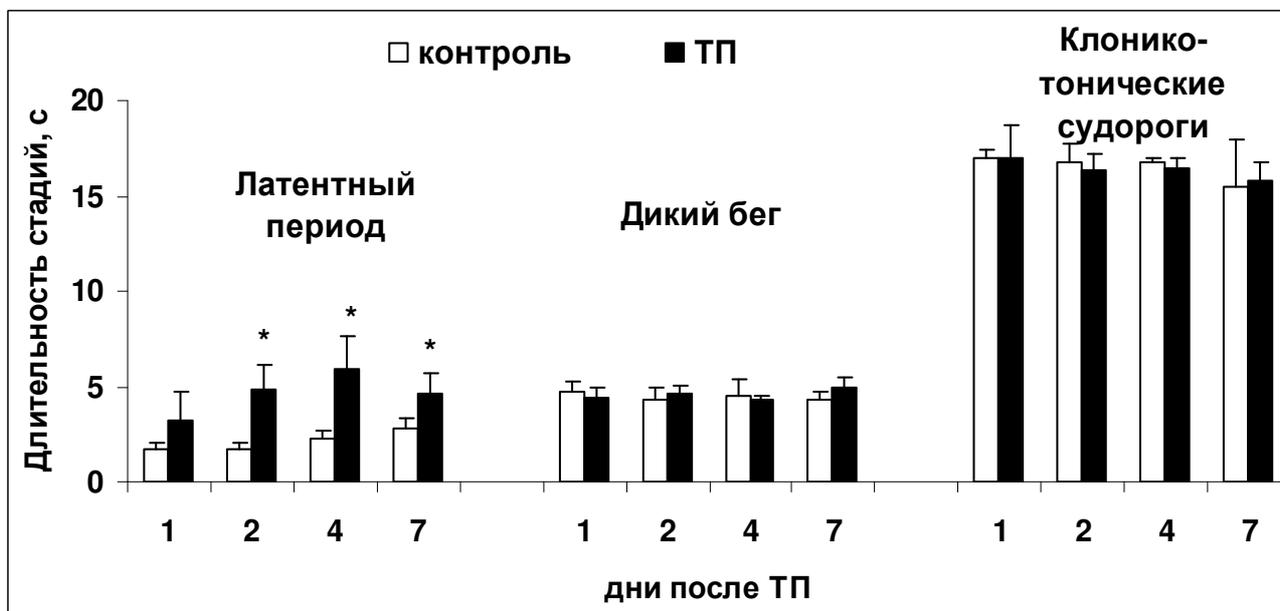


Рис. 8. Изменение длительности стадий судорожного припадка, вызванного аудиогенной стимуляцией у крыс линии Крушинского-Молодкиной после теплового прекондиционирования (ТП).

После теплового воздействия у крыс линии КМ не наблюдалось изменение длительности атаксии и катаlepsии, однако, снижалось количество животных с симптомами катаlepsии (на 50% через 1-2 дня и на 70% через 4-7 дней после теплового пре кондиционирования).

Анализ изменения содержания Hsp70i в плазме крови и структурах мозга после кратковременного теплового пре кондиционирования показал, что через 30 мин после теплового воздействия у крыс линии КМ происходит увеличение содержания Hsp70i в 6.6 ($p < 0.05$) раза по сравнению с контролем, что связано, вероятно, с выходом белка из клеток крови. По-видимому, эта быстрая реакция направлена на защиту организма от неблагоприятных условий среды [Guzhova et al., 2001; Johnson, Fleshner, 2006]. Выявлено, что содержание Hsp70i повышается в гипоталамусе, гиппокампе, среднем мозге и нижних буграх четверохолмия в 1-й и 4-й дни после теплового пре кондиционирования. Наиболее выраженное увеличение содержания Hsp70i отмечено в гиппокампе и нижних буграх четверохолмия. В таламусе, пириформной коре, мозолистом теле, сенсомоторной коре и мозжечке изменения содержания Hsp70i не обнаружены. Изменение содержания Hsc70 в структурах мозга после теплового пре кондиционирования не происходит. Наблюдается определенная связь между максимумом увеличения содержания Hsp70i в нижних буграх четверохолмия и увеличением латентного периода судорожного припадка у крыс линии КМ, поскольку нижние бугры четверохолмия считают ответственными за инициацию аудиогенных судорог [Faingold, Anderson, 1991; Faingold, 1999]. Известно, что при тепловом пре кондиционировании увеличение экспрессии HSPs происходит в течение 12-24 часов [Chen et al., 1999; King et al., 2002]. Вместе с этим отмечается связь протективных свойств HSP70 не с увеличением его экспрессии, а с повышением содержания в клетках [Маргулис, Гужова, 2000]. Предполагается, что длительное влияние теплового пре кондиционирования на судорожную активность у крыс линии КМ до 4-7 дня связаны с увеличением содержания Hsp70i в структурах мозга, ответственных за инициацию аудиогенных судорог.

Таким образом, в ходе работы получены данные о том, что Hsp70, состоящий из двух членов семейства HSP70, обладает сомногенным, терморегуляторным и противосудорожным действием. Введение Hsp70 в 3-й желудочек мозга голубям и крысам вызывает отчетливое увеличение «естественного» медленного сна в период его суточного максимума. При действии Hsp70 увеличение длительности медленного сна сопровождается типичным для этого состояния снижением сократительной активности мышц и температуры мозга. Механизмы изменений характеристик состояний сна и бодрствования и показателей терморегуляции при действии Hsp70 оказались сходными у голубей и крыс; выявленные некоторые различия в эффектах Hsp70 могут быть связаны с видовыми особенностями животных. Hsp70i вызывает изменения изученных характеристик, идентичные по направлению и величине к эффектам Hsp70, состоящего из Hsp70i и Hsc70. Предполагается, что именно со стресс-индуцибельным членом семейства HSP70 связано сомногенное и терморегуляторное действие Hsp70. Проведенное исследование у крыс линии КМ с наследственной эпилепсией показало, что Hsp70 и Hsp70i снижают тяжесть

и длительность тонических судорог, а тепловое прекондиционирование, повышающее уровень Hsp70i в структурах головного мозга, способствует значительной задержке начала судорожного припадка. Эти данные свидетельствуют в пользу предположения о том, что индуцибельный Hsp70i способен усиливать тормозные процессы в мозге как в «нормальных» условиях, так и при преобладании возбуждающих процессов у крыс с наследственной формой аудиогенной эпилепсии.

ВЫВОДЫ

1. Микроинъекции Hsp70, состоящего из двух членов семейства HSP70 (стресс-индуцибельного Hsp70i и конститутивного Hsc70), в 3-й желудочек мозга голубей и крыс вызывают увеличение общего времени медленного сна (в течение первых 7 часов у голубей и первых 3 часов у крыс); это увеличение реализуется путем активации механизмов поддержания более длительных эпизодов медленного сна и не сопровождается изменением мощности спектра электроэнцефалограммы, что указывает на сохранение «естественного» медленного сна. У голубей отмечено более позднее (с 4-го по 8-й час после микроинъекции) достоверное снижение времени быстрого сна, обусловленное уменьшением числа его эпизодов.
2. Микроинъекции Hsp70 приводят к снижению сократительной активности мышц и температуры мозга у голубей и крыс; при этом не выявлено достоверных изменений периферической температуры. Вызываемое Hsp70 снижение температуры мозга в эпизодах медленного сна у голубей, в отличие от крыс, согласуется с увеличением длительности эпизодов и уменьшением сократительной активности мышц.
3. При микроинъекциях индуцибельного Hsp70i выявлены изменения временных характеристик сна и бодрствования и показателей терморегуляции, идентичные эффектам Hsp70. Конститутивный Hsc70 не оказывает влияния на исследованные показатели.
4. Микроинъекции Hsp70 и Hsp70i в 3-й желудочек мозга вызывают близкое по величине уменьшение длительности тонических судорог у крыс линии Крушинского-Молодкиной с наследственной формой аудиогенной эпилепсии; Hsc70 не влияет на судорожную активность.
5. Кратковременное (в течение 5 мин) тепловое прекондиционирование крыс линии Крушинского-Молодкиной приводит к увеличению латентного периода судорог (в 2.8 раза), совпадающему по срокам (через 4 дня) с повышением содержания Hsp70i в гиппокампе, гипоталамусе, миндалине, среднем мозге и, наиболее значительно, в нижних буграх четверохолмия.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах

1. Пастухов Ю.Ф., Екимова И.В., Худик К.А., Гужова И.В. Белок теплового шока 70 кДа, свободный от липополисахарида, обладает гипотермическим и сомногенным действием // ДАН. – 2005. – Т. 402. – N. 2. – С. 275-278.
2. Пастухов Ю.Ф., Екимова И.В., Худика К.А., Гужова И.В. Белок 70кДа в контроле сна и терморегуляции // Ж. эвол. биохим. и физиол. – 2008. – Т. 44. – N 1. – С. 65-71.

Статьи в сборниках научных работ

1. Пастухов Ю.Ф., Екимова И.В., Гужова И.В., Худик К.А. Интегративные механизмы реализации пирогенного и сомногенного эффектов белка теплового шока 70 кДа: гипотеза // Проблемы интеграции функций в физиологии и медицине. – Минск, ПЧУП «Бизнесофсет». – 2004. – С. 291-298.
2. Ницинская Л.Е., Худик К.А., Пастухов Ю.Ф. Влияние теплового прекондиционирования на судорожную активность на разных моделях экспериментальной эпилепсии у крыс // Медико-биологические аспекты действия физических факторов. – Мн., 2006. – С. 181-184.

Тезисы докладов

1. Пастухов Ю.Ф., Екимова И.В., Худик К.А., Андреева Л.И., Гужова И.В. Участие белка теплового шока 70кДа в регуляции висцеральных функций // 3-я Всероссийская конференция (с международным участием) «Механизмы функционирования висцеральных систем». – Санкт-Петербург. – 2003. – С. 246-247.
2. Худик К.А. Физиологические эффекты БТШ70 кДа. // VII Всероссийская медико-биологическая конференции молодых ученых «Человек и его здоровье». – Санкт-Петербург. – 2004. – С. 309-310.
3. Lapshina K.V., Mankovskaja T.N., Hudik K.A. Effect of HSP70 kDa on somato-visceral characteristics before and after the stress. // 8-th Multidisciplinary International Conference of biological psychiatry “Stress and Behavior”. – Psihofarmacol. Biol. Narcol. – 2004. – Т 4. – N. 2-3. – P. 699-700.
4. Худик К.А. Различия в параметрах терморегуляции при центральном действии препаратов белка теплового шока. // XIX съезд физиологического общества им. И.П. Павлова. Симпозиум «Метаболизм, энергообеспечение, терморегуляция». – Екатеринбург. – 2004. – Рос. Физиол. журн. (приложение) – Т 90. – N 8. – С. 53.
5. Екимова И.В., Лапшина К.В., Маньковская Т.Н., Худик К.А., Пастухов Ю.Ф. Сомногенное действие белка теплового шока 70 кДа и его значение для процесса реабилитации после стресса. // 4-ая Всероссийская конференция «Актуальные проблемы сомнологии». – Москва. – 2004. – С. 24.

6. Худик К.А., Эрам С.Ю. Изучение эффектов БТШ 70 кДа на временные и спектральные характеристики медленно-волнового сна у крыс. // Всероссийская конференция молодых исследователей «Физиология и медицина». – Вестник молодых ученых. – Санкт-Петербург. – 2005. – С. 132.
7. Маньковская Т.Н., Худик К.А. Эффекты БТШ 70 кДа до и после стресса. // Всероссийская конференция молодых исследователей «Физиология и медицина». – Вестник молодых ученых. – Санкт-Петербург. – 2005. – С. 73.
8. Hudic K.A., Lapshina K.V., Eram S.Yu., Mankovskaya T.N. Effects of Hsp70 kDa on spectral characteristics of Non-rapid-eye-movement sleep in rats and pigeons. // 9-th Multidisciplinary International Conference of biological psychiatry “Stress and Behavior”. Symposium “Sleep and stress”. – Psihofarmacol. Biol. Narcol. – 2005. – P. 699-700.
9. Mankovskaja T.N., Hudik K.A. Stress protein 70 kDa promotes earlier recovery of sleep after stress. // Abstr. of the 3rd International workshop «Sleep as a window to the world of wakefulness». – Rostov-on-Don. – 2005. – P.68.
10. Hudik K.A. Changes in temporal characteristics of sleep-wake cycle under central and peripheral microinjections of Hsp 70 kDa. // Abstr. of the 3rd International workshop «Sleep as a window to the world of wakefulness». – Rostov-on-Don. – 2005. – P.108.
11. Худик К.А., Ватаев С.И., Пастухов Ю.Ф. Влияние БТШ70 на судорожные припадки, вызванные активацией NMDA-рецепторов и звуковой стимуляцией у крыс. // 4-я Всероссийская конференция (с международным участием) «Механизмы функционирования висцеральных систем». – Санкт-Петербург. – 2005. – С. 260.
12. Ницинская Л.Е., Худик К.А. Изучение противосудорожных эффектов Hsp70 у крыс линии Wistar и Крушинского-Молодкиной // Материалы 10-ой Всероссийской медико-биологической конференции «Человек и его здоровье». – Санкт-Петербург. – 2007. – С.309-310.
13. Hudik K.A., Pastukhov Yu.F. Anticonvulsant effects of protein 70 kDa and thermal preconditioning in Krushinskii-Molodkina rats // Abstr. of the 10th Jubilee Multidisciplinary International Conference of Biological Psychiatry «Stress and behavior». – St.-Petersburg. – 2007. – P. 24.
14. Hudik K.A. Effects of HSP70 on thermal, temporal and spectral characteristics of sleep and wakefulness states in rats and pigeons. // Abstr. of the 4th International workshop «Sleep as a window to the world of wakefulness». – Moscow. – 2007. – P. 113.
15. Худик К.А. Влияние белка теплового шока 70 кДа на судорожный припадок у крыс линии Крушинского-Молодкиной // Материалы XX Съезда физиологического общества им. И.П. Павлова. – Москва. – 2007. – С. 467.
16. Khudik K.A., Nitsinskaya L.E., Guzhova I.V., Ekimova I.V., Pastukhov Yu.F. Role of chaperones 70 kDa in pathogenesis of seizures with different etiology // Abstr. of the 11th Multidisciplinary International Neuroscience and Biological Psychiatry Conference «Stress and behavior». – St.-Petersburg. – 2008. – P. 59-60.

17. Пастухов Ю.Ф., Екимова И.В., Худик К.А., Гусельникова Е.А. Центральные механизмы сомногенных эффектов HSP70 // Тез. докладов VI Всероссийской конференции с международным участием – «Актуальные проблемы сомнологии». – Санкт-Петербург. – 2008. – С. 70.
18. Khudik K. The role of inferior colliculus in audiogenic seizures in Krushinskii-Molodkina rats // Abstr. of the 12th Multidisciplinary International Neuroscience and Biological Psychiatry Conference «Stress and behavior». – St.-Petersburg. – 2009. – P. 39.

Худик К.А. Сомногенные, терморегуляторные и противосудорожные эффекты белков теплового шока 70 кДа // Автореф. дис. канд. биол. наук: 03.00.13 – СПб., 2009. – 22 с.

Подписано в печать 07.10.2009. Формат 60*84 1/16.

Бумага офсетная. Печать офсетная. Печ. л. 1,0.

Тираж 100 экз. Заказ_____ .

Отпечатано с готового оригинал-макета.

ЗАО «Принт-Экспресс»

197101, С.-Петербург, ул. Большая Монетная, 5 лит. А