

На правах рукописи

**Ницинская
Лариса Евгеньевна**

**ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОСУДОРОЖНОГО ДЕЙСТВИЯ БЕЛКА
ТЕПЛОВОГО ШОКА 70 кДа В МОДЕЛЯХ ГЕНЕРАЛИЗОВАННОЙ
ЭПИЛЕПСИИ У КРЫС**

03.03.01. – физиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2010

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

Научный руководитель: кандидат биологических наук, доцент
Екимова Ирина Васильевна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Лукомская Нера Яковлевна

доктор медицинских наук, профессор
Шабанов Петр Дмитриевич

Ведущая организация: **Санкт-Петербургский Государственный
Университет**

Защита диссертации состоится «8» февраля 2011 года в 11 часов на
заседании диссертационного совета (Д 002.127.01) при Учреждении Российской
академии наук Института 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 Учреждения Российской
академии наук Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М.
Сеченова РАН по адресу: 194223, г. Санкт-Петербург, пр. М. Тореза, 44.

Автореферат разослан « » _____ 2010 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
доктор биологических наук, профессор

М.Н. Маслова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Среди наиболее актуальных проблем эпилепсии остаются резистентность более трети больных к медикаментозному лечению и побочные эффекты современных противосудорожных препаратов [Burnham, 2006; Mula et al. 2007]. Это указывает на необходимость дальнейшего изучения механизмов защиты мозга в различных моделях эпилепсии. Особое внимание уделяется поиску веществ, содержащихся в мозге и обладающих нейропротективными свойствами и способностью вмешиваться в ключевые звенья генерации судорожной активности. Перспективными в этом отношении могут оказаться шапероны семейства белков теплового шока Heat Shock Proteins 70 kDa (HSP70).

HSP70 являются одними из основных систем контроля качества белков и защиты клеток и организмов от различных повреждающих факторов. Благодаря шаперонной активности два члена семейства HSP70 - конститутивный (Hsc70) и индуцибельный (Hsp70i) - участвуют в процессах фолдинга и рефолдинга полипептидов, ускорении транслокации белков через мембраны, а также в протеолитической деградациии нестабильных белков, сборке и разборке белковых комплексов [Hartl, Hayer-Hartl, 2002; Ron, Walter, 2007; Morimoto, 2008]. В головном мозге млекопитающих высокие уровни Hsc70 обнаруживаются в нормальных условиях, а Hsp70i - в условиях действия на организм высоких температур, гипоксии, нейротоксических соединений и других повреждающих факторов [Sharp et al., 1991; Bechtold et al., 2000., Moon et al., 2001; Chen, Brown, 2007]. Усиление экспрессии Hsp70i показано в коре головного мозга при височно-лобной эпилепсии у людей [Yang et al., 2008] и в нейронах гиппокампа крыс после генерализованных судорог, спровоцированных каиновой [Vass et al., 1989] или иботеновой кислотами [Planas, 1995]. Какое значение в механизмах эпилептогенеза имеет увеличение экспрессии Hsp70i в структурах головного мозга, пока не вполне понятно. Некоторые исследователи считают, что при развитии эпилептиформной активности мозга увеличение экспрессии и содержания Hsp70i в различных отделах лимбической системы связано с нейропротективной функцией этого белка, поскольку те нейроны, в которых содержание Hsp70i повышается, остаются неповрежденными после генерализованных судорог [Yang et al., 1996; Ayala, Tapia, 2008]. Имеющиеся в литературе единичные данные указывают на возможное противосудорожное действие Hsp70i. Показано, что тепловое прекондиционирование, вызывающее экспрессию белков теплового шока Hsp70i и других членов семейств HSP, в модели наследственной аудиогенной эпилепсии увеличивает только латентный период генерализованных судорог [Худик, 2009]. Остается не ясным, может ли эта процедура изменить длительность моторных компонентов судорог, а также тяжесть судорожного припадка и послесудорожных двигательных нарушений в моделях генерализованных судорог, вызванных гиперактивацией глутаматных рецепторов NMDA-типа или ослаблением тормозных ГАМК-ергических процессов в головном мозге.

В течение многих лет считалось, что большая молекула Hsp70i не способна проходить сквозь плазматическую мембрану клеток, но постепенно накапливались данные о выходе Hsp70i из клеток. Шаперон Hsp70i найден во внеклеточном пространстве, а также в плазме крови и ликворе [Tytell et al., 1986; Guzhova et al. 1998, 2001; Campisi et al., 2003; Steensberg et al., 2006]; его уровень снижается с возрастом и возрастает при таких заболеваниях, как гипертония и атеросклероз [Rockley, 2001]. После введения Hsp70i в ликвор третьего желудочка мозга крыс он преодолевает ликворэнцефалический барьер, проникает в нейроны и пресинаптические терминалы лимбических структур мозга и при этом ослабляет тяжесть NMDA- индуцированных судорог [Ekimova et al., 2010]. Показано, что в нейронах коры головного мозга и гиппокампа Hsp70i колокализуется с везикулярным белком синаптофизином и белком-катализатором синтеза ГАМК глутаматдекарбоксилазой. Остается не выясненным, способен ли Hsp70i вступать в белок-белковое взаимодействие с синаптофизином и глутаматдекарбоксилазой в головном мозге. Противосудорожное действие экзогенного Hsp70i в модели генерализованных судорог, вызванных ослаблением тормозных ГАМК-ергических процессов в головном мозге, не исследовалось.

Цель исследования - определить поведенческие показатели противосудорожного действия индуцибельного белка теплового шока 70 кДа (Hsp70i) в моделях генерализованных NMDA-индуцированных и коразоловых судорог у крыс Вистар и выяснить мишени его действия в гиппокампе.

Выделены следующие **основные задачи**:

1. Изучить влияние ингибитора экспрессии Hsp70i кверцетина на поведенческие показатели генерализованных судорог, вызванных активацией центральных глутаматных рецепторов NMDA-типа и ослаблением тормозных ГАМК-ергических процессов в головном мозге (при системном введении коразола), а также на содержание Hsp70i в плазме крови и структурах головного мозга.
2. Определить эффекты теплового прекондиционирования на поведенческие показатели генерализованных NMDA-индуцированных и коразоловых судорог и содержание Hsp70i в структурах головного мозга и плазме крови.
3. Выяснить, способен ли кверцетин предотвращать влияние теплового прекондиционирования на поведенческие показатели судорожной активности в моделях NMDA-индуцированных и коразоловых судорог и на уровень Hsp70i в плазме крови и структурах головного мозга.
4. Изучить изменения поведенческих показателей коразоловых судорог при микроинъекциях в ликвор третьего желудочка мозга препарата Hsp70 и сопоставить эти изменения с эффектами теплового прекондиционирования.
5. Выяснить способность индуцибельного Hsp70i вступать во взаимодействие с везикулярным белком синаптофизином и белком-ферментом синтеза ГАМК, глутаматдекарбоксилазой 67, в гиппокампе - структуре мозга, критической для генерации и поддержания генерализованной судорожной активности.

Научная новизна

В двух моделях генерализованной эпилепсии у крыс Вистар - при гиперактивации NMDA-типа глутаматных рецепторов и снижении активности тормозных ГАМК-ергических процессов в головном мозге (при системном введении коразола) - впервые установлено: а) отчетливое противосудорожное действие теплового прекондиционирования; б) усиление тяжести судорожного припадка и предотвращение противосудорожного действия теплового прекондиционирования ингибитором экспрессии шаперона Hsp70i кверцетином; в) повышение (или уменьшение) содержания Hsp70i в структурах мозга, участвующих в генерации и поддержании судорог, совпадает по времени с противосудорожным действием (или его угнетением), что указывает на ключевую роль индуцибельного белка Hsp70i в противосудорожных эффектах теплового прекондиционирования. В модели коразоловых судорог впервые обнаружено противосудорожное действие экзогенного Hsp70, сопоставимое по показателям поведения с тепловым прекондиционированием. Впервые выяснены молекулярные мишени противосудорожного действия экзогенного Hsp70i в гиппокампе.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Антиконвульсантные эффекты теплового прекондиционирования совпадают по срокам с увеличением, а проконвульсантные эффекты кверцетина – с уменьшением содержания Hsp70i в структурах мозга, участвующих в реализации генерализованных NMDA-индуцированных и коразоловых судорог.
2. Увеличение содержания в мозге эндогенного Hsp70i (путем теплового прекондиционирования) и экзогенного Hsp70i (при введении препарата Hsp70 в третий желудочек мозга) вызывает сходные противосудорожные эффекты в модели коразоловых судорог.
3. Везикулярный белок синаптофизин и ключевой фермент синтеза ГАМК, глутаматдекарбоксилаза 67, вовлечены в противосудорожное действие индуцибельного члена семейства HSP70.

Теоретическая и практическая значимость работы

Работа имеет фундаментальное значение для понимания защитной роли белков теплового шока семейства 70 кДа при таком социально значимом заболевании как эпилепсия, при котором около трети больных резистентны к медикаментозному лечению. Полученные в ходе исследования данные о противосудорожных эффектах индуцибельного белка Hsp70i в двух моделях генерализованной эпилепсии и выявленные синаптические мишени его противосудорожного действия могут служить основанием для апробации в клинике ряда известных ранее и новых лекарственных средств растительного происхождения, увеличивающих экспрессию и содержание в мозге шаперонов 70 кДа. Перспективным является также использование индукторов Hsp70i при разработке подходов, направленных на снижение побочных эффектов

традиционных противосудорожных препаратов. 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 9-й - 11-й Всероссийских конференциях молодых ученых «Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2006 - 2008), Всероссийской конференции молодых исследователей «Физиология и медицина» (Санкт-Петербург, 2005), на 9-й - 13-й Международных конференциях «Stress and behavior» (Санкт-Петербург, 2005, 2007, 2008 - 2010), на XX и XXI Съездах физиологического общества им. И.П. Павлова (Москва, 2007; Калуга, 2010), на VII Всероссийской конференции с международным участием «Механизмы функционирования висцеральных систем» (Санкт-Петербург, 2009).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 18 работ, из которых статьи в рецензируемых журналах – 3, статьи в сборниках научных работ – 2, тезисы докладов – 13.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, пяти глав, содержащих результаты исследования, обсуждения результатов, выводов и списка литературы, включающего 31 отечественных и 205 зарубежных источников. Работа изложена на 186 страницах машинописного текста, иллюстрирована 5 таблицами и 69 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования выполнены на 235 половозрелых крысах-самцах линии Вистар массой тела 170 - 220 г. Поведенческие судороги вызывали микроинъекцией агониста NMDA-типа глутаматных рецепторов N-метил-D-аспарагиновой кислотой (NMDA) (80 нг, Sigma, США) в третий желудочек мозга (3-й ж.м.) или в/б инъекцией коразола (75 мг/кг, пентилентетразол, Sigma, США). Для введения фармакологических препаратов в 3-й ж.м. животным под общим нембуталовым наркозом (в/б, 50 мг/кг) имплантировали проводящие канюли (0.8 мм каудальнее брегмы, 0 мм от средней линии и 6.0 мм ниже поверхности черепа) [Paxinos, Watson, 1998]. Микроинъекции растворов препаратов в 3-й ж.м. (в объеме 2 мкл) проводили со скоростью введения 0.5 мкл/мин. В модели NMDA-индуцированных судорог регистрировали: латентный период моторных судорог, длительность «дикого» бега, длительность клонических и тонических судорог, количество животных с клоническими и тоническими судорогами, общую продолжительность припадка, количество животных с постсудорожными симптомами атаксии и ротационным синдромом, длительность симптомов атаксии и ротационного синдрома. В модели коразоловых судорог оценивали следующие поведенческие показатели: латентный период судорожного припадка,

длительность клонического и тонического компонентов судорог, количество животных с клоническими и тоническими судорогами, количество животных с симптомами атаксии, их длительность. Тяжесть судорог и послесудорожных симптомов атаксии оценивали в баллах по модифицированной шкале Рэсин [Racine, 1972] и Стёрджин [Рукояткина и др., 2000], соответственно. Для записи и анализа судорожной активности и симптомов атаксии, вызванных NMDA и коразолом, применялась система видеонаблюдения фирмы Logitech (Швейцария).

Для блокады экспрессии Hsp70i использовали биофлавоноид кверцетин (5 мг/кг, ICN, США), который в объеме 0.2 мл вводили животным в/б за 4 ч до инъекции NMDA или коразола. Контрольным животным вводили растворитель кверцетина (в/б, физиологический раствор с добавлением 1% Твин-20) в объеме 0.2 мл. Для усиления эндогенной экспрессии Hsp70i животных подвергали тепловому прекондиционированию за 24 ч до инициации судорог. Для этого наркотизированных крыс (нембутал, 50 мг/кг) нагревали до ректальной температуры 41⁰ С и держали их при такой температуре тела в течение 10 мин. Контрольным крысам за 24 ч до инициации судорог в/б вводили нембутал. Для того чтобы оценить вклад Hsp70i в механизмы развития моторных судорог и послесудорожных двигательных нарушений при тепловом прекондиционировании, животным вводили кверцетин за 4 ч до проведения процедуры теплового прекондиционирования.

В опытах использовали препарат Hsp70, выделенный из красных (медленных) волокон тазобедренной мышцы быка (лаборатория защитных механизмов клетки Института цитологии РАН). Препарат Hsp70 состоял из смеси Hsp70i и Hsc70 в соотношении 7:3. Степень очистки препарата Hsp70 проверялась с помощью электрофореза и составляла более 97% [Guzhova et al., 1998; Novoselova et al., 2005]. Для исследования применяли препарат Hsp70, освобожденный от липополисахарида (ЛПС) путем пропускания через колонку с полимиксин В-агарозным гелем (Sigma, США). Для проверки степени очистки Hsp70 от ЛПС использовали общепринятый LALA-тест (*Limulus polyphemus* amoebocyte lysate assay). Для того чтобы оценить влияние остаточной концентрации ЛПС в препарате Hsp70 на моторные судороги и послесудорожные двигательные нарушения, животным вводили термоденатурированный Hsp70 (нагревание на водяной бане до 100 °С в течение 5 мин). Препарат Hsp70 (6 мкг), термоденатурированный Hsp70 (6 мкг), фосфатный буфер (контрольная группа) вводились в 3-й ж.м. за 2 ч до инициации коразоловых судорог.

Определение содержания Hsp70i в плазме крови проводили с помощью модифицированного метода иммуноферментного анализа [Новоселов и др., 2004] с использованием поликлональных кроличьих антител против Hsp70i (клон R2, разведение 1:2000). Для исследования содержания Hsp70i в структурах головного мозга применяли метод иммуноблоттинга с использованием моноклональных мышинных антител против Hsp70i (клон 2E4, разведение 1:2000). Антитела были получены в лаборатории защитных механизмов клетки Института цитологии РАН.

Исследование взаимодействия Hsp70i с синаптофизинном и глутаматдекарбоксилазой 67 (ГДК 67) проводили с помощью метода ко-

иммунопреципитации. Для этого использовали лизат, приготовленный из гиппокампа в буфере TBS (150 mM NaCl, 20 mM Трис-HCl pH 7.5, 1 mM ЭДТА (pH 8.0), 1% Тритон X-100, смесь ингибиторов протеаз). К пробам, содержащим 1 мг общего белка и доведенным до объема 1000 мкл TBS буфером, добавляли по 20 мкг препарата Hsp70 и инкубировали в течение ночи. После центрифугирования к образцам добавляли по 3 мкл белок-G агарозы (Sigma, США) и 2 мкл антител к синаптофизину (Abscam, Великобритания) или к ГДК 67 (Chemicon, США). В другие образцы добавляли по 20 мкл белок-G агарозы и 20 мкл моноклональных антител против экзогенного Hsp70i (клон 116, полученные в лаборатории защитных механизмов клетки Института цитологии РАН). После инкубации гель осаждали центрифугированием, а супернатант отбирали для приготовления электрофорезных проб. Гель три раза отмывали TBS буфером и использовали для приготовления электрофорезных проб. Определение Hsp70i, синаптофизина или ГДК 67 проводили с помощью электрофореза и иммуноблоттинга. Для контроля за неспецифическим связыванием готовили пробы из лизатов, проинкубированных с белок-G- агарозой.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы Statistica 6.0. Для сравнения 2-х независимых групп животных по количественному признаку использовали t-критерий Стьюдента (при нормальном распределении), U-критерий Манна-Уитни (при ненормальном распределении). При проведении анализа качественных признаков в 2 независимых группах (анализ таблиц 2 x 2) применяли точный критерий Фишера. Различия полученных результатов считались статистически достоверными при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Влияние кверцетина на содержание Hsp70i в плазме крови и структурах головного мозга, а также на поведенческие показатели генерализованных судорог у крыс линии Вистар.

В контрольных условиях содержание Hsp70i в плазме крови крыс Вистар составляет в среднем 5 ± 0.9 нг/мл. Введение растворителя кверцетина не влияло на уровень Hsp70i в плазме крови. Через 4 ч после в/б введения кверцетина у 100% крыс содержание Hsp70i в плазме крови было ниже определяемого уровня.

Из данных литературы известно, что в механизмы генерации и поддержания NMDA-индуцированных и коразоловых судорог вовлечены пириформная кора, миндалина, гиппокамп, гипоталамус, таламус, средний мозг, ядра мозжечка и др. структуры [Avoli et al., 2002; Valisek et al., 2007; Miller et al., 1987; Snyder-Keller, Keller, 2001; Brevard et al., 2006]. Поэтому при изучении содержания Hsp70i в головном мозге именно этим структурам уделялось особое внимание. Методом иммуноблоттинга выяснено, что через 4 ч после введения кверцетина содержание Hsp70i снижалось в гиппокампе и таламусе по сравнению с контролем (в/б введение растворителя кверцетина). В миндалине, гипоталамусе, пириформной коре, мозжечке и среднем мозге содержание Hsp70i не изменялось.

Введение NMDA крысам Вистар приводило с латентным периодом 6 ± 0.6 с к развитию «дикого» бега (длительностью 24 ± 1.7 с). Фаза «дикого» бега у 86% животных заканчивалась клоническими судорогами (12 ± 1.3 с), которые у 33% крыс переходили в фазу тонических судорог (3 ± 0.9 с). Общая длительность судорожного припадка составляла 36 ± 2.2 с. Судороги, индуцированные NMDA, вызывали гибель у 13% крыс. Тяжесть припадка составляла 3.8 балла. После окончания генерализованных судорог у 43% животных наблюдались симптомы атаксии (продолжительностью 82 ± 15.6 с), которые проявлялись неуклюжими и резкими движениями, потерей баланса при вставании на задние лапы, редкими заваливаниями на бок. Тяжесть симптомов атаксии составляла 2.5 балла. Ротационный синдром длительностью 27 ± 5.1 с наблюдался у 64% животных. Введение растворителя кверцетина за 4 ч до инициации судорог не влияло на моторные компоненты NMDA-индуцированных судорог и послесудорожные двигательные нарушения.

Установлено, что NMDA-индуцированные судороги не вызывали изменения содержания Hsp70i в плазме крови крыс Вистар. Анализ содержания Hsp70i в структурах головного мозга выявил, что через 24 ч после NMDA-индуцированных судорог уровень Hsp70i увеличивался в гиппокампе и не изменялся в пириформной коре, миндалине и гипоталамусе по сравнению с контролем (микроинъекция фосфатного буфера в 3-й ж.м.).

Введение кверцетина за 4 ч до введения NMDA увеличивало длительность тонических судорог в 4.3 раза ($p < 0.05$) (рис. 1 А) и общую длительность судорожного припадка в 1.2 раза ($p < 0.05$) (рис. 1 А) по сравнению с контролем. Несмотря на усиление тяжести судорожного припадка (рис. 1 Б) (преимущественно за счет возрастания на 30% ($p < 0.05$) числа крыс с наиболее опасными для жизни тоническими судорогами), ни одно животное при введении кверцетина не погибло. В период после окончания судорожного припадка наблюдалось увеличение на 62% ($p < 0.05$) числа крыс с симптомами атаксии, их средней длительности в 7 раз ($p < 0.05$) и тяжести (практически у всех животных выявлялись бочкообразные движения или полная неспособность к перемещению). Увеличивалось число крыс с ротационным синдромом (на 20%) и повышалась его средняя длительность в 1.9 раз ($p < 0.05$) по сравнению с контролем.

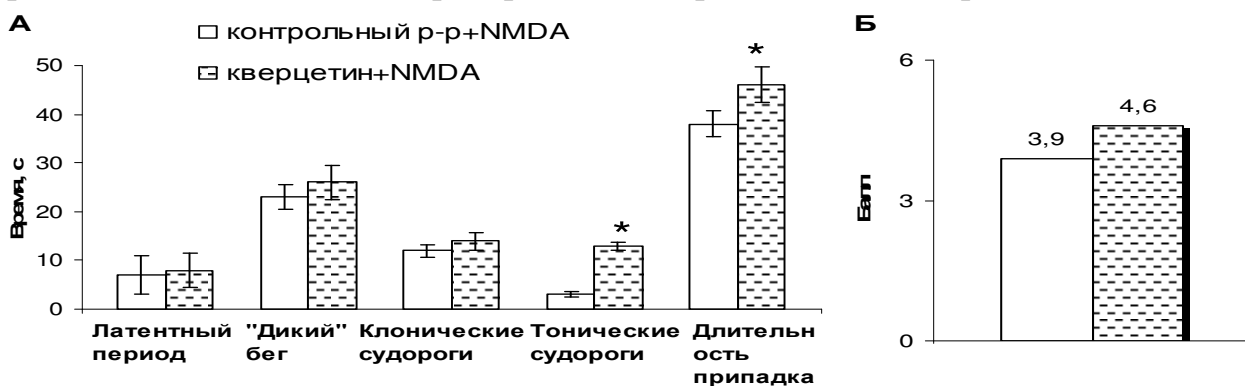


Рис. 1 Влияние кверцетина на моторные компоненты NMDA-индуцированных судорог (А) и на тяжесть судорожного припадка (Б) у крыс линии Вистар.

Здесь и на рисунках 2, 4-8 данные на рисунке А представлены как среднее арифметическое \pm ошибка среднего; данные на рисунке Б представлены в виде усредненных значений баллов.

Обозначения:

«контрольный р-р+NMDA» - крысы, которым за 4 ч до инъекции NMDA в/б вводили растворитель кверцетина (n=8)

«кверцетин+NMDA» - крысы, которым за 4 ч до инъекции NMDA в/б вводили кверцетин (n=10)

Здесь и на последующих рисунках звездочками отмечены статистически значимые различия между экспериментальной и контрольной группами: * - при уровне значимости $p < 0.05$, ** - при уровне значимости $p < 0.01$.

Введение крысам линии Вистар коразола приводило с латентным периодом 42 ± 1.9 с к развитию судорожного припадка, начинавшегося с отдельных подергиваний скелетной мускулатуры туловища и развития орально-лицевых судорог. После этого у всех исследуемых животных следовала фаза клонических судорог (длительностью 12 ± 0.9 с), а затем у 90% - фаза тонических судорог (10 ± 1.2 с). Коразоловые судороги вызвали смерть у 90% крыс. Тяжесть припадка составляла 6 баллов. После окончания судорожного припадка у 90% животных наблюдались двигательные нарушения в виде симптомов атаксии (продолжительностью 1233 ± 63.2 с и тяжестью в 4.9 баллов), которые проявлялись в виде значительного ухудшения антигравитационных рефлексов, полной неспособности к перемещению. Введение растворителя кверцетина за 4 ч до инициации судорог не изменяло поведенческих показателей коразоловых судорог.

Коразоловые судороги, как и NMDA-индуцированные судороги, не влияли на содержание Hsp 70i в плазме крови крыс. Через 6 ч после окончания коразоловых судорог содержание Hsp70i увеличивалось в гиппокампе, а через 24 ч – в гиппокампе и мозжечке и не изменялось в остальных исследованных структурах по сравнению с контролем (в/б инъекция физиологического раствора).

Введение кверцетина увеличивало длительность клонических судорог в 2 раза ($p < 0.05$) (рис. 2 А), а тонических – в 1.4 раза ($p < 0.05$) (рис. 2 А). Блокада экспрессии Hsp70i кверцетином не влияла на гибель животных и тяжесть судорожного припадка по сравнению с контролем (рис. 2 Б). Изменений числа животных с симптомами атаксии, их длительности и тяжести не обнаружено.

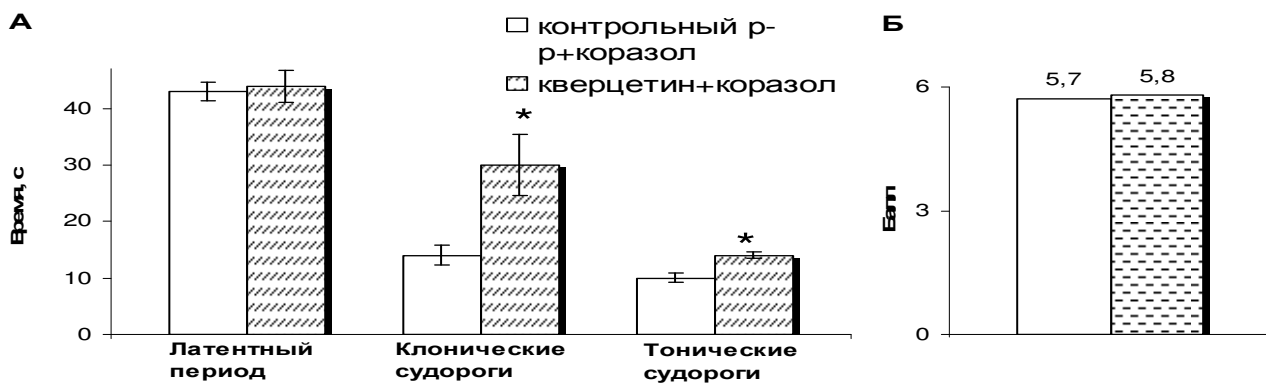


Рис. 2 Влияние кверцетина на моторные компоненты коразоловых судорог (А) и на тяжесть судорожного припадка (Б) у крыс линии Вистар.

Обозначения:

«контрольный р-р+ коразол» - крысы, которым за 4 ч до инъекции коразола в/б вводили растворитель кверцетина (n=9)

«кверцетин+коразол» - крысы, которым за 4 ч до инъекции коразола в/б вводили кверцетин (n=11)

Увеличение длительности моторных компонентов судорожных припадков и послесудорожных двигательных нарушений, выявляемое в те же сроки, что и уменьшение содержания Hsp70i в плазме крови и структурах головного мозга, свидетельствует о возможном вовлечении шаперона Hsp70i в центральные механизмы регуляции генерализованных судорог. Снижение уровня Hsp70i в гиппокампе и таламусе, нейроны и нервные сети которых включены в механизмы инициации и поддержания эпилептиформной активности мозга [Avoli et al., 2002; Brevard, et al., 2006], по-видимому, приводит к усилению нарушений синаптических процессов в этих структурах, вызванных NMDA или коразолом, и, как следствие, к увеличению тяжести судорожного синдрома и послесудорожных двигательных нарушений. Основанием для данного предположения послужили исследования, в которых показано, что Hsp70 вовлечен в молекулярные механизмы экзоцитоза [Swaine et al., 2006] и клатрин-зависимого эндоцитоза синаптических везикул [Ungewickell et al., 1995, Morgan et al., 2001], а также модулирования работы N-типа Ca^{2+} каналов [Natochin et al., 2005; Miller et al., 2003].

2. Исследование эффектов теплового прекондиционирования на поведенческие показатели NMDA-индуцированных и коразоловых судорог и содержание Hsp70i в плазме крови и структурах головного мозга

Чтобы определить способность эндогенного белка Hsp70i оказывать противосудорожное действие в моделях генерализованной эпилепсии у крыс, представлялось важным исследовать влияние увеличения его содержания в головном мозге на судорожную активность и послесудорожные двигательные нарушения, индуцированные NMDA и коразолом. Для увеличения содержания Hsp70i в головном мозге использовали краткосрочное тепловое прекондиционирование крыс, которое, как известно, вызывает увеличение экспрессии и содержания белков теплового шока, в том числе и Hsp70i, в различных структурах мозга [Manzerra et al., 1997; Leoni et al., 2000]. Поскольку тепловое прекондиционирование проводилось в условиях нембулового наркоза, были выполнены контрольные серии экспериментов по изучению эффекта нембутала на исследуемые показатели через 24 ч с момента его введения.

Наше исследование показало, что введение нембутала не влияло на содержание Hsp70i в плазме крови крыс Вистар. Через 15 мин после теплового прекондиционирования содержание Hsp70i в плазме крови увеличивалось в 4.5 раз ($p < 0.01$), а к 60 мин снижалось до контрольных значений. Через 6 ч после теплового прекондиционирования содержание Hsp70i увеличивалось в

пириформной коре, таламусе, гипоталамусе, гиппокампе, среднем мозге и мозжечке и не изменялось в миндалине, по сравнению с контролем (рис. 3). Через 24 ч после теплового прекондиционирования содержание Hsp70i увеличивалось во всех исследованных структурах (рис. 3).

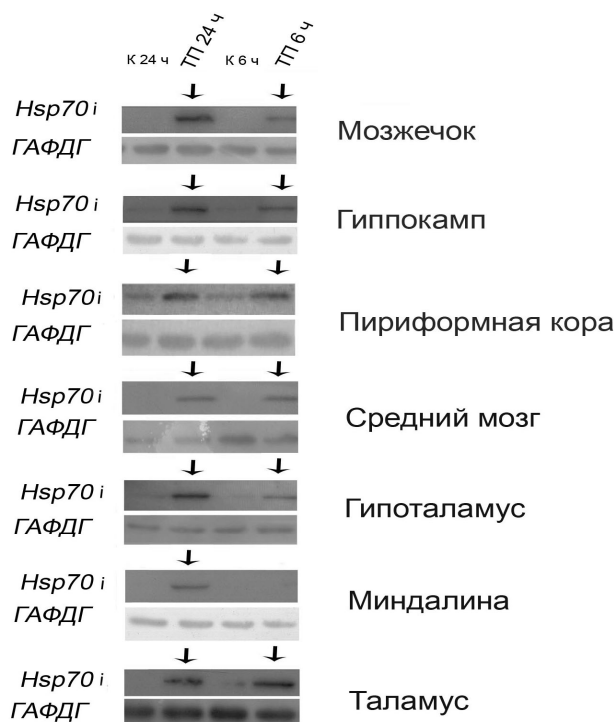


Рис. 3 Влияние теплового прекондиционирования на содержание индуцибельного белка теплового шока 70 кДа (Hsp70i) в структурах головного мозга крыс линии Вистар.

Обозначения:
 «К 6 ч», «К 24 ч» - в/б введение нембутала контрольным крысам за 6 ч и 24 ч до декапитации, соответственно;
 «ТП 6 ч», «ТП 24 ч» - крысы, которых декапитировали через 6 ч и 24 ч после теплового прекондиционирования, соответственно.

Выяснено, что введение нембутала не влияло на поведенческие компоненты NMDA-индуцированных судорог и послесудорожные двигательные нарушения. Проведение процедуры теплового прекондиционирования под нембуталовым наркозом увеличивало латентный период «дикого» бега (в 14 раз, $p < 0.01$), снижало длительность клонических судорог (в 1.9 раза, $p < 0.05$) и общую длительность судорожного припадка (в 1.5 раз, $p < 0.05$) по сравнению с контролем (рис. 4 А). Тяжесть судорог после теплового прекондиционирования снижалась (рис. 4 Б) преимущественно за счет сокращения на 56% ($p < 0.05$) количества крыс с клоническими судорогами. Обнаружено уменьшение в 2 раза числа крыс с симптомами атаксии ($p < 0.05$) и ослабление их тяжести. В отличие от контрольной группы, симптомы атаксии после теплового прекондиционирования проявлялись в виде необычных, неуклюжих и резких движений. Количество животных с ротационным синдромом и его длительность не изменялись.



Рис. 4 Влияние теплового прекондиционирования на моторные компоненты NMDA-индуцированных судорог (А) и на тяжесть судорожного припадка (Б) у крыс линии Вистар.

Обозначения:

«нембутал+NMDA» - контрольные крысы, подвергавшиеся нембуталовому наркозу за 24 ч до введения NMDA (n=5);

«ТП+NMDA» - крысы, подвергавшиеся тепловому прекондиционированию за 24 ч до введения NMDA (n=9).

Показано, что инъекция нембутала не изменяла моторные компоненты судорог и послесудорожные симптомы атаксии, вызванные коразолом. Процедура теплового прекондиционирования в 1.8 раз ($p < 0.05$) увеличивала латентный период коразоловых судорог и снижала тяжесть судорожного припадка по сравнению с контролем (рис. 5 А, Б). Снижение тяжести коразоловых судорог происходило за счет уменьшения числа животных с тоническими судорогами (на 50%, $p < 0.05$) и снижения смертности (на 50%, $p < 0.05$). Тепловое прекондиционирование вдвое ($p < 0.05$) сокращало число животных с симптомами атаксии, их длительность (в 1.4 раза, $p < 0.05$) и тяжесть. После теплового прекондиционирования животные уже могли поддерживать баланс во время вставания на лапы, однако, сохранялись резкие и неуклюжие движения.

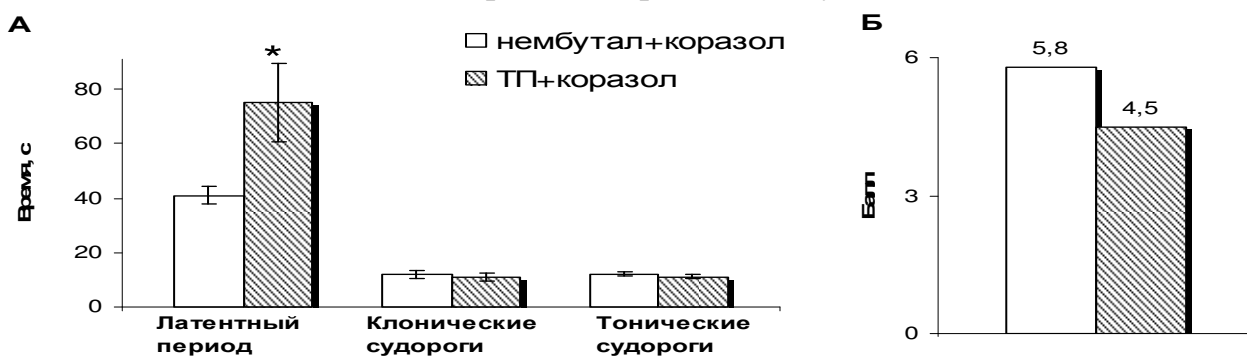


Рис. 5 Влияние теплового прекондиционирования на моторные компоненты коразоловых судорог (А) и на тяжесть судорожного припадка (Б) у крыс линии Вистар.

Обозначения:

«нембутал+коразол» - контрольные крысы, подвергавшиеся нембуталовому наркозу за 24 ч до введения коразола (n=9);

«ТП+коразол» - крысы, подвергавшиеся тепловому прекондиционированию за 24 ч до введения коразола (n=10).

Полученные данные свидетельствуют, что при инициации NMDA и коразоловых судорог на сроках, совпадающих с увеличением содержания Hsp70i в структурах лимбической системы, наблюдается увеличение латентного периода судорожного припадка, уменьшение его тяжести и послесудорожных симптомов атаксии. Эти данные позволили нам высказать гипотезу, что основной вклад в противосудорожные эффекты теплового прекондиционирования вносит индуцибельный белок Hsp70i.

3. Влияние кверцетина на поведенческие показатели судорожной активности в моделях генерализованных судорог и на уровень Hsp70i в плазме крови и структурах головного мозга после теплового прекондиционирования

Поскольку тепловое прекондиционирование вызывает экспрессию не только Hsp70i, но и других членов семейств белков теплового шока [Bechtold, Brown, 2003; Kim et al., 2004], которые могут обладать и антагонистическими свойствами, представлялось важным изучить влияние ингибитора экспрессии Hsp70i кверцетина на поведенческие показатели судорожной активности в моделях NMDA-индуцированных и коразоловых судорог и на уровень Hsp70i в плазме крови и структурах головного мозга после теплового прекондиционирования. Проведенное исследование показало, что введение кверцетина за 4 ч до теплового прекондиционирования предотвращало вызываемые им противосудорожные эффекты и повышение содержания Hsp70i в плазме крови и структурах головного мозга (пириформной коре, гиппокампе, миндалине, гипоталамусе, таламусе, среднем мозге). В этих опытах отмечено утяжеление судорожного припадка, вызванного введением NMDA. Об этом свидетельствовали: уменьшение латентного периода «дикого» бега в 12 раз ($p < 0.01$), увеличение длительности клонических судорог в 1.7 раз ($p < 0.05$) и общей длительности судорожного припадка в 1.5 раза ($p < 0.05$) по сравнению с группой животных, которых подвергали тепловому прекондиционированию (рис. 6 А). При этом число крыс с клоническими судорогами возросло на 56% ($p < 0.05$) и тяжесть припадка увеличивалась (рис. 6 Б). После окончания судорог наблюдалось увеличение числа крыс с симптомами атаксии (на 78%, $p < 0.05$), их длительности (в 2 раза, $p < 0.05$) и тяжести по сравнению с тепловым прекондиционированием и контролем (в/б растворитель кверцетина, через 4 ч - введение нембутала). Практически у всех животных выявлялись бочкообразные движения или полная неспособность к перемещению. Количество животных с ротационным синдромом и его длительность не изменялись.

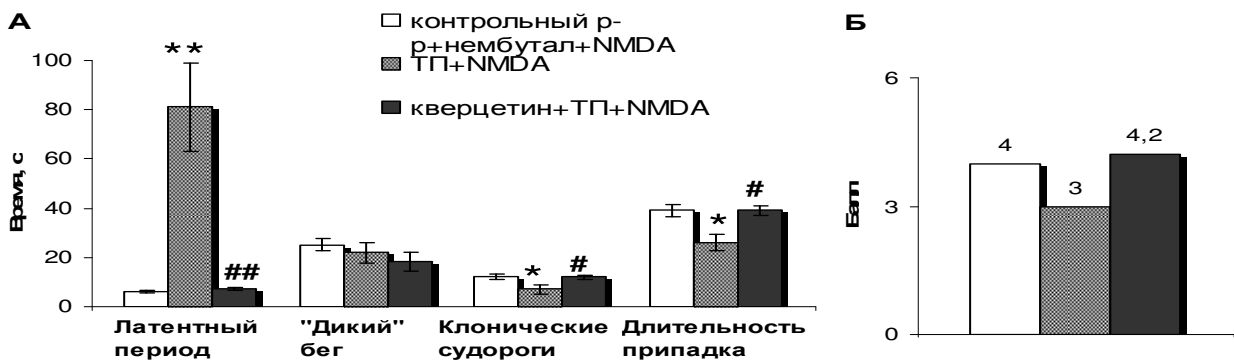


Рис. 6 Влияние кверцетина на моторные компоненты NMDA-индуцированных судорог (А) и на тяжесть судорожного припадка (Б) после теплового прекондиционирования у крыс линии Вистар.

Обозначения:

«контрольный р-р+нембутал+NMDA» - крысы, которым за 24 ч до инъекции NMDA в/б вводили растворитель кверцетина и нембутал (n=5);

«ТП+NMDA» - крысы, подвергавшиеся тепловому прекондиционированию за 24 ч до введения NMDA (n=9);

«кверцетин+ТП+NMDA» - крысы, которым вводили NMDA через 24 ч после теплового прекондиционирования, проведенного через 4 ч после введения кверцетина (n=5).

Решетками отмечены статистически значимые различия между группами «ТП+NMDA» и «кверцетин+ТП+NMDA». # - при уровне значимости $p < 0.05$, ## - при уровне значимости $p < 0.01$.

В модели коразоловых судорог введение кверцетина за 4 ч до теплового прекондиционирования, также как и при NMDA-индуцированных судорогах, усиливало тяжесть судорожного припадка. Об этом свидетельствовали снижение латентного периода судорог в 2 раза ($p < 0.05$) и увеличение длительности тонических судорог в 1.4 раза ($p < 0.05$) по сравнению с тепловым прекондиционированием (рис. 7 А). Тяжесть коразоловых судорог увеличивалась (рис. 7 Б) за счет увеличения количества животных с тоническими судорогами (на 36%, $p < 0.05$) и увеличения гибели животных (на 46%, $p < 0.05$). При введении кверцетина за 4 ч до теплового прекондиционирования наблюдалось увеличение на 36% ($p < 0.05$) количества крыс с симптомами атаксии, их длительности (в 1.3 раза, $p < 0.05$) и тяжести. Практически у всех животных симптомы атаксии проявлялись неспособностью к перемещению или бочкообразными движениями, чего не наблюдалось в группе с тепловым прекондиционированием.

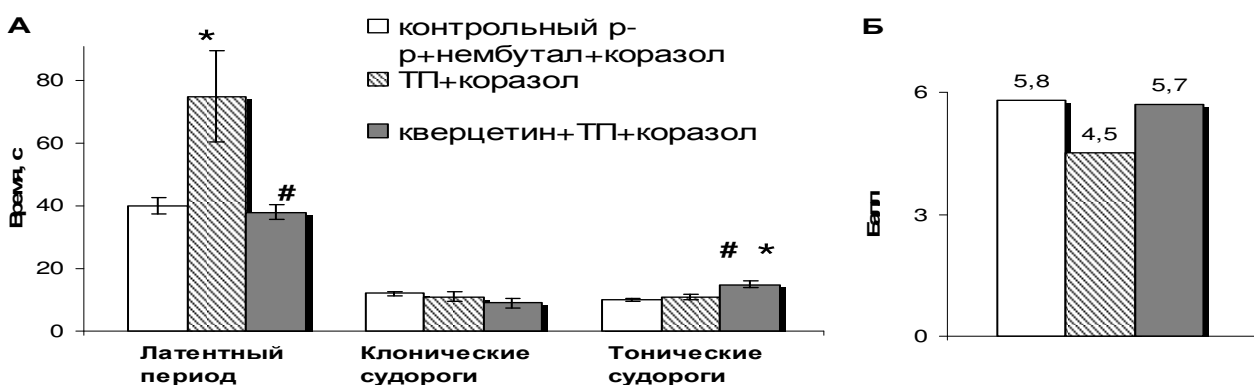


Рис. 7 Влияние кверцетина на моторные компоненты коразоловых судорог (А) и на тяжесть судорожного припадка (Б) после теплового прекондиционирования у крыс линии Вистар.

Обозначения:

«контрольный р-р+нембутал+ коразол» - крысы, которым за 24 ч до инъекции коразола в/б вводили растворитель кверцетина и нембутал (n=7);

«ТП+ коразол» - крысы, подвергавшиеся тепловому прекондиционированию за 24 ч до введения коразола (n=10);

«кверцетин+ТП+коразол» - крысы, которым вводили коразол через 24 ч после теплового прекондиционирования, проведенного через 4 ч после введения кверцетина (n=7).

Решеткой отмечены статистически значимые различия между группами «ТП+коразол» и «кверцетин+ТП+коразол» при уровне значимости $p < 0.05$.

Полученные результаты подтверждают гипотезу о том, что основной вклад в противосудорожные эффекты теплового прекондиционирования вносит индуцибельный белок Hsp70i, содержание которого значительно возрастает после теплового прекондиционирования в лимбических структурах головного мозга, вовлеченных в инициацию и поддержание генерализованных судорог. Противосудорожные эффекты Hsp70i могут быть связаны с его способностью модулировать пресинаптические процессы передачи сигнала в головном мозге. В пользу данного предположения указывают электрофизиологические исследования, выполненные на слайсах продолговатого мозга мыши и нервно-мышечном соединении личинки *Drosophila*, в которых показано, что тепловое прекондиционирование защищало синаптическую передачу от повреждающего действия высоких температур путем модулирования пресинаптических процессов высвобождения нейромедиаторов [Karunanithi et al., 1999; Kelty et al., 2002].

4. Изучение противосудорожных эффектов препарата Hsp70

Увеличения содержания Hsp70i в структурах головного мозга можно достичь также путем введения в ликворную систему мозга препарата Hsp70 [Ekimova et al., 2010]. Проведенное исследование показало, что введение препарата Hsp70 в ликвор 3-го ж.м. увеличивало латентный период судорожного припадка в 1.2 раза ($p < 0.05$) и в 1.7 раз ($p < 0.05$) укорачивало длительность клонических судорог по сравнению с контролем (рис. 8 А). Количество животных с тоническими судорогами уменьшалось на 45% ($p < 0.05$). Экзогенный Hsp70, как и тепловое прекондиционирование, понижал смертность крыс на 45% ($p < 0.05$) и тяжесть судорог (рис. 8 Б). Отмечено уменьшение числа крыс с симптомами атаксии на 45% ($p < 0.05$) и ослабление их тяжести. Симптомы атаксия проявлялись в виде резких, неуклюжих движений и редких заваливаний на бок. Введение растворителя Hsp70 (фосфатный буфер) и термоденатурированного Hsp70 в 3-й ж.м. крыс не оказывало влияния на моторные компоненты коразоловых судорог и послесудорожные двигательные нарушения.

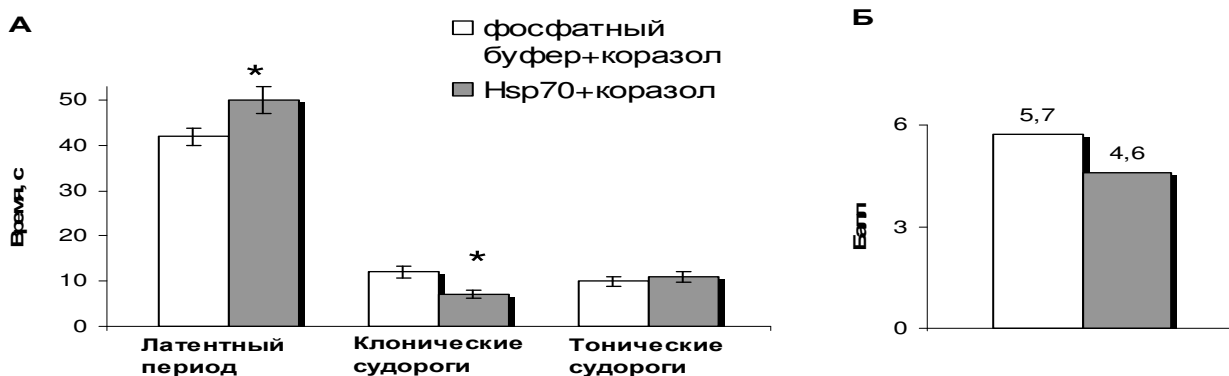


Рис. 8 Влияние экзогенного Hsp70 на моторные компоненты коразоловых судорог (А) и на тяжесть судорожного припадка (Б) у крыс линии Вистар.

Обозначения:

«фосфатный буфер+коразол» - крысы, получавшие инъекцию фосфатного буфера в 3-й ж.м. за 2 ч до в/б введения коразола (n=9);

«Hsp70+коразол» - крысы, которым за 2 ч до введения коразола делали микроинъекцию Hsp70 в 3-й ж.м. (n=11).

Таким образом, увеличение содержания в мозге экзогенного Hsp70i (при введении его в 3-й ж. м.) оказывает сходный с тепловым прекоондиционированием противосудорожный эффект в модели коразоловых судорог. Эти данные являются еще одним подтверждением противосудорожного действия белка теплового шока 70 кДа в модели генерализованной эпилепсии.

5. Исследование белок-белкового взаимодействия экзогенного индуцибельного Hsp70i с синаптофизин и глутаматдекарбоксилазой 67

С помощью метода конфокальной микроскопии недавно показано, что меченый флуоресцентным красителем препарат Hsp70, введенный в 3-й ж.м. крыс, способен проникать в структурные элементы мозга [Ekimova et al., 2010]. В гиппокампе экзогенный Hsp70 колокализовался с белком-катализатором синтеза ГАМК, глутаматгидроксилазой 67 (ГДК 67), и белком синаптических везикул, синаптофизин. Эти данные позволили предположить, что Hsp70 может физически связываться с синаптофизин и ГДК 67. С помощью метода ко-иммунопреципитации выяснено, что в гиппокампе экзогенный индуцибельный Hsp70i взаимодействует с синаптофизин (рис. 9), о чем свидетельствовало появление в преципитате Hsp70i (верхняя панель рис. 9) и синаптофизина (нижняя панель рис. 9). Синаптофизин и Hsp70i присутствовали также в супернатанте (фракция белков лизата, не связавшихся с антителами против синаптофизина или экзогенного Hsp70i). Это свидетельствует об избыточном количестве Hsp70i и синаптофизина в инкубационной смеси.

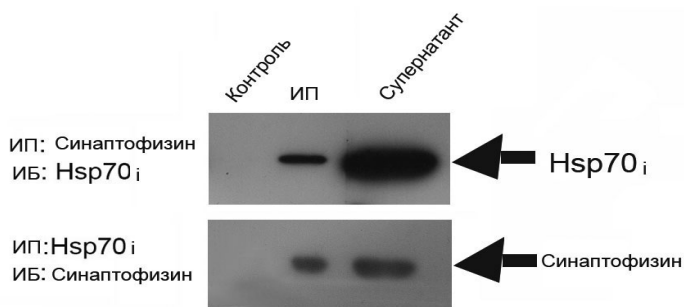


Рис. 9 Экзогенный индуцибельный Hsp70i вступает в белок-белковое взаимодействие с синаптофизин в гиппокампе крыс. Верхняя панель рис.: после иммунопреципитации с антителами

против синаптофизина белковые комплексы осаждали белок-G- агарозой и анализировали методом ИБ с антителами против экзогенного Hsp70i. Нижняя панель рис.: после иммунопреципитации с антителами против экзогенного Hsp70i белковые комплексы осаждали белок-G- агарозой и анализировали методом ИБ с антителами против синаптофизина. Сокращения здесь и на рис. 10: ИП – иммунопреципитат, ИБ – иммуноблоттинг.

Выявлено, что экзогенный Hsp70i способен вступать во взаимодействие и с ГДК 67 в гиппокампе крыс. На это указывало появление в преципитате Hsp70i (рис. 10). На рис. 10 видно, что Hsp70i присутствует также в супернатанте, что указывает на избыточное количество Hsp70i в инкубационной смеси. Эти данные позволили предположить, что синаптофизин и ГДК 67 - ключевые мишени противосудорожного действия индуцибельного Hsp70i.

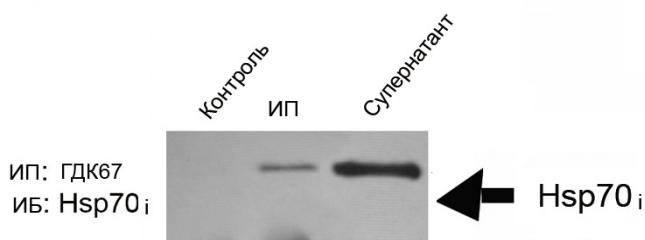


Рис. 10 Экзогенный индуцибельный Hsp70i вступает в белок-белковое взаимодействие с ГДК 67 в гиппокампе крыс. На рис. 10: после иммунопреципитации с антителами против ГДК 67 белковые комплексы осаждали белок-G- агарозой и анализировали методом ИБ с антителами против экзогенного Hsp70i.

Таким образом, в ходе работы получены новые данные о том, что ингибитор экспрессии Hsp70i кверцетин, вызывающий уменьшение содержания Hsp70i в плазме крови и структурах головного мозга (гиппокамп, таламус), оказывал проконвульсантное действие в моделях генерализованной эпилепсии. Тепловое прекондиционирование, увеличивавшее содержания Hsp70i в структурах головного мозга, вовлеченных в генерацию и поддержание судорожной активности (гиппокамп, пириформная кора, миндалина, гипоталамус, таламус, средний мозг), напротив, оказывало противосудорожное действие и снижало послесудорожные двигательные нарушения, вызванные NMDA и коразолом. В условиях действия ингибитора экспрессии Hsp70i кверцетина, тепловое прекондиционирование не вызывало увеличения содержания Hsp70i в структурах головного мозга крыс и не оказывало противосудорожного действия в моделях генерализованной эпилепсии. Эти данные указывают на то, что противосудорожное действие теплового прекондиционирования связано с

увеличением содержания индуцибельного Hsp70i в структурах головного мозга, «критических» для реализации судорожной активности. В пользу данного предположения свидетельствуют и данные, полученные при введении экзогенного Hsp70 в 3-й ж.м. крыс. Экзогенный Hsp70 оказывал противосудорожное действие, сходное с тепловым прекондиционированием. В ходе исследования выяснено, что в гиппокампе молекулярными мишенями противосудорожного эффекта Hsp70i могут являться везикулярный белок синаптофизин и ключевой фермент синтеза ГАМК, ГДК 67. Можно полагать, что противосудорожное действие Hsp70i связано с его способностью вовлекаться в молекулярные механизмы модуляции экзоцитоза синаптических везикул и функции фермента синтеза ГАМК, ГДК 67, в интернейронах гиппокампа. Возникновение судорожного синдрома связано с нарушением баланса между возбуждающими и тормозными процессами в мозге. По-видимому, увеличение содержания Hsp70i в головном мозге, достигнутое тепловым прекондиционированием или введением препарата Hsp70 в 3-й ж.м., усиливает ГАМК-связанные пресинаптические механизмы передачи тормозного сигнала в ЦНС. Эти тормозные механизмы являются ключевыми в процессах снижения активности возбуждающих систем и проявления противосудорожного эффекта Hsp70i в моделях генерализованной эпилепсии.

ВЫВОДЫ

1. Ингибитор экспрессии Hsp70i кверцетин увеличивает а) длительность тонического компонента судорог, тяжесть припадка и послесудорожных симптомов атаксии в модели NMDA-индуцированных судорог и б) длительность не только тонического, но и клонического компонента в модели коразоловых судорог; этим проконвульсантным эффектам кверцетина в обеих моделях генерализованных судорог у крыс соответствует по срокам (через 4 часа) уменьшение содержания шаперона Hsp70i в гиппокампе, таламусе и в плазме крови.
2. Кратковременное (в течение 10 мин) тепловое прекондиционирование в обеих моделях судорог вызывает увеличение латентного периода судорожной активности и ослабление тяжести судорожного припадка и послесудорожных симптомов атаксии; эти противосудорожные эффекты совпадают по срокам (через 24 ч) с повышением содержания шаперона Hsp70i в структурах мозга, участвующих в реализации генерализованных судорог (гиппокамп, пириформная кора, миндалина, гипоталамус, таламус, средний мозг).
3. В обеих моделях судорог введение кверцетина за 4 часа до теплового прекондиционирования предотвращает вызываемые им противосудорожные эффекты и повышение содержания Hsp70i в плазме крови и структурах головного мозга (гиппокампе, пириформной коре, миндалине, гипоталамусе, таламусе, среднем мозге).
4. Введение препарата Hsp70 в ликвор третьего желудочка мозга в модели коразоловых судорог вызывает противосудорожный эффект, сходный с тепловым прекондиционированием (увеличение латентного периода судорог,

ослабление тяжести припадка и послесудорожных симптомов атаксии), а также отчетливое уменьшение длительности клонических судорог.

5. Индуцибельный белок Hsp70i вступает в межмолекулярное взаимодействие с везикулярным белком синаптофизин и ферментом синтеза ГАМК, глутаматдекарбоксилазой 67 (ГДК67), в гиппокампе крыс. Синаптофизин и ГДК67 являются молекулярными мишенями противосудорожного действия Hsp70i.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах

1. Екимова И.В., Комарова Т.Г., Ницинская Л.Е., Пастухов Ю.Ф., Гужова И.В. Эффекты экзогенного белка теплового шока 70 кДа и кверцетина на NMDA-индуцированные судороги // Докл. РАН – 2008. – Т. 418. – № 5. – С. 705-708.
2. Ницинская Л. Е., Екимова И. В., Гужова И. В., Фейзулаев Б. А., Пастухов Ю.Ф. Влияние кверцетина на тяжесть химически индуцированных судорог и содержание белка теплового шока 70 кДа в структурах головного мозга крыс // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2010. – Т. 96. – № 3. – С. 283-292.
3. Ekimova I.V., Nitsinskaya L.E., Romanova I.V., Pastukhov Yu.F., Margulis B.A., Guzhova I.V. Exogenous protein Hsp70 can penetrate into the brain structures and attenuate the severity of chemically-induced seizures. J. Neurochem. – 2010. – V. 115. – № 4. – P. 1035-1044.

Статьи в сборниках научных работ

1. Екимова И.В., Ницинская Л.Е., Комарова Т.Г., Пастухов Ю.Ф., Гужова И.В. Роль белка стресса в механизмах развития судорожных состояний // Стресс и висцеральные системы. – Мн: ПЧУП “Бизнесофсет”. – 2005. – С. 80-84.
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: ПЧУП “Бизнесофсет”. – 2006. – С. 181-184.

Тезисы докладов

1. Pastukhov Iu. F., Komarova T. G., Nitsinskaya L. E., Ekimova I. V. Effects of HSP70 on NMDA-induced seizure in rats // Abstr. of the IXth Conference «Stress and Behavior». Psychopharmacology & biological narcology. – St.-Petersburg. – 2005. – P. 900.
2. Chernyshev M.V., Nitsinskaya L.E. An inhibitor of HSP expression quercetin does not alter open field behavior in rats predisposed to audiogenic seizures // Abstr. of the IXth Conference «Stress and Behavior». Psychopharmacology & biological narcology. – St.-Petersburg. – 2005. – P. 123.
3. Комарова Т. Г., Ницинская Л. Е. Влияние белка теплового шока 70кДа и кверцетина на поведение белых крыс при гиперактивации NMDA типа глутаматных рецепторов // Тез. Всероссийской конференции молодых

- исследователей «Физиология и медицина». – Вестник молодых ученых. – Санкт-Петербург. – 2005. – С. 56.
4. Ницинская Л.Е. Влияние теплового прекондиционирования на судорожную активность, вызванную пентилентетразолом // Материалы 9-ой Всероссийской медико-биологической конференции «Человек и его здоровье». – Санкт-Петербург. – 2006. – С. 152–153.
 5. 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.
 6. Екимова И.В., Пастухов Ю.Ф., Комарова Т.Г., Ницинская Л.Е. Шапероны в регуляции судорожной активности // Материалы XX Съезда физиологического общества им. И.П. Павлова. – Москва. – 2007. – С. 35-36.
 7. Ekimova I.V., Nitsinskaya L.E., Pastukhov Iu.F., Guzhova I.V. Study of effects of thermal preconditioning and quercetin on seizure activity and content of heat shock protein 70 kDa in blood plasma in Wistar rats // Abstr. of the 10th Jubilee Multidisciplinary International Conference of Biological Psychiatry «Stress and behavior». – St.-Petersburg. – 2007. – P. 22.
 8. Ницинская Л.Е. Влияние теплового прекондиционирования на содержание Hsp70 кДа в структурах головного мозга и на коразол-индуцированную судорожную активность // Материалы 11-ой Всероссийской медико-биологической конференции «Человек и его здоровье». – Санкт-Петербург. – 2008. – С.262-263.
 9. 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.
 10. Yakimchuk A., Nitsinskaya L., Ekimova I., Guzhova I. The role of the Hsp70 in the regulation of motor seizures // Abstr. of the 12th Multidisciplinary International Neuroscience and Biological Psychiatry Conference «Stress and behavior». – St.-Petersburg. – 2009. – P. 42.
 11. Екимова И.В., Ницинская Л.Е., Романова И.В., Гужова И.В., Пастухов Ю.Ф. Центральные механизмы реализации сомато-висцеральных и противосудорожных эффектов белка теплового шока 70кДа // Материалы VII Всероссийской конференции с международным участием «Механизмы функционирования висцеральных систем». – Санкт-Петербург. – 2009. – С. 159-160.
 12. Nitsinskaya L. The effects of thermal preconditioning and exogenous Hsp70 on motor disorders after chemically induced seizures // Abstr. of the 14th Multidisciplinary International Neuroscience and Biological Psychiatry Conference «Stress and behavior». – St.-Petersburg. – 2010. – P. 43.
 13. Ницинская Л.Е. Молекулярные мишени экзогенного белка теплового шока 70кДа в головном мозге // Материалы XXI Съезда физиологического общества им. И.П. Павлова. – Калуга. – 2010. – С. 442-443.

Ницинская Л.Е Изучение противосудорожного действия белка теплового шока 70 кДа в моделях генерализованной эпилепсии у крыс // Автореф. дис. канд. биол. наук: 03.03.01 – СПб., 2010. – 22 с.

Подписано в печать 27.12.2010. 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