

А.Г. Беспалов^{1,2}, П.П. Трегуб¹, В.П. Куликов^{1,2}, А.И. Пиянзин¹, А.А. Белоусов¹

Роль VEGF, HSP-70 и белка S-100B в механизмах потенцирования гиперкапнией нейропротекторного эффекта гипоксии

¹ — Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования

«Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России, 656038, Алтайский край, Барнаул, пр. Ленина, 40

² — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, 630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 4

Изучали роль VEGF, HSP-70 и S-100B в потенцировании гиперкапнией нейропротекторного эффекта гипоксии. Показано, что нейропротекторные эффекты при воздействии гиперкапнической гипоксией, опосредованные увеличением синтеза белка S-100B, преимущественно обусловлены действием углекислого газа, а не дефицита кислорода. Нейропротекторные эффекты HSP-70 обусловлены гипоксией, но сочетанное воздействие гипоксией и гиперкапнией дает значительное увеличение синтеза HSP-70, по сравнению с изолированным воздействием гипоксией. Вазкуляризация активируется в равной степени, как гипоксией, так и гиперкапнией, без значимого суммирования эффектов при их сочетании. Это свидетельствует о доминирующем влиянии гиперкапнии, по сравнению с гипоксией, в механизмах нейропротекции, связанных с белком S-100B, но не с белком VEGF, и о потенцировании гиперкапнией нейропротекторной эффективности гипоксии, связанной с белком HSP-70.

Ключевые слова: гипоксия, гиперкапния, гиперкапническая гипоксия, VEGF, HSP-70, S-100B, нейропротекция

A.G. Bespalov^{1,2}, P.P. Tregub¹, V.P. Kulikov^{1,2}, A.I. Pijanin¹, A.A. Belousov¹

The role of VEGF, HSP-70 and protein S-100B in the potentiation effect of the neuroprotective effect of hypercapnic hypoxia

¹ — Altay State Medical University, Barnaul, Lenin st., 40

² — Scientific-Research Institute of Physiology and Fundamental Medicine / 630117, Novosibirsk, Timakov st., 4

Studied the role of VEGF, HSP-70 and S-100B in potentiating hypercapnia neuroprotective effect of hypoxia. Demonstrated that neuroprotective effects when exposed hypercapnic hypoxia-mediated protein synthesis increased S-100B, mainly due to the action of carbon dioxide, and not oxygen deficiency. Neuroprotective effects of HSP-70 due to hypoxia, but the combined effect of hypoxia and hypercapnia gives a significant increase in the synthesis of HSP-70 in comparison with the isolated effect of hypoxia. Vascularization activated equally as hypoxia and hypercapnia, without adding significant effects in combination. This suggests dominant effect hypercapnia, hypoxia compared in neuroprotection mechanisms related to protein S-100B, but not the protein VEGF, hypercapnia and potentiate the neuroprotective efficacy of hypoxia-related protein HSP-70.

Key words: hypoxia, hypercapnia hypercapnic hypoxia, VEGF, HSP-70, S-100B, neuroprotection

Гипоксические респираторные тренировки являются эффективным средством, увеличивающим толерантность головного мозга к гипоксии/ишемии [14, 21]. Пермиссивная гиперкапния оказывает выраженное нейропротекторное действие при ишемическом повреждении головного мозга [17, 22]. Ранее в нашей лаборатории была показана высокая эффективность сочетания гипоксии и гиперкапнии (гиперкапнической гипоксии) для профилактики и реабилита-

ции ишемического повреждения головного мозга в эксперименте [1, 2]. При этом нейропротекторная эффективность гиперкапнической гипоксии существенно превышает изолированное воздействие гипоксии и гиперкапнии [3]. Это свидетельствует о потенцировании гиперкапнией эффектов гипоксии при их сочетанном воздействии.

В литературе не представлено работ, посвященных изучению механизмов нейропротекции при сочетанном воздействии гиперкапнии и гипоксии. Однако имеются данные об участии белка теплового шока HSP-70 в увеличении толерантности головного мозга к ишемии при гипоксическом прекондиционировании

Для корреспонденции: Беспалов Андрей Григорьевич, канд. мед. наук, доцент каф. патофизиологии, ультразвуковой и функциональной диагностики ГБОУ ВПО «Алтайского государственного медицинского университета» Минздрава России, e-mail: rector@agmu.ru

[11]. Также известно, что при изолированном и сочетанном воздействии гипоксией и гиперкапнией на здоровых крыс повышается экспрессия эндотелиального фактора роста сосудов (VEGF) [15] и, доказано, что белок астроцитарной глии S-100B, выполняющий нейротрофическую функцию, оказывает протекторный эффект при ишемическом повреждении нервной ткани [9]. Таким образом, указанные факторы могут в значительной степени обуславливать нейропротекторную эффективность сочетанного воздействия гиперкапнии и гипоксии.

Цель исследования — изучение роли VEGF, HSP-70 и S-100B в потенцировании гиперкапнией нейропротекторного эффекта гипоксии.

Методика

Исследование проведено на 60 крысах Wistar (самцы, массой 233 ± 54 г; в возрасте 8—9 мес.). Животные были рандомизированы с использованием программы SPSS 11.5 и разделены на 4 равные группы по 15 крыс, в зависимости от концентрации кислорода и углекислого газа в газовой смеси: НГ — группа нормобарической гипоксии (O_2 — 13%, CO_2 — 0%); ПГ — группа пермиссивной гиперкапнии (O_2 — 21%, CO_2 — 7%); ГГ — группа гиперкапнической гипоксии (O_2 — 13%, CO_2 — 7%); К — контрольная группа (дыхание атмосферным воздухом).

Животные всех групп проходили курс респираторных воздействий в течение 15 сут. по 20 мин ежедневно по методике, описанной ранее [3]. На следующие сутки после окончания тренировок у всех животных под тиопенталовым наркозом (50 мг/кг, внутривенно) воспроизводили ишемию головного мозга путём перевязки правой общей сонной артерии (ОСА) [17]. Во время проведения операций по моделированию ишемического повреждения, часть животных погибла, в итоге, группы крыс, использованных в исследовании, сформировались следующим образом: НГ, $n = 11$; ПГ, $n = 15$; ГГ, $n = 14$; К, $n = 11$.

В конце 10-суточного послеоперационного периода у всех крыс под тиопенталовым наркозом производили забор крови из нижней полой вены. Для получения сыворотки кровь центрифугировали при 3000 об./мин через 30 мин после забора. В сыворотке исследовали содержание VEGF, HSP-70 и белка S-100B методом иммуоферментного анализа на планшетном фотометре «Multiskan Ascent» (ThermoFisher Scientific, Финляндия). Для определения VEGF использовался набор Rat VEGF-C platinum ELISA (Bender MedSystems GmbH, Австрия), HSP-70 — набор HSP70 high sensitivity EIA kit

(ENZO LIFE SCIENCES GmbH, Германия), S-100B — набор CanAg S100 EIA (Fujirebio Diagnostics Inc, Швеция).

Статистический анализ проводили с помощью программного пакета SPSS 11.5. Сравнение между группами производилось по непараметрическому критерию Манна—Уитни. Значимыми считались различия, при $p < 0,05$. Все данные представлены в виде средних величин (медиана — Me), нижнего и верхнего квартиля (25%; 75%).

Результаты и обсуждение

Исследование показало, что концентрация белка S-100B в сыворотке крови была выше в группах ПГ и ГГ, по отношению к контролю (рис. 1).

Известно, что S-100B, высвобождающийся при структурных повреждениях клеток мозга, рекомендуется в качестве раннего биомаркера повреждения [12]. Увеличение S-100B коррелирует с выраженностью и тяжестью инсульта [8]. В клетках нервной системы S-100B участвует в регуляции энергетического метаболизма [4], кальциевого гомеостаза и дифференцировки клеток [16], стимулирует репарацию и блокирует апоптоз [6], а также уменьшает активацию глии нейротоксическими факторами [5]. В ряде экспериментальных работ показан нейропротекторный эффект белка S-100B [7, 9, 10, 13]. Исходя из этого, увеличение концентрации S-100B в сыворотке крови крыс, подвергнутых гиперкапническому и гипоксическому гиперкапническому воздействию, свидетельствует об активации вышеуказанных механизмов под влиянием гиперкапнии.

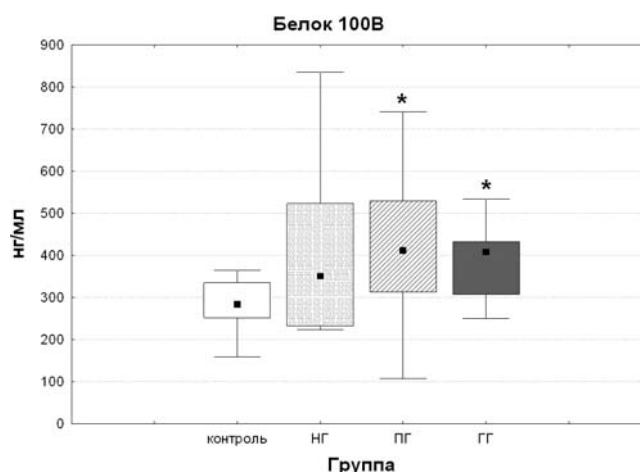


Рис. 1. Концентрация белка S-100B в сыворотке крови у крыс после 15-кратного курса респираторных воздействий. Данные представлены как медиана \pm 25/75 квартили. * — различия с контрольной группой ($p < 0,05$).

Концентрация белка теплового шока HSP-70 в сыворотке крови была значительно выше в группах НГ и ГГ по сравнению с группой контроля (рис. 2). При этом концентрация HSP-70 в группе ГГ была выше, чем в группе ПГ. HSP-70 необходим для клеточной репарации, выживания и обеспечения нормальных клеточных функций [19]. Он является молекулярным шапероном, который предотвращает денатурацию белков и восстанавливает поврежденные белки в ответ на клеточный стресс [18]. Белок HSP-70 является важнейшим звеном нейропротекции при индуцированной толерантности головного мозга к ишемическому повреждению [20].

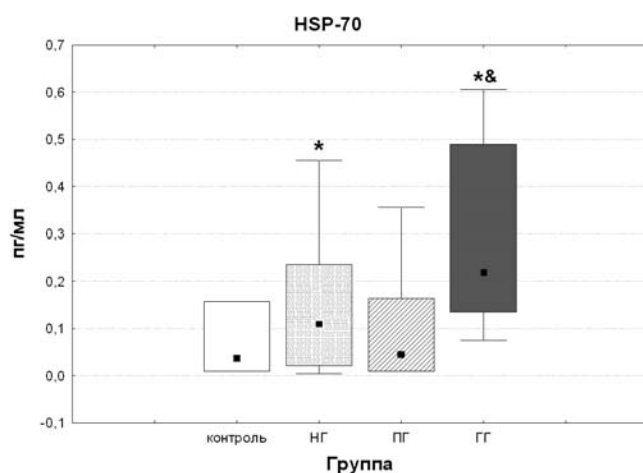


Рис. 2. Концентрация HSP-70 в сыворотке крови у крыс после 15-кратного курса респираторных воздействий. Данные представлены как медиана \pm 25/75 квартили. * — различия с контрольной группой ($p < 0,05$). & — различия с группой ПГ ($p < 0,05$).

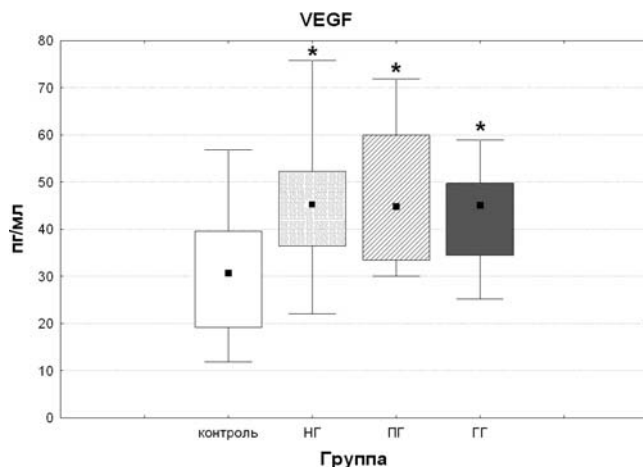


Рис. 3. Содержание VEGF в сыворотке крови у крыс после 15-кратного курса респираторных воздействий. Данные представлены как медиана \pm 25/75 квартили. * — различия с контрольной группой ($p < 0,05$).

Показано значительное усиление экспрессии белка HSP-70 под воздействием нормобарической гипоксии [11]. Наше исследование также показало рост концентрации HSP-70 в сыворотке крови животных, подвергнутых воздействию нормобарической гипоксии перед моделированием ишемического повреждения головного мозга. Однако перmissive гиперкапния не повлияла на увеличение концентрации этого белка. В то же время, сочетанное воздействие гипоксии и гиперкапнии показало значимое увеличение синтеза HSP-70 в 5,5 раза по сравнению с контролем. Это свидетельствует о выраженном нейропротекторном потенциале именно гиперкапнической гипоксии, превосходящем по эффективности изолированное воздействие гипоксии. Интересно, что перmissive гиперкапния не приводит к увеличению концентрации HSP-70, однако усиливает эффект гипоксии при их сочетании, что требует дальнейшего изучения.

Концентрация эндотелиального фактора роста сосудов в сыворотке крови во всех опытных группах была значительно выше, по сравнению с группой контроля (рис. 3). При этом между опытными группами не было обнаружено различий в концентрации VEGF.

В экспериментах на здоровых крысах показано, что концентрация VEGF повышается как при изолированном гипоксическом и гиперкапническом воздействии, так и при их сочетании [15]. В нашем исследовании, увеличение концентрации VEGF в сыворотке крови у крыс, подвергнутых респираторным воздействиям перед моделированием ишемического повреждения, свидетельствует о равнозначном влиянии как изолированного, так и сочетанного воздействия гиперкапнии и гипоксии на один из основных факторов ангиогенеза. В пользу этого также свидетельствует отсутствие различий по концентрации VEGF между опытными группами.

Таким образом, нейропротекторные эффекты при воздействии гиперкапнической гипоксией, опосредованные увеличением синтеза белка S-100B, преимущественно обусловлены действием углекислого газа, а не дефицита кислорода. Нейропротекторные эффекты HSP-70 обусловлены гипоксией, но сочетанное воздействие гипоксией и гиперкапнией дает значительное увеличение синтеза HSP-70 по сравнению с изолированным воздействием гипоксией. Вазкуляризация активируется в равной степени как гипоксией, так и гиперкапнией, без значимого суммирования эффектов при их сочетании. Это свидетельствует о доминирующем влиянии гиперкапнии, по сравнению с гипоксией, в механизмах нейропротекции, связанных с белком S-100B, но не с белком VEGF, и о потенцировании гиперкапнией нейропротекторной эффективности гипоксии, связанной с белком HSP-70.

Список литературы

1. Беспалов А.Г., Куликов В.П., Лепилов А.В. Тренировки с гиперкапнической гипоксией как средство увеличения толерантности головного мозга к ишемии // Патология кровообращения и кардиохирургия. — 2004. — 3. — С. 60—63.
2. Куликов В.П., Беспалов А.Г., Якушев Н.Н. Эффективность тренировок с гиперкапнической гипоксией в реабилитации ишемического повреждения головного мозга в эксперименте // Вестник восстановительной медицины. — 2008. — 2. — С. 59—61.
3. Трегуб П.П., Куликов В.П., Беспалов А.Г. и др. Нейропротективная эффективность тренировок с изолированным и сочетанным воздействием гипоксией и гиперкапнией в эксперименте // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2013. — Т. 155, №3. — С. 302—305.
4. Acheson A., Lindsay R.M. Non target-derived roles of the neurotrophins // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. — 1996. — 351(1338). — P. 417—422.
5. Bianchi R., Kastrisianaki E., Giambanco I., Donato R. S100B Protein stimulates microglia migration via RAGE-dependent up-regulation of chemokine expression and release // J. Biol. Chem. — 2011. — №286(9). — P. 7214—7226.
6. Donato R., Sorci G., Riuzzi F. et al. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal // Biochim. Biophys. — 2009. — №1793(6). — P. 1008—1022.
7. Huttunen H.J., Kuja-Panula J., Sorci G. et al. Coregulation of Neurite Outgrowth and Cell Survival by Amphoterin and S100 Proteins through Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) Activation // J. Biol. Chem. — 2000. — №275. — P. 40096—400105.
8. Jauch E.C., Lindsell C., Broderick J.R. et al. Association of serial biochemical markers with acute ischemic stroke: the national institute of neurological disorders and stroke recombinant tissue plasminogen activator stroke study // Stroke. — 2006. — №37(10). — P. 2508—2513.
9. Kleindienst A., Harvey H.B., Rice A.C. et al. Intraventricular infusion of the neurotrophic protein S100B improves cognitive recovery after fluid percussion injury in the rat // J. Neurotrauma. — 2004. — №21(5). — P. 541—547.
10. Li Y., Wang J., Sheng J.G. et al. S100 beta increases levels of beta-amyloid precursor protein and its encoding mRNA in rat neuronal cultures // J. Neurochem. — 1998. — 71. — P. 1421—1428.
11. Lin H.J., Wang C.T., Niu K.C. et al. Hypobaric hypoxia preconditioning attenuates acute lung injury during high-altitude exposure in rats via up-regulating heat-shock protein 70 // Clin. Sci. (Lond.). — 2011. — №121(5). — P. 223—231.
12. Ramlawi B., Rudolph J.L., Mieno S. et al. Serologic markers of brain injury and cognitive function after cardiopulmonary bypass // Ann. Surg. — 2006. — №244(4). — P. 593—601.
13. Rickmann M., Wolff J.R., Meyer D.L. Expression of S100 protein in the vestibular nuclei during compensation of unilateral labyrinthectomy symptoms // Brain Res. — 1995. — 688. — P. 8—14.
14. Rybnikova E., Gluschenko T., Tulkova E. et al. Preconditioning induces prolonged expression of transcription factor pCREB and NF- κ B in the neocortex of rats before and following severe hypobaric hypoxia // J. Neurochem. — 2008. — 106(2). — P. 1450—1458.
15. Sifafakas N.M., Jordan M., Wagner H. et al. Diaphragmatic angiogenic growth factor mRNA responses to increased ventilation caused by hypoxia and hypercapnia // Eur. Respir. J. — 2001. — 17(4). — P. 681—687.
16. Sorci G., Riuzzi F., Arcuri C. et al. The many faces of S100B protein: when an extracellular factor inactivates its own receptor and activates another one // Ital. J. Anat. Embryol. — 2010. — 115(1—2). — P. 147—151.
17. Vannucci R.C., Towfighi J., Heitjan D.F., Brucklacher R.M. Carbon dioxide protects the perinatal brain from hypoxic-ischemic damage: an experimental study in the immature rat // Pediatrics. — 1995. — 95 (6). — P. 868—874.
18. Willis M.S., Patterson C. Hold me tight: Role of the heat shock protein family of chaperones in cardiac disease // Circulation. — 2010. — №122(17). — P. 1740—1751.
19. Yellon D.M., Latchman D.S. Stress proteins and myocardial protection // J. Mol. Cell. Cardiol. — 1992. — №24(2). — P. 113—124.
20. Yenari M.A. Heat shock proteins and neuroprotection // Adv. Exp. Med. Biol. — 2002. — №513. — P. 281—299.
21. Zhan L., Wang T., Li W. et al. Activation of Akt/FoxO signaling pathway contributes to induction of neuroprotection against transient global cerebral ischemia by hypoxic preconditioning in adult rats // J. Neurochem. — 2010. — 114 (3). — P. 897—908.
22. Zhou Q., Cao B., Niu L. et al. Effects of permissive hypercapnia on transient global cerebral ischemia-reperfusion injury in rats // Anesthesiology. — 2010. — №112. — P. 288—297.

Поступила 30.10.13

Сведения об авторах:

Трегуб Павел Павлович, аспирант каф. патофизиологии, ультразвуковой и функциональной диагностики ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России

Куликов Владимир Павлович, д.м.н., проф., зав. каф. патофизиологии, ультразвуковой и функциональной диагностики ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России

Пиянзин Алексей Илларионович, канд. мед. наук, докторант каф. педиатрии, ФПК и ППС ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России

Белоусов Андрей Анатольевич, врач клинической лаб. диагностики Консультативно-диагностического центра ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России