

© О. В. Ветровой, Е. А. Рыбникова, Т. С. Глущенко, М. О. Самойлов, 2014
УДК 611.813.3:612.273.2:599.323.4

О. В. Ветровой¹, Е. А. Рыбникова², Т. С. Глущенко¹ и М. О. Самойлов¹

ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИЧЕСКОГО ПОСТКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ НА ЭКСПРЕССИЮ ПРОТИВОАПОПТОТИЧЕСКОГО БЕЛКА Bcl-2 И НЕЙРОТРОФИНА BDNF В ПОЛЕ CA1 ГИППОКАМПА КРЫС, ПЕРЕЖИВШИХ ТЯЖЁЛУЮ ГИПОКСИЮ

¹ Лаборатория регуляции функций нейронов мозга (зав. — проф. М. О. Самойлов); ² лаборатория нейроэндокринологии (зав. — проф. Н. Э. Ордян), Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург

Методом количественной иммуногистохимии исследована экспрессия противоапоптотического белка Bcl-2 и нейротрофина BDNF в поле CA1 гиппокампа у крыс, переживших тяжёлую гипоксию (ТГ), повреждающие последствия которой были скомпенсированы последующими тремя сеансами посткондиционирования (ПостК) умеренной гипобарической гипоксией (360 мм рт. ст., 2 ч, трижды с интервалом 24 ч). Выявлено снижение экспрессии исследуемых белков в гиппокампе у крыс после ТГ. Гипоксическое ПостК, улучшающее структурно-функциональную реабилитацию после тяжелого гипоксического воздействия, увеличивало экспрессию Bcl-2 и BDNF в нейронах поля CA1 гиппокампа у крыс, переживших ТГ. Результаты свидетельствуют о вовлечении Bcl-2 и BDNF в процессы адаптации к ТГ и компенсации ее повреждающего эффекта.

Ключевые слова: гиппокамп, тяжелая гипоксия, посткондиционирование, BDNF, Bcl-2

Согласно оценкам Всемирной организации здравоохранения, во всем мире нарушения мозгового кровообращения занимают второе место среди причин смертности и инвалидизации населения после ишемической болезни сердца. Поэтому очевидна необходимость разработки эффективных лекарственных средств и немедикаментозных способов структурно-функциональной реабилитации мозга после повреждающей гипоксии/ишемии. Одним из наиболее перспективных в этом отношении немедикаментозных способов является посткондиционирование (ПостК) — оказание экстремальных воздействий умеренной интенсивности на особей, переживших тяжелое повреждающее воздействие. Феномен ПостК впервые описан на сердце, когда было установлено, что использование кратковременной ишемии на ранних стадиях реперфузии значительно снижает размеры зоны повреждения после перенесенного инфаркта и улучшает выживаемость кардиомиоцитов [16]. В 2006 г. ишемическое ПостК было произведено на мозгу в модели фокальной ишемии на мышах [15]. Недавно был разработан новый, неинвазивный способ ПостК с использованием умеренной гипобарической гипоксии (УГГ) [1]. В моделях на крысах показано, что ПостК 3-кратной УГГ эффективно предотвращает инду-

цируемую тяжелой гипоксией (ТГ) гибель нейронов гиппокампа и неокортекса, способствует полной функциональной реабилитации после ТГ или психоэмоциональных стрессов, нормализуя активность гормональной системы и поведение у крыс [2, 12]. В настоящее время информации о механизмах, опосредующих протективный эффект ПостК с УГГ, нет. Выдвинута гипотеза, что гипоксическое ПостК модифицирует экспрессию белков, играющих важную роль в процессах нейропротекции и нейропластичности. Наиболее вероятными мишенями, на которые, прежде всего, направлено действие ПостК, являются противоапоптотический белок Bcl-2 и нейротрофический фактор BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor). Как известно, Bcl-2 препятствует запуску апоптоза, опосредуемого митохондриями, за счет ограничения проницаемости наружной митохондриальной мембраны для цитохрома C, а BDNF является полипептидом, ответственным за пролиферацию нейронов, дифференцировку, выживание, синаптическую пластичность, процессы памяти и обучения. Цель настоящей работы — изучение влияния 3-кратного ПостК УГГ на экспрессию Bcl-2 и BDNF в поле CA1 гиппокампа, являющегося наиболее уязвимым для гипоксии/ишемии образованием мозга у крыс, переживших ТГ.

Сведения об авторах:

Ветровой Олег Васильевич (e-mail: vov210292@yandex.ru), Глущенко Татьяна Сергеевна (e-mail: samoilov@pavlov.infran.ru), Самойлов Михаил Олегович (e-mail: mos@kolt.infran.ru), лаборатория регуляции функций нейронов мозга; Рыбникова Елена Александровна (e-mail: samoilov@pavlov.infran.ru), лаборатория нейроэндокринологии, Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6

Материал и методы. Работа выполнена на взрослых крысах-самцах линии Вистар массой 200–250 г. Животные росли в стандартных условиях вивария Института физиологии им. И.П.Павлова РАН и содержались в лабораторных условиях при свободном доступе к воде и пище. При проведении экспериментов соблюдались требования, сформулированные в Директивах Совета Европейского Сообщества (86/609/ЕЕС) об использовании животных для экспериментальных исследований. Протоколы опытов были утверждены Комиссией по гуманному обращению с животными Института физиологии им. И.П.Павлова РАН. Для создания ТГ животных помещали в барокамеру проточного типа, снижали давление до 160–180 мм рт.ст., что соответствует подъему на высоту 11 000 м. Длительность воздействия — 3 ч. ПостК осуществляли путём 3-кратного воздействия умеренной гипобарической гипоксией (360 мм рт.ст., что соответствует подъему на высоту 5000 м), длительностью 2 ч, с интервалами 24 ч между сеансами. Первый сеанс проводили через 24 ч после ТГ, поскольку ранее было показано, что это наиболее эффективный режим ПостК [12]. Животных декапитировали через 75 (n=6) и 96 ч (n=6) после ТГ и, соответственно, через 3 (n=6) и 24 ч (n=6) после окончания ПостК (в каждой временной точке проводили контроль). Контрольную группу составили крысы, не подвергавшиеся гипоксии. Для устранения влияния на результаты не связанных с гипоксией условий эксперимента (перенос крыс из клетки в барокамеру) животных контрольной группы тоже помещали в барокамеру на 15 мин, но давление в ней не понижали (по 6 крыс на каждой временной точке). Образцы ткани мозга фиксировали 24 ч в молекулярном фиксаторе FineFix и обрабатывали согласно стандартному гистологическому протоколу. Изготавливали серийные парафиновые срезы мозга во фронтальной плоскости толщиной 7 мкм на уровне –2,80 мм от брегмы. Для оценки экспрессии белков Bcl-2 и BDNF использовали иммуногистохимический метод. Основные этапы метода: 1) инкубация с поликлональными кроличьими антителами к

Bcl-2 и BDNF (Santa Cruz Biotechnology, Inc, США, 1:50); 2) инкубация с вторичными биотинилированными антителами и ABC-комплексом (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories, Inc, США); 3) визуализация реакции (DAB substrate kit for peroxidase, Vector Laboratories, Inc, США). Анализ препаратов проводили с помощью морфометрической установки, состоящей из светового микроскопа Jenaval (Carl Zeiss, Германия), цифровой камеры Baumer CX05c (Baumer Optronic, Германия) и компьютера IBM PC с программным обеспечением ВидеоТест-Мастер (Морфология) (Видео Тест, Россия). На основании оценки оптической плотности, иммунопозитивные клетки разделяли на слабо и интенсивно окрашенные (Ni), у которых оптическая плотность была выше средней оптической плотности объекта, в данном случае 0,09 усл.ед. Определяли общее число иммунопозитивных клеток (N) и число Ni-клеток на снимке площадью 460×340 мкм (об.40).

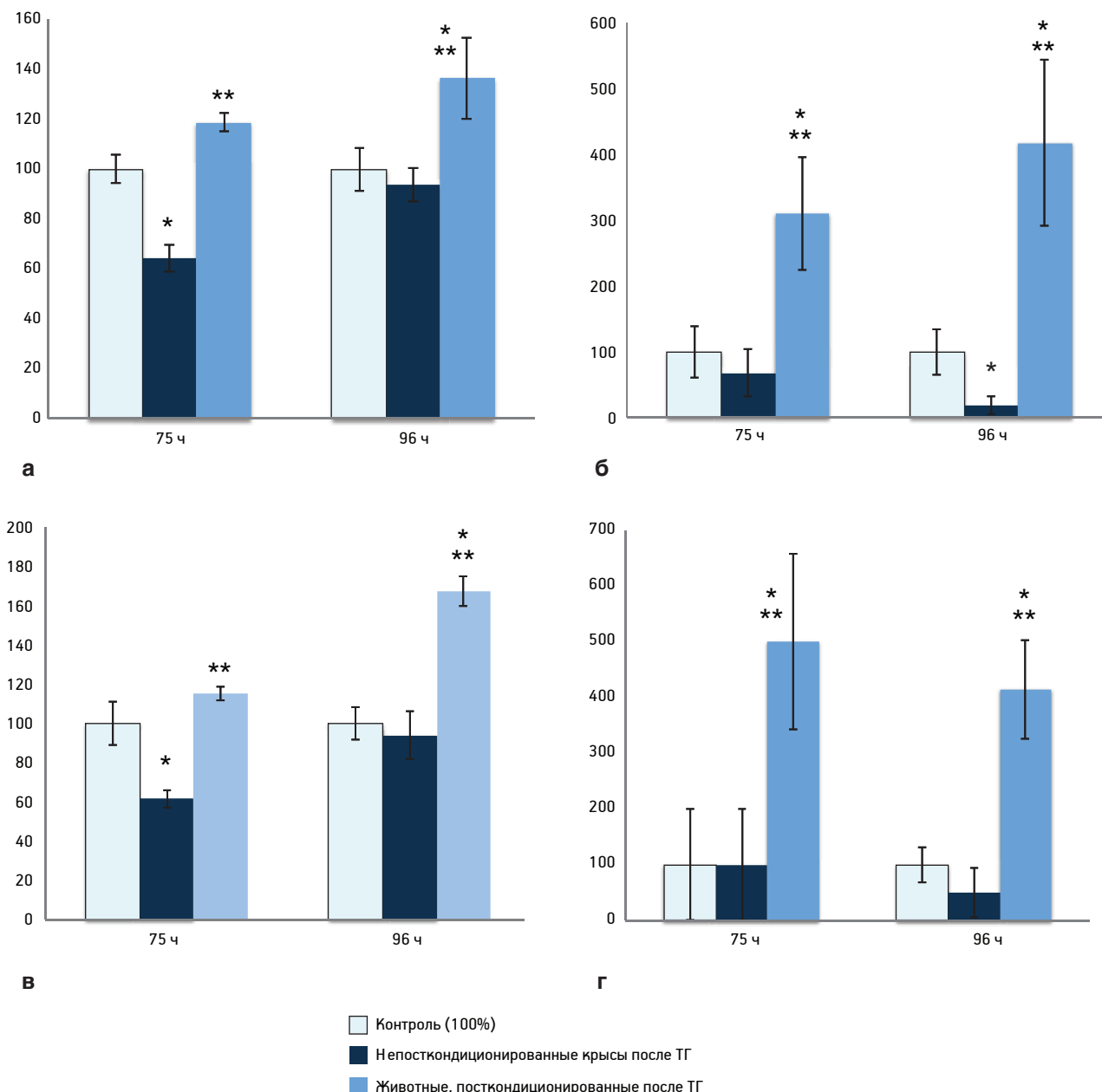
Результаты обрабатывали с помощью пакетов анализа данных STATISTICA 7.0 StatSoft, Inc и Microsoft Excel'2003, использовали непараметрический критерий Манна—Уитни. Изменения считали значимыми при $P \leq 0,05$. Все результаты представлены в виде среднего арифметического и его стандартной ошибки.

Результаты исследования. У не ПостК-крыс количество Bcl-2-иммунопозитивных клеток в поле CA1 гиппокампа через 75 ч после ТГ

было значимо ниже, чем у животных контрольной группы, однако количество клеток, интенсивно экспрессирующих этот белок, в данной временной точке значимо не отличалось от контроля. Через 96 ч после ТГ количество Bcl-2-иммунопозитивных клеток значимо не отличалось от контроля, но доля интенсивно экспрессирующих пирамидных нейронов снижалась до 20% от таковой в контроле. В дорсальной части гиппокампа через 3 ч после последнего сеанса ПостК (соответственно через 75 ч после ТГ в этой группе) не наблюдалось значимого изменения доли иммунопозитивных клеток по сравнению с контролем. Вместе с тем, количество интенсивно экспрессирующих клеток возрастало в 3 раза. Через 24 ч после завершения 3-кратного ПостК (соответственно через 96 ч после ТГ) общее количество иммунопозитивных клеток, также как и количество Ni-нейронов, было увеличено (рисунков, а, б). Происходило также изменение доли слабо и интенсивно окрашенных клеток от общего количества Bcl-2-иммунопозитивных клеток. Так, в поле CA1 гиппокампа у не ПостК-крыс через 96 ч после ТГ наблюдалось уменьшение относительного содержания интенсивно окрашенных клеток по сравнению с контролем. У животных, переживших ТГ+ПостК, в этой же временной точке происходило увеличение доли Ni-клеток от общего количества нейронов (N) по сравнению с контролем.

Тяжелая гипобарическая гипоксия приводила к значимому уменьшению доли экспрессирующих BDNF-клеток в поле CA1 гиппокампа спустя 75 ч после воздействия. Интенсивность экспрессии BDNF не различалась с таковой в контрольной группе. Через 96 ч после воздействия относительное содержание BDNF-иммунопозитивных клеток в дорсальной части гиппокампа нормализовалось, доля интенсивно экспрессирующих клеток также не имела значимых различий с контролем (см. рисунок, в, г). У ПостК-животных выявлено повышение экспрессии BDNF. При анализе соотношения иммунопозитивных клеток с различной интенсивностью окраски выявлено, что в дорсальной части гиппокампа у не ПостК-крыс через 96 ч после ТГ происходило уменьшение доли интенсивно окрашенных клеток от общего количества BDNF-иммунопозитивных клеток по сравнению с контролем. У крыс, переживших ТГ+ПостК, через 24 ч после последнего сеанса гипоксии наблюдалось увеличение доли Ni-клеток от общего количества нейронов по сравнению с контролем.

Обсуждение полученных данных. Гипоксия является одним из видов воздействия,



Относительное содержание иммунопозитивных Bcl-2-клеток (а) и интенсивно экспрессирующих Bcl-2-клеток (б), иммунопозитивных-BDNF-клеток (в) и интенсивно экспрессирующих BDNF-клеток (г) в поле CA1 гиппокампа у контрольных крыс и в различные сроки после тяжелой гипобарической гипоксии (ТГ) у не посткондиционированных и посткондиционированных животных.

По оси абсцисс — время после ТГ; по оси ординат — доля клеток по сравнению с контролем (%). Одна звездочка — различия по сравнению с контролем значимы при $P \leq 0,05$; две звездочки — различия значимы по сравнению с ТГ при $P \leq 0,05$; вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки

нарушающего гомеостаз организма и вызывающего ответную реакцию, направленную на его восстановление. Однако, если эти нарушения слишком велики и клетка не способна их компенсировать, то запускаются механизмы ее повреждения и гибели. Тяжелые формы гипоксии способны вызывать целый ряд функциональных и структурных нарушений, обратимых и необратимых, что зависит от интенсивности и длительности воздействия.

Наиболее чувствительны к повреждающему действию гипоксии такие образования мозга, как гиппокамп, в особенности его дорсальная часть, неокортекс и пириформная кора. В настоящем исследовании были подтверждены результаты предыдущих работ о деструктивном влиянии ТГ на нейроны уязвимых образований мозга крыс, сопровождающемся смещением соотношения факторов регуляции выживания/гибели клетки в сторону проапоптотических белков на фоне пода-

вления экспрессии антиапоптотических факторов [11]. Показано, что ТГ приводит к снижению содержания антиапоптотического белка Bcl-2 в поле СА1 гиппокампа даже в поздние сроки после воздействия (75–96 ч), результатом чего становится гибель 30% нейронов данной области через 7 сут после воздействия [12]. Воздействие ПостК УГГ в нашей модели способствовало выживанию нервных клеток [12]. Согласно полученным в данной работе результатам, нейропротективный эффект ПостК может реализовываться за счет вызываемой им отчетливо выраженной активации экспрессии Bcl-2, заключающейся в увеличении как общего количества экспрессирующих Bcl-2 клеток, так и интенсивности его экспрессии отдельными клетками. Сходные данные были получены и в модели раннего ишемического ПостК [14]. Регуляция транскрипции Bcl-2 осуществляется адаптивными транскрипционными факторами CREB, NF-κB [5, 9]. Мобилизация CREB (за счет фосфорилирования) была продемонстрирована при изучении эффекта ишемического [6] и гипобарического [3] preconditionирования. Следует отметить, что гипоксическое preconditionирование как ишемическое, так и гипобарическое, увеличивало экспрессию NF-κB, хотя ТГ/ишемия приводили к снижению его экспрессии [3, 4].

По данным литературы, NF-κB и CREB также активируют экспрессию нейротрофина BDNF [7, 10]. В нашем исследовании были получены результаты, согласно которым в поле СА1 гиппокампа у крыс, переживших тяжелую гипобарическую гипоксию с последующим ПостК, происходит значительное увеличение экспрессии этого нейротрофина, что свидетельствует о вероятном участии данного фактора в компенсаторном действии ПостК. Мишенями рецептора BDNF (TrkB) является PI3K (phosphatidylinositol 3-kinases). Известно, что селективное ингибирование PI3K нивелирует нейропротективный эффект ишемического ПостК [13]. Наряду с Akt-сигнализацией, взаимодействие BDNF с рецептором также может приводить к запуску MAP-киназного (Erk1/2) каскада, способствующего активации транскрипции нейропротективных генов [8].

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что реализация нейропротективного действия ПостК УГГ сопровождается индукцией экспрессии Bcl-2 и BDNF, вероятно, выполняющих роль эффекторов нейропротективных процессов, способствующих структурно-функциональной реабилитации мозга после тяжелого повреждающего воздействия.

Работа поддержана грантом РФФИ № 13-04-00532.

ЛИТЕРАТУРА

1. Патент РФ № 2437164. Способ реабилитации после гипоксии, вызывающей нарушение функций мозга в моделях на лабораторных животных. Е.А. Рыбникова и М.О. Самойлов. Заявка от 01.10.2010. Официальный бюл. ФИПС, 2011, т. 35, с. 2437164.
2. Рыбникова Е., Воробьев М. и Самойлов М. Гипоксическое посткондиционирование корректирует нарушения поведения крыс в модели посттравматического стрессового расстройства. Журн. высш. нервн. деят., 2012, т. 62, № 3, с. 364–371.
3. Чурилова А., Рыбникова Е., Глушенко Т. и др. Влияние умеренной гипобарической гипоксии в режиме preconditionирования на экспрессию транскрипционных факторов в гиппокампе мозга крыс до и после тяжелой гипоксии. Морфология, 2009, т. 136, вып. 6, с. 38–42.
4. Blondeau N., Widmann C., Lazdunski M. et al. Activation of the nuclear factor-kappaB is a key event in brain tolerance. J. Neurosci., 2001, v. 21, p. 4668–4677.
5. Chiueh C., Andoh T. and Chock P. Induction of thioredoxin and mitochondrial survival proteins mediates preconditioning-induced cardioprotection and neuroprotection. Ann. N Y Acad. Sci., 2005, v. 1042, p. 403–418.
6. Hara T., Hamada J., Yano S. et al. CREB is required for acquisition of ischemic tolerance in gerbil hippocampal CA1 region. J. Neurochem., 2003, v. 86, p. 805–814.
7. Herdegen T. and Leah J. Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. Brain Res. Rev., 1998, v. 28, № 3, p. 370–490.
8. Howe C., Valletta J., Rusnak A. et al. NGF signaling from clathrin-coated vesicles: evidence that signaling endosomes serve as a platform for the Ras-MAPK pathway. Neuron, 2001, v. 32, № 5, p. 801–814.
9. Karin M. and Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. Nat. Immunol., 2002, v. 3, p. 221–227.
10. Knapska E. and Kaczmarek L. A gene for neuronal plasticity in the mammalian brain: Zif268/Egr-1/NGFI-A/Krox-24/TIS8/ZENK? Prog. Neurobiol., 2004, v. 74, № 4, p. 183–211.
11. Rybnikova E., Sitnik N., Gluschenko T. et al. The preconditioning modified neuronal expression of apoptosis-related proteins of Bcl-2 superfamily following severe hypobaric hypoxia in rats. Brain Res., 2006, v. 1089, № 1, p. 195–202.
12. Rybnikova E., Vorobyev M., Pivina S. et al. Postconditioning by mild hypoxic exposures reduces rat brain injury caused by severe hypoxia. Neurosci. Lett., 2012, v. 513, № 1, p. 100–105.
13. Scartabelli T., Gerace E., Landucci E. et al. Neuroprotection by group I mGlu receptors in a rat hippocampal slice model of cerebral ischemia is associated with the PI3K-Akt signaling pathway: a novel postconditioning strategy? Neuropharmacology, 2008, v. 55, p. 509–516.
14. Xing B., Chen H., Zhang M. et al. Ischemic postconditioning inhibits apoptosis after focal cerebral ischemia/reperfusion injury in the rat. Stroke, 2008, v. 39, p. 2362–2369.
15. Zhao H., Sapolsky R. and Steinberg G. Interrupting reperfusion as a stroke therapy: ischemic postconditioning reduces infarct size after focal ischemia in rats. J. Cereb. Blood Flow Metab., 2006, v. 26, p. 1114–1121.

16. Zhao Z-Q., Corvera J., Halkos M. et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, 2003, v. 285, p. 579–588.

Поступила в редакцию 12.11.2013

EFFECT OF HYPOXIC POSTCONDITIONING ON THE EXPRESSION OF ANTIAPOPTOTIC PROTEIN BCL-2 AND NEUROTROPHIN BDNF IN CA1 HIPPOCAMPAL FIELD OF RATS SURVIVING SEVERE HYPOXIA

O. V. Vetrovoy, Ye. A. Rybnikova, T. S. Glushchenko and M. O. Samoilov

Using the method of quantitative immunohistochemistry, the expression of antiapoptotic protein Bcl-2 and neurotrophin

BDNF was studied in CA1 hippocampal field of rats that survived severe hypoxia (SH), the damaging effects of which were compensated by subsequent three postconditioning (PC) sessions of mild hypobaric hypoxia (360 mm Hg, 2 hours, three times with 24 hour intervals). It was shown that the expression of the proteins studied was decreased in rat hippocampus after SH. Hypoxic postconditioning which improved the structural and functional rehabilitation after SH, was shown to up-regulate the expression of Bcl-2 and BDNF in hippocampal CA1 neurons in rats that survived SH. These results suggest the involvement of Bcl-2 and BDNF in processes of adaptation to SH and compensation of its damaging effects.

Key words: *hippocampus, severe hypoxia, postconditioning, BDNF, Bcl-2*

Laboratory of Regulation of Brain Neuron Functions; Laboratory of Neuroendocrinology, RAMS I.P. Pavlov Institute of Physiology, St. Petersburg

О. С. Сотников СИНЦИТИАЛЬНАЯ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ СВЯЗЬ И СЛИЯНИЕ НЕЙРОНОВ



Глубокоуважаемые коллеги!

Профессор О. С. Сотников — автор новой книги «Синцитиальная цитоплазматическая связь и слияние нейронов» (2013) — предлагает получить её в подарок. Книга опубликована по гранту РФФИ РАН, но издательство «Наука» теперь не может распространять свою продукцию, поэтому рекомендуем монографию специалистам и преподавателям гистологии.

Многочисленные морфологические находки феномена дву- и многоядерных нейронов продемонстрированы в ганглиях беспозвоночных и мозгу позвоночных. Особенно много их описано в норме в вегетативных ганглиях (до нескольких десятков процентов), а также при травме и заболеваниях. В книге описаны результаты экспериментов на живых изолированных нейронах, позволившие искусственно получать массу дикарионов и симпласты нейронов. Впервые приведены доказательства того, что дикарионы образуются не путем амитоза, а с помощью синцитиального слияния нейронов. Полученные *in vivo* препараты и исследование кинетики нейронов *in vitro* позволяют дополнить знаменитую нейронную теорию и решить 100-летнюю дискуссию S. Ramon y Cajal и С. Golgi представлениями о естественном существовании

синцития в нервной системе и о механизме этого физиологического явления. Получены также доказательства возможности экспериментальной ампутации ядер нейронов и слияния их безъядерных фрагментов с другими нервными клетками.

Для получения книги необходимо выслать адрес (обязательно с почтовым индексом)

по e-mail: ossotnikov@mail.ru.

После получения книги необходимо оплатить ее пересылку по адресу: 188680, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, п/о Колтуши, с. Павлово, ул. Быкова, 25-а, кв. 115, Титовой Галине Ивановне.