

А. В. Чурилова, Т. С. Глущенко и М. О. Самойлов

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ АНТИАПОПТОТИЧЕСКОГО БЕЛКА Bcl-2 В НЕОКОРТЕКСЕ И ГИППОКАМПЕ У КРЫС ПОД ВЛИЯНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМОВ ГИПОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ

Лаборатория регуляции функций нейронов мозга (зав. — проф. М. О. Самойлов), Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург

На 72 крысах-самцах линии Вистар с использованием иммуноцитохимического метода изучали уровень экспрессии антиапоптотического фактора Bcl-2 в нейронах неокортекса и гиппокампа при воздействии повреждающей тяжелой (ТГ) и умеренной гипобарической (УГГ) гипоксии, а также их сочетания. ТГ (180 мм рт. ст.) подавляла или не изменяла экспрессию Bcl-2 в нейронах исследуемых областей мозга. 1-кратное преко кондиционирование УГГ (360 мм рт. ст.) оказывало схожее с ТГ действие на экспрессию Bcl-2. Напротив, многократные преко кондиционирующие воздействия существенно увеличивали уровень экспрессии Bcl-2 через 3–24 ч после ТГ, что способствовало предотвращению повреждений нейронов, вызываемых ТГ. Сама УГГ индуцировала повышение уровня экспрессии Bcl-2 только при ее многократных (3- и 6-кратном) сеансах, тогда как одиночные сеансы не оказывали влияния на содержание Bcl-2. Очевидно, усиление экспрессии Bcl-2, наблюдаемое в ответ на многократные воздействия УГГ, имеет важное значение для формирования механизмов повышения толерантности нейронов мозга к повреждающим воздействиям.

Ключевые слова: неокортекс, гиппокамп, белок Bcl-2, гипобарическая гипоксия, нейропротекция

В 80-е годы прошлого столетия была обнаружена отсроченная гибель нейронов в поле CA1 гиппокампа спустя несколько суток после ишемии [7]. Впоследствии тоже было выявлено и в других наиболее чувствительных к гипоксии/ишемии областях мозга — неокортексе, стриатуме, мозжечке. Установлено, что подобного вида повреждения нейронов связаны с механизмом индукции апоптоза (запрограммированной клеточной смерти) с вовлечением генов и белков-киллеров [8]. Центральное место в регуляции механизмов апоптоза занимают белки семейства генов bcl-2 — проапоптотические Bax, Bcl-xs и антиапоптотические — Bcl-2, Bcl-xL [6, 9, 10]. Индукция апоптоза вслед за повреждающими воздействиями ишемии/гипоксии в уязвимых областях мозга связана с увеличением содержания проапоптотических и снижением — антиапоптотических белков.

В начале 90-х годов прошлого столетия был обнаружен другой феномен «ишемической/гипоксической толерантности мозга», индуцируемой перед повреждающим воздействием умеренной, так называемой преко кондиционирующей (ПК) ишемией/гипоксией, в значительной степени предотвращающей гибель нейронов в уязвимых

областях мозга [1]. Было показано, что ПК умеренной гипобарической гипоксией (УГГ) способно нивелировать структурно-функциональные повреждения нейронов гиппокампа и неокортекса, а также изменять соотношения в них содержания про- и антиапоптотических белков, индуцируемых тяжелой гипоксией (ТГ) [14, 15]. Известно, что различные режимы (по кратности, длительности) ПК-воздействий оказывают неоднозначное по эффективности влияние на внутриклеточные механизмы протекции. Необходимо проведение дальнейших исследований, направленных на выявление оптимальных режимов ПК, вызывающих наиболее эффективную мобилизацию защитных механизмов, в частности, участвующих в регуляции процесса апоптоза [1]. Цель настоящего исследования — изучение влияния нескольких режимов ПК с использованием УГГ на экспрессию антиапоптотического белка Bcl-2 в нейронах неокортекса и гиппокампа до и после повреждающей ТГ.

Материал и методы. Работа выполнена на 72 взрослых самцах крыс линии Вистар массой 200–250 г, содержащихся в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище. При проведении экспериментов соблюдались требования, сформулированные в Директивах Совета

Сведения об авторах:

Чурилова Анна Викторовна (e-mail: annch05@mail.ru), Глущенко Татьяна Сергеевна (e-mail: tsgluschenko@mail.ru),
Самойлов Михаил Олегович (e-mail: samoilov@pavlov.infran.ru), лаборатория регуляции функций нейронов мозга,
Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6

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. ТГ создавали в барокамере проточного типа при атмосферном давлении 180 мм рт. ст. в течение 3 ч. В режиме ПК крыс подвергали УГГ (давление в барокамере составляло 360 мм рт. ст.) в течение 2 ч. Эти 2 режима использовали в различных комбинациях в следующих экспериментальных группах (по 6 животных в каждой группе): 1-я группа — крысы, подвергнутые действию ТГ; 2-, 3-, 4-я группы — крысы, подвергнутые 1, 3 или 6 сеансам гипоксического ПК (в случае 3- и 6-кратного ПК интервал между сеансами был 24 ч) и спустя 24 ч — ТГ; 5-, 6-, 7-я группы — крысы, подвергнутые только 1, 3 или 6 сеансам гипоксического ПК; 8-я группа — контрольная группа животных, которых помещали в барокамеру при нормальном атмосферном давлении на 3 ч. Через 3 и 24 ч после ТГ или через 24 ч после последнего сеанса ПК крыс декапитировали и извлекали головной мозг, который фиксировали в 4% параформальдегиде, приготовленном на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4), в течение 24 ч и подвергали гистологической обработке по стандартному протоколу. Изготавливали серии чередующихся парафиновых фронтальных срезов мозга толщиной 7 мкм на уровне –2,8 мм от брегмы и монтировали их на предметные стекла. Для оценки экспрессии Bcl-2 в неокортексе и гиппокампе крыс использовали иммуноцитохимический метод с компьютерным анализом микроизображений. Для этого после стандартных процедур депарафинирования, регидратации и демаскировки антигена срезы в течение ночи при 4 °С инкубировали с первичными поликлональными антителами к Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, США, разведение 1:100) и далее использовали авидин-биотиновую систему детекции (Vector Labs, США). Для визуализации реакции использовали диаминобензидин. После обезжизивания и заключения срезов в желатин проводили количественный анализ иммунореактивности нейронов с использованием системы, состоящей из светового микроскопа Olympus CX31 (Olympus, Япония), цифровой камеры Progres CT1 (Jenoptic, Германия) и компьютера IBM PC с программным обеспечением Videotest Master Morphology 5.2. Определяли величину оптической плотности каждой клетки в условных единицах (усл.ед.) яркости. Иммунопозитивными (ИП) считались клетки, оптическая плотность которых превышала показатель фона на 2 усл.ед. На основании заданных параметров, исходя из показателей оптической плотности, все ИП-клетки разделяли на 2 класса: интенсивно и слабо ИП. К первому классу относили нейроны с условным показателем в пределах 0,13–1,00, ко второму — в интервале 0,02–0,13. Анализировали общее число ИП-клеток и их распределение по классам интенсивности. Результаты статистически обрабатывали с помощью пакетов анализа данных STATISTICA 7.0 Stat Soft, Inc и Microsoft Excel'2003, использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA ($P < 0,05$). Все данные представлены в виде среднего арифметического значения и его стандартной

ошибки. Результаты выражены в процентах от контроля, который был принят за 100.

Результаты исследования. В различных сериях экспериментов оценивали особенности влияния УГГ и ТГ, а также их сочетанного воздействия на характер экспрессии Bcl-2 в нейронах неокортекса и вентрального отдела гиппокампа (поля СА3/СА4).

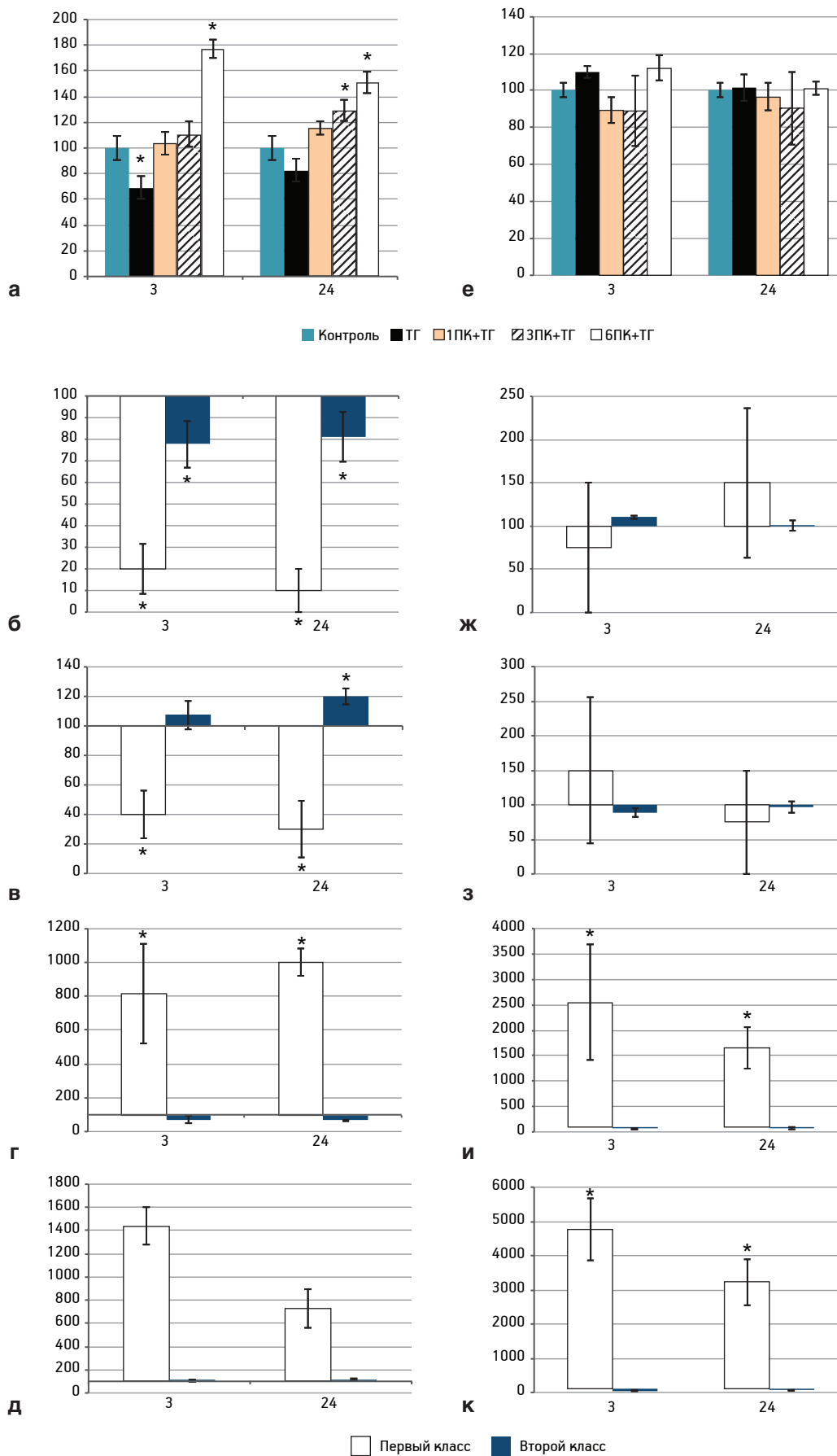
В неокортексе в контрольной группе животных был отмечен низкий уровень Bcl-2-иммунореактивности, причем преобладали клетки, относящиеся к слабо ИП-нейронам. ТГ приводила к подавлению экспрессии Bcl-2 в неокортексе. Это проявлялось снижением общего числа Bcl-2-ИП-клеток на 30 и 20% по сравнению с контролем к 3 и 24 ч после воздействия и отсутствием интенсивно ИП-клеток (рис. 1, а, б).

1-кратное ПК не изменяло общего количества Bcl-2-ИП-клеток, но приводило к снижению интенсивности иммунореактивности на 60–70% к 3 и 24 ч после ТГ (см. рис. 1, а, в). Многократные воздействия УГГ существенно повышали экспрессию Bcl-2 в неокортексе в ответ на ТГ. При этом, происходило увеличение как общего числа Bcl-2-ИП-клеток, так и интенсивно ИП-нейронов. При применении 3-кратного воздействия УГГ наблюдалось умеренное увеличение (на 30% по отношению к контролю) общего количества Bcl-2-ИП-клеток (см. рис. 1, а) к 24 ч после ТГ, а интенсивность экспрессии составляла 800 и 1000% к 3 и 24 ч соответственно (см. рис. 1, г). В случае 6-кратно ПК ТГ максимальная экспрессия наблюдалась через 3 ч: общее число ИП-клеток увеличивалось на 77%, а количество интенсивно-экспрессирующих — на 1300% по отношению к контролю. К 24 ч общее количество ИП-нейронов снижалось до 150%, а интенсивно ИП-клеток — до 730% относительно контроля (см. рис. 1, а, д).

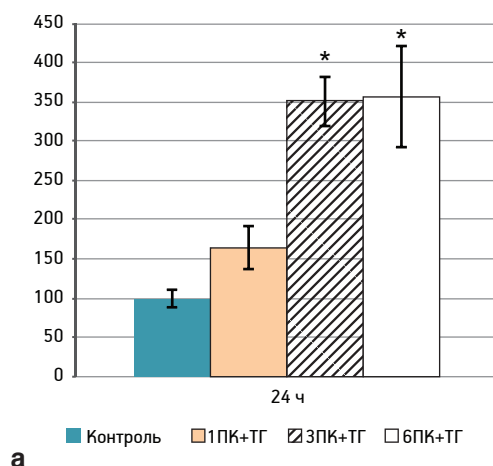
В нейронах полей СА3/СА4 гиппокампа в контрольной группе животных наблюдался низкий уровень Bcl-2-иммунореактивности. При этом, уровень экспрессии Bcl-2 в гиппокампе был гораздо ниже, чем в неокортексе. ТГ и ТГ с 1-кратным ПК не влияли на уровень экспрессии Bcl-2 в нейронах полей СА3/СА4 гиппокампа через 3 и 24 ч после воздействия (см. рис. 1, е–з). В отличие от этого, при многократных сеансах ПК происходило существенное увеличение экспрессии Bcl-2 после

Рис. 1. Содержание Bcl-2-иммунопозитивных (ИП) клеток в неокортексе (а–д) и гиппокампе (е–к) у крыс через 3 и 24 ч после тяжелой гипоксии (ТГ) у непрекондиционированных и прекокондиционированных (ПК) крыс.

а, е — доля всех Bcl-2-ИП-клеток; б–д, ж–к — доля интенсивно ИП (первый класс)- и слабо ИП (второй класс)-клеток; б, ж — после ТГ; в–д, з–к — после ТГ у 1-, 3- и 6-кратно ПК-крыс (соответственно); по осям абсцисс — время после ТГ (ч); по осям ординат — доля клеток (%), по отношению к контролю, принятому за 100). Звездочки — различия по сравнению с контролем значимы при $P \leq 0,05$. Вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки



ТГ, в основном за счет увеличения доли интенсивно ИП-клеток. Интенсивность экспрессии составляла 2550 и 4760% по отношению к контролю через 3 ч после ТГ в случае 3- и 6-кратного ПК соответственно. Через 24 ч отмечалось незначительное снижение доли интенсивно ИП-клеток до 1650 и 3225% по отношению к контролю в случае 3- и 6-кратного ПК соответственно (см. рис. 1, е, и, к).



В трех сериях экспериментов (группы 5–7) оценивали характер экспрессии Bcl-2 в ответ на воздействие УГГ в режиме ПК, без последующей ТГ. 1-кратный сеанс УГГ приводил к незначимому увеличению общего количества Bcl-2-ИП-клеток в неокортексе (на 65% по отношению к контролю) (рис. 2, а), но, вместе с тем, вызывал снижение интенсивности иммунореактивности (на 70%) (см. рис. 2, б, г).

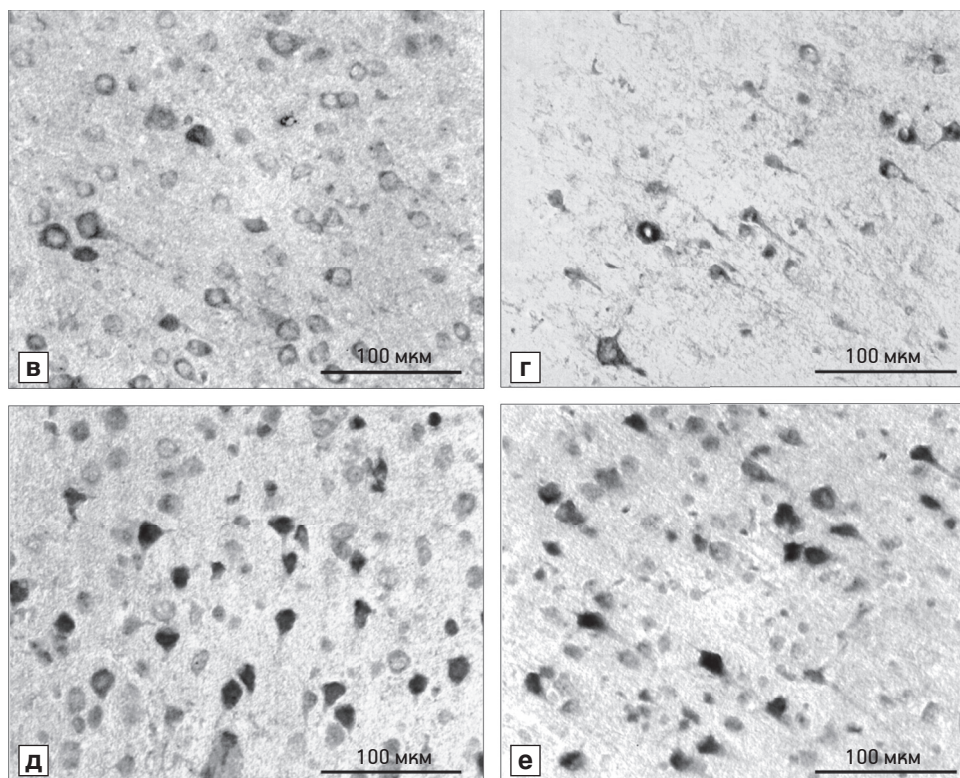
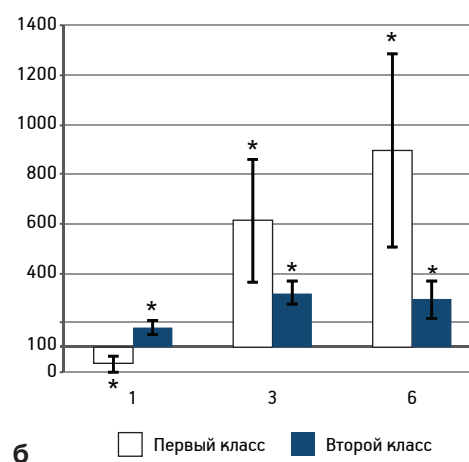


Рис. 2. Bcl-2-иммунопозитивные (ИП) клетки в неокортексе у крыс через 24 ч после воздействия умеренной гипобарической гипоксией (прекондиционирование — ПК).

а — доля всех Bcl-2-клеток; б — доля интенсивно ИП(первый класс)- и слабо ИП(второй класс)-клеток.

По осям абсцисс: а — время после последнего сеанса ПК, ч; б — количество сеансов ПК; по осям ординат — доля клеток (% по отношению к контролю, принятому за 100); звездочки — различия по сравнению с контролем значимы при $P \leq 0,05$. Вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки; в — неокортекс у контрольной крысы; г-е — у крыс после 1-, 3- и 6-кратного ПК. в-е — иммуногистохимическая реакция на Bcl-2

В гиппокампе в ответ на 1-кратный сеанс УГГ уровень экспрессии Bcl-2 не изменялся (рис. 3, а, б, г). В отличие от этого, многократные сеансы УГГ существенно повышали уровень Bcl-2 в обеих исследуемых областях. В неокортексе 3- и 6-кратные воздействия УГГ приводили к увеличению как общего количества Bcl-2-ИП-клеток (на 250%), так и интенсивно ИП-клеток (на 513 и 793% по отношению к контролю для 3- и 6-кратных воздействий УГГ соответственно) (см. рис. 2, а, б, д, е). В полях СА3/СА4 гиппокампа общее количество Bcl-2-ИП-клеток увеличивалось на

880 и 1100%, а доля интенсивно ИП-клеток — на 612 и 1700% по отношению к контролю в случае 3- и 6-кратных воздействий УГГ соответственно (см. рис. 3, а, б, д, е).

Обсуждение полученных данных. Результаты проведенного исследования выявили особенности влияния тяжелой повреждающей и нескольких, различающихся по кратности, режимов прекодиционирующей УГГ, а также их сочетанного воздействия на экспрессию антиапоптотического белка Bcl-2 в нейронах неокортекса и вентрального отдела гиппокампа.

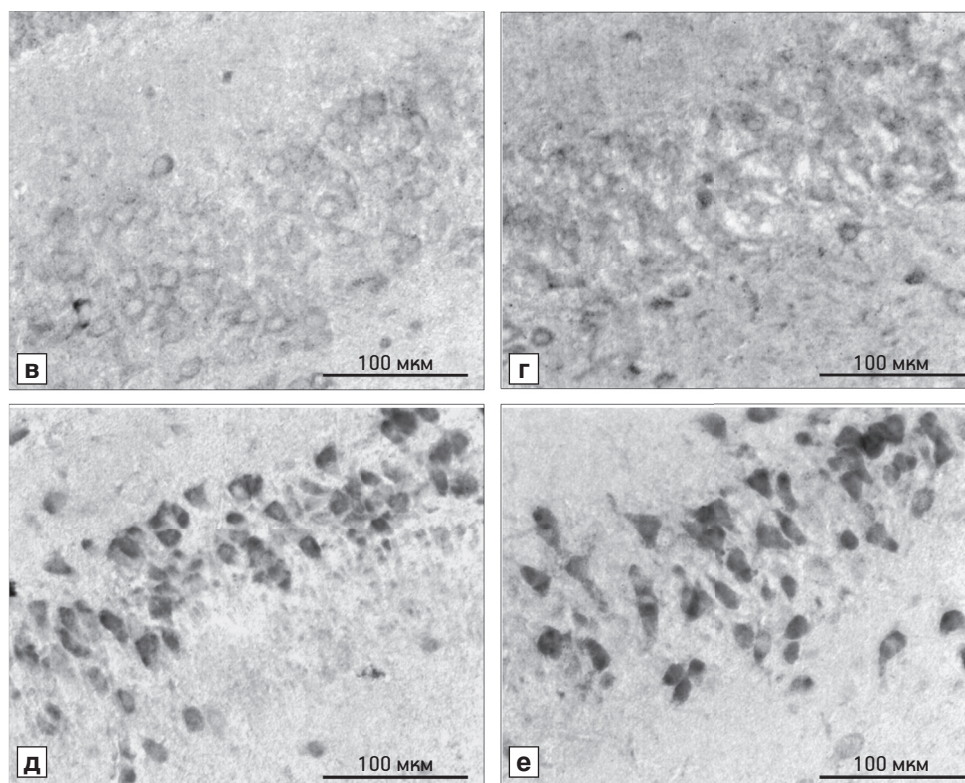
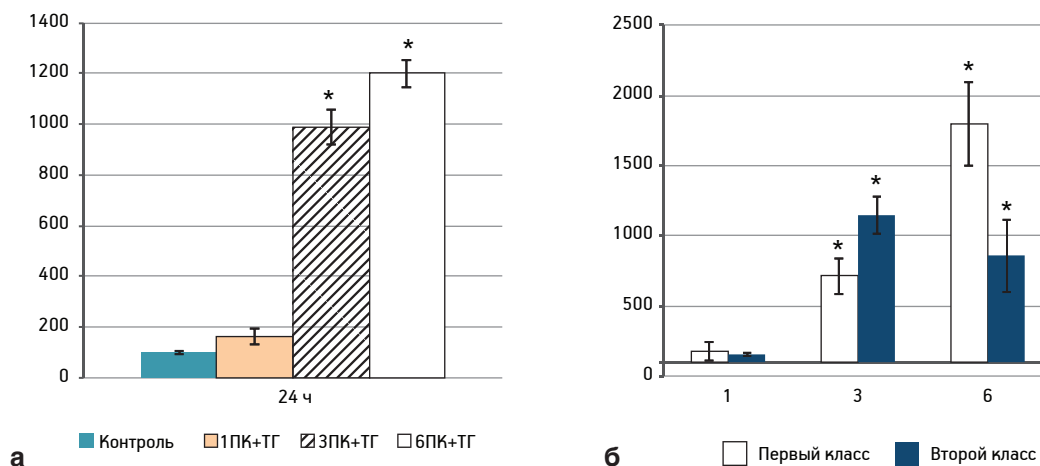


Рис. 3. Bcl-2-иммунопозитивные (ИП) клетки в вентральном отделе гиппокампа (CA3/CA4) у крыс через 24 ч после воздействия умеренной гипобарической гипоксией (прекодиционирование — ПК).

в — гиппокамп у контрольной крысы; г–е — у крыс после 1-, 3- и 6-кратного ПК. Остальные обозначения те же, что на рис. 2

ТГ вызывает существенное подавление экспрессии Bcl-2 в неокортексе через 3 и 24 ч после ТГ. После 1-кратного ПК ТГ оказывает подобное же действие. В отличие от этого, многократные (3- и 6-кратные) сеансы ПК не только устраняют эти изменения, но и усиливают экспрессию Bcl-2 нейронами. В вентральном отделе гиппокампа (поля СА3/СА4), где в контроле наблюдаются единичные Bcl-2-экспрессирующие нейроны, как ТГ, так и ТГ после 1-кратного ПК, не оказывают влияния на Bcl-2-иммунореактивность. В то же время, ТГ вслед за многократным ПК вызывает активацию процесса экспрессии Bcl-2 нейронами.

Ранее с использованием морфологических методов (окраски по Нисслию и выявлении апоптоза *in situ*) было показано, что ТГ индуцирует апоптоз множества нейронов исследуемых областей мозга, а 3-кратное ПК-воздействие в значительной мере предотвращает этот процесс [14, 15]. Недавно установлено, что 1-кратные, в отличие от 3- и 6-кратных, сеансы ПК с использованием УГГ не оказывают протективного воздействия на вызываемые ТГ структурные повреждения по типу апоптоза нейронов неокортекса и гиппокампа [3]. Сопоставление этих наблюдений с результатами настоящего исследования и данными литературы, свидетельствующими о важной роли Bcl-2 в регуляции апоптоза [5, 9, 10], позволяет сделать заключение о том, что, в отличие от 1-кратных, многократные воздействия гипоксического ПК способны запускать нейропротективные антиапоптотические внутриклеточные процессы. Установлено, что первые 2–4 ч после ишемического инсульта являются критическими для нарушения проницаемости митохондриальной мембраны и высвобождения из этих органелл цитохрома С с последующим запуском апоптотического каскада [4]. Одной из основных функций белка Bcl-2 является предотвращение этого процесса. Согласно нашим данным, уже через 3 ч после ТГ у крыс, подвергнутых многократному, но не 1-кратному ПК, отмечается высокий уровень содержания Bcl-2 в нейронах неокортекса и гиппокампа, что, очевидно, имеет важное значение для предотвращения запуска программы апоптоза и повреждения/гибели нейронов.

Большой интерес представляют обнаруженные нами особенности влияния самого 1- и многократного ПК-воздействия на нейрональную Bcl-2-экспрессию в исследуемых областях мозга. 3-, 6-кратные сеансы ПК, в отличие от 1-кратного, индуцируют активацию экспрессии в нейронах Bcl-2 к 24 ч после воздействия. Таким образом, многократные ПК-воздействия приводят к повышению содержания Bcl-2 в нейронах, и

последующая ТГ протекает на этом фоне, что может способствовать формированию внутриклеточных защитных механизмов. Установлено, что, наряду с указанным выше механизмом протективного действия Bcl-2, этот белок вовлечен в контроль переноса Ca^{2+} из эндоплазматической сети в митохондрии и предотвращение избыточного патологического накопления в них Ca^{2+} , которое приводит к нарушению функций этих органелл [11]. Как известно, экспрессия гена bcl-2 индуцируется рядом семейств транскрипционных факторов, в частности, активационными pCREB, NF-kB, а также рецепторами минералокортикоидов. Вероятно, обнаруженное нами усиление экспрессии Bcl-2 в ответ на многократные ПК-воздействия обусловлено вызываемой ими активацией этих транскрипционных факторов, что подтверждается ранее полученными данными об индуцированной 3-кратным ПК сверхэкспрессии в нейронах неокортекса и гиппокампа pCREB, NF-kB [1, 2, 13], а также рецепторов минералокортикоидов [12]. В то же время, 1-кратное ПК не оказывало такого действия [2].

В последнее время стал широко обсуждаться вопрос о возможном участии разных семейств микро-РНК, мишенями которых являются члены семейства генов bcl-2, в патологических и нейропротективных эффектах ишемии/гипоксии [11]. Решение этого вопроса является перспективным для разработки новых способов нейропротекции.

Таким образом, полученные данные убедительно свидетельствуют о важной роли антиапоптотического белка Bcl-2 в механизмах нейропротективных эффектов ПК-воздействия, индуцируемого многократными сеансами УГГ.

Работа поддержана грантом РФФИ № 11-04-00677.

ЛИТЕРАТУРА

1. Самойлов М. О. и Рыбникова Е. А. Молекулярно-клеточные и гормональные механизмы индуцированной толерантности мозга к экстремальным факторам среды. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова, 2012, т. 98, № 1, с. 108–126.
2. Самойлов М. О., Рыбникова Е. А. и Чурилова А. В. Сигнальные молекулярные и гормональные механизмы формирования протективных эффектов гипоксического preconditionирования. Пат. физиол., 2012, № 3, с. 3–10.
3. Чурилова А. В., Глушенко Т. С. и Самойлов М. О. Изменения нейронов гиппокампа и неокортекса крыс под влиянием различных режимов гипобарической гипоксии. Морфология, 2012, т. 141, вып. 1, с. 7–11.
4. Fujimura M., Morita-Fujimura Y., Noshita N. et al. The cytosolic antioxidant copper/zinc-superoxide dismutase prevents the early release of mitochondrial cytochrome c in ischemic brain after transient focal cerebral ischemia in mice. J. Neurosci., 2000, v. 20, p. 2817–2824.

5. Gillies L.A. and Kuwana T. Apoptosis regulation at the mitochondrial outer membrane. *J. Cell. Biochem.*, 2014, v. 115, № 4, p. 632–640.
6. Hardwick J.M., Chen Y.B. and Jonas E.A. Multipolar functions of BCL-2 proteins link energetics to apoptosis. *Trends Cell Biol.*, 2012, v. 22, p. 318–328.
7. Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.*, 1982, v. 239, p. 57–69.
8. Love S. Apoptosis and brain ischemia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 2003, v. 27, p. 267–282.
9. Mayer B. and Oberbauer R. Mitochondrial regulation of apoptosis. *News Physiol. Sci.*, 2003, v. 18, p. 89–94.
10. Ouyang Y.B. and Giffard R.G. Cellular neuroprotective mechanisms in cerebral ischemia: Bcl-2 family proteins and protection of mitochondrial function. *Cell Calcium*, 2004, v. 36, p. 303–311.
11. Ouyang Y.B., Stary C.M., Yang G.Y. and Giffard R. Micro RNAs: innovative targets for cerebral ischemia and stroke. *Curr. Drug Targets*, 2013, v. 14, № 1, p. 90–101.
12. Rybnikova E., Glushchenko T., Churilova A. et al. Expression of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in hippocampus of rats exposed to various modes of hypobaric hypoxia: Putative role in hypoxic preconditioning. *Brain Res.*, 2011, v. 1381, p. 66–77.
13. Rybnikova E., Glushchenko T., Tulkova E. et al. Preconditioning induces prolonged expression of transcription factors pCREB and NF-kappa B in the neocortex of rats before and following severe hypobaric hypoxia. *J. Neurochem.*, 2008, v. 106, № 3, p. 1450–1458.
14. Rybnikova E., Sitnik N., Glushchenko 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, p. 195–202.
15. Rybnikova E., Vataeva L., Tyulkova E. et al. Preconditioning prevents impairment of passive avoidance learning and suppression of brain NGFI-A expression induced by severe hypoxia. *Behav. Brain Res.*, 2005, v. 160, p. 107–114.

Поступила в редакцию 27.02.2014

CHANGES IN THE EXPRESSION OF BCL-2 ANTIAPOPTOTIC PROTEIN IN RAT NEOCORTEX AND HIPPOCAMPUS UNDER THE INFLUENCE OF VARIOUS MODES OF HYPOBARIC HYPOXIA

A.V.Churilova, T.S.Glushchenko and M.O.Samoilov

Using immunocytochemical method, the level of expression of Bcl-2 antiapoptotic factor was studied in neurons of the neocortex and hippocampus in 72 male Wistar rats exposed to damaging severe hypoxia (SH), moderate hypobaric hypoxia (MHH), as well as their combination. After SH (180 mmHg) Bcl-2 expression in the neurons of the brain regions examined was reduced or unchanged. The effect of preconditioning with one trial of MHH (360 mmHg) on Bcl-2 expression was similar to that seen after SH. In contrast, preconditioning with repeated exposures to MHH significantly up-regulated Bcl-2 expression levels 3–24 h after SH that apparently protected neurons from SH-induced injury. MHH alone, not followed by SH, significantly increased Bcl-2 expression only after multiple (three or six) exposures whereas single MHH exposure had no effect on Bcl content. Hence, up-regulation of Bcl-2 seen in response to multiple MHH trials appears to be important for the formation of the mechanisms of brain neuronal tolerance to damaging factors.

Key words: *neocortex, hippocampus, Bcl-2 protein, hypobaric hypoxia, neuroprotection*

Laboratory of Regulation of Brain Neuron Functions, RAS I.P.Pavlov Institute of Physiology, St. Petersburg