

© Коллектив авторов, 2015
УДК 611.813.3.018:612.015.348:599.323.4

Н.С.Щербак^{1, 3}, А.Г.Русакова^{1, 3}, М.М.Галагудза³, Г.Ю.Юкина², Е.Р.Баранцевич³,
В.В.Томсон², Е.В.Шляхто^{1, 3}

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА Bcl-2 В НЕЙРОНАХ ПОЛЕЙ ГИППОКАМПА ПОСЛЕ ПРИМЕНЕНИЯ ИШЕМИЧЕСКОГО ПОСТКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА

¹ Лаборатория неотложной кардиологии (зав. — проф. Е.М.Нифонтов), Институт сердечно-сосудистых заболеваний;
² Научно-исследовательский центр (дир. — проф. В.В.Томсон), Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П.Павлова; ³ Институт экспериментальной медицины (дир. — д-р мед. наук М.М.Галагудза), Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А.Алмазова, Санкт-Петербург

Исследована экспрессия белка Bcl-2 в пирамидных нейронах полей CA1, CA2, CA3 и CA4 гиппокампа у песчанок монгольских (*Meriones unguiculatus*) в ранний (2 сут) и отдаленный (7 сут) реперфузионный период после 7-минутной ишемии переднего мозга, после применения ишемического посткондиционирования (ИПостК), а также у ложнооперированных животных (n=60). У последних наибольший уровень экспрессии Bcl-2 характерен для нейронов поля CA4, наименьший — для CA1 (P<0,01). Обратимое ишемическое повреждение мозга приводило к нарастанию дефицита числа морфологически неизмененных нейронов гиппокампа с увеличением длительности реперфузионного периода, при этом в нейронах отмечалось существенное понижение экспрессии Bcl-2 в раннем реперфузионном периоде, однако в отдаленном реперфузионном периоде это понижение в значительной степени нивелировалось. ИПостК, представленное в виде трех эпизодов реперфузии—ишемии по 15/15 с, способствовало значимому увеличению числа морфологически неизмененных нейронов в полях CA1 и CA3 в ранний реперфузионный период. При этом увеличение уровня экспрессии Bcl-2 отмечалось в цитоплазме морфологически неизмененных нейронов во всех полях гиппокампа. В отдаленный реперфузионный период после ИПостК число неизмененных нейронов было увеличено в полях CA1, CA3 и CA4 (P<0,05), при этом только в нейронах поля CA1 гиппокампа было обнаружено значимое увеличение экспрессии Bcl-2 (на 12,7%, P<0,01). Результаты позволяют сделать вывод о том, что цитопротективный эффект ИПостК для поля CA1 гиппокампа реализуется через механизм, приводящий к увеличению экспрессии белка Bcl-2, т. е. путем блокирования апоптоза.

Ключевые слова: гиппокамп, нейроны, Bcl-2, ишемия—реперфузия, ишемическое посткондиционирование

Степень повреждения различных структур головного мозга (ГМ) при ишемии—реперфузии определяется продолжительностью и глубиной первичной ишемии и интенсивностью вторичного повреждения при реперфузии, которое также способствует отсроченной гибели нейронов [9]. Некроз, апоптоз и окислительный стресс играют важную роль в патогенезе вторичного повреждения при ишемии—реперфузии ГМ. Про- и антиапоптотические белки семейства Bcl-2 выполняют свои функции опосредованно через митохондрии и играют ключевую роль в процессе регуляции клеточной гибели. Белок Bcl-2 является антиапоптотическим и реализует свою функцию путем предотвращения олигомеризации и трансло-

кации белка Вах в митохондрии с последующим подавлением высвобождения проапоптотических митохондриальных белков через митохондриальные поры. Также установлено, что экспрессия белка Bcl-2 может предотвращать возникновение не только апоптоза нейронов, но и некроза [7]. Известно, что обратимая ишемия ГМ приводит к уменьшению уровня экспрессии белка Bcl-2 [1, 5]. Однако существуют исследования, в которых показано отсутствие изменений содержания белка Bcl-2 в нейронах после ишемии—реперфузии [6, 14, 19]. Уровень нейрональной экспрессии Bcl-2 в экспериментальных исследованиях используется как маркер нейропротективной эффективности исследуемых веществ [6]. Увеличение экспрес-

Сведения об авторах:

Щербак Наталья Сергеевна (e-mail: ShcherbakNS@yandex.ru), Институт сердечно-сосудистых заболеваний;
Юкина Галина Юрьевна (e-mail: ripson@inbox.ru), лаборатория патоморфологии; Томсон Владимир Викторович (e-mail: nic.spb@mail.ru),
Научно-исследовательский центр; Баранцевич Евгений Робертович (e-mail: professorerb@yandex.ru), кафедра неврологии и мануальной медицины; Шляхто Евгений Владимирович (e-mail: e.shlyakhto@almazovcentre.ru), кафедра факультетской терапии, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, 197022, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, 6–8

Русакова Анна Геннадьевна (e-mail: rusak.92.92@mail.ru), лаборатория системного кровообращения,
Галагудза Михаил Михайлович (e-mail: galagoudza@mail.ru), Институт экспериментальной медицины,
Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова, 197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, 2

сии белка Bcl-2 за счет трансфекции гена *bcl-2* при помощи вирусных векторов или липосомно-плазмидного комплекса дает нейропротективный эффект [3]. С другой стороны — известно, что ишемическое посткондиционирование (ИПостК) ГМ способствует уменьшению выраженности реперфузионного повреждения и приводит к увеличению объема жизнеспособной ткани ГМ в пределах зоны ишемии [2, 18]. Однако участие белка Bcl-2 в реализации нейропротективного эффекта ИПостК ГМ остается малоизученным, а результаты проведенных исследований немногочисленны и противоречивы [1, 5, 14]. Причины противоречивых результатов могут быть связаны с различиями в протоколах ИПостК, в использовании различных экспериментальных моделей, а также в методиках детекции экспрессии белка Bcl-2. Кроме того, в проведенных исследованиях не изучался уровень экспрессии Bcl-2 в структурах ГМ с неодинаковой чувствительностью к действию ишемии—реперфузии в разные сроки реперфузии и после применения ИПостК.

Цель настоящей работы — исследование изменения уровня экспрессии белка Bcl-2 в цитоплазме морфологически неизмененных нейронов полей гиппокампа при различной продолжительности реперфузии после применения ИПостК при обратимой ишемии—реперфузии переднего мозга у монгольских песчанок.

Материал и методы. Все эксперименты были проведены в соответствии с рекомендациями этических комитетов Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. И.П.Павлова и ФГБУ Северо-Западного федерального медицинского исследовательского центра им. В.А.Алмазова.

Моделирование ишемического повреждения. Исследование выполнено на песчанках-самцах (*Meriones unguiculatus*) массой 60–80 г, наркотизированных хлоралгидратом (450 мг/кг, внутривенно). Обратимую глобальную ишемию ГМ моделировали путем двусторонней окклюзии общих сонных артерий на 7 мин с последующей реперфузией в течение 2 и 7 сут. ИПостК моделировали путем снятия и наложения микрохирургических зажимов на общие сонные артерии в раннем реперфузионном периоде согласно выбранному протоколу эксперимента на основании ранее выполненных исследований [2] — 3 эпизода по 15 с реперфузии и 15 с реокклюзии непосредственно после 7-минутной ишемии ГМ. Проводили ложную операцию (ЛО) с аналогичными манипуляциями, но без наложения микрохирургических зажимов на артерии. Все животные были разделены на следующие группы: 1) ЛО2 (n=10) — ложнооперированные животные, находившиеся под наблюдением после операции в течение 2 сут; 2) ЛО7 (n=10) — ложнооперированные животные и находившиеся под наблюдением после операции в течение 7 сут; 3) И2 (n=10) — 7-минутная ишемия с последующей реперфузией в течение 2 сут; 4) И7 (n=10) — 7-минутная ишемия с реперфузией в течение 7 сут; 5) И2+ИПостК (n=10) — 7-минутная ишемия с применением ИПостК и реперфузией в течение 2 сут; 6) И7+ИПостК (n=10) —

7-минутная ишемия с применением ИПостК и реперфузией в течение 7 сут. Все хирургические вмешательства проводили на термостатируемом операционном столе (TCAT-2LV Controller; Physitemp Instruments Inc., Clifton, NJ, США) при температуре $37,0 \pm 0,5$ °C. В послеоперационном периоде до момента выхода животных из наркоза их температура также поддерживалась на постоянном уровне за счет внешнего источника тепла. После завершения периода реперфузии животных каждой группы повторно наркотизировали, извлекли ГМ и нарезали его на сегменты, содержащие гиппокамп, используя фронтальную матрицу для ГМ мелких грызунов (WPI, США). Срезы ГМ фиксировали в 10% нейтральном формалине и заливали в парафин по стандартной методике. Для общегистологической оценки фронтальные срезы толщиной 5 мкм, соответствующие стереотаксическому атласу монгольской песчанки (брегма — $1,7 \pm 0,2$ мм) [11], окрашивали гематоксилином — эозином. Для морфометрического анализа препараты окрашивали толуидиновым синим по методу Ниссля, на которых под световым микроскопом ДМ-750 (Leica, Германия) на нескольких срезах гиппокампа при ув. 400 подсчитывали количество неизмененных пирамидных нейронов в полях CA1, CA2, CA3 и CA4. Полученный показатель пересчитывали на 1 мм протяженности пирамидного слоя. Нейроны оценивали в соответствии с существующими критериями оценки: четко очерченное ядро эллипсоидной или круглой формы; хорошо различимые ядрышки, расположенные в центре ядра; ядро немного темнее, чем окружающий нейропил; цитоплазма нейронов четко отграничена от окружающего нейропила [17]. Для оценки экспрессии белка Bcl-2 использовали иммуногистохимический метод. После стандартной процедуры депарафинирования и регидратации срезов осуществляли тепловое демаскирование антигена в цитратном буфере pH 6,0 (DiagnosticBioSystems, США) в течение 60 мин и инкубацию 30 мин при комнатной температуре. На первом этапе инкубацию срезов проводили с поликлональными кроличьими антителами к Bcl-2 (Abcam Ltd, Великобритания). Антитела разводили 1:100 на блокирующем растворе (Diagnostic BioSystems, США). Для выявления комплекса антиген—антитело применяли набор реагентов Novocastra Peroxidase Detection System (Novocastra, Великобритания). Продукт иммуноцитохимической реакции выявляли при помощи хромогена DAB+ (Novocastra, Великобритания). Препараты докрашивали гематоксилином Джилла (Bio-Optica, Италия). Экспрессию белка Bcl-2 в нейронах анализировали на основании результатов измерения оптической плотности продукта реакции, которую осуществляли с помощью морфометрической установки, состоящей из светового микроскопа (Carl Zeiss, Германия), цифровой камеры Baumer CX05e (Baumer Optronic, Германия), компьютера IBM PC с программным обеспечением «ВидеоТест-Морфология» (ВидеоТест, Россия). Результаты анализа выражали в относительных единицах (отн. ед.) оптической плотности. В каждой анализируемой области ГМ проводили измерение оптической плотности в цитоплазме 50 неизмененных нейронов, тех, где срез прошел через ядрышко. При каждом измерении вычитали оптическую плотность фона.

Результаты обрабатывали статистически с использованием программ «STATISTICA 6.0» (Stat Sort Inc) и Microsoft Excel 2003 с вычислением среднего арифметического и его стандартной ошибки. После проверки распределения на нормальность значимость различий между группами оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Различия считали значимыми при $P < 0,05$.

Результаты исследования. При морфологическом изучении нейронов полей СА1, СА2, СА3 и СА4 гиппокампа в группах ЛО2 и ЛО7 не наблюдалось дистрофических изменений пирамидных нейронов. Ко 2-м суткам реперфузии после моделирования ишемии—реперфузии переднего мозга в группе И2 во всех полях гиппокампа отмечались перичеселлярный отек и наличие нейронов с морфологическими изменениями. При этом наиболее интенсивная их гибель была обнаружена в полях СА1 и СА3; количество неизмененных нейронов уменьшалось на 76 и 46% соответственно при сравнении с таковым в аналогичных полях гиппокампа группы ЛО2 ($P<0,01$) (таблица). Увеличение реперфузионного периода до 7 сут способствовало нарастанию редукции числа неизмененных нейронов в полях гиппокампа. В большей степени страдали нейроны полей СА1, СА3 и СА4, в которых их число уменьшалось на 81,9 ($P<0,01$), 58,5 ($P<0,01$) и 21,1% ($P<0,05$) соответственно, а в поле СА2 — только на 6,8% ($P>0,05$) при сравнении с таковым в группе ЛО7.

Ко 2-м суткам реперфузионного периода после применения ИПостК (группа И2+ИПостК) отмечалось значимое увеличение числа морфологически неизмененных нейронов в полях гиппокампа СА1 (в 2,2 раза) и СА3 (в 1,6 раза) при сравнении с таковым в группе И2 ($P<0,01$). В полях СА2 и СА4 количество неизмененных пирамидных нейронов было лишь на 1,5 и 6,9% больше, чем в группе И2 ($P>0,05$, см. таблицу). В отдаленный реперфузионный период после применения ИПостК (группа И7+ИПостК) отмечалось сокращение дефицита неизмененных нейронов при сравнении с таковым в группе И7. При этом в полях гиппокампа СА1 и СА3 также наблюдалось существенное увеличение числа морфологически неизмененных нейронов, а именно, в 2,3 ($P<0,01$) и 1,6 ($P<0,01$) раза соответственно при сравнении с их количеством в группе И7. В поле СА4 число неизмененных нейронов было больше на 19,1% ($P<0,05$), а в поле СА2 — на 1,3% ($P>0,05$), чем в группе И7 (см. таблицу).

В различных полях гиппокампа у монгольских песчанок наблюдались особенности распределения нейронов с различным уровнем экспрессии белка Bcl-2 (рисунок). Уровень экспрессии белка Bcl-2, регистрируемый в цитоплазме пирамидных нейронов полей СА1, СА2, СА3 и СА4 гиппокампа, не различался в двух группах ложнооперированных животных — ЛО2 и ЛО7. Однако наблюдались различия этого показателя в отдельных полях гиппокампа. Минимальный уровень экспрессии белка Bcl-2 в группах ЛО2 и

ЛО7 был обнаружен в нейронах поля СА1 гиппокампа, а максимальный — в нейронах поля СА4 (см. рисунок). Уровень экспрессии белка Bcl-2 в цитоплазме нейронов у животных ЛО групп зависел от принадлежности нейрона к определенному полю гиппокампа и распределялся в следующем порядке: СА1 > СА2 > СА3 > СА4 ($P<0,05$).

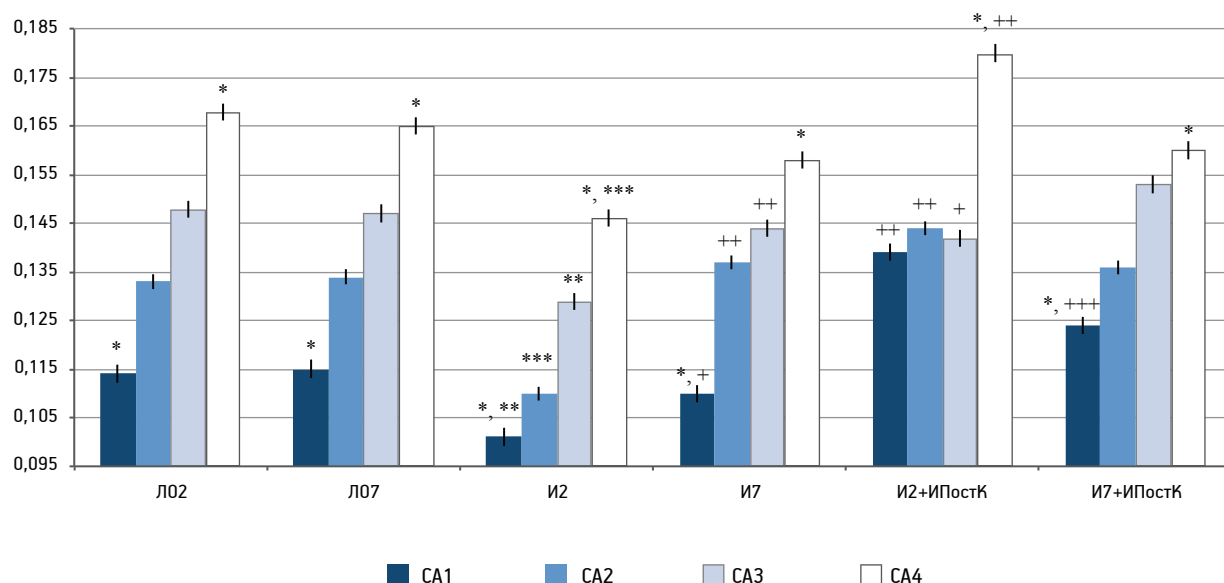
Уровень экспрессии Bcl-2 в цитоплазме нейронов различных полей гиппокампа зависел от длительности реперфузионного периода после повреждающей ишемии (см. рисунок). В группе И2 этот показатель в цитоплазме неизмененных пирамидных нейронов поля СА1 гиппокампа значимо уменьшался по сравнению с таковым в группе ЛО2 (на 11,5%, $P<0,05$), а к 7-м суткам реперфузии (группа И7) он повышался и значимо не отличался от уровня экспрессии, регистрируемой в группе ЛО7 ($P>0,05$). Экспрессия белка Bcl-2 в нейронах поля СА2 в группе И2 значимо понижалась по сравнению с таковой в группе ЛО2 (на 17,3%, $P<0,01$), однако к 7-м суткам реперфузии экспрессия существенно возрастала и была на 24,5% выше, чем в группе И2 ($P<0,01$), при этом она не отличалась от экспрессии, регистрируемой в группе ЛО7 ($P>0,05$). В морфологически неизмененных нейронах поля СА3 изменение экспрессии Bcl-2 в целом соответствовало закономерностям, наблюдаемым в поле СА2. Так, в морфологически неизмененных нейронах поля СА3 гиппокампа в ответ на ишемию переднего мозга ко 2-м суткам реперфузии уровень экспрессии Bcl-2 понизился на 12,8% по сравнению

Количество морфологически неизмененных нейронов в полях гиппокампа монгольских песчанок в различные периоды реперфузии после глобальной ишемии переднего мозга с последующим применением ишемического посткондиционирования ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, на протяжении 1 мм на срезе)

Экспериментальная группа	Поля гиппокампа			
	СА1	СА2	СА3	СА4
ЛО2	352±10	216±11	201±8	135±9
ЛО7	347±9	224±10	212±10	141±8
И2	85±11*	203±8	110±7*	116±10
И7	63±12***	208±10	88±8***	111±8**
И2+ИПостК	186±11#	207±11	177±10#	124±10
И7+ИПостК	144±10###	212±12	144±9##	133±8##

Различия значимы: * по сравнению с показателями в группе ЛО2 при $P<0,01$; ** по сравнению с показателями в группе ЛО7 при $P<0,05$; *** при $P<0,01$; # по сравнению с показателями в группе И2 при $P<0,01$; ## по сравнению с показателями в группе И7 при $P<0,05$; ### при $P<0,01$.

Примечание. Расшифровку обозначений групп см. в разделе «Материал и методы».



Уровень экспрессии белка Bcl-2 в морфологически неизмененных нейронах полей CA1, CA2, CA3 и CA4 гиппокампа монгольских песчанок (*Meriones unguiculatus*) при применении ишемического посткондиционирования при глобальной ишемии — реперфузии переднего мозга.

По горизонтальной оси — группы животных: ЛО2, ЛО7 — ложнооперированные животные и находившиеся под наблюдением 2 и 7 сут соответственно; И2, И7 — 7-минутная ишемия с последующей реперфузией в течение 2 и 7 сут соответственно; И2+ИПостК и И7+ИПостК — 7-минутная ишемия с применением ишемического посткондиционирования и реперфузией в течение 2 и 7 сут соответственно; по оси ординат — оптическая плотность (отн. ед.). Различия значимы: * по сравнению с показателями в полях гиппокампа внутри группы при $P < 0,01$; ** по сравнению с показателями в группе ЛО2 при $P < 0,05$; *** при $P < 0,01$; + по сравнению с показателями в группе И2 при $P < 0,05$; ++ при $P < 0,01$; +++ по сравнению с показателями в группе И7 при $P < 0,01$.

с таковым в группе ЛО2 ($P < 0,05$) и существенно повысился к 7-м суткам реперфузии в группе И2 (на 11,6%, $P < 0,01$). При этом различий с группой ЛО7 не наблюдалось ($P > 0,05$). Экспрессия Bcl-2 в нейронах поля CA4 ко 2-м суткам реперфузии понижалась по сравнению с показателем в группе ЛО2 (на 13,1%, $P < 0,01$). К 7-м суткам реперфузии значимого повышения уровня экспрессии по сравнению с таковой в группах И2 и ЛО7 не наблюдалось ($P > 0,05$).

Уровень экспрессии Bcl-2 в морфологически неизмененных нейронах полей гиппокампа в ответ на обратимую ишемию ко 2-м суткам реперфузионного периода распределялся в следующем порядке: CA4>CA3>CA2=CA1 ($P < 0,01$); к 7-м суткам реперфузионного периода — CA4>CA3=CA2>CA1 ($P < 0,01$).

На 2-е сутки реперфузии применение ИПостК приводило к увеличению уровня экспрессии белка Bcl-2 в цитоплазме морфологически неизмененных нейронов во всех полях гиппокампа по сравнению с таковым в группе И2 (см. рисунок). При сравнении этого показателя в нейронах полей CA1, CA2, CA3 и CA4 гиппокампа в группах И2 и И2+ИПостК в последней наблюдалось его увеличение на 37 ($P < 0,01$), 30,9 ($P < 0,01$), 10,1 ($P < 0,05$) и 23,3% ($P < 0,01$) соответственно. При этом уровень экспрессии Bcl-2 в нейронах поля CA4 был

значимо выше, чем в нейронах остальных полей гиппокампа в группе И2+ИПостК ($P < 0,01$). При анализе изменения экспрессии белка Bcl-2 в отдаленном реперфузионном периоде после применения ИПостК только в цитоплазме нейронов поля CA1 было обнаружено ее значимое увеличение (на 12,7%, $P < 0,01$), тогда как в остальных полях гиппокампа различий по сравнению с таковым в группе И7 обнаружено не было.

При применении ИПостК ко 2-м суткам реперфузии характер изменения экспрессии Bcl-2 в морфологически неизмененных нейронах различных полей гиппокампа распределялся в следующем порядке: CA4>CA3=CA2=CA1 ($P < 0,01$); а к 7-м суткам: CA4=CA3 >CA2>CA1 ($P < 0,01$).

Обсуждение полученных данных. К концу 2-х суток реперфузионного периода обратимая 7-минутная глобальная ишемия ГМ приводила к повреждению нейронов пирамидного слоя гиппокампа, с преимущественным дефицитом морфологически неизмененных нейронов в полях CA1 и CA3. При увеличении реперфузионного периода до 7 сут дефицит морфологически неизмененных нейронов нарастал в полях CA1, CA3 и обнаруживался в поле CA4. При этом пирамидные нейроны в поле CA2 оставались морфологически неизмененными как в раннем, так и в отдаленном реперфузионном периоде. Известно,

что наибольшей чувствительностью к действию ишемии—реперфузии обладают нейроны полей СА1 и СА3 [2, 15]. Увеличение нарастания дефицита морфологически неизмененных нейронов в отдаленном реперфузионном периоде объясняется феноменом отсроченной гибели нейронов [9].

При анализе распределения нейронов в зависимости от уровня экспрессии Bcl-2 и принадлежности к определенному полю гиппокампа было обнаружено, что наибольший уровень экспрессии характерен для нейронов поля СА4, наименьший — поля СА1. Известно, что уровень экспрессии белка Bcl-2 в различных отделах ГМ существенно варьирует в зависимости от топографии отдела и имеет существенные различия между развивающимся мозгом и мозгом у взрослых особей [13]. В нашем исследовании обратимая ишемия—реперфузия ГМ приводила к существенному понижению экспрессии белка Bcl-2 в раннем реперфузионном периоде, однако в отдаленном реперфузионном периоде это понижение в значительной степени нивелировалось. Наибольшая степень понижения экспрессии Bcl-2 была характерна для нейронов поля СА2, а наименьшая — для нейронов поля СА1. Полученные нами результаты согласуются с данными, полученными ранее в ряде экспериментальных исследований, в которых с использованием различных методик было показано понижение экспрессии белка Bcl-2 в различных структурах ГМ в ответ на ишемию [1, 5, 16]. Так, при использовании 4-сосудистой методики моделирования глобальной ишемии ГМ у крыс линии Вистар было установлено, что 10-минутная ишемия с последующей реперфузией длительностью 3 сут приводила к значимому снижению экспрессии белка Bcl-2 в нейронах поля СА1 гиппокампа; при этом анализ экспрессии Bcl-2 проводили путем Вестерн-блоттинга [5]. Уменьшение интенсивности реакции на белок Bcl-2 было обнаружено в поле СА1 гиппокампа у монгольских песчанок после моделирования 5-минутной ишемии ГМ [16]. Понижение экспрессии белка Bcl-2 было установлено методом количественной иммуногистохимии в поле СА1 гиппокампа у крыс, переживших тяжелую гипоксию [1]. Полученные нами результаты, а также результаты других исследований не противоречат сведениям об ингибировании белкового синтеза вследствие тяжелой ишемии [8]. Существуют и противоположные данные об экспрессии белка Bcl-2 [6, 14, 19]. В исследовании, проведенном на монгольских песчанках, было установлено, что при 5-минутной ишемии ГМ и последующей реперфузии в течение 4 сут, а также у ложнооперированных животных Bcl-2-позитивные нейроны

в поле СА1 не обнаруживались, в то время как при применении ингибитора протеаз, участвующих в апоптозе, N-тосил-L-фенилаланил хлорметил кетону-иммунореактивные нейроны выявлялись [6]. В исследовании на крысах линии Вистар с использованием 4-сосудистой методики моделирования глобальной ишемии ГМ было установлено, что 8-минутная ишемия с последующей реперфузией длительностью 3 сут приводила к значимому повышению экспрессии белка Bcl-2 в поле СА1 и зубчатой извилине гиппокампа, верифицированному иммуногистохимически [14]. Можно предположить, что в данном исследовании при анализе учитывались не только морфологически неизмененные нейроны поля СА1 гиппокампа. При использовании 4-сосудистой методики моделирования 8-минутной глобальной ишемии ГМ у крыс линии Sprague–Dawley методом иммуногистохимии была выявлена активность экспрессии белка Bcl-2 в поле СА1 гиппокампа к концу 3-х суток реперфузионного периода. При этом различий в экспрессии белка у ложнооперированных крыс и крыс, перенесших ишемию, обнаружено не было [19]. Авторами не было указано, измерялся ли уровень экспрессии белка Bcl-2 в морфологически неизмененных нейронах поля СА1 гиппокампа, срез которых проходил через ядрышко, как это было предложено делать для стандартизации морфологического анализа [9]. Существование противоречивых результатов можно объяснить использованием различных методик моделирования ишемии—реперфузии ГМ, различными временными точками анализа уровня экспрессии белка, использованием различных видов экспериментального инфаркта ГМ, а также разнообразных методик детекции и реактивов. Также следует упомянуть, что ген *bcl-2* является достаточно хорошо изученным геном у грызунов. У них описано несколько различных транскриптов, которые имеют одну и ту же открытую рамку считывания и кодируют один и тот же белок. Существующие различия в длине транскрипта объясняются полиморфизмом гена в нетранслируемой области мРНК гена *bcl-2*, характерной для тканей различных видов и линий животных [4].

Применение ИПостК приводило к увеличению числа морфологически неизмененных нейронов в полях СА1 и СА3 в раннем реперфузионном периоде и в полях СА1, СА3 и СА4 — в отдаленном. Обнаруженный нами нейропротективный эффект ИПостК согласуется с результатами ряда исследований, в которых на различных экспериментальных моделях было показано, что при-

менение ИПостК приводит к цитопротективному эффекту в отдельных структурах ГМ [2, 20].

Применение ишемических посткондиционирующих стимулов после обратимой повреждающей ишемии ГМ у монгольских песчанок вызывало увеличение экспрессии белка Bcl-2 в цитоплазме морфологически неизмененных нейронов всех полей гиппокампа при сравнении с таковой в группах без применения ИПостК. При этом наибольшая степень повышения уровня белка Bcl-2 отмечалась в раннем реперфузионном периоде, т.е. через 48 ч после ишемии. В отдаленном реперфузионном периоде у песчанок происходило повышение уровня белка Bcl-2 в цитоплазме неизмененных нейронов в наиболее чувствительной к ишемии зоне — поле СА1. Полученные нами результаты об увеличении уровня экспрессии белка Bcl-2 согласуются с данными исследования, проведенного с использованием других методик и протоколов моделирования ИПостК. Так, при фокальной 60-минутной ишемии ГМ у крыс линии Sprague–Dawley применение 6 эпизодов ишемии—реперфузии по 30 с к 24 ч реперфузии способствовало уменьшению объема повреждения и приводило к увеличению уровня белка Bcl-2, выявленного при помощи Вестерн-блоттинга в пораженном полушарии [18]. Тем же методом было установлено, что применение ИПостК при глобальной ишемии ГМ у крыс приводит к увеличению экспрессии белка Bcl-2 и числа жизнеспособных нейронов в поле СА1 [5]. Однако в указанных выше исследованиях экспрессию белка Bcl-2 измеряли в гомогенате структур ГМ, и такой подход не позволяет судить о метаболических изменениях, происходящих непосредственно в нейронах отдельных структур ГМ и не позволяет оценить вклад ИПостК в изменение содержания белка в нейронах. Известно, что клетки глии в ответ на действие ишемии—реперфузии также реагируют изменением уровня экспрессии белка Bcl-2 [13]. Существуют только единичные исследования, направленные на изучение изменения уровня экспрессии белка Bcl-2 непосредственно в цитоплазме нейронов. Так, методом количественной иммуногистохимии было показано, что 3 сеанса ИПостК, вызванных умеренной гипобарической гипоксией, после тяжелой гипоксии приводят к увеличению экспрессии белка Bcl-2 в цитоплазме выживших нейронов [1]. Однако существует исследование, показывающее уменьшение экспрессии белка Bcl-2 в поле СА1 у крыс после применения ИПостК на модели глобальной ишемии [14].

Нами показано, что ишемические стимулы, выполненные непосредственно после ишемии,

приводят к увеличению экспрессии белка Bcl-2 в нейронах всех полей гиппокампа. При этом наибольшая степень ее повышения при применении ИПостК в раннем и отдаленном реперфузионном периоде была характерна для самых чувствительных к ишемии нейронов ГМ — нейронов поля СА1 гиппокампа, что позволяет сделать вывод о том, что в механизмы цитопротекции при ИПостК вовлекается белок Bcl-2.

D.J.Kane и соавт. [7] показали, что экспрессия белка Bcl-2 может защищать нейроны не только от апоптоза, но и от некроза. Они предположили, что вместо того, чтобы непосредственно ингибировать программируемую гибель клеток, Bcl-2 может модулировать общие клеточные процессы, например, образование свободных радикалов, участвующих в запуске апоптотической и некротической гибели клетки. Существуют также исследования, показывающие нейропротективные эффекты белка Bcl-2 в условиях *in vivo*. Так, при трансфекции гена *bcl-2* при помощи вирусных векторов или липосомно-плазмидного комплекса было обнаружено уменьшение объема зоны инфаркта при фокальной ишемии ГМ у крыс или гибели нейронов в поле СА1 гиппокампа при глобальной ишемии у песчанок монгольских [3, 10]. В исследовании, проведенном на трансгенных мышах, было показано, что повышенная экспрессия гена *bcl-2* уменьшает зону повреждения ГМ при фокальной ишемии, а также может препятствовать гибели клеток мозга при ишемии [12].

Ишемические стимулы, выполненные непосредственно после ишемии в периоде ранней реперфузии, способствуют увеличению синтеза белка Bcl-2 в нейронах всех полей гиппокампа, обладающих разной устойчивостью к повреждающему действию ишемии—реперфузии. При этом степень повышения экспрессии Bcl-2 коррелирует с выраженностью цитопротективного эффекта ИПостК в отдельных полях гиппокампа. Принимая во внимание, что не существует окончательного мнения о гибели нейронов в полях гиппокампа путем апоптоза или некроза, можно предположить, что нейроны в поле СА1 гибнут преимущественно путем апоптоза. Таким образом, полученные результаты, вероятно, позволяют сделать вывод, что нейропротективный эффект ИПостК в поле СА1 гиппокампа реализуется через механизм, приводящий к увеличению экспрессии белка Bcl-2, т.е. путем блокирования апоптоза.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ по государственной поддержке ведущих научных школ (НШ-1611.2014.7).

ЛИТЕРАТУРА

1. Ветровой О.В., Рыбникова Е.А., Глущенко Т.С., Самойлов М.О. Влияние гипоксического посткондиционирования на экспрессию противоапоптотического белка Bcl-2 и нейротрофина BDNF в поле CA1 гиппокампа крыс, переживших тяжелую гипоксию // *Морфология*. 2014. Т. 145, вып.2. С. 16–20.
2. Щербак Н.С., Галагудза М.М., Кузьменков А.Н. и др. Морфофункциональные изменения поля CA1 гиппокампа у монгольских песчанок при применении ишемического посткондиционирования // *Морфология*. 2012. Т. 142, вып.5. С. 12–16.
3. Cao Y.J., Shibata T., Rainov N.G. Liposome-mediated transfer of the bcl-2 gene results in neuroprotection after in vivo transient focal cerebral ischemia in an animal model // *Gene Ther.* 2002. Vol. 9, № 6. P. 415–419.
4. Castren E., Ohga Y., Berzaghi M.P. et al. bcl-2 messenger Rna is localized in neurons of the developing and adult rat brain // *Neuroscience*. 1994. Vol. 61. P. 165–177.
5. Ding Z. M., Wu B., Zhang W. Q. et al. Neuroprotective effects of ischemic preconditioning and postconditioning on global brain ischemia in rats through the same effect on inhibition of apoptosis // *Int. J. Mol. Sci.* 2012. Vol. 13, № 5. P. 6089–6101.
6. Hara A., Niwa M., Nakashima M. et al. Protective effect of apoptosis-inhibitory agent, N-tosyl-L-phenylalanyl chloromethyl ketone against ischemia-induced hippocampal neuronal damage // *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 1998. Vol. 18, № 8. P. 819–823.
7. Kane D.J., Ord T., Anton R., Bredesen D.E. Expression of bcl-2 inhibits necrotic neural cell death // *J. Neurosci. Res.* 1995. Vol. 40. P. 269–275.
8. Kiessling M., Stumm G., Xie Y. et al. Differential transcription and translation of immediate early genes in the gerbil hippocampus after transient global ischemia // *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 1993. Vol. 13. P. 914–924.
9. Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia // *Brain Res.* 1982. Vol. 239. P. 57–69.
10. Lawrence M.S., McLaughlin J.R., Sun G.H. et al. Herpes simplex viral vectors expressing Bcl-2 are neuroprotective when delivered after a stroke // *J. Cereb Blood Flow. Metab.* 1997. Vol. 17, № 7. P. 740–744.
11. Loskota W.J., Lomax P., Verity, M.A. A Stereotaxic Atlas of the Mongolian Gerbil Brain. Ann Arbor, Mich. USA. Ann Arbor Science Publishers, 1974.
12. Martinou J.C., Dubois-Dauphin M., Staple J.K. et al. Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia // *Neuron*. 1994. Vol. 13, № 1. P. 17–30.
13. Merry D.E., Veis D.J., Hickey W.F., Korsmeyer S.J. Bcl-2 protein expression is widespread in the developing nervous system and retained in the adult PNS // *Development*. 1994. Vol. 120, № 2. P. 301–311.
14. Nemethova M., Danielisova V., Gottlieb M. et al. Ischemic postconditioning in the rat hippocampus: mapping of proteins involved in reversal of delayed neuronal death // *Arch. Ital. Biol.* 2010. Vol. 148, № 1. P. 23–32.
15. Radenovic L., Selakovic V., Janac B., Andjus P.R. Neuroprotective efficiency of NMDA receptor blockade in the striatum and CA3 hippocampus after various durations of cerebral ischemia in gerbils // *Acta Physiol. Hung.* 2011. Vol. 98, № 1. P. 32–44.
16. Shimazaki K., Ishida A., Kawai N. Increase in bcl-2 oncoprotein and the tolerance to ischemia-induced neuronal death in the gerbil hippocampus // *Neurosci. Res.* 1994. Vol. 20, № 1. P. 95–99.
17. Stummer W., Weber K., Tranmer B. et al. Reduced mortality and brain damage after locomotor activity in gerbil forebrain ischemia // *Stroke*. 1994. Vol. 25. P. 1862–1869.
18. Xing B., Chen H., Zhang M. et al. Ischemic postconditioning inhibits apoptosis after focal cerebral ischemia/reperfusion injury in the rat // *Stroke*. 2008. Vol. 39, № 8. P. 2362–2369.
19. Zhang Q.G., Wang R.M., Han D. et al. Preconditioning neuroprotection in global cerebral ischemia involves NMDA receptor-mediated ERK-JNK3 crosstalk // *Neurosci. Res.* 2009. Vol. 63, № 3. P. 205–212.
20. Zhao H., Ren C., Chen X., Shen J. From rapid to delayed and remote postconditioning: the evolving concept of ischemic postconditioning in brain ischemia // *Curr. Drug. Targets*. 2012. Vol. 13. P. 173–187.

Поступила в редакцию 16.06.2015

CHANGE IN BCL-2 PROTEIN EXPRESSION IN NEURONS OF THE HIPPOCAMPAL AREAS AFTER THE APPLICATION OF ISCHEMIC CEREBRAL POSTCONDITIONING

N.S.Shcherbak^{1, 3}, A.G.Rusakova^{1, 3}, M.M.Galagudza³, G.Yu.Yukina², Ye.R.Barantsevich³, V.V.Thomson², Ye.V.Shlyakhto^{1, 3}

Bcl-2 protein expression was studied in hippocampal CA1, CA2, CA3 and CA4 pyramidal neurons in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*), of the in in the early (Day 2) and late (Day 7) reperfusion period after a 7-minute forebrain ischemia and following ischemic postconditioning (IPostC), as well as in sham-operated animals (n=60). In the latter, the highest level of Bcl-2 expression was found in CA4 neurons, while the lowest — in CA1 neurons (P<0.01). Reversible ischemic brain damage led to the increasing deficit of morphologically unchanged hippocampal neurons with the increasing duration of reperfusion period. This was accompanied by a significant decrease in expression of Bcl-2 in the early reperfusion period, but in the late reperfusion period this decrease largely disappeared. IPostC, applied as three episodes of ischemia-reperfusion lasting 15/15 seconds, contributed to significant increase in the number of morphologically unchanged CA1 and CA3 neurons in the early reperfusion period, while the expression of Bcl-2 was increased in morphologically unchanged neurons in all the hippocampal areas. In the late reperfusion period after IPostC, the number of unchanged neurons was increased in hippocampal areas CA1, CA3 and CA4 (P<0.05), while a significant increase in Bcl-2 expression (by 12.7%, P<0.01) was detected only in CA1 neurons. The results suggest that the cytoprotective effect of IPostC in hippocampal CA1 area is realized through a mechanism leading to increased expression of Bcl-2 protein, i.e., by blocking apoptosis.

Key words: *hippocampus, neurons, Bcl-2, ischemia-reperfusion, ischemic postconditioning*

¹ Institute of Cardiovascular Diseases, ² Research Center, First St.Petersburg Pavlov State Medical University; ³ Institute of Experimental Medicine, North-West Federal Medical Research Center, St.Petersburg