

© Коллектив авторов, 2009
УДК 616.831.33:612.273.2:599.323.4

А.В. Чурилова, Е.А. Рыбникова, Т.С. Глущенко, Е.И. Тюлькова и М.О. Самойлов

ВЛИЯНИЕ УМЕРЕННОЙ ГИПОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ В РЕЖИМЕ ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ НА ЭКСПРЕССИЮ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ pCREB И NF-κB В ГИППОКАМПЕ МОЗГА КРЫС ДО И ПОСЛЕ ТЯЖЕЛОЙ ГИПОКСИИ

Лаборатория регуляции функций нейронов мозга (зав. — проф. М.О. Самойлов) Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, e-mail: annch05@mail.ru

Преко́ндицио́нирование с использованием трехкратной умеренной гипобарической гипоксии — гипоксическое преко́ндицио́нирование (ГП) — повышает толерантность уязвимых нейронов мозга к тяжелой гипоксии и другим повреждающим факторам. В работе исследовали изменения экспрессии транскрипционных факторов NF-κB (nuclear factor kappaB) и CREB (c-AMP response element binding protein) в гиппокампе преко́ндицио́нированных умеренной гипоксией крыс. Методами иммуноцитохимии выявлено, что ГП повышает иммунореактивность к NF-κB и фосфорилированному CREB (pCREB) в CA1-CA4 полях гиппокампа и зубчатой извилине, а также способствует повышению экспрессии этих транскрипционных факторов в гиппокампе преко́ндицио́нированных крыс через 3–24 ч после тяжелой гипобарической гипоксии. Данные свидетельствуют о вовлечении NF-κB и CREB в механизмы формирования толерантности мозга, активируемые ГП.

Ключевые слова: гиппокамп, нейроны, гипобарическая гипоксия, преко́ндицио́нирование, транскрипционные факторы.

Важная роль в формировании клеточного ответа на различного вида стимуляции принадлежит факторам транскрипции — компонентам, непосредственно осуществляющим регуляцию экспрессии генов в клетке, в частности, транскрипционным факторам NF-κB (nuclear factor kappaB — ядерный фактор κB) и CREB (c-AMP response element binding protein — белок, связывающий реактивный элемент циклического аденозинмонофосфата), поскольку они осуществляют контроль таких клеточных процессов, как пролиферация, дифференциация, воспалительные реакции, апоптоз [3, 9, 10]. В нервной системе CREB и NF-κB являются ключевыми транскрипционными факторами, обеспечивающими нейрональную пластичность и участвующими в процессах обучения и памяти [8–10]. Наряду с этим, регулируя широкий спектр различных проадаптивных генов, в том числе ранних генов c-fos, zif268, генов пептидных антиоксидантов, нейротрофинов, митоген-активируемой протеинкиназы MAPK/ERK (mitogen activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase — киназа, регулируемая внеклеточным сигналом), антиапоптотических белков семейства Bcl-2, белков теплового шока и др., CREB и NF-κB вовлекаются в защитные реакции нейронов мозга от различных повреждающих воздействий.

Гипоксическое преко́ндицио́нирование (ГП) — превентивное воздействие краткими повторяющимися эпизодами умеренной гипоксии, является одним из эффективных способов формирования нейропротективных механизмов мозга [1]. ГП индуцирует *гипоксическую толерантность*, характеризующуюся увеличением устойчивости мозга к повреждающим воздействиям, в частности

к последующей тяжелой гипоксии (ТГ). Показано, что ГП эффективно предотвращает повреждения и гибель нейронов мозга, а также нарушения поведения и памяти, вызываемые тяжелой гипобарической гипоксией [13, 14]. При этом ГП усиливает экспрессию продуктов протективных генов, регулируемых pCREB и NF-κB. В частности, ГП модифицирует экспрессию белковых продуктов ранних генов c-fos, zif268, антиоксидантов Trx-1, Mn-SOD, MAPK/ERK, антиапоптотических белков Bcl-2, Bcl-xL в гиппокампе и неокортексе в ответ на ТГ [2, 13, 14]. Установлено, что ГП также вызывает повышение экспрессии транскрипционных факторов pCREB и NF-κB в неокортексе крыс в ответ на ТГ [12]. Как известно, одним из наиболее уязвимых образований мозга является гиппокамп, поэтому целью настоящей работы явилось проведение сравнительного анализа изменений экспрессии фосфорилированной (активной) формы CREB (pCREB) и NF-κB (p50) вслед за тяжелой гипобарической гипоксией в различных отделах гиппокампа преко́ндицио́нированных и непреко́ндицио́нированных крыс. Наряду с этим, в задачи исследования входило изучение влияния самой умеренной гипобарической гипоксии, использованной в качестве преко́ндицио́нирующего воздействия, на экспрессию транскрипционных факторов pCREB и NF-κB (p50) в гиппокампе крыс.

Материал и методы. Работа выполнена на взрослых самцах крыс линии Вистар массой 200–250 г, содержавшихся в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище. При проведении экспериментов соблюдались требования, сформулированные в Директивах Совета Европейского сообщества (86/609/EEC) об использовании животных для экспериментальных исследований. Протоколы

опытов были утверждены Комиссией по гуманному обращению с животными Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Условия тяжелой гипобарической гипоксии создавали в барокамере проточного типа при атмосферном давлении 180 мм рт. ст. Крыс помещали в барокамеру на 3 ч. С целью preconditionирования крыс трехкратно подвергали умеренной гипобарической гипоксии в течение 2 ч с интервалом между сеансами в 24 ч. При этом давление в барокамере составляло 360 мм рт. ст. Экспериментальные животные были подразделены на 4 группы: 1) крысы, подвергнутые действию ТГ; 2) крысы, подвергнутые ГП и спустя 24 ч — ТГ; 3) крысы, подвергнутые только ГП; 4) контрольная группа животных. По 6 крыс в каждой группе. Через 3 и 24 ч после ТГ (группы 1, 2) или последнего сеанса ГП (группа 3) крыс декапитировали и извлекали головной мозг. Образцы ткани мозга фиксировали в 4% параформальдегиде, приготовленном на 0,1M фосфатном буфере (pH 7,4), в течение 24 ч и подвергали гистологической обработке по стандартному протоколу. Далее изготавливали серии чередующихся парафиновых фронтальных срезов мозга толщиной 7 мкм на уровне –2,80 мм от брегмы [11] и монтировали их на предметные стекла.

Для оценки экспрессии белков pCREB и NF-κB(p50) в гиппокампе крыс использовали иммуноцитохимический метод. Основные этапы метода: 1) инкубация с поликлональными кроличьими антителами к фосфорилированному CREB (pCREB, Sigma, разведение 1:100) и NF-κB(p50) (Santa Cruz Biotechnology, Inc, США, разведение 1:100); 2) инкубация с вторичными биотинилированными антителами (разведение 1:200); 3) инкубация с комплексом авидина с биотинилированной пероксидазой (ABC, Vector Laboratories, Inc, США, разведение реагентов А и В 1:100); 4) визуализация реакции с помощью диаминобензидина. 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 (разработка ООО «Видео Тест», Санкт-Петербург).

Результаты исследования. В контрольной группе животных практически отсутствовали pCREB-иммунопозитивные клетки в зонах CA1, CA2, CA3, CA4 и лишь единичные — встречались в зубчатой извилине гиппокампа (рис. 1, а, г).

Воздействие ТГ не изменяло экспрессии pCREB в этих отделах ни через 3, ни через 24 ч (см. рис. 1, б, д). У preconditionированных животных ТГ вызвала увеличение pCREB-иммунореактивности в зонах CA2, CA3, CA4 и особенно в зубчатой извилине гиппокампа через 3 ч. При этом основную долю клеток составляли слабо меченные клетки. К 24 ч после воздействия иммунореактивность к pCREB усиливалась в этих зонах за счет увеличения числа интенсивно меченных клеток (см. рис. 1, в, е). В зоне CA1 гиппокампа также наблюдалось увеличение иммунореактивности к pCREB к 24 ч после воздействия, но общее число клеток, экспрессирующих pCREB, оставалось довольно низким.

При воздействии трехкратной умеренной гипобарической гипоксией в режиме ГП через 3 ч паттерн экспрессии pCREB был схож с таковым в контрольной группе животных. Изменения иммунореактивности к pCREB обнаруживались к 24 ч. При этом интенсивность экспрессии pCREB варьировала в зависимости от области гиппокампа. Так, в зонах CA1, CA4 наблюдалось незначительное увеличение экспрессии pCREB, тогда как в CA3 и зубчатой извилине количество pCREB-иммунореактивных клеток существенно возрастало по сравнению с контролем (рис. 2). При этом часть клеток были слабо окрашены, однако встречались и интенсивно окрашенные.

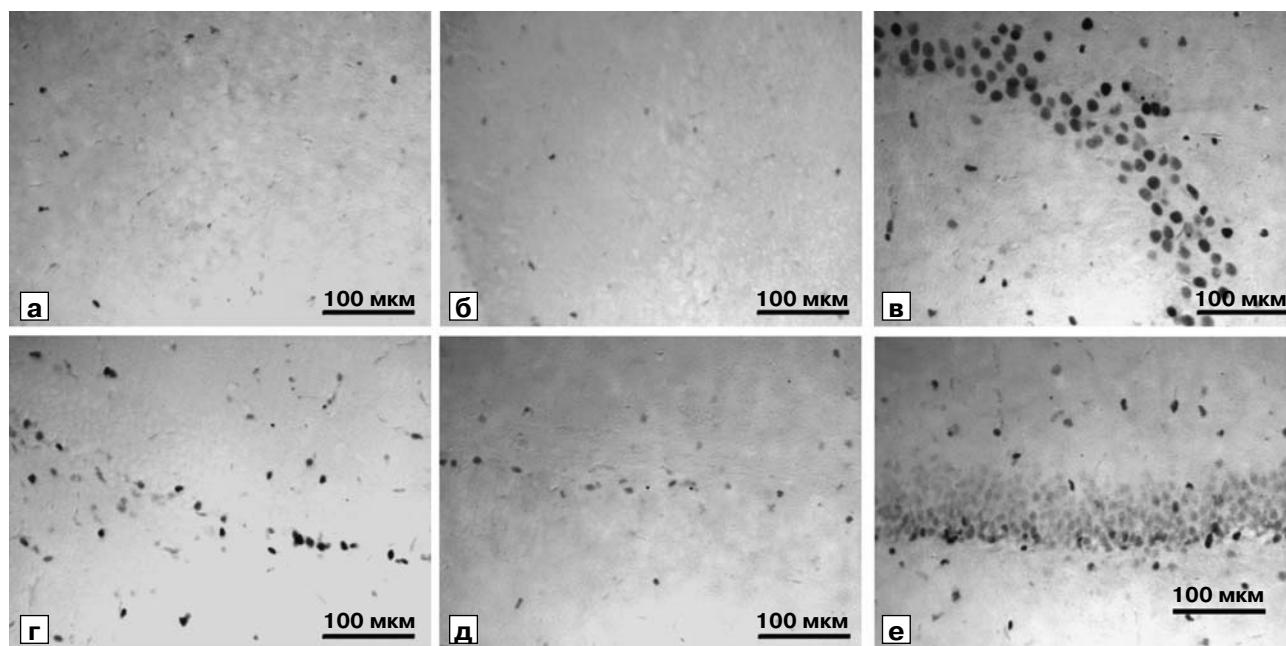


Рис. 1. Зона CA3 (а–в) и зубчатая извилина (г–е) гиппокампа контрольных (а, г) и через 24 ч после воздействия тяжелой гипоксии у непрекondиционированных (б, д) и preconditionированных (в, е) крыс.

Иммуноцитохимическая реакция на pCREB.

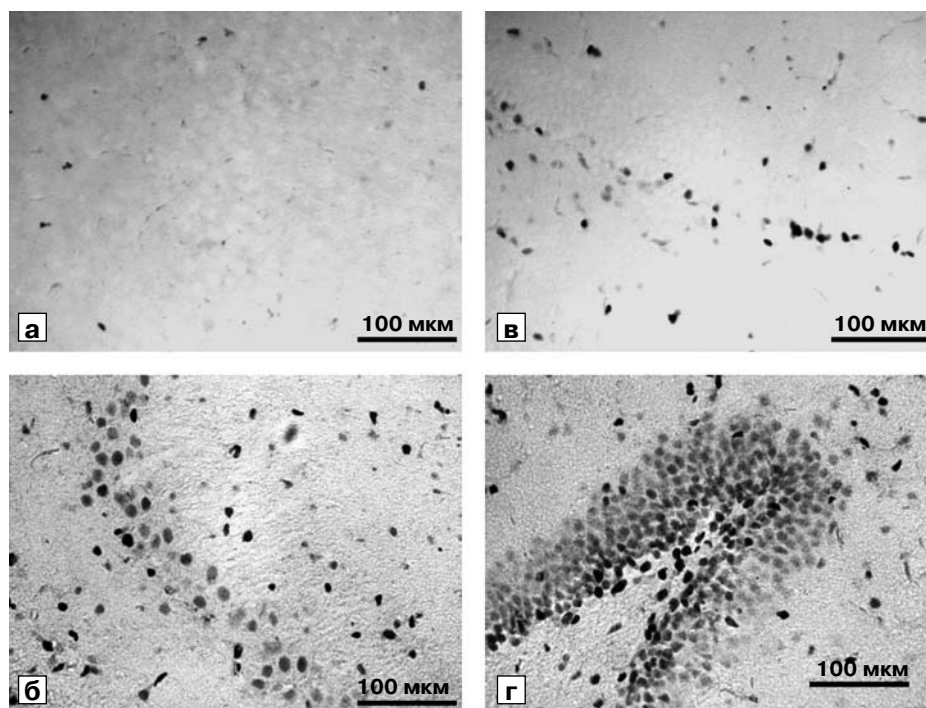


Рис. 2. Зона СА3 (а, б) и зубчатая извилина (в, г) гиппокампа контрольных (а, в) крыс и через 24 ч после их гипоксического прекондиционирования (б, г).

Иммуноцитохимическая реакция на pCREB.

Иммунореактивность к NF-κB в контрольной группе животных (рис. 3, а, г), а также через 3–24 ч после ТГ практически не выявлялась (рис. 3, б, д). В ответ на ТГ у прекондиционированных животных значительно увеличилась экспрессия NF-κB в CA1, CA2, CA3 (см. рис. 3, в, е), в меньшей степени — в зубчатой извилине через 3 ч. При этом основную долю клеток составляли интенсивно меченные нейроны. К 24 ч эффект воздействия нивелировался.

В ответ на само ГП через 3 ч не выявлялись NF-κB-иммунореактивные клетки во всех зонах гиппокампа. Вместе с тем, отмечалось значительное повышение экспрессии NF-κB к 24 ч в CA1/CA2, CA3/CA4 (рис. 4), зубчатой извилине. При этом преобладали интенсивно меченные клетки.

Обсуждение полученных данных. Как известно, гиппокамп относится к наиболее чувствительным к гипоксии и ишемии образованиям мозга. Обнаруженный в настоящей работе низкий уровень транскрипционных факторов pCREB и NF-κB в этой области мозга у контрольных животных, вероятно, является одной из причин, обуславливающих высокую уязвимость нейронов гиппокампа к гипоксии. ГП с применением умеренной гипобарической гипоксии, приводящее, по нашим данным, к повышению устойчивости нейронов, значительно повышало экспрессию pCREB и NF-κB в различных зонах гиппокампа. Паттерн индукции исследуемых транскрипционных факторов в областях гиппокампа варьировал. Так, вызываемая ГП активация CREB вслед за ТГ проявлялась в наибольшей степени в вентральных обла-

стях гиппокампа (CA3—CA4, зубчатая извилина), но не в CA1, в то время как высокая экспрессия NF-κB больше затрагивала зоны аммонового рога (CA1—CA4) и в меньшей степени — зубчатую извилину. Трехкратное воздействие умеренной гипобарической гипоксией само по себе повышало иммунореактивность к pCREB и NF-κB аналогичным образом, причем этот эффект обнаруживался не ранее чем к 24 ч после последнего сеанса умеренной гипоксии, т. е. в тот период, когда, согласно ранее принятой схеме, на животных оказывается тяжелое повреждающее воздействие. Эти результаты согласуются с данными, касающимися реакции другого уязвимого образования мозга — неокортекса, где было также выявлено, что ГП усиливает экспрессию pCREB и NF-κB через 1 сут после последнего сеанса [12]. Кроме того, в данной работе было показано, что ГП вызывает стойкое и длительное (до 24 ч) увеличение экспрессии pCREB и NF-κB в неокортексе крыс в ответ на ТГ. Как показано в настоящем исследовании, ГП с последующей ТГ также вызывает значительное увеличение экспрессии этих транскрипционных факторов в гиппокампе мозга крыс. Однако при этом имеются некоторые различия в экспрессии pCREB и NF-κB. Так, максимальная экспрессия pCREB наблюдается к 24 ч после воздействия ТГ, а значит, является пролонгированной. Экспрессия NF-κB не продолжительна, поскольку затухает к 24 ч, но проявляется быстро (к 3 ч) и отчетливо выражена, так как среди NF-κB-иммунореактивных клеток преобладают интенсивно меченные.

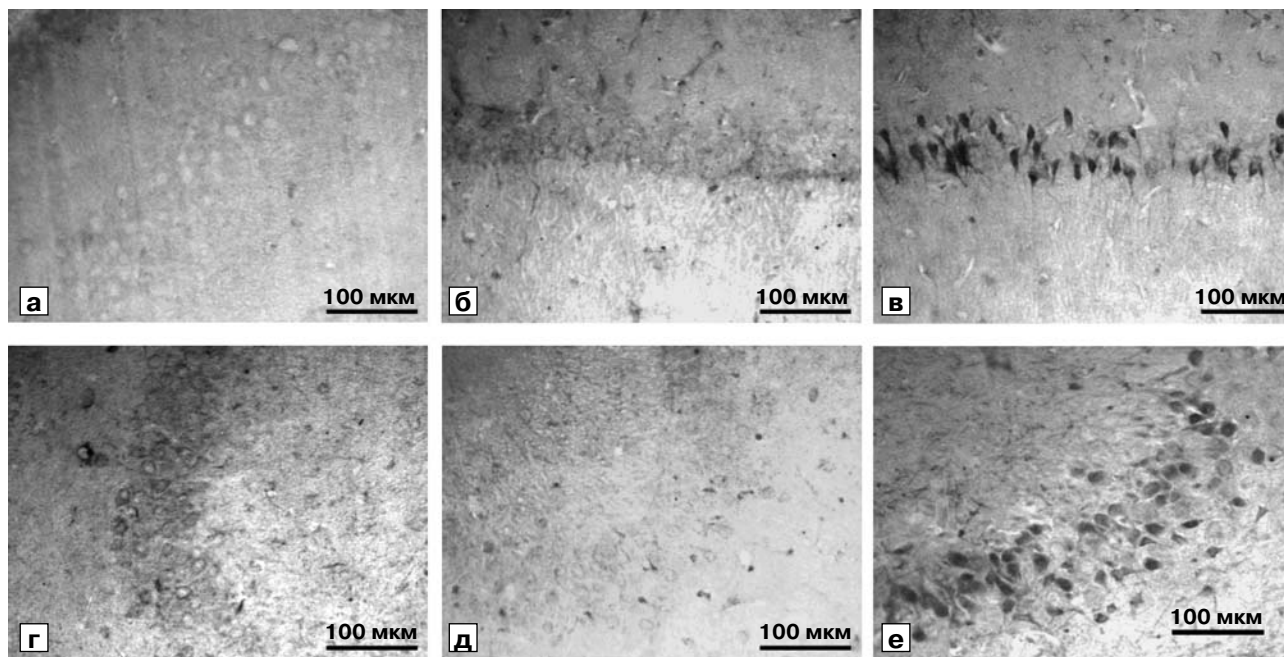


Рис. 3. Зоны CA1 (а–в) и CA3 (г–е) гиппокампа контрольных (а, г) и через 3 ч после воздействия тяжелой гипоксии у непрекondиционированных (б, д) и preconditionированных (в, е) крыс.

Иммуноцитохимическая реакция на NF-κB (p50).

Следует отметить, что так же, как и в случае ГП, ишемическое preconditionирование увеличивало экспрессию pCREB [7] и NF-κB [3], хотя сама ишемия приводит к снижению экспрессии pCREB [7] и NF-κB [4] в чувствительных зонах мозга (CA1 гиппокампа, неокортекс).

Изложенное дает основания полагать, что индукция транскрипционных факторов CREB и NF-κB может быть одним из важных механизмов, вовлекаемых в формирование толерантности нейронов мозга к тяжелой гипоксии/ишемии и другим повреждающим воздействиям. Это представле-

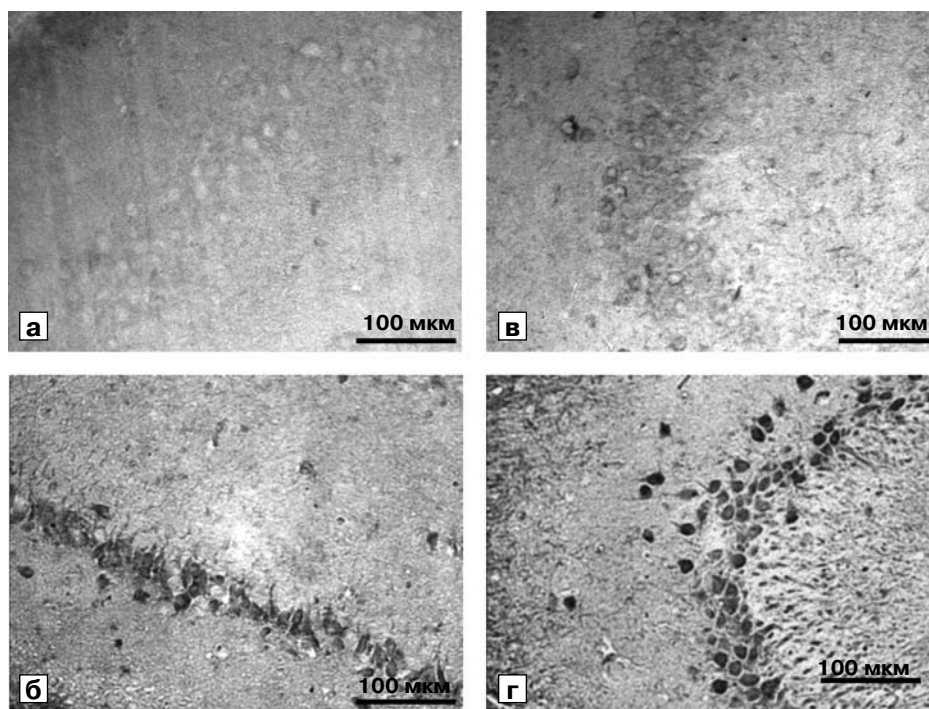


Рис. 4. Зоны CA1 (а, б) и CA3 (в, г) гиппокампа контрольных (а, в) крыс и через 24 ч после их гипоксического preconditionирования (б, г).

Иммуноцитохимическая реакция на NF-κB (p50).

ние подтверждается и рядом других сведений. В частности, установлено, что NF- κ B участвует в механизмах нейропротекции от воздействий ишемии, ионизирующего излучения, генотоксического стресса, глутамат-индуцированной эксайтотоксичности [3]. В работе Z. Yu и соавт. [15] было показано, что нейроны гиппокампа трансгенных мышей, лишенных NF- κ B (p50), были более чувствительны к действию эксайтотоксинов, чем нейроны интактных мышей. Как известно, pCREB и NF- κ B участвуют в нейропротекции, индуцируя в нейронах экспрессию проадаптивных генов. В частности, pCREB активирует транскрипцию генов c-fos, zif268, гена пептидного антиоксиданта Trx-1, генов антиапоптотических белков Bcl-2, Bcl-xL [6]. NF- κ B также индуцирует в нейронах экспрессию генов, кодирующих антиапоптотические белки Bcl-2, Bcl-xL и антиоксидантный белок MnSOD и ингибирует экспрессию гена проапоптотического белка Bax [5, 10]. Ранее было показано, что у прекондиционированных животных модифицируется экспрессия соответствующих белков в ответ на ТГ. В частности, ГП приводит к увеличению содержания белков c-Fos, NGFI-A, Bcl-2, Bcl-xL, тиоредоксинов, супероксиддисмутаза и снижению уровня Bax в неокортексе и гиппокампе крыс [2, 13, 14]. Вызываемая ГП высокая экспрессия продуктов адаптивных генов и подавление экспрессии проапоптотических белков в ответ на ТГ в неокортексе и гиппокампе мозга прекондиционированных крыс, очевидно, в значительной мере обусловлены активацией CREB и NF- κ B.

Таким образом, согласно полученным результатам, ГП с использованием умеренной гипобарической гипоксии повышает уровни транскрипционных факторов pCREB и NF- κ B в гиппокампе крыс, а также способствует их усиленной экспрессии вслед за тяжелой повреждающей гипоксией. Очевидно, это представляет собой один из важных механизмов нейропротекции, ответственный за активацию адаптивных генов в процессе формирования толерантности мозга к повреждающим воздействиям.

Работа поддержана грантами РФФИ № 07-04-00664 и 08-04-00363.

ЛИТЕРАТУРА

- Самойлов М.О. Мозг и адаптация. Молекулярно-клеточные механизмы. СПб., изд. Ин-та физиологии им. И.П. Павлова РАН, 1999.
- Строев С.А. и Самойлов М.О. Эндogenous антиоксиданты и гипоксическая толерантность мозга. СПб., изд. Ин-та физиологии им. И.П. Павлова РАН, 2006.
- Blondeau N., Widmann C., Lazdunski M. and Heurteaux C. Activation of the nuclear factor-kappaB is a key event in brain tolerance. *J. Neurosci.*, 2001, v. 21, p. 4668–4677.
- Botchkina G.I., Geimonen E., Bilof M.L. et al. Loss of NF-kappaB activity during cerebral ischemia and TNF cytotoxicity. *J. Mol. Med.*, 1999, v. 5, p. 372–381.
- Bui N.T., Livolsi A., Peyron J.F. and Prehn J.H. Activation of nuclear factor kappaB and Bcl-x survival gene expression by nerve growth factor requires tyrosine phosphorylation of IkkappaBalpha. *J. Cell Biol.*, 2001, v. 152, p. 753–764.
- Chiueh C.C., Andoh T. and Chock P.B. Induction of thioredoxin and mitochondrial survival proteins mediates preconditioning-induced cardioprotection and neuroprotection. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2005, v. 1042, p. 403–418.
- 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.
- Kida S., Josselyn S.A., de Ortiz S.P. et al. CREB required for the stability of new and reactivated fear memories. *Nat. Neurosci.*, 2002, v. 5, p. 348–355.
- Lonze B.E. and Ginty D.D. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron*, 2002, v. 35, p. 605–623.
- Mattson M.P. NF-kappaB in the survival and plasticity of neurons. *Neurochem. Res.*, 2005, v. 30, p. 883–893.
- Paxinos G. and Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Sydney, Orlando, San Diego, New York, Austin, London, Montreal, Tokyo, Toronto, Academic Press, 1986.
- Rybnikova E., Glushchenko T., Tyulkova E. et al. Preconditioning induces prolonged expression of transcription factors pCREB and NF-kappaB in the neocortex of rats before and following severe hypoxia. *J. Neurochem.*, 2008, v. 106, p. 1450–1458.
- 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.
- 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. *Beh. Brain Res.*, 2005, v. 160, p. 107–114.
- Yu Z., Zhou D., Bruce-Keller A.J. et al. Lack of the p50 subunit of nuclear factor-kappaB increases the vulnerability of hippocampal neurons to excitotoxic injury. *J. Neurosci.*, 1999, v. 19, p. 8856–8865.

Поступила в редакцию 24.06.09

THE EFFECT OF MILD HYPOBARIC HYPOXIA IN PRECONDITIONING REGIME ON THE EXPRESSION OF PCREB AND NF- κ B TRANSCRIPTION FACTORS IN RAT HIPPOCAMPUS BEFORE AND AFTER SEVERE HYPOXIA

A.V. Churilova, Ye.A. Rybnikova, T.S. Glushchenko, Ye.I. Tiul'kova and M.O. Samoilov

Preconditioning using threefold mild hypobaric hypoxia (HH) is known to increase the tolerance of vulnerable brain neurons to severe hypoxia and other damaging factors. In the present study, the changes of the expression of transcription factors NF- κ B (nuclear factor kappa B) and CREB (cAMP response element binding protein) were studied in the hippocampus of rats preconditioned by mild hypoxia. Using immunocytochemical method, it was demonstrated that HH increased NF- κ B and phosphorylated CREB (pCREB) immunoreactivity in CA1–CA4 fields of the hippocampus and gyrus dentatus. It also contributed to the up-regulation of the expression of these transcription factors in the hippocampus of preconditioned rats 3–24 h following severe HH. These findings suggest that NF- κ B and CREB are involved in HH-activated mechanisms of brain tolerance development.

Key words: hippocampus, neurons, hypobaric hypoxia, preconditioning, transcription factors.

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