

ВЛИЯНИЕ ИШЕМИЧЕСКОГО ПОСТКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ НА ЭКСПРЕССИЮ БЕЛКА Vcl-2 В НЕЙРОНАХ НЕОКОРТЕКСА ПРИ ГЛОБАЛЬНОЙ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА У КРЫС

Щербак Н.С.^{1,2}, Овчинников Д.А.², Галагудза М.М.^{1,2},
Юкина Г.Ю.¹, Баранцевич Е.Р.^{1,2}, Томсон В.В.¹, Шляхто Е.В.^{1,2}

¹ Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Северо-Западный Федеральный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Щербак Наталия Сергеевна,
ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: ShcherbakNS@yandex.ru

Статья поступила в редакцию 24.02.2016
и принята к печати 15.03.2016.

Резюме

Исследована экспрессия белка Vcl-2 в нейронах слоев II, III и V коры головного мозга крыс в ранний и отдаленный реперфузионный период после 10-минутной полной глобальной ишемии головного мозга, а также после применения ишемического посткондиционирования (ИПостК). Обратимая глобальная ишемия головного мозга приводит к дефициту морфологически неизменных нейронов в слоях II, III и V коры, который нарастает в отдаленный реперфузионный период и сопровождается понижением уровня экспрессии белка Vcl-2 в цитоплазме неизменных нейронов. ИПостК, представленное в виде трех эпизодов реперфузии-ишемии по 15/15 секунд и выполненное после ишемии способствует цитопротективному эффекту для слоев II, III и V коры и к увеличению экспрессии белка Vcl-2 в цитоплазме морфологически неизменных нейронов указанных слоев. При этом в слое V в ранний реперфузионный период не было отмечено изменения количества морфологически неизменных нейронов, но в них обнаружено понижение уровня экспрессии белка Vcl-2, которое повышалось после применения ИПостК. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что реализация нейропротективного эффекта ИПостК для слоев II, III и V коры при глобальной ишемии-реперфузии головного мозга у крыс, реализуется через механизм, приводящий к увеличению экспрессии белка Vcl-2.

Ключевые слова: неокортекс, Vcl-2, ишемия-реперфузия, ишемическое посткондиционирование, крысы

Для цитирования: Щербак Н.С., Овчинников Д.А., Галагудза М.М., Юкина Г.Ю., Баранцевич Е.Р., Томсон В.В., Шляхто Е.В. Влияние ишемического посткондиционирования на экспрессию белка Vcl-2 в нейронах неокортекса при глобальной ишемии-реперфузии головного мозга у крыс. Трансляционная медицина. 2016; 3 (1): 63–72.

////////////////////////////////////
**INFLUENCE OF ISCHEMIC
POSTCONDITIONING ON BCL-2 PROTEIN
EXPRESSION OF NEOCORTEX NEURONS
IN GLOBAL CEREBRAL ISCHEMIA-
REPERFUSION**

**Shcherbak N.S.^{1,2}, Ovchinnikov D.A.², Galagudza M.M.²,
Yukina G. Yu.¹, Barantsevich E.R.^{1,2}, Thomson V.V.¹, Shlyakhto E.V.^{1,2}**

¹ Pavlov First Saint Petersburg State Medical University,
Saint Petersburg, Russia

² Federal Almazov North-West Medical Research Centre,
Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Natalia S. Shcherbak,
Federal Almazov North-West Medical
Research Centre,
Akkuratova str. 2, Saint Petersburg, Russia
197341.
E-mail: ShcherbakNS@yandex.ru

*Received 24 February 2016; accepted 15
March 2016.*

////////////////////////////////////
Abstract

We investigated the Bcl-2 protein expression in neurons of layers II, III, and V of the cerebral cortex of rats at an early and lasting reperfusion period after a 10-minute complete global cerebral ischemia and after application of ischemic postconditioning (IPostC). Reversible global brain ischemia leads to a shortage of morphologically unaltered neurons in layers II and III of the cortex in which increases in the late reperfusion period and is accompanied by a decrease in the level Bcl-2 protein expression in the cytoplasm of neurons unchanged. IPostC, applied as three episodes of ischemia-reperfusion lasting 15/15 seconds contributed to significant increase in the number of morphologically unchanged neurons in layers II, III, and V of the cortex and to an increase Bcl-2 protein expression in cytoplasm of morphologically unchanged neurons of these layers. In the layer of in the early reperfusion period, there were no changes in the number of morphologically unchanged neurons, but they found a decrease in the level of Bcl-2 protein expression, which increased after application of IPostC. The obtained results allow to conclude, that the implementation of the neuroprotective effect of IPostC for layers II, III, and V of the cortex during global ischemia-reperfusion brain in rats, is implemented through a mechanism leading to increased Bcl-2 protein expression.

Key words: neocortex, Bcl-2, ischemia-reperfusion, ischemic postconditioning, rats

*For citation: Shcherbak NS, Ovchinnikov DA, Galagudza MM, Yukina GYu, Barantsevich ER, Thomson VV, Shlyakhto EV. Influence of ischemic postconditioning on Bcl-2 protein expression of neocortex neurons in global cerebral ischemia-reperfusion. *Translyatsionnaya medicina = Translational Medicine*. 2016; 3 (1): 62–71.*

Введение

Поиск способов защиты головного мозга от ишемического и реперфузионного повреждения представляет центральную проблему нейробиологии и фундаментальной медицины. В последнее десятилетие внимание ученых обращено к эндогенным способам нейропротекции. Ишемическое посткондиционирование (ИПостК) — эндогенный способ защиты головного мозга от повреждающего действия ишемии-реперфузии, защитный эффект

которого формируется при моделировании коротких ишемических стимулов в реперфузионный период. Известно, что окислительный стресс, некроз и апоптоз задействованы в механизмах вторичного повреждения при ишемическом повреждении головного мозга. Несмотря на достаточное количество исследований, посвященных изучению эффектов и механизмов ИПостК, полного представления о путях реализации нейропротекции при применении коротких ишемических стимулов до сих пор

нет. Остается неизученной вовлеченность белка Bcl-2 в механизмы реализации нейропротективных эффектов ИПостК головного мозга. Исследований, посвященных этой теме, мало, а результаты проведенных исследований крайне противоречивы [2–5].

Цель настоящей работы — оценить цитопротективный эффект ишемического посткондиционирования на нейроны неокортекса и исследовать в морфологически неизменных нейронах изменение уровня экспрессии белка Bcl-2 при полной глобальной ишемии-реперфузии головного мозга у крыс.

Материалы и методы

Все эксперименты были проведены в соответствии с рекомендациями Этических комитетов ГБОУ ВПО «ПСПбГМУ им. И.П. Павлова» и ФГБУ «СЗФМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава РФ, а также в соответствии с требованиями Постановления Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 29.08.2014 г. № 51 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)».

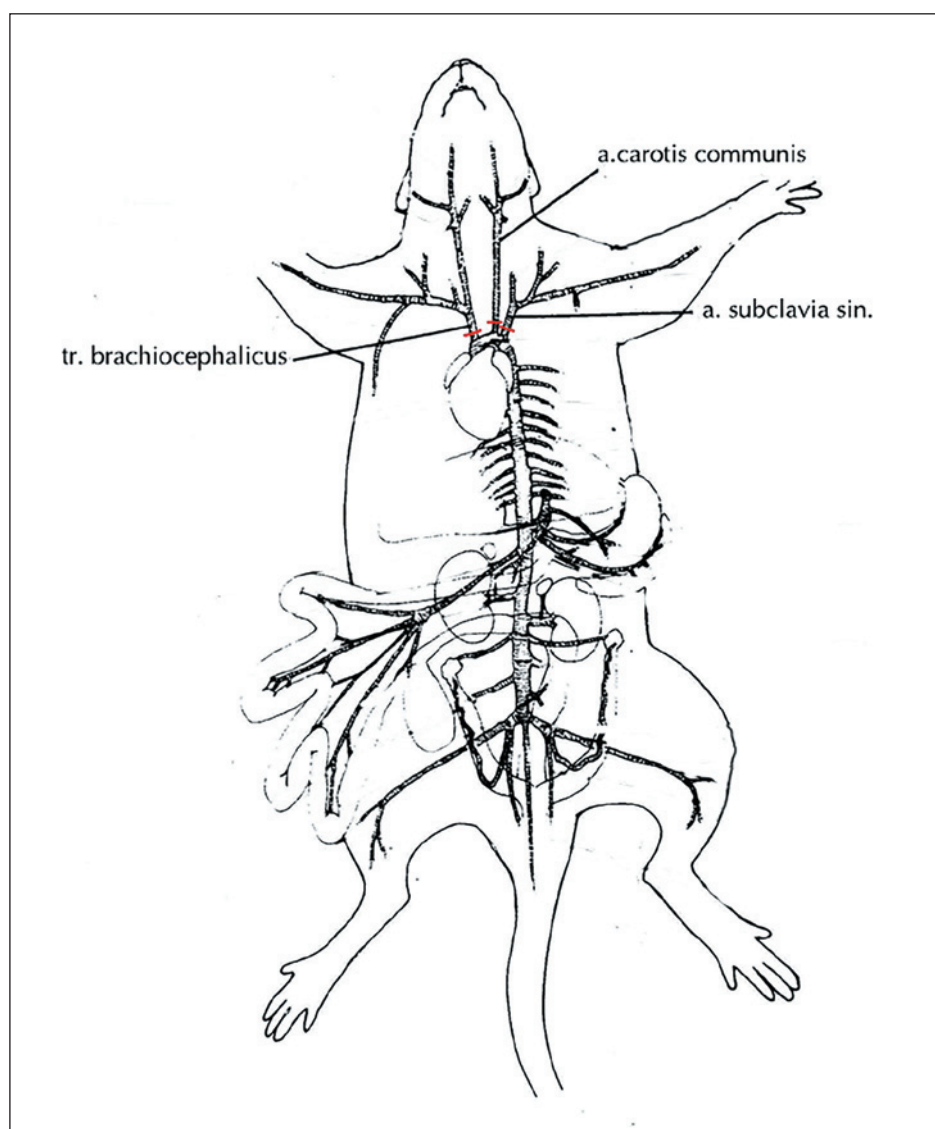
Моделирование ишемического повреждения. Моделирование ишемического повреждения. Исследование проводилось на крысах-самцах стока (линии) Wistar массой 220–250 г (питомник «Рапполово» РАН, Ленинградская область), содержащихся в условиях 12/12-часового свето-темнового режима и получавших стандартный корм и питьевую воду *ad libitum*. Животных наркотизировали хлоралгидратом (450 мг/кг внутривенно). Обратимую полную глобальную ишемию головного мозга проводили путем окклюзии плечеголового ствола, левой подключичной артерии и левой общей сонной артерии (Рис. 1). Глобальную ишемию длительностью 10 минут моделировали по ранее описанной методике, с применением аппарата искусственной вентиляции легких (SAR830, США) и специально разработанной интубационной трубки [6–8]. ИПостК моделировали путем снятия и наложения микрохирургических зажимов на артерии в раннем реперфузионном периоде согласно разработанному протоколу эксперимента — 3 эпизода по 15/15 сек реперфузии/реокклюзии после 10-минутной глобальной ишемии с последующим реперфузионным периодом, длительность которого составляла 2 и 7 суток. При проведении ложной операции осуществляли аналогичные манипуляции, но без наложения микрохирургических зажимов на артерии. Животные случайной выборкой были распределены на экспериментальные группы: 1) «ЛЮ 2» (n = 8) — ложноперированные крысы; длитель-

ность реперфузионного периода после проведения хирургических манипуляций составляла 2 суток; 2) «ЛЮ 7» (n = 7) — то же, что и в предыдущей группе, но длительность реперфузии составляла 7 суток; 3) «Ишемия 2» (n = 10) — крысы, перенесшие 10-минутную ишемию с последующим реперфузионным периодом 2 суток; 4) «Ишемия 7» (n = 10) — то же, что и в предыдущей группе, но длительность реперфузии составляла 7 суток; 5) «ПостК 2» (n = 10) — крысы, которым были выполнены 3 эпизода по 15/15 сек реперфузии/реокклюзии после 10-минутной ишемии мозга с последующей реперфузией, длительность которой составляла 2 суток; 6) «ПостК 7» (n = 13) — то же, что и в предыдущей группе, но длительность реперфузии составляла 7 суток. Все хирургические вмешательства проводились на термостатируемом операционном столе («TCAT-2LV controller», Physitemp Instruments Inc., Clifton, NJ, США) при температуре $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$. В послеоперационном периоде до момента выхода животных из наркоза их температура также поддерживалась на постоянном уровне за счет внешнего источника тепла.

Гистологический анализ. После завершения периода реперфузии животных из каждой группы повторно наркотизировали, извлекали головной мозг из полости черепа и нарезали на сегменты, используя фронтальную матрицу для головного мозга мелких грызунов (WPI, США). Срезы мозга фиксировали в 10 % нейтральном формалине и заливали в парафин по стандартной методике. Для общегистологической оценки фронтальные срезы толщиной 3 мкм, соответствующие стереотаксическому атласу головного мозга крысы (брегма $-3,6 \pm 0,2$ мм) [9], окрашивали гематоксилином и эозином. Для морфометрического анализа препараты окрашивали толуидиновым синим по методу Ниссля, на которых под световым микроскопом «ДМ-750» (Leica, Германия) на нескольких срезах при увеличении $\times 400$ (об. 40, ок. 10) подсчитывали количество морфологически неизменных нейронов в слоях II, III и V окципитальной области коры головного мозга крысы. Полученный показатель пересчитывали на 1 мм^2 слоя коры головного мозга. Нейроны оценивали в соответствии с существующими критериями оценки: четко очерченное ядро эллипсоидной или округлой формы; ясно различимые ядрышки, расположенные в центре ядра; ядро немного темнее, чем окружающий нейропилль; цитоплазма нейронов четко отграничена от окружающего нейропиля [10].

Иммуногистохимический анализ. Для оценки экспрессии белка Bcl-2 использовали иммуногистохимический метод [5]. После стандартной

Рисунок 1. Схематичное изображение мест окклюзии магистральных сосудов, отходящих от дуги аорты: плечеголового ствола, левой подключичной артерии и левой общей сонной артерии (*tr. brachiocephalicus*, *a. subclavia sin.*, *a. carotis communis sin.*).



процедуры депарафинирования и регидратации проводили тепловое демаскирование антигена в цитратном буфере pH 6,0 (DiagnosticBioSystems, США) в течение 60 мин. Инкубацию проводили 30 минут при комнатной температуре. На первом этапе проводили инкубацию срезов с поликлональными кроличьими антителами к Bcl-2 (Abcam Ltd, Великобритания). Антитела разводились 1:100 на блокирующем растворе (Diagnostic BioSystems, США). Для выявления комплекса антиген-антитело применяли набор реагентов Novocastra Peroxidase Detection System (Novocastra, Великобритания). Визуализацию продукта иммуноцитохимической реакции проводили при помощи хромогена DAB+ (Novocastra, Великобритания). Препараты докрашивали гематоксилином Джилла (Bio-Optica, Италия). Анализ экспрессии белка Bcl-2 в нейронах

проводили на основании измерения оптической плотности продукта реакции, которую осуществляли на морфометрической установке, 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 каждом анализируемом слое коры головного мозга проводили измерение оптической плотности в цитоплазме 50 неизменных нейронов, в площади среза содержащих ядрышко. При каждом измерении вычитали оптическую плотность фона.

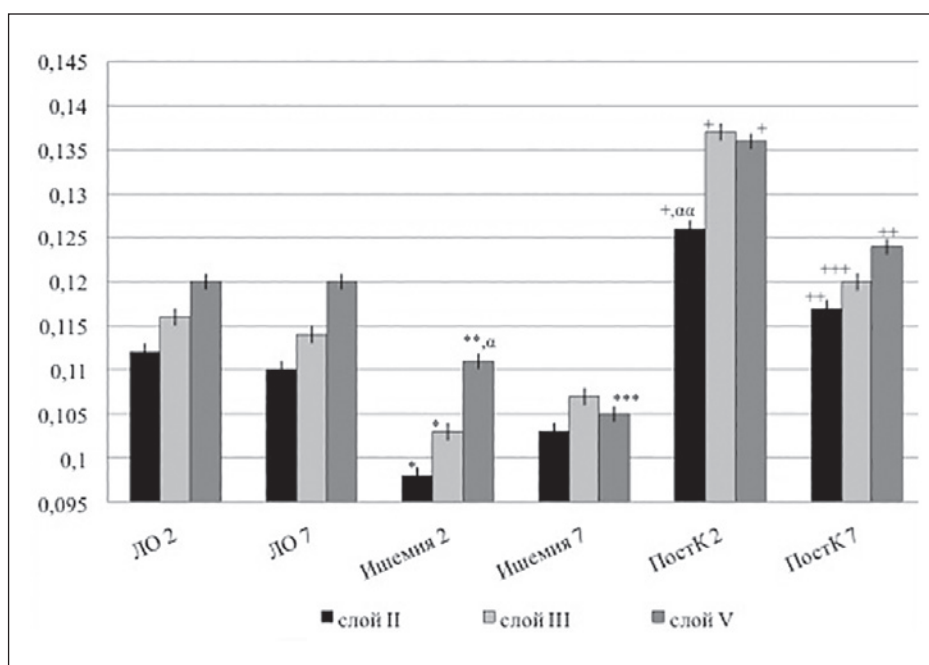
Результаты обрабатывались статистически с использованием программ «Statistica 6.0» (StatSoft

Таблица. Количество морфологически неизменных нейронов в слоях коры мозга крыс в различные периоды реперфузии после глобальной ишемии головного мозга с последующим применением ишемического посткондиционирования (на 1 мм² на срезе)

Экспериментальная группа	Слои коры		
	II	III	V
ЛО 2	360 ± 17	343 ± 12	191 ± 11
ЛО 7	392 ± 18	352 ± 11	184 ± 15
Ишемия 2	223 ± 15*	201 ± 14**	177 ± 12
Ишемия 7	197 ± 16 ^{aaa}	189 ± 10 ^{aa}	138 ± 9 ^a
ПостК 2	284 ± 9 [#]	271 ± 12 [#]	181 ± 11
ПостК 7	254 ± 11 ^{φφ}	247 ± 14 ^{φφ}	167 ± 10 ^φ

Различия значимы: * по сравнению с показателем в группе «ЛО 2» при P < 0,01; ** при P < 0,001; ^a по сравнению с показателем в группе «ЛО 7» при P < 0,05; ^{aa} при P < 0,01; ^{aaa} при P < 0,001; # по сравнению с показателем в группе «Ишемия 2» при P < 0,01; φ по сравнению с показателем в группе «Ишемия 7» при P < 0,05; φφ при P < 0,01.

Рисунок 2. Уровень экспрессии белка Vc-12 в морфологически неизменных нейронах слоев II, III и V коры мозга крыс при применении ишемического посткондиционирования при полной глобальной ишемии-реперфузии головного мозга.



По горизонтальной оси — группы животных; по оси ординат — оптическая плотность (отн. ед.). Различия значимы: * по сравнению с показателями в группе «ЛО 2» при P < 0,01; ** по сравнению с показателями в группе «ЛО 2» при P < 0,05; *** по сравнению с показателями в группе «ЛО 7» при P < 0,01; ^a по сравнению с показателем слоя II внутри группы при P < 0,01; ^{aa} при P < 0,05; + по сравнению с показателями в группе «Ишемия 2» при P < 0,01; ++ по сравнению с показателями в группе «Ишемия 7» при P < 0,01; +++ при P < 0,05.

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 учитывались как значимые при $P < 0,05$.

Результаты

При морфологическом исследовании коры головного мозга крыс ложнооперированных групп — «ЛЮ 2» и «ЛЮ 7» — на препаратах, окрашенных по методу Ниссля, выявлялись шесть слоев, представленных в виде клеток различной величины. Преобладали нормохромные клетки с четко очерченным ядром округлой формы и крупным ядрышком, расположенным, как правило, в центре ядра. Нейроны слоев II и III были представлены в виде мелких и средних нейронов, для слоя III было характерно более рыхлое расположение нейронов по отношению к слою II, слой IV практически был не выражен, для слоя V было характерно наличие крупных пирамидных нейронов. Морфометрический анализ слоев II, III и V коры головного мозга не выявил значимых различий в количестве нейронов в двух группах ложнооперированных животных — «ЛЮ 2» и «ЛЮ 7». При этом плотность нейронов в слое V была ниже при сравнении со слоями II и III коры мозга в группах «ЛЮ 2» и «ЛЮ 7» (табл.).

Ко 2-м суткам реперфузионного периода после 10-минутной глобальной ишемии головного мозга у крыс (группа «Ишемия 2») развивалось мозаичное повреждение окципитальной области коры головного мозга. На гистологических срезах отмечался периваскулярный и перицеллюлярный отек и морфологические изменения нейронов. При сравнении количества морфологически неизменных нейронов в слоях II, III и V в группах «ЛЮ 2» и «Ишемия 2» в последней наблюдалось уменьшение на 38,1 ($P < 0,01$), 41,4 ($P < 0,001$) и 7,1 % ($P > 0,05$) соответственно. К 7-м суткам реперфузионного периода обратимая 10-минутная глобальная ишемия мозга способствовала нарастанию дефицита морфологически неизменных нейронов в слоях коры головного мозга. Так в слоях II, III и V их число уменьшалось на 49,6 ($P < 0,001$), 46,1 ($P < 0,01$) и 25,2 % ($P < 0,05$) соответственно по сравнению с таковым в группе «ЛЮ 7».

Применение ИПостК после 10-минутной глобальной ишемии ко 2-м суткам реперфузионного периода приводило к увеличению количества неизменных нейронов в слоях II, III и V на 27 % ($P < 0,01$), 34,6 ($P < 0,01$) и 2,3 % ($P > 0,05$) соответственно, при сравнении с аналогичными показателями для коры головного мозга в группе «Ишемия 2» (табл.). В отда-

ленном реперфузионном периоде после 10-минутной глобальной ишемии с последующим применением ИПостК (группа «ПостК 7»), отмечалось увеличение количества морфологически неизменных нейронов в слоях II, III и V на 28,9 ($P < 0,01$), 30,5 ($P < 0,01$) и 21,3 % ($P < 0,05$) соответственно, при сравнении с таковым в группе «Ишемия 7» (табл.).

Уровень экспрессии белка Vcl-2 в нейронах слоев II, III и V коры головного мозга крыс, не различался в двух группах ложнооперированных животных — «ЛЮ 2» и «ЛЮ 7» (Рис. 2). При этом в обеих группах в цитоплазме нейронов слоя V наблюдалась тенденция к более высокому уровню экспрессии белка Vcl-2, однако достоверных различий с таковым для слоев II и III, обнаружено не было ($P > 0,05$).

Под влиянием обратимой ишемии головного мозга в целом отмечалось снижение экспрессии белка Vcl-2 в морфологически неизменных нейронах коры. Однако уровень экспрессии белка Vcl-2 в цитоплазме неизменных нейронов слоев II, III и V коры по-разному изменялся в зависимости от длительности реперфузионного периода (рис. 2). Ко 2-м суткам реперфузионного периода в слоях II, III и V коры мозга наблюдалось значимое уменьшение уровня экспрессии белка Vcl-2 на 12,5 ($P < 0,01$), 11,2 ($P < 0,01$) и 7,5 % ($P < 0,05$) соответственно, при сравнении с таковым в группе «ЛЮ 2». К 7-м суткам реперфузионного периода (группа «Ишемия 7») экспрессия Vcl-2 в цитоплазме морфологически неизменных нейронов слоев II, III и V значимо не изменялась при сравнении с уровнем экспрессии в аналогичных слоях коры в группе «Ишемия 2». При этом в слое V уровень экспрессии белка Vcl-2 понижался по сравнению с таковым в группе «ЛЮ 7» (на 12,5 %, $P < 0,01$).

К 2-м суткам реперфузионного периода уровень экспрессии белка Vcl-2 в цитоплазме морфологически неизменных нейронов слоя V был значимо выше при сравнении с аналогичным показателем, регистрируемым в слое II ($P < 0,01$). В отдаленном реперфузионном периоде различий в уровне экспрессии белка Vcl-2 в цитоплазме неизменных нейронов в слоях II, III и V обнаружено не было ($P > 0,05$).

Применение ИПостК ко 2-м суткам реперфузионного периода (группа «ПостК 2») приводило к увеличению уровня экспрессии белка Vcl-2 в цитоплазме морфологически неизменных нейронов слоев II, III и V коры головного мозга при сравнении с таковым в группах «ЛЮ 2» и «Ишемия 2» (рис. 2). При этом в группе «ПостК 2» наблюдалось увеличение экспрессии белка Vcl-2 в цитоплазме неизменных нейронов слоев II, III и V на 28,6 ($P < 0,01$), 33,1 ($P < 0,01$) и 22,5 % ($P < 0,01$) соответственно, при сравнении с аналогичными показате-

лями в группе «Ишемия 2». К 7-м суткам реперфузионного периода после применения ишемических посткондиционирующих стимулов (группа «ПостК 7») в слоях II, III и V было обнаружено значимое увеличение уровня экспрессии белка Bcl-2 на 13,6 ($P < 0,01$), 12,1 ($P < 0,05$) и 18,1 % ($P < 0,01$) соответственно, при сравнении с таковыми показателями в группе «Ишемия 7». Необходимо отметить, что к 7-м суткам реперфузионного периода после применения ИПостК в группе «ПостК 7» наблюдалось некоторое понижение уровня экспрессии белка Bcl-2 при сравнении с уровнем, регистрируемым в группе «ПостК 2» ($P > 0,05$).

Ко 2-м суткам реперфузионного периода после применения ИПостК уровень экспрессии Bcl-2 в цитоплазме морфологически неизменных нейронов слоя II был значимо ниже, чем в слоях III и V (на 8,1 % $P < 0,05$ и на 7,4 % $P < 0,05$). При сравнении этого показателя в нейронах слоев II, III и V в группе «ПостК 7» различий не наблюдалось ($P > 0,05$).

Обсуждение полученных результатов

Гистологическое исследование фронтальных срезов головного мозга крыс линии Wistar показало, что у животных структура коры мозга типична для грызунов [11]. При анализе распределения нейронов в зависимости от уровня экспрессии Bcl-2 и принадлежности к определенному слою коры достоверных различий обнаружено не было. Однако известно, что уровень экспрессии белка Bcl-2 в различных полях гиппокампа существенно варьирует в зависимости от топографии нейрона [5].

Обратимая 10-минутная полная глобальная ишемия головного мозга приводила к типичному мозаичному повреждению нейронов коры с нарастанием дефицита морфологически неизменных нейронов при увеличении реперфузионного периода, наблюдаемое явление объясняется феноменом отсроченной гибели нейронов [12]. В отдаленный реперфузионный период уменьшение плотности морфологически неизменных нейронов отмечалось не только в слоях II и III, но и в слое V. Полученные нами результаты, подтверждаются результатами других исследований, в которых показано, что нейроны слоя V коры головного мозга обладают большей устойчивостью к действию ишемии-реперфузии, чем нейроны слоев II и III [13, 14].

Полная обратимая ишемия головного мозга у крыс сопровождалась понижением уровня экспрессии белка Bcl-2 в морфологически неизменных нейронах слоев II, III и V коры. Наблюдаемое явление объясняется понижением общего метаболизма и синтеза белков в организме в ответ на неблагоприятный фактор внутренней среды ор-

ганизма в виде ишемического и реперфузионного повреждения головного мозга [15]. При этом в нейронах слоя V в раннем реперфузионном периоде не отмечалось уменьшения неизменных нейронов, но уровень экспрессии белка Bcl-2 в морфологически неизменных нейронах этого слоя понижался, хотя был значимо выше, чем в нейронах мелкоклеточных этажей коры. К 7-м суткам реперфузионного периода значимое снижение уровня экспрессии белка Bcl-2 отмечалось только для морфологически неизменных нейронов слоя V, в то время как редукция жизнеспособных нейронов отмечалась во всех анализируемых слоях — II, III и V — коры головного мозга. Такая разнонаправленная динамика в изменении уровня экспрессии белка Bcl-2 у нейронов, обладающих дифференциальной чувствительностью к действию ишемии, в различные периоды реперфузии может объясняться функциональными особенностями нейронов и нейро-глиальным индексом слоя. Также необходимо учитывать тот факт, что по-прежнему нет единого мнения о пути гибели нейронов коры при ишемии-реперфузии, возможно, в различные периоды реперфузии нейроны могут гибнуть как апоптозом так и некрозом и на выбор механизма гибели нейрона может влиять состояние глиии. Известно, что клетки глиии в ответ на действие ишемии-реперфузии также реагируют изменением уровня экспрессии белка Bcl-2 [16]. Полученные в нашем исследовании результаты, подтверждаются рядом исследований, в которых было зафиксировано понижение экспрессии белка Bcl-2 в раннем реперфузионном периоде [2, 5, 17]. Однако необходимо отметить, что в указанных работах исследованию подвергались только поля гиппокампа. Анализ уровня экспрессии белка Bcl-2 в нейронах слоев II, III и V коры при глобальной ишемии-реперфузии головного мозга нами проведен впервые.

Применение ИПостК приводило к увеличению числа морфологически неизменных нейронов в слоях полях II и III в раннем реперфузионном периоде и в слоях II, III и V — в отдаленном. Обнаруженный нами выраженный нейропротективный эффект ИПостК согласуется с результатами исследования, полученными для нейронов гиппокампа при применении аналогичного протокола ишемических посткондиционирующих стимулов, но при глобальной 7-минутной ишемии переднего мозга у песчанок монгольских [5]. Существуют исследования, в которых на разных экспериментальных моделях было показано, что применение различных протоколов ИПостК при 5–15 минутной длительности тестовой ишемии приводит к цитопротективному эффекту для отдельных структур

головного мозга [3, 4, 16].

В нашем исследовании применение ишемических посткондиционирующих стимулов после обработкой повреждающей ишемии головного мозга у крыс приводило к увеличению уровня экспрессии белка Bcl-2 в цитоплазме морфологически неизменных нейронов анализируемых слоев коры головного мозга. При этом наибольшая степень повышения уровня белка Bcl-2 отмечалась в раннем реперфузионном периоде, т.е. ко 2-м суткам реперфузионного периода. Можно предположить, что наибольший пик метаболической активности ИПостК для коры головного мозга реализуется в ранний реперфузионный период. В раннем реперфузионном периоде после применения ИПостК повышение экспрессии белка Bcl-2 в нейронах было различной степени, а распределение нейронов внутри слоев мозга от уровня экспрессии существенно образом отличалось от распределения, наблюдаемого в ложнооперированной группе. К 7-м суткам реперфузионного периода, после применения ИПостК распределение нейронов внутри слоев мозга в зависимости от уровня экспрессии Bcl-2 соответствовало распределению, наблюдаемому в группе ложнооперированных крыс.

Полученные нами результаты об увеличении уровня экспрессии белка Bcl-2 при применении ИПостК подтверждаются исследованиями, проведенными с использованием других методик и протоколов моделирования ИПостК. При 60-минутной фокальной ишемии головного мозга у крыс 6 эпизодов ишемии-реперфузии по 30 секунд к 24 часам реперфузии приводили к уменьшению объема повреждения и увеличению уровня белка Bcl-2 в пораженном полушарии, выявленного при помощи вестерн-блоттинга [18]. Однако необходимо отметить, что в вышеуказанном исследовании экспрессию белка Bcl-2 измеряли в гомогенате целого полушария головного мозга. Такой подход не позволяет судить о метаболических изменениях, происходящих непосредственно в нейронах отдельных структур головного мозга, в частности, в определенных слоях мозга, и не позволяет оценить вклад ИПостК в изменение уровня экспрессии белка непосредственно в нейронах анализируемой области. Клетки глии в ответ на действие посткондиционирующих стимулов, также как и в ответ на ишемию-реперфузию могут реагировать изменением уровня экспрессии белка Bcl-2 [19]. Увеличение экспрессии белка Bcl-2 для гиппокампа при применении различных протоколов ИПостК было установлено на различных моделях ишемического повреждения головного мозга [2, 3, 5]. Тем не менее существуют исследования, показывающие уменьшение эк-

спрессии белка Bcl-2 после применения ИПостК после глобальной ишемии [4]. Существование противоречивых результатов можно объяснить использованием различных методик моделирования ишемии-реперфузии головного мозга, неодинаковыми временными точками анализа уровня экспрессии белка Bcl-2, использованием различных видов экспериментального инфаркта мозга, а также разнообразных методик детекции экспрессии белка и использованных реактивов.

Таким образом, нами было показано, что ишемические стимулы, выполненные непосредственно после ишемии приводят к цитопротективному эффекту для слоев II, III и V коры и к увеличению экспрессии белка Bcl-2 в цитоплазме морфологически неизменных нейронов указанных слоев. При этом в слое V в ранний реперфузионный период не было отмечено изменения количества морфологически неизменных нейронов, но в них наблюдалось понижение уровня экспрессии белка Bcl-2, которое повышалось после применения ИПостК. Наблюдаемое событие может объясняться нейроглиальным индексом слоя V, функциональными особенностями нейронов данного слоя, а также специфическим развитием компенсаторной реакции характерной для окципитальной области головного мозга.

Необходимо отметить, что экспрессия белка Bcl-2 может защищать нейроны не только от апоптоза, но и от некроза [20]. По результатам работы авторами было выдвинуто предположение, что вместо того, чтобы непосредственно ингибировать программируемую гибель клеток, Bcl-2 может модулировать общие клеточные процессы, например, образование свободных радикалов, которое может приводить к апоптотической или некротической гибели клетки [20]. Подтверждением данного предположения могут служить результаты ряда исследований, в которых уменьшение зоны некроза головного мозга при фокальной ишемии сопровождалось повышением экспрессии белка Bcl-2 в поврежденном полушарии [21, 22].

Обратимая глобальная ишемия головного мозга способствует гибели нейронов слоев II, III и V коры, которое нарастает в отдаленный реперфузионный период и понижению в них уровня экспрессии белка Bcl-2. Ишемические стимулы, выполненные непосредственно после ишемии в периодах ранней и отдаленной реперфузии, способствуют увеличению синтеза белка Bcl-2 в нейронах слоев II, III и V коры, обладающих разной устойчивостью к повреждающему действию ишемии-реперфузии. Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что реализация нейротек-

тивного эффекта ИПостК для слоев II, III и V коры при глобальной ишемии-реперфузии головного мозга у крыс, реализуется через механизм, приводящий к увеличению экспрессии белка Bcl-2.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

1. The resolution of the Chief state sanitary doctor of the Russian Federation dated 29.08.2014 No. 51 «Sanitary-epidemiological requirements to the device, equipment and maintenance of experimental biological clinics (vivariums)» Registered in Ministry of justice of Russia on 31 October 2014 No. 34547. In Russian. [Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 29.08.2014 № 51 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)». Зарегистрировано в Минюсте России 31 октября 2014 г. № 34547].
2. Vetrovoy OV, Rybnikova EA, Gluchshenko TS, Samoylov MO. Effect of hypoxic postconditioning on the expression of antiapoptotic protein Bcl-2 and neurotrophin BDNF in CA1 hippocampal field of rats surviving severe hypoxia. *Morfologia*. 2014; 145(2): 16-20. In Russian. [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; 145. №2. С. 16-20.].
3. Ding ZM, Wu B, Zhang WQ, 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; 13(5): 6089-6101.
4. 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; 148(1): 23-32.
5. Shcherbak NS, Rusakova AG, Galagudza MM, Yukina GU, Barantsevich ER, Thomson VV, Shlyakhto EV. Change BCL-2 protein expression in neurons of the hippocampus after cerebral ischemic postconditioning. *Morfologia*. 2015; 48(5): 21-27. [Щербак Н.С., Русакова А.Г., Галагудза М.М., Юкина Г.Ю., Баранцевич Е.Р., Томсон В.В., Шляхто Е.В. Изменение экспрессии белка Bcl2 в нейронах полей гиппокампа после применения ишемического посткондиционирования головного мозга. *Морфология*. 2015; 48(5): 21-27].
6. Shcherbak NS, Galagudza MM, Kuzmenkov AN, et al. A new rat model of reversible global cerebral ischemia. *Bull Exp Biol Med*. 2012; 152: 656-658.
7. Shcherbak NS, Ovchinnikov DA, Kuzmenkov AN, Galagudza MM, Mitrofanova LB, Barantsevich ER, Shlyakhto EV. Method of modeling global cerebral ischemia in small laboratory animals. The patent for the invention 2464645 25.11.2010. Russia IPC G 09 B 23 28, A 61 B 17 00 – 2010148215/14. In Russian. [Щербак Н.С., Овчинников Д.А., Кузьменков А.Н., Галагудза М.М., Митрофанова Л.Б., Баранцевич Е.Р., Шляхто Е.В. Способ моделирования глобальной ишемии головного мозга у мелких лабораторных животных. Патент на изобретение 2464645 25.11.2010. Россия МПК G 09 B 23 28, A 61 B 17 00. – 2010148215/14].
8. Shcherbak NS, Kuzmenkov AN, Ovchinnikov DA, Galagudza MM. Endotracheal tube for artificial ventilation of the lungs in rodents. The patent for useful model 121389 27.04.12. Russia IPC G 09 B 23 28. – 2012117849/14. In Russian. [Щербак Н.С., Кузьменков А.Н., Овчинников Д.А., Галагудза М.М. Интубационная трубка для проведения искусственной вентиляции легких у грызунов. Патент на полезную модель 121389 27.04.12. Россия МПК G 09 B 23 28. – 2012117849/14].
9. Paxinos G, Watson Ch. The rat brain in stereotaxic coordinates. N.Y. Academic Press. 1998.
10. Stummer W, Weber K, Tranmer B, et al. Reduced mortality and brain damage after locomotor activity in gerbil forebrain ischemia. *Stroke*. 1994; 25: 1862-1869.
11. Linnik M, Miller J, Sprinkle-Cavallo J, et al. Apoptotic DNA fragmentation in the rat cerebral cortex induced by permanent middle cerebral artery occlusion. *Brain. Res Mol Brain Res*. 1995; 32: 116-124.
12. Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res*. 1982; 239: 57-69.
13. Potashev DD. Vliyanie shuntirovaniya obshchich sonnich arteriyi pri ostroyi okkluzii na citoarchitektoniku neokorteksa belich kris// *Morfologia*. 2006; 129(4): 102. In Russian. [Поташев Д.Д. Влияние шунтирования общих сонных артерий при острой окклюзии на citoarchitektoniku neokorteksa belich kris. *Морфология*. 2006; 129(4): 102.]
14. Pulsinelli WA, Buchan AM. The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. *Stroke*. 1988; 19: 913-914.
15. 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; 13: 914-924.
16. Xing B, Chen H, Zhang M, et al. Ischemic postconditioning inhibits apoptosis after focal cerebral ischemia/reperfusion injury in the rat. *Stroke*. 2008; 39(8): 2362-2369.
17. 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; 20(1): 95-99.
18. 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; 13: 173-187.
19. Merry DE, Veis DJ, Hickey WF, Korsmeyer SJ. Bcl-2 protein expression is widespread in the developing nervous system and retained in the adult PNS. *Development*. 1994; 120; 2: 301-311.
20. Kane DJ, Ord T, Anton R, Bredesen DE. Expression of bcl-2 inhibits necrotic neural cell death. *J Neurosci Res*. 1995; 40: 269-275.
21. Martinou JC, Dubois-Dauphin M, Staple JK, et al. Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron*. 1994; 13(4): 1017-1030.
22. Cao YJ, Shibata T, Rainov NG. 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; 9(6): 415-419.

Информация об авторах

Щербак Наталия Сергеевна — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории неотложной кардиологии НИИ сердечно-сосудистых заболеваний ГБОУ ВПО «ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова», ведущий научный сотрудник лаборатории нанотехнологий Института экспериментальной медицины ФГБУ «СЗФМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России;

Овчинников Дмитрий Александрович — младший научный сотрудник лаборатории метаболизма миокарда Института экспериментальной медицины ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Галагудза Михаил Михайлович — д.м.н., директор Института экспериментальной медицины ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, профессор кафедры патофизиологии ГБОУ ВПО «ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова»;

Юкина Галина Юрьевна — к.б.н., заведующая лабораторией патоморфологии ГБОУ ВПО «ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова»;

Баранцевич Евгений Робертович — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой неврологии и мануальной медицины ГБОУ ВПО «ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова», заведующий НИО ангионеврологии ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Томсон Владимир Викторович — д.м.н., профессор, директор научно-исследовательского центра ГБОУ ВПО «ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова»;

Шляхто Евгений Владимирович - д.м.н., профессор, академик РАН, генеральный директор ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, заведующий кафедрой факультетской терапии ГБОУ ВПО «ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова».

Author information:

Natalya S. Shcherbak, PhD, Senior Researcher, Urgent Cardiology Laboratory of Institute of Cardiovascular Diseases, First Pavlov State Medical University of Saint-Petersburg, Leading Researcher of Nanotechnology Laboratory of Institute for Experimental Medicine, Federal Almazov North-West Medical Research Centre;

Dmitriy A. Ovchinnikov, Junior Researcher of Myocardial metabolism Laboratory of Institute for Experimental Medicine, Federal Almazov North-West Medical Research Centre;

Mikhail M. Galagudza, PhD, Head of the Institute for Experimental Medicine of Federal Almazov North-West Medical Research Centre, Saint-Petersburg, Professor at the Department for pathophysiology, First Pavlov State Medical University of Saint-Petersburg;

Galina Yu. Yukina, PhD, Head of the Laboratory for pathomorphology, Research Center, First Pavlov State Medical University of Saint-Petersburg

Eugene R. Barantsevich, PhD, professor, head of Department for neurology and manual medicine FPO of First Pavlov State Medical University of Saint-Petersburg, head of research Department for angioneurology of Almazov North-West Medical Research Centre;

Vladimir V. Thomson, PhD, Professor, Director of

Research Center, First Pavlov State Medical University of Saint-Petersburg;

Eugene V. Shlyakhto, PhD, MD, Professor, Academician of RAS, General Director, Almazov North-West Medical Research Centre, Saint-Petersburg, Head of Department for faculty therapy, First Pavlov State Medical University of Saint-Petersburg.