

Е. И. БОНЬ, Н. Е. МАКСИМОВИЧ, О. А. КАРНЮШКО, С. М. ЗИМАТКИН, А. А. НОВАК

ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ Bcl-2 В ТЕМЕННОЙ КОРЕ И ГИППОКАМПЕ КРЫС ПРИ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ

Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет»,
г. Гродно, Республика Беларусь

Цель работы – изучить и проанализировать динамику изменения содержания белка Bcl-2 при различной степени тяжести ишемии у нескольких групп крыс. Моделировали ишемию головного мозга (ИГМ) различной степени тяжести (частичную, субтотальную и ступенчатую субтотальную) в условиях внутривенного тиопенталового наркоза (40–50 мг/кг). И с помощью иммуногистохимического метода с использованием моноклональных антител измеряли содержание Bcl-2 в цитоплазме пирамидных нейронов 5-го слоя теменной коры и поля CA₁ гиппокампа.

Ключевые слова: белок Bcl-2, ишемия, крысы, иммуногистохимический метод.

Введение. Патогенез ишемического повреждения головного мозга включает биохимический каскад, частью которого является активация апоптоза [4, 7]. Кроме патогенетической роли, апоптоз играет важную роль в процессе эмбрио- и органогенеза, а также инволюции органов и тканей в стареющем организме, иммунном ответе и других процессах.

Проявлениями апоптоза нейронов являются: набухание перикариона, деструкция нейропилия, конденсация хроматина, фрагментация ДНК с последующим кариорексисом.

Внешний (рецепторный) механизм апоптоза индуцируется внеклеточными стресс-сигналами, которые воспринимаются специфическими трансмембранными рецепторами.

Каспазозависимая клеточная гибель может подавляться ингибиторами широкого спектра, например, N-бензилоксикарбонил-Val-Ala-Asp-флуорометилкетонном.

Существует митохондриальный механизм усиления функции эффекторных каспаз. При этом каспаза-3 в активном состоянии расщепляет протеин цитоплазмы Bid, который затем перемещается к митохондрию и встраивается в мембрану, что приводит к освобождению цитохрома c из митохондрии в цитозоль. Цитохром c взаимодействует с Apoptotic protease activating factor 1 (APAF-1) и прокаспазой-9 с активацией последней и активацией прокаспазы-3, которая, в свою очередь, активирует каспазы-6 и 7 [1].

Причинами, запускающими апоптоз через изменение функции митохондрии, являются: дефицит факторов роста в окружающей клетку среде, увеличение образования в клетке активных форм кислорода, повреждение ДНК и др. [2].

Под влиянием этих стимулов изменяется функция протеинов, относящихся к семейству Bcl (B-Cell Leukemia/Lymphoma). Протеины этого семейства делятся на два класса.

Протеины первого класса семейства Bcl ингибируют апоптоз. Они погружены в наружную мембрану митохондрий и регулируют проницаемость мембраны, а также уменьшают образование активных форм кислорода. Представителями этого класса протеинов являются Bcl-2 и Bcl-x_L.

Белок Bcl-2 локализуется на внешней мембране митохондрий, ингибируя действия проапоптотических белков, которые обычно действуют на митохондриальную мембрану, способствуя повышению ее проницаемости и запуску апоптоза [10].

Протеины второго класса семейства Bcl стимулируют развитие апоптоза. Эти протеины находятся в цитозоле, но затем перемещаются к мембране митохондрий, где взаимодействуют с представителями первого класса – протеинами Bcl-2 и Bcl-x_L, ингибируя их. Членами протеинов второго класса семейства Bcl являются Bid, Bad, Bax и др.

Активация представителей второго класса Bcl вызывает повышение проницаемости внутренней мембраны митохондрий, что приводит к набуханию матрикса митохондрий и разрыву наружной мембраны [9]. При подавлении функции членов семейства Bcl-2, ингибирующих апоптоз, может образоваться «неселективный мегаканал» в мембране митохондрии, увеличивающий проницаемость мембраны, что приводит к освобождению цитохрома с и белка DIABLO из митохондрий в цитозоль.

Поступивший в цитозоль цитохром с взаимодействует с АРАФ-1, привлекая каспазу-9, что приводит к формированию комплекса протеинов – апоптосомы. В присутствии АТФ происходит активация каспазы-9. Протеин DIABLO инактивирует протеиновые ингибиторы апоптоза, что ведет к активации каспазы-3 [3].

Иницирующими факторами механизма с вовлечением внутреннего пути апоптоза являются внутриклеточные изменения, такие как повреждение ДНК, окислительный стресс, цитозольная кальциевая перегрузка, эксайтотоксичность (гиперстимуляция рецепторов глутамата), накопление денатурированных белков в эндоплазматической сети и другие [5]. Основным механизмом развития внутреннего пути апоптоза – увеличение проницаемости мембран митохондрий. Данный тип клеточной гибели может быть каспазозависимым или осуществляться независимо от каспаз [6].

Каспазозависимый путь клеточной смерти связан с лизисом хроматина и сопровождается истощением НАД⁺ и АТФ.

Согласно данным литературы, при церебральной ишемии, вызванной окклюзией средней мозговой артерии, в нейронах коры головного мозга снижается содержание белка Bcl-2 [10–12]. Вместе с тем, представляет интерес изучение изменения его содержания при церебральной ишемии различной степени тяжести [8].

Материалы и методы исследования. Эксперименты выполнены на 42 самцах беспородных белых крыс массой 260 ± 20 г с соблюдением требований Директивы Европейского Парламента и Совета № 2010/63/EU от 22.09.2010 о защите животных, используемых для научных целей.

Моделировали ишемию головного мозга (ИГМ) различной степени тяжести (частичную, субтотальную и ступенчатую субтотальную) в условиях внутривенного тиопенталового наркоза (40–50 мг/кг).

Частичную ишемию головного мозга (ЧИГМ) моделировали путем перевязки одной общей сонной артерии (ОСА) справа.

Субтотальную ишемию головного мозга (СИГМ) моделировали путем одновременной перевязки ОСА.

Ступенчатую субтотальную ИГМ (ССИГМ) осуществляли путем последовательной перевязки обеих ОСА с интервалом 7 суток (подгруппа 1), 3-е суток (подгруппа 2) и 1 сутки (подгруппа 3).

Взятие материала (участков теменной коры и гиппокампа) осуществляли через 1 час после операции.

Контрольную группу составили ложно оперированные крысы аналогичных пола и веса.

Определение содержания Bcl-2 в цитоплазме пирамидных нейронов 5-го слоя теменной коры и поля СА₁ гиппокампа крыс осуществляли иммуногистохимическим методом с использованием моноклональных антител. С этой целью после декапитации у крыс быстро извлекали головной мозг, кусочки коры больших полушарий головного мозга фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде при +4 °С (на ночь), затем заключали в парафин.

Парафиновые срезы толщиной 5 мкм готовили с помощью микротомы, монтировали на предметные стекла. Препараты обрабатывали согласно протоколу иммуноцитохимической реакции для световой микроскопии, исключая процедуру теплового демаскирования антигенов. Для определения иммунореактивности молекулярного маркера Bcl-2 применяли первичные моноклональные мышинные антитела (Anti-Bcl-2 rabbit pAb antibody, Finetest, Китай, CatalogNo. FNab00839) в разведении 1 : 1600 при +4 °С, с экспозицией 20 ч во

влажной камере. Содержание белка Bcl-2 изучали в цитоплазме нейронов в иммуногистохимических препаратах на основе величины оптической плотности осадка хромогена с помощью микроскопа Axioscop 2 plus (Zeiss, Германия), цифровой видеокамеры (LeicaDFC 320, Германия) и программы анализа изображения ImageWarp (Bitflow, США).

Для предотвращения систематической ошибки измерений образцы головного мозга от сравниваемых контрольной и опытных групп животных изучали в одинаковых условиях.

В результате исследований получены количественные непрерывные данные. Так как в эксперименте использованы малые выборки, которые имели ненормальное распределение, анализ проводили методами непараметрической статистики с помощью лицензионной компьютерной программы Statistica 10.0 для Windows (StatSoft, Inc., США). Данные представлены в виде Me (LQ; UQ), где Me – медиана, LQ – значение нижнего квартиля; UQ – значение верхнего квартиля. Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$ (тест Крускаллы-Уоллиса с поправкой Бонферони).

Результаты и их обсуждение. У крыс с ЧИГМ изменений содержания Bcl-2 по отношению к уровню в контрольной группе ($p > 0,05$) не было выявлено (таблица 1, 2, рисунки 1, 2), что свидетельствует о сохранении нормальной регуляции апоптоза при данной виде ИГМ.

Таблица 1. Содержание Bcl-2 в цитоплазме пирамидных нейронов теменной коры головного мозга крыс с ишемией головного мозга, Me (LQ; UQ)

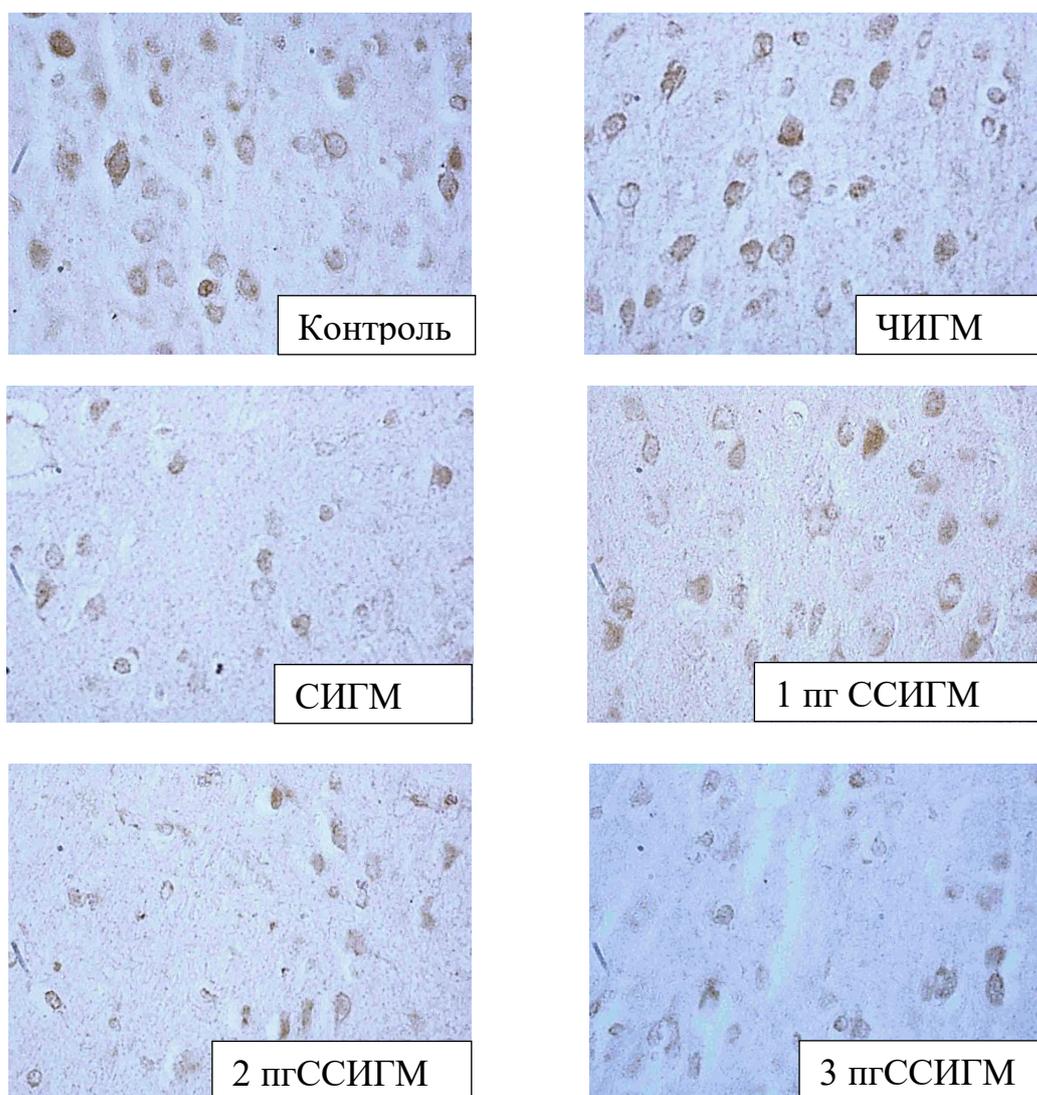
Контроль	ЧИГМ	СИГМ	ССИГМ		
			1 пг	2 пг	3 пг
0,25 (0,24; 0,26)	0,24 (0,22; 0,25)	0,16* (0,15; 0,16)	0,25 (0,24; 0,26)	0,16* (0,16; 0,16)	0,16* (0,15; 0,16)

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с группой «контроль»; ЧИГМ – частичная ишемия головного мозга; СИГМ – субтотальная ишемия головного мозга; ССИГМ – субтотальная ступенчатая ишемия головного мозга

Таблица 2. Содержание Bcl-2 в цитоплазме пирамидных нейронов поля CA₁ гиппокампа головного мозга крыс с ишемией головного мозга, Me (LQ; UQ)

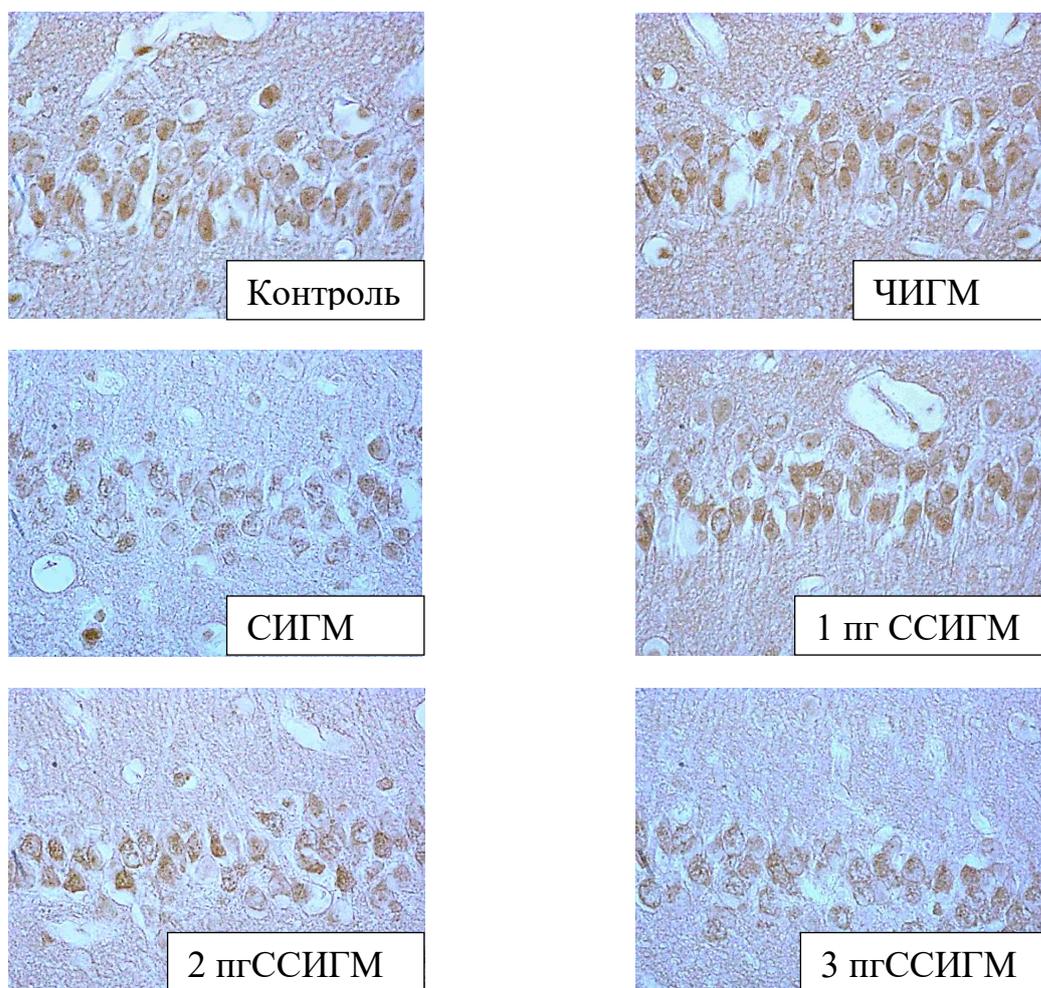
Контроль	ЧИГМ	СИГМ	ССИГМ		
			1 пг	2 пг	3 пг
0,22 (0,20; 0,23)	0,23 (0,22; 0,24)	0,16* (0,15; 0,16)	0,24 (0,23; 0,25)	0,16* (0,15; 0,16)	0,16* (0,16; 0,17)

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с группой «контроль»; ЧИГМ – частичная ишемия головного мозга; СИГМ – субтотальная ишемия головного мозга; ССИГМ – субтотальная ступенчатая ишемия головного мозга



Примечание: ЧИГМ – частичная ишемия головного мозга;
ССИГМ – ступенчатая субтотальная ишемия головного мозга;
СИГМ – субтотальная ишемия головного мозга

Рисунок 1. Содержание Vcl-2 (в единицах оптической плотности) в цитоплазме пирамидных нейронов теменной коры крыс с частичной (ЧИГМ), ступенчатой субтотальной (ССИГМ) и субтотальной (СИГМ) ишемией головного мозга. Цифровая микрофотография. Увеличение $\times 40$



Примечание: ЧИГМ – частичная ишемия головного мозга;
 ССИГМ – ступенчатая субтотальная ишемия головного мозга;
 СИГМ – субтотальная ишемия головного мозга

Рисунок 2. Содержание Bcl-2 (в единицах оптической плотности) в цитоплазме пирамидных нейронов поля CA₁ гиппокампа крыс с частичной (ЧИГМ), ступенчатой субтотальной (ССИГМ), субтотальной (СИГМ) и тотальной (ТИГМ) ишемией головного мозга. Цифровая микрофотография. Увеличение ×40

При СИГМ, по сравнению с группой «контроль», содержание Bcl-2 уменьшилось – на 36 % в теменной коре ($p < 0,05$) и на 27 % в гиппокампе ($p < 0,05$), что может быть признаком нарушения блокировки апоптоза при более тяжелом виде ИГМ.

По сравнению с ЧИГМ, при СИГМ содержание Bcl-2 было меньше на 33% в теменной коре ($p < 0,05$) и на 30 % в гиппокампе ($p < 0,05$).

По сравнению с группой «контроль», в 1-й подгруппе ССИГМ с промежутком между перевязками ОСА 7 суток содержание Bcl-2 не изменялось ($p > 0,05$), а во 2-й и 3-й подгруппах ССИГМ (промежуток между перевязками 3 суток 1 сутки, соответственно), уменьшилось – на 36 % в теменной коре ($p < 0,05$) и на 27 % в гиппокампе ($p < 0,05$).

По сравнению с 1-й подгруппой ССИГМ, содержание Bcl-2 во 2-й и 3-й подгруппах ССИГМ уменьшилось на 36 % в теменной коре ($p < 0,05$) и на 33% в гиппокампе ($p < 0,05$). Между 2-й и 3-й подгруппах различий не было ($p > 0,05$).

Различий в содержании Bcl-2 в цитоплазме нейронов теменной коры и гиппокампа между 1-й подгруппой ССИГМ и ЧИГМ не было ($p > 0,05$), в то время как по сравнению с СИГМ, оно было меньше на 33 % как в теменной коре ($p < 0,05$) так и в гиппокампе ($p < 0,05$).

Таким образом, изменения содержания Bcl-2 в 1-й, 2-й и 3-й подгруппах ССИГМ были разнонаправленными: в 1-й подгруппе с максимальным интервалом между перевязками ОСА 7 суток, оно не изменялось, свидетельствуя о нормальной регуляции процессов апоптоза, в то время как во 2-й и 3-й подгруппах содержание Bcl-2 снижалось, что может указывать на отсутствие блокировки процессов гибели нейронов при более тяжелых формах ишемии головного мозга.

Заключение. Таким образом, наиболее значительные изменения содержания Bcl-2 произошли при субтотальной ишемии головного мозга продолжительностью 1 сутки, в то время как при частичной и ступенчатой субтотальной ишемии головного мозга с интервалом между перевязками обеих общих сонных артерий 7 суток содержание Bcl-2 не изменялось, по сравнению с показателями в группе «контроль». При ступенчатой субтотальной ишемии головного мозга с интервалом между перевязками обеих общих сонных артерий 1 и 3 сутки содержание Bcl-2 было сходным с таковым при одновременной перевязке обеих общих сонных артерий.

Литература:

- [1]. Беленичев И.Ф. Нейропротекция и нейропластичность: монография // «Полиграф плюс». 2014. 512 с.
- [2]. Бонь, Е.И., Максимович Н.Е. Способы моделирования и морфофункциональные маркеры ишемии головного мозга // Биомедицина. 2018. № 2. С. 59–71.
- [3]. Бонь, Е.И., Максимович Н.Е. Сравнительный анализ морфологических нарушений нейронов теменной коры и гиппокампа крыс при различных видах экспериментальной ишемии головного мозга // Оренбургский медицинский вестник. 2021. № 2. С. 29–36.
- [4]. Гусев Е.И., Скворцов В.И. Ишемия головного мозга // М: Медицина, 2001. 326 с.
- [5]. Коржевский Д.Э., Гилерович Е.Г., Кирик О.В. Иммуногистохимическое исследование головного мозга // Санкт-Петербург: СпецЛит. 2016. 143 с.
- [6]. Максимович Н.Е., Бонь Е.И., Зиматкин С.М. Головной мозг крысы и его реакция на ишемию: монография // Гродно: ГрГМУ. 2020. 240 с.
- [7]. Максимович Н.Е. Роль оксида азота в патогенезе ишемических и реперфузионных повреждений мозга: монография // Гродно: ГрГМУ, 2004. 178 с.
- [8]. Clemens J.A. Cerebral ischemia: gene activation, neuronal injury, and the protective role of antioxidants // Free Radic. Biol. Med. 2000. Vol. 28. P. 1526–1531.
- [9]. Dadgostar E. et al. Aquaporin 4 in Traumatic Brain Injury: From Molecular Pathways to Therapeutic Target // Neurochem. Res. 2022. P. 860–871.
- [10]. C. Hu, X. Chen, M. Wang, L. et al. Analgesic protects against cerebral ischemia-reperfusion through apoptosis inhibition and anti-neuroinflammation in rats // Neuropeptides. 2022. Art. 102230.
- [11]. Q. Hu, L. Luo, P. Yang et al. Neuroprotection of boropinol-B in cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting inflammation and apoptosis // Brain Res. Vol. 1798. Art. 148132.
- [12]. H. Wasan, D. Singh, B. Joshi et al. Dihydropyridin alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury by attenuating apoptosis and astrogliosis in peri-infarct cortex. Neurol. Res. 2022. Vol. 44. № 5. P. 403-414.

L. I. BON, N. YE. MAKSIMOVICH, O. A. KARNYUSHKO, S. M. ZIMATKIN, A. A. NOVAK

CHANGES IN BCL-2 CONTENT IN THE PARIETAL CORTEX AND HIPPOCAMPUS OF RATS WITH CEREBRAL ISCHEMIA OF VARYING SEVERITY

Educational Establishment “Grodno State Medical University”, Grodno, Republic of Belarus

Summary

The aim of the work was to study and analyze the dynamics of changes in the content of Bcl-2 protein with varying degrees of severity of ischemia in several groups of rats. Cerebral ischemia (IGM) of varying severity (partial, subtotal, and stepwise subtotal) was modeled under conditions of intravenous thiopental anesthesia (40–50 mg/kg). The content of Bcl-2 in the cytoplasm of pyramidal neurons of the 5th layer of the parietal cortex and the CA₁ field of the hippocampus was measured using an immunohistochemical method using monoclonal antibodies.

Keywords: Bcl-2 protein, ischemia, rats, immunohistochemical method.