

## СТРЕСС ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА НЕЙРОНОВ ПРИ ИНСУЛЬТЕ МАКСИМАЛЬНО ОГРАНИЧИВАЕТСЯ СОЧЕТАНИЕМ ГИПЕРКАПНИИ И ГИПОКСИИ

П.П.Трегуб<sup>\*,\*\*</sup>, В.П.Куликов<sup>\*,\*\*</sup>, Ю.Г.Мотин<sup>\*</sup>, М.Е.Нагибаева<sup>\*</sup>, А.С.Забродина<sup>\*</sup>

*\*ГБОУ ВПО Алтайский государственный медицинский университет Минздрава РФ, Барнаул; \*\*ФГБНУ НИИ физиологии и фундаментальной медицины, Новосибирск, РФ*

Исследовали интенсивность экспрессии шаперона GRP-78 и транскрипционного фактора NF-κB при формировании ишемической толерантности головного мозга после сочетанного и изолированного воздействия гипоксии и гиперкапнии. Сочетанное воздействие гипоксии и гиперкапнии максимально увеличивает экспрессию шаперона GRP-78 и фактора NF-κB, а формирование ишемической толерантности при воздействии гиперкапнической гипоксии обусловлено активацией адаптивной ветви стресса эндоплазматического ретикулума. При этом гиперкапния в сочетании с гипоксией является приоритетным фактором для активации GRP-78 и транскрипционного фактора NF-κB.

**Ключевые слова:** гипоксия, гиперкапния, эндоплазматический ретикулум, инсульт, ишемическая толерантность

Гипоксическое воздействие является эффективным средством повышения ишемической толерантности головного мозга [8, 11, 14]. В последнее десятилетие возрос интерес к использованию в качестве нейропротектора пермиссивной ("допустимой") гиперкапнии и была доказана ее эффективность в профилактике ишемически-реперфузионного повреждения головного мозга [12].

В наших предыдущих работах было показано, что сочетание гиперкапнии и гипоксии максимально уменьшает объем инсульта при фокальном ишемическом повреждении головного мозга крысы [13]. Также мы показали, что увеличение ишемической толерантности головного мозга после проведения курса гиперкапнически-гипоксических воздействий опосредовано усилением экспрессии VEGF, повышением нейротрофической активности белка S-100B, синтеза белка HSP-70 [1] и пролиферативной и синтетической активности нейронов периинфарктной области [2].

Однако природа нейропротективного эффекта при сочетанном воздействии гиперкапнии и

гипоксии изучена мало. Одним из сигнальных механизмов формирования ишемической толерантности головного мозга может быть ответ эндоплазматического ретикулума (ЭПР) на возникновение внутриклеточного стресса. На субклеточном уровне ответ ЭПР на стресс (unfolding protein response — UPR) включает адаптивную (запускающую каскад мобилизационных реакций) и дезадаптивную (активирующую апоптоз) ветвь [7]. Ключевым звеном адаптивной ветви UPR является шаперон GRP-78 [5], экспрессия которого повышается при воздействии гипоксического стимула [9]. Он запускает каскад внутриклеточных реакций, одной из которых является активация транскрипционного фактора NF-κB, происходящая в ответ на накопление в просвете ЭПР дефектных белков и инициацию стресса [6, 15], что в конечном итоге приводит к увеличению адаптивного потенциала клеток.

Целью данного исследования являлась оценка экспрессии GRP-78 и NF-κB при формировании ишемической толерантности головного мозга после сочетанного и изолированного воздействия гипоксии и гиперкапнии.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали крыс-самцов Вистар ( $n=80$ ) массой  $284.5 \pm 46.0$  г. Респираторные воздействия осуществлялись в герметичной камере, как описано ранее [13]. Группы животных различались по газовому составу воздуха во время тренировочных воздействий.

Группа НГ (нормобарическая гипоксия:  $P_{O_2}=90$  мм рт. ст.,  $P_{CO_2}=1$  мм рт. ст., остальное  $N_2$ ): животные дышали газовой смесью 20 мин в день таким образом, чтобы  $P_{O_2}$  сохранялось в пределах 90 мм рт. ст. Группа ПГ (пермиссивная гиперкапния:  $P_{O_2}=150$  мм рт. ст.,  $P_{CO_2}=50$  мм рт. ст., остальное  $N_2$ ): животные также дышали газовой смесью 20 мин в день, но  $P_{O_2}$  сохранялось в пределах 150 мм рт. ст., а  $P_{CO_2}$  — 50 мм рт. ст. Группа ГГ (гиперкапническая гипоксия:  $P_{O_2}=90$  мм рт. ст.,  $P_{CO_2}=50$  мм рт. ст., остальное  $N_2$ ): животные также дышали газовой смесью 20 мин в день, но  $P_{O_2}$  сохранялось в пределах 90 мм рт. ст., а  $P_{CO_2}$  — 50 мм рт. ст. Группа К (контроль для воздействия гипоксии/гиперкапнии, группа сравнения:  $P_{O_2}=150$  мм рт. ст.,  $P_{CO_2}=1$  мм рт. ст., остальное  $N_2$ ): эти животные подвергались тем же манипуляциям, что и крысы опытных групп, за исключением воздействия гипоксии и/или гиперкапнии.

Крысы всех групп прошли 15-кратный курс респираторных воздействий. На следующие сутки после завершения курса у всех животных под наркозом (смесь 75 мг кетамина и 10 мг ксилазина на 1 кг массы тела внутривенно) моделировали фокальное ишемическое повреждение головного мозга путем введения в бедренную вену 3% раствора бенгальского розового (30 мг/кг массы животного) и последующего 10-минутного освещения скальпированного участка теменной области черепа лазером мощностью 20 мВт с длиной волны 532 нм [4,10]. Через 72 ч после моделирования инсульта животных декапитировали и извлекали головной мозг.

Препараты после гистологической подготовки секционировали (толщина среза 10 мкм). Иммуногистохимическое исследование проводили непрямой двухшаговым стрептавидин-биотин-методом с контролем специфичности реакции. После стандартной процедуры депарафинизации и регидратации выполняли блокирование эндогенной пероксидазы согласно рекомендациям производителя антител ("Santa Cruz"). Восстановление антигенной специфичности проводили с помощью предварительной обработки срезов, погруженных в цитратный буфер pH 6.0, и трехкратного 7-минутного воздействия микроволнового излучения мощностью 600 Вт.

В качестве первичных антител использовали антитела к NF-κB (P-50: sc-101744) и к шаперону GRP-78 (N-20: sc-1050) в разведениях 1:50. Продукты реакции визуализировали с помощью системы Goat ABC Staining system: sc-2023 ("Santa Cruz") и диаминобензидина.

Анализ экспрессии проводили на микроскопе SX51 ("Olimpus") с помощью программного комплекса "ImageJ" [3]. Согласно методике интенсивность белого спектра (максимальное значение — 255, минимальное — 0) в цитоплазме и ядре считалась обратно пропорциональной уровню экспрессии антигена. Анализировали не менее 100 нейронов из перинфарктной области не менее чем в 5 полях зрения. Микроскопию препаратов и анализ экспрессии маркеров проводили исследователи, не знающие, к какой группе относились образцы.

Статистический анализ полученных данных проводили в программе "Statistica 6.0" с использованием непараметрического  $U$  критерия Манна—Уитни. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0.05$ .

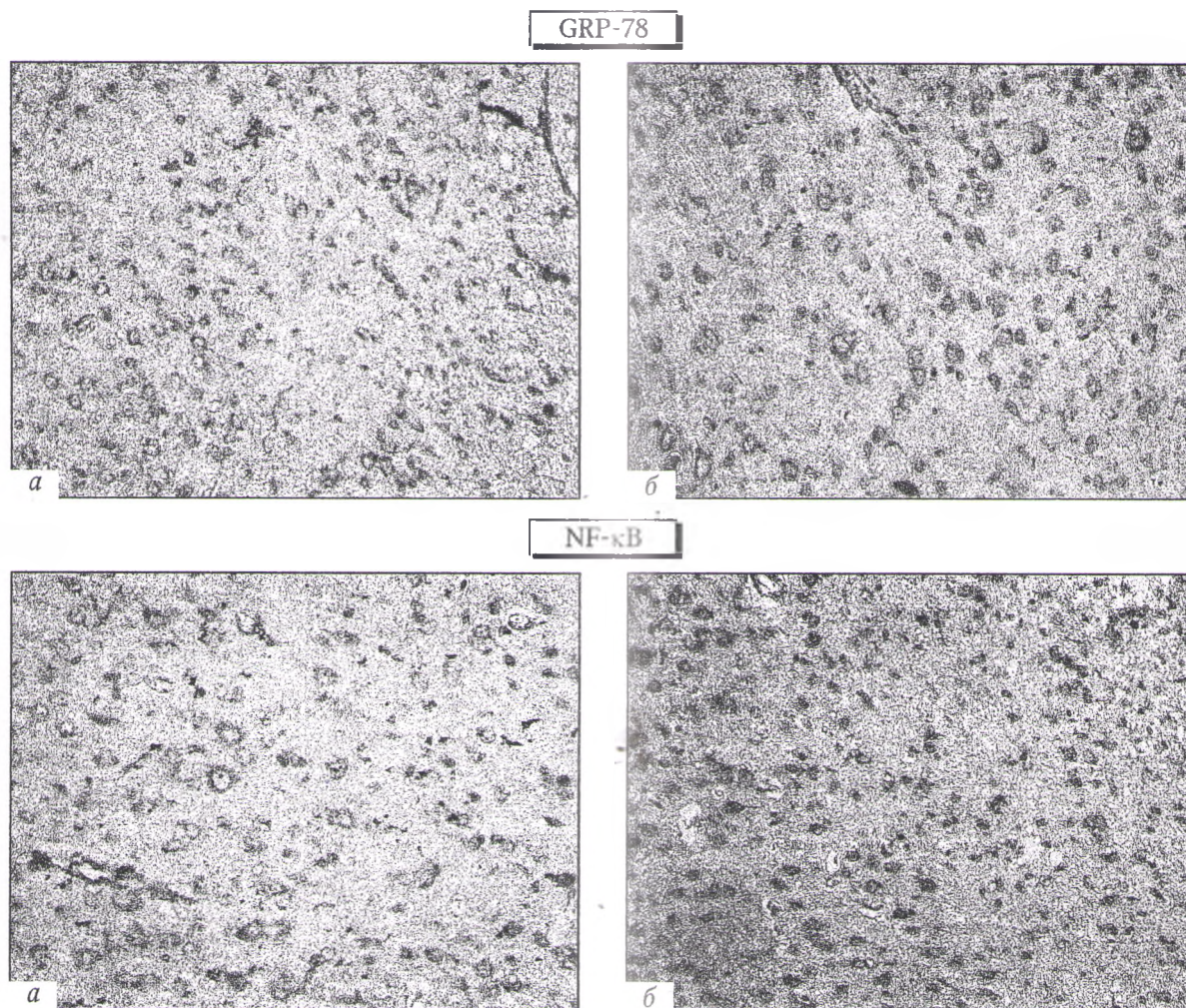
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Масса тела до эксперимента, перед операцией и после эксперимента у животных всех групп значимо не различалась (данные не представлены). Во время проведения операций с моделированием фокального ишемического повреждения часть животных погибла. По результатам вскрытия было установлено, что основной причиной смерти был отек головного мозга и/или отек легких, которые, вероятно, являлись осложнением оперативного вмешательства. В итоге группы крыс сформировались следующим образом: группа К  $n=10$ , группа НГ  $n=12$ , группа ПГ  $n=9$ , группа ГГ  $n=12$ .

В телах нейронов крыс групп К и ГГ отчетливо наблюдались выраженные различия в уровне экспрессии шаперона GRP-78 и адаптивного фактора NF-κB (рис. 1). Шаперон GRP-78 локализуется на мембране гранулярного ЭПР, имеет адаптивную функцию в клетках и играет ключевую роль в антиапоптозном эффекте при формировании внутриклеточного стресса, участвуя в рефолдинге белков [5].

Экспрессия белка GRP-78 в цитоплазме нейронов перинфарктной области была максимальной в группе ГГ (рис. 2). В группе НГ экспрессия была наименьшей, что свидетельствует о выраженных нарушениях клеточного метаболизма и дезактивации адаптивного потенциала нейронов, приводящих к дистрессу ЭПР. Возможно, данный факт обусловлен тем, что после 15-кратного курса





**Рис. 1.** Периинфарктная зона коры головного мозга экспериментальных животных,  $\times 400$ . Слабо выраженная цитоплазматическая экспрессия GRP-78 и NF- $\kappa$ B в нейронах крыс группы контроля (а) и выраженная экспрессия в нейронах крыс группы ГГ (б).

гипоксических воздействий адаптогенные механизмы в ЭПР могли быть исчерпаны.

Экспрессия в группе ПГ не отличалась от таковой в контроле, но была выше, чем в группе НГ. Это может свидетельствовать о том, что гиперкапния в сочетании с гипоксией оказывает выраженное влияние на активацию шаперона GRP-78, а углекислота в этом процессе имеет доминирующее влияние. Сходная тенденция была отмечена нами при исследовании другого шаперона (HSP-70) в сыворотке крови [1].

Транскрипционный фактор NF- $\kappa$ B в условиях покоя находится в связанном состоянии в цитозоле, а во время стресса и активации он переходит внутрь ядра, активируя транскрипцию генов, ингибирующих апоптоз и формирующих клеточную адаптацию, являясь также одним из ключевых регуляторов инициации провоспалительного ответа тканей на стресс [6].

Цитоплазматическая экспрессия NF- $\kappa$ B в нейронах периинфарктной области головного мозга была максимальной в группе ГГ (рис. 3, а). В группе НГ и ПГ экспрессия оказалась интенсивнее, чем в контроле, причем эти группы не различались между собой. Данный факт может быть связан как с одинаковой активностью гиперкапнии и гипоксии в отношении стимуляции этого фактора, так и с переходом активной формы NF- $\kappa$ B из цитоплазмы в ядро.

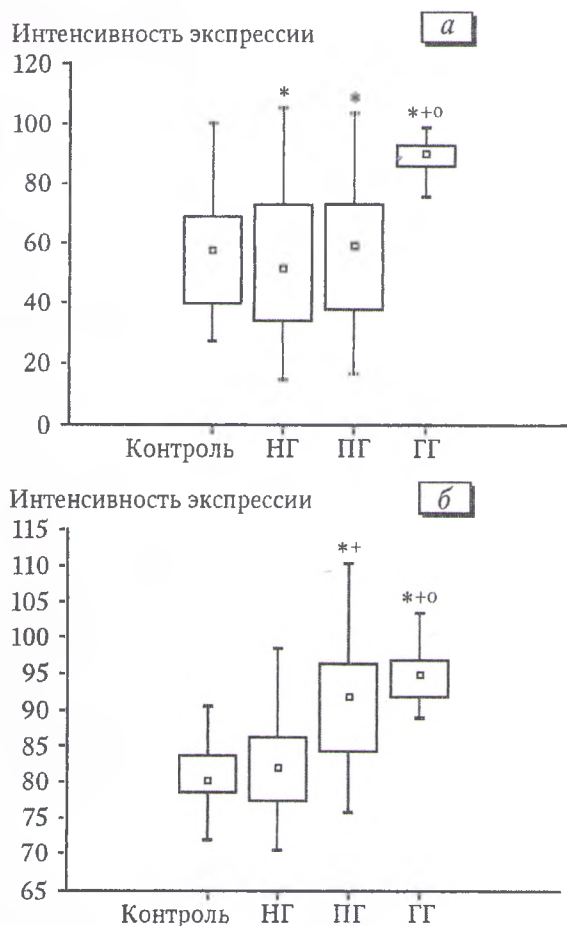
Уровень нуклеарной экспрессии NF- $\kappa$ B был также наиболее выражен при сочетанном воздействии гиперкапнии и гипоксии (рис. 3, б). В группе ПГ экспрессия оказалась интенсивнее, чем в контроле и группе НГ, причем между собой группы НГ и контроля не различались. Это может свидетельствовать о том, что переход этого фактора в ядро не успел произойти при воздействии НГ. При воздействии ПГ, напротив, наблюдалось





**Рис. 2.** Уровень экспрессии шаперона GRP-78 после фокального ишемического повреждения головного мозга у крыс при изолированном и сочетанном воздействии гипоксии и гиперкапнии.

Здесь и на рис. 3:  $p < 0.001$  по сравнению \*с контролем, \*с группой НГ, °с группой ПГ.



**Рис. 3.** Уровень цитоплазматической (а) и нуклеарной (б) экспрессии транскрипционного фактора NF-κB после фокального ишемического повреждения головного мозга у крыс при изолированном и сочетанном воздействии гипоксии и гиперкапнии.

повышение цитоплазматической экспрессии NF-κB в сочетании с увеличением его концентрации в ядре, что может свидетельствовать об активном переходе активированного фактора внутрь ядра. Принимая во внимание этот факт, можно объяснить наибольшую цитоплазматическую и ядерную экспрессию фактора NF-κB в группе ГГ тем, что при сочетанном воздействии НГ и ПГ происходит суммирование их эффектов, обуславливающее наиболее выраженный нейропротективный эффект. Также можно предположить, что у гипоксии и гиперкапнии существуют разные пути активации фактора NF-κB.

Таким образом, можно заключить, что сочетанное воздействие гипоксии и гиперкапнии максимально увеличивает экспрессию шаперона GRP-78 и фактора NF-κB, а формирование ишемической толерантности при воздействии гиперкапнической гипоксии обусловлено активацией адаптивной ветви UPR. При этом гиперкапния в сочетании с гипоксией является приоритетным фактором для активации GRP-78 и транскрипционного фактора NF-κB.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Беспалов А.Г., Трегуб П.П., Куликов В.П., Пилянзин А.И., Белоусов А.А. Роль VEGF, HSP-70 и белка S-100B в механизмах потенцирования гиперкапнией нейропротекторного эффекта гипоксии // Патол. физиол. и экспер. тер. 2014. № 2. С. 24-27.
2. Трегуб П.П., Куликов В.П., Ручейкин Н.Ю., Белова Е.В., Мотин Ю.Г. Пролиферативная и синтетическая активность нервных клеток после сочетанного и изолированного воздействия гипоксией и гиперкапнией // Бюл. exper. биол. 2015. Т. 159, № 3. С. 311-314.
3. Abramoff M.D., Magelhaes P.J., Ram S.J. Image Processing with ImageJ // Biophotonics International. 2004. Vol. 11, N 7. P. 36-42.
4. Chen F., Suzuki Y., Nagai N., Peeters R., Sun X., Coudyzer W., Marchal G., Ni Y. Rat cerebral ischemia induced with photochemical occlusion of proximal middle cerebral artery: a stroke model for MR imaging research // MAGMA. 2004. Vol. 17, N 3-6. P. 103-108.
5. Dickhout J.G., Krepinsky J.C. Endoplasmic reticulum stress and renal disease // Antioxid. Redox Signal. 2009. Vol. 11, N 9. P. 2341-2352.
6. Kaneko M., Niinuma Y., Nomura Y. Activation signal of nuclear factor-kappa B in response to endoplasmic reticulum stress is transduced via IRE1 and tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 // Biol. Pharm. Bull. 2003. Vol. 26, N 7. P. 931-935.
7. Kitamura M. Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in renal pathophysiology: Janus faces // Am. J. Physiol. Renal Physiol. 2008. Vol. 295, N 2. P. F323-F334.

8. Neckár J., Papousek F., Nováková O., Ost'ádal B., Kolár F. Cardioprotective effects of chronic hypoxia and ischaemic preconditioning are not additive // *Basic Res. Cardiol.* 2002. Vol. 97, N 2. P. 161-167.
9. Ostergaard L., Simonsen U., Eskildsen-Helmond Y., Vorum H., Ulbjerg N., Honoré B., Mulvany M.J. Proteomics reveals lowering oxygen alters cytoskeletal and endoplasmatic stress proteins in human endothelial cells // *Proteomics.* 2009. Vol. 9, N 19. P. 4457-4467.
10. Pevsner P.H., Eichenbaum J.W., Miller D.C., Pivawer G., Eichenbaum K.D., Stern A., Zakian K.L., Koutcher J.A. A photothrombotic model of small early ischemic infarcts in the rat brain with histologic and MRI correlation // *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 2001. Vol. 45, N 3. P. 227-233.
11. Rybnikova E., Gluschenko T., Tulkova E., Churilova A., Jaroshevich O., Baranova K., Samoilov M. Preconditioning induces prolonged expression of transcription factors pCREB and NF-kappa B in the neocortex of rats before and following severe hypobaric hypoxia // *J. Neurochem.* 2008. Vol. 106, N 3. P. 1450-1458.
12. Tao T., Liu Y., Zhang J., Xu Y., Li W., Zhao M. Therapeutic hypercapnia improves functional recovery and attenuates injury via antiapoptotic mechanisms in a rat focal cerebral ischemia/reperfusion model // *Brain Res.* 2013. Vol. 1533. P. 52-62.
13. Tregub P., Kulikov V., Motin Y., Bespalov A., Osipov I. Combined exposure to hypercapnia and hypoxia provides its maximum neuroprotective effect during focal ischemic injury in the brain // *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 2015. Vol. 24, N 2. P. 381-387.
14. Zhan L., Wang T., Li W., Xu Z.C., Sun W., Xu E. Activation of Akt/FoxO signaling pathway contributes to induction of neuroprotection against transient global cerebral ischemia by hypoxic preconditioning in adult rats // *J. Neurochem.* 2010. Vol. 114, N 3. P. 897-908.
15. Zhang K., Kaufman R.J. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response // *Nature.* 2008. Vol. 454. P. 455-462.

Получено 02.09.15