

УДК 577.34

ЭКСПРЕССИЯ СИГНАЛЬНЫХ И НЕЙРОНАЛЬНЫХ БЕЛКОВ В ПЕНУМБРЕ ВОКРУГ ЯДРА ФОТОТРОМБОТИЧЕСКОГО ИНФАРКТА В КОРЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ

© 2015 С.В. Демьяненко¹, С.Н. Панченко², А.Б. Узденский^{1*}

¹ Южный федеральный университет, Академия биологии
и биотехнологии, 344090 Ростов-на-Дону;
электронная почта: auzd@yandex.ru

² Ростовский государственный медицинский
университет, 344022 Ростов-на-Дону

Поступила в редакцию 12.01.15
После доработки 11.03.15

Фотодинамическое воздействие на кору мозга животных с использованием водорастворимого фотосенсибилизатора бенгальского розового, не пересекающего гематоэнцефалический барьер, приводит к агрегации тромбоцитов, закупорке мелких сосудов и локальному инфаркту. Необратимые повреждения клеток в ядре инфаркта распространяются на окружающие ткани. Формируется переходная зона, называемая пенумброй. Быстрый некроз ткани в ядре инфаркта невозможно предотвратить, но можно ограничить более медленное распространение повреждения и защитить клетки пенумбры. Мы изучали изменения морфологии ткани и профиля экспрессии белка в пенумбре. Морфологическое исследование (стандартное окрашивание гематоксилин-эозином) показало, что в коре мозга крыс через 1 ч после фотодинамического воздействия 3 мм ядро инфаркта было окружено пенумброй шириной 1,5–2 мм, где изменения нейронов (гипо- или гиперхромия, пикноз) были ниже, чем в ядре. Протеомное исследование 224 нейрональных и сигнальных белков с помощью микрочипов Panorama Antibody Microarray – Neurobiology («Sigma-Aldrich», США) выявило в ткани пенумбры повышенную экспрессию белков, участвующих в поддержании целостности и навигации нейритов (NAV3, MAP1, CRMP2, PMP22); осуществляющих межклеточные взаимодействия (*N*-кадгерин) и синаптическую передачу (глутаматдекарбоксилаза, триптофангидроксилаза, Munc-18-1 и Munc-18-3, synphylin-1); контроль качества митохондрий и митофагию (PINK1, Parkin); убиквитин-опосредованный протеолиз (UCHL1, PINK1, Parkin, synphylin-1), а также сигнальных белков (PKC α , ERK5) по сравнению с контрольной корой в контралатеральном полушарии. Эти процессы были направлены на поддержание выживаемости и восстановление тканей. Снижение уровня протеинкиназы C, ее изоформ PKC β 1/2, а также белка TDP-43 может быть направлено на снижение повреждения ткани. Некоторые из этих белков могут потенциально служить маркерами нейропротекции и нейродегенерации, а также потенциальными мишенями для фармакологического воздействия на поврежденные ткани пенумбры.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: инсульт, нейродегенерация, пенумбра, протеомика.

Ишемический инсульт – один из основных факторов инвалидности и смерти людей. Фокальная ишемия, вызванная закупоркой кровеносных сосудов, очень быстро (за несколько мин) приводит к истощению АТФ, генерации активных форм кислорода, повреждению кле-

точных мембран, потере ионных градиентов, деполяризации, эксайтотоксичности, смерти клеток и отеку тканей. Эти повреждающие процессы распространяются из ядра инфаркта и вызывают гибель клеток в прилегающей переходной области (пенумбре) [1, 2]. В ядре инфаркта

Принятые сокращения: CRMP2 – collapsin response mediator protein 2 (белок-медиатор ответа на коллапсин 2); DYRK1A – dual-specificity tyrosine-phosphorylated regulated kinase 1A (киназа двойной специфичности 1A); ERK5 – extracellular regulated kinase 2 (внеклеточно регулируемая киназа 2); GABA – γ -butiric acid (γ -аминомасляная кислота); MAP1 – microtubule-associated protein 1 (связанный с микротрубочками белок 1); NAV3 – neuron navigator 3 protein (навигатор нейронов 3); PINK1 – PTEN-induced mitochondrial protein kinase (PTEN-индуцированная митохондриальная протеинкиназа); PKC α – protein kinase α (протеинкиназа α); PKC – protein kinase C (протеинкиназа C); PKC β 1 – protein kinase C isoform β 1 (изоформа β 1 протеинкиназы C); PMP22 – peripheral myelin protein 22 (периферический белок миелина 22); PTI – phototrombotic infarction (фототромботический инфаркт); SIRT1 – NAD⁺-dependent deacetylase sirtuin-1 (NAD⁺-зависимая деацетилаза сиртуин 1); TDP-43 – transactivation response DNA-binding protein (ДНК-связывающийся белок, реагирующий на трансактивацию генов); UCHL1 – ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (C-терминальная убиквитингидролаза L1).

* Адресат для корреспонденции.

практически невозможно спасти нервные клетки от острого некроза, но в пенумбре повреждение ткани развивается медленнее, в течение нескольких часов и дней, и это «терапевтическое окно» дает время для защиты клеток и уменьшения нейрпатологических последствий [1–3]. Однако большинство имеющихся нейропротекторных препаратов пока не эффективно. Так, детальные клинические исследования церебральной, на который возлагали большие надежды, не выявили достоверной разницы в летальности пациентов и наличии у них побочных эффектов между применением этого препарата и плацебо [4]. Поэтому для разработки новых подходов к лечению последствий инсульта необходимо всестороннее исследование биохимических механизмов, регулирующих нейродегенерацию в пенумбре, и поиск новых нейропротекторов.

Среди экспериментальных моделей ишемического инсульта наиболее популярна окклюзия среднемозговой артерии путем перевязки или введения нейлоновой нити с силиконовым покрытием. Тромботическая окклюзия создается с помощью инъекции тромбов или тромбина. Но при этом не всегда получается контролируемый и хорошо воспроизводимый локальный инфаркт мозга. Это оказалось возможным на основе фотодинамического эффекта и локального лазерного облучения [5–11].

При фотодинамическом воздействии на окрашенные клетки, возбужденные светом молекулы красителя-фотосенсибилизатора передают энергию кислороду и переводят его в высокоэнергетическую синглетную форму. Синглетный кислород и другие активные формы кислорода вызывают окислительный стресс и смерть клеток. Основанная на этом эффекте фотодинамическая терапия применяется в онкологии для разрушения опухолей [12]. Фотодинамическая индукция локального тромбоза в мозге животных – нетрадиционное применение фотодинамического эффекта. В этом методе локальное лазерное облучение мозга животных после введения водорастворимого фотосенсибилизатора бенгальского розового, который не пересекает гематоэнцефалический барьер и остается в кровеносном русле, приводит к фотосенсибилизированному окислительному повреждению эндотелия и базальной мембраны, агрегации тромбоцитов и окклюзии мелких сосудов. Это быстро, за минуты, вызывает локальный фототромботический инфаркт мозговой ткани (ФТИ). Достоинства ФТИ как модели инсульта включают малую инвазивность воздействия, контроль расположения, размера и степени повреждения, хорошую воспроизводимость [5–11]. Микроин-

фаркт с закупоркой мелких сосудов вызывает когнитивные нарушения, деменцию и другие неврологические расстройства. Механизмы реакции нервной ткани на ишемическое повреждение и ее восстановление после микроинфаркта, в частности, участие в этих процессах различных нейроспецифических и сигнальных белков изучены пока недостаточно [13–15].

Современные протеомные методы обеспечивают информацию об экспрессии сотен белков в биологических тканях [16–19]. Для характеристики изменений уровня различных нейрональных и сигнальных белков в полутени после очагового фототромботического инфаркта в участке сенсомоторной коре головного мозга крысы мы использовали протеомные микрочипы, позволяющие одновременно изучить изменения экспрессии 224 сигнальных и нейрональных белков по сравнению с симметричным контрольным участком в контралатеральной коре.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проведены на взрослых самцах крыс Вистар (200–250 г), содержащихся при температуре 22–26° с 12-часовым световым днем, при вентиляции порядка 18 смен воздуха в час. Животных содержали в соответствии с принятым в институте протоколом. Опыты проведены согласно этическим нормам и правилам проведения экспериментов над животными Европейского Союза (86/609/ЕЕС).

Односторонний фототромботический инфаркт соматосенсорной коры крыс вызывали по модифицированному методу [7]. Крыс анестезировали с помощью внутривенной инъекции хлоралгидрата (300 мг/кг), растворенного в физиологическом растворе. После продольного разреза кожи головы удаляли надкостницу. Бенгальский розовый («Sigma-Aldrich», США), растворенный в физиологическом растворе, вводили в подключичную вену в дозировке 20 мг/кг. После введения красителя крыс фиксировали в стереотаксической установке и через черепную кость проводили одностороннее лазерное облучение соматосенсорной коры (поля FL-forelimb sensorimotor cortex, HL – hindlimb sensorimotor cortex и Par1 – parietal primary somatosensory cortex [20]). Параметры облучения: длина волны 532 нм, интенсивность 64 мВт/см², диаметр луча 3 мм, длительность 30 мин. Температуру тела поддерживали на уровне 36,7–37,5°.

Через 1 ч после лазерного облучения животных умерщвляли повышенной дозой хлоралгидрата (600 мг/кг) и декапитацией. Визуализацию ядра инфаркта и пенумбры осуществляли с по-

мощью 15-минутного окрашивания коры мозга 1%-ным раствором хлорида трифенилтетразоля («Sigma-Aldrich», США) при 37°. Для гистологического исследования крыс транскортиально перфузировали 10%-ным забуференным формалином, рН 7,2, при хлоралгидратной анестезии через 1 ч после облучения. Затем мозг извлекали и постфиксировали формалином. Кусочки коры, включающие облученный участок, пенумбру и окружающую ткань заключали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 6–8 мкм монтировали на предметные стекла, депарафинировали, окрашивали гематоксилином и эозином, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации, просветляли ксилолом, заключали в канадский бальзам по стандартным гистологическим методикам и исследовали под микроскопом. Все наблюдавшиеся крупные пирамидные нейроны делили на следующие категории: нормальные, обратимо измененные (гиперхромные или гипохромные) и пикнотические (табл. 1). Их количества подсчитывали с помощью окулярной решетки на трех срезах у 4-х крыс в шести рандомизированных областях при 400-кратном увеличении микроскопа в облученном полушарии (опыт) и необлученном контралатеральном полушарии (контроль). Среднее число нейронов каждого типа в одном поле зрения через 1 ч после ФТИ сравнивали с таковым в контрольных образцах. Статистическую оценку достоверности различий проводили с помощью метода ANOVA (программа Statistica 6.1).

В протеомном исследовании экспрессии 224 нейрональных и сигнальных белков мы использовали микрочипы Panorama Antibody Array – Neurobiology (NBAA5, «Sigma-Aldrich», США). В состав набора входили два одинаковых микрочипа, представляющих собой предметные стекла, покрытые нитроцеллюлозной мембраной, содержащей 448 микрокапель с иммобилизованными антителами против 224 нейрональных и сигнальных белков. Они организованы в 32 груп-

пы, каждая из которых содержит в дубликate антитела против семи белков (14 микрокапель), одну микрокаплю с BSA (сывороточный альбумин быка; негативный контроль) и микрокаплю с красителями Cy3 и Cy5, конъюгированными с BSA (позитивный контроль).

Через 1 ч после ФТИ область ядра инфаркта в коре вырезали (3 мм) кольцевым ножом и отбрасывали. Затем окружающую ткань в кольце шириной 2 мм, содержащую пенумбру, вырезали вторым (7 мм) кольцевым ножом. Такой же образец, вырезанный из необлученной контралатеральной коры, служил контролем. Образцы быстро замораживали в жидком азоте и переносили в морозильную камеру (–85°). Для получения достаточного количества материала в протеомном исследовании соединяли опытные образцы облученной коры от шести крыс. В качестве контроля таким же образом собирали симметричные образцы неповрежденной контралатеральной коры мозга тех же шести крыс. Кусочки корковой ткани взвешивали и гомогенизировали на льду в лизирующем буфере, дополненном нуклеазой бензоазой и ингибиторами протеиназы и фосфатазы компоненты набора NBAA5 («Sigma-Aldrich», США). Затем подопытный и контрольный лизаты центрифугировали 2 мин при 10 000 об/мин в холодной центрифуге при 4°. Супернатанты собирали, содержание белка в них, определенное по методу Бредфорд, выравнивали до 1 мг/мл. После этого в одном варианте контрольный и подопытный лизаты инкубировали 30 мин в темноте при комнатной температуре с флуорохромами Cy3 и Cy5, а в другом – для самоконтроля – наборот: Cy5 и Cy3 соответственно. Образцы (200 мкл) наносили на мини-колонки SigmaSpin Columns (компоненты NBAA5, «Sigma-Aldrich», США) и несвязавшиеся флуорохромы удаляли с помощью их центрифугирования (4000 об/мин; 4 мин). Содержание белка в элюатах повторно определяли. Контрольный и подопытный образцы, содержащие по 10 мкг/мл

Таблица 1. Среднее число измененных нейронов на одно поле зрения микроскопа в ядре инфаркта и пенумбре через 1 ч после локального фотодинамического воздействия на сенсомоторную кору мозга крысы

	Нормальные нейроны	Гипохромные нейроны	Гиперхромные нейроны	Пикнотические нейроны	Общее количество нейронов
Контроль	127 ± 8	10 ± 2	3 ± 1	–	140 ± 8
Ядро инфаркта	98 ± 7	14 ± 2	18 ± 4*	3 ± 1*	133 ± 13
Пенумбра	121 ± 6	10 ± 2	12 ± 2*	–	143 ± 8

Примечание. Приведены значения, усредненные по 6 случайно выбранным полям зрения (увеличение 400×) на 3 срезах у 4 крыс, и стандартные ошибки средних. Достоверность отличий: * $p < 0,05$.

белка и окрашенные Cy3 и Cy5 соответственно, смешивали в 5 мл инкубационного буфера (компонента NBAA5, «Sigma-Aldrich», США). В другом варианте смешивали контрольный и подопытный образцы, окрашенные наоборот – (Cy5 и Cy3) соответственно. Такое взаимно противоположное окрашивание позволяет компенсировать различия в связывании белками красителей Cy3 или Cy5 и обеспечивает верификацию эксперимента. Микрочипы инкубировали 40 мин с этими смесями в темноте. Затем стекла промывали три раза в промывочном буфере (компонент NBAA5, «Sigma-Aldrich», США) и три раза в чистой воде, высушивали и сканировали на сканере GenePix 4100A («Molecular Devices», США) на длинах волн 532 и 635 нм, соответствующих максимумам флуоресценции Cy3 и Cy5. Так как интенсивность флуоресценции в пятнах пропорциональна количеству связанного белка, то последующее сравнение флуоресценции опытных и контрольных образцов позволяет говорить об изменениях уровня экспрессии изучаемых белков, вызванных экспериментальным воздействием. Флуоресцентные изображения микрочипов анализировали и нормализовали с помощью программы GenePix Pro 6.0. Фоновые значения флуоресценции в кольце вокруг каждого пятна вычитали. Для оценки отношения уровней белка в экспериментальном и контрольном образцах в каждом пятне определяли медианные величины отношений интенсивности флуоресценции Cy5/Cy3 (или Cy3/Cy5 при обратном окрашивании). Эксперимент повторяли дважды. Полученные восемь величин отношений (2 дубликата на каждом чипе \times 2 чипа \times 2 опыта) усредняли. Средние величины и стандартные отклонения приведены в табл. 2, где отображены только отношения, достоверно отличающиеся от 1 ($p < 0,05$) и превышающие 30% «уровень отсечения».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ядро ФТИ диаметром ~ 3 мм окружено пенумброй шириной 1,5–2 мм (рис. 1). Количество пирамидных нейронов (они главным образом выявлялись на гистологических препаратах) с патологическими изменениями в сенсомоторной коре мозга крысы, не подвергавшейся фотодинамическому воздействию, было незначительным (рис. 2, а, табл. 1). Морфологические изменения в ядре инфаркта через 1 ч после воздействия (рис. 2) включали локальную вакуолизацию нейропиля (рис. 2, б) и перинеуральный отек (рис. 2, в). Некоторые нейроны были гиперхромными и содержали пикнотические

ядра (рис. 2, г). Среднее число пикнотических и гиперхромных нейронов в поле зрения увеличилось соответственно от 0 и 3 ± 1 в контрольной контралатеральной коре до 3 ± 1 ($p < 0,05$) и 18 ± 4 ($p < 0,05$) в ядре инфаркта (табл. 1). В пенумбре наблюдался градиент морфологических изменений от почти таких же сильных, как в ядре инфаркта, на границе с ним до слабых, постепенно переходящих в норму на периферии, где большинство нейронов выглядело неповрежденными (рис. 2, д, е). Среднее число гиперхромных нейронов в поле зрения 12 ± 2 было в пенумбре выше, чем в контроле ($p < 0,05$), но ниже, чем в ядре инфаркта (табл. 1). В некоторых местах на периферии пенумбры участки со сравнительно нормальной морфологией перемежались с участками, в которых наблюдались перинеуральный отек (рис. 2, д) и набухание тел нейронов и некоторых нейритов (рис. 2, е).

Используя протеомные микрочипы NBAA5, мы сравнили средние уровни 224 нейрональных белков в пенумбре (2-мм кольцо вокруг ядра ФТИ в коре головного мозга) с таковыми в необлученной контралатеральной коре через 1 ч после фотодинамического воздействия. Среди белков, экспрессия которых повышалась более, чем на 30% (табл. 2) были: убиквитин-1 и С-терминальная убиквитингидролаза L1 (UCHL1), участвующая в убиквитин-опосредованном протеолизе (+51 и +78% соответственно); митохондриальная РТЕН-индуцированная протеинкиназа PINK1 и белок Parkin, участвующие в контроле качества митохондрий, их разделении и митофагии (+75 и +41% соответственно); белок миеллина RMP22 (+72%); протеинкиназа В α (PKВ α , +58%), регулирующая пролиферацию клеток и апоптоз; N-кадгерин (+57%), участвующий в межклеточной адгезии; глутаматдекарбоксилаза, которая преобразует L-глутамат в ГАМК (+51%); триптофангидроксилаза, синтезирующая серотонин (+48%); белок-медиатор ответа на коллапсин 2 (CRMP2), компонент пути коллапсин/семафорин, который контролирует направление роста аксонов (+49%); регулируемая фосфотирозином киназа двойной специфичности 1A (DYRK1A), которая фосфорилирует разные факторы транскрипции и некоторые другие белки (+46%); навигатор нейронов 3 (NAV3) (+45%); MAP-киназа ERK5, опосредующая сигналы на окислительный стресс и защищающая клетки от апоптоза (+40%); синаптические белки Munc-18-1 и Munc-18-3 (+33% и +53%), синфилин-1, участвующий в синаптической функции и убиквитин-опосредованной деградации белков (+38%) и связанный с микротрубочками белок MAP1 (+36%). В то же время уровень ряда белков снижался: протеинки-

Таблица 2. Относительные изменения экспрессии нейрональных и сигнальных белков в пенумбре вокруг ядра локального фототромботического инфаркта в сенсомоторной коре крыс по сравнению с необлученной контралатеральной корой через 1 ч после облучения

Белки	Среднее отношение	SD	Функции белков
1	2	3	4
Опыт/контроль (повышение)			
C-терминальная убиквитин-гидролаза L1 (RA-15)	1,78	0,22	убиквитинирование и протеолиз
PINK1	1,75	0,54	контроль качества митохондрий защищает нейроны от индуцированной стрессом дисфункции митохондрий
PMP22	1,72	0,62	периферический белок миелина опосредует образование миелина, межклеточные взаимодействия и блокирует пролиферацию
Протеинкиназа PKB α	1,58	0,21	регулирует пролиферацию, метаболизм и апоптоз
N-кадгерин	1,57	0,33	участвует в межклеточной адгезии
Munc-18-3	1,53	0,17	связывается с синтаксином, участвует в экзоцитозе синаптических пузырьков и выбросе нейромедиатора
Убиквитин-1	1,51	1,19	убиквитинирование и протеолиз
Глутаматдекарбоксилаза 65 (514–530)	1,51	0,16	превращение глутамата в ГАМК
CRMP2	1,49	0,35	компонент пути коллапсин/семафорин; локализуется в конусах роста аксонов, направляет рост аксона
Фосфотреонины	1,48	0,24	модификация функций белков; редки в нормальной ткани, но их уровень 10-кратно возрастает при повреждении
Триптофангидроксилаза	1,48	0,17	синтез серотонина в серотонинэргических нейронах
DYRK1A	1,46	0,31	фосфорилирует факторы транскрипции FKHR, NFAT, STAT3, CREB и другие, белок Tau, связанный с микротрубочками
NAV3	1,45	0,36	навигатор роста нейронов 3, экспрессируется в нервной системе в раннем онтогенезе и при повреждении
Parkin	1,41	0,28	контроль качества митохондрий стимулирует убиквитинизацию белков и митофагию
ERK5 (Big MAPK-BMK1)	1,40	0,15	участвует в сигнальных путях, инициируемых окислительным стрессом
Синфилин-1	1,37	0,14	в нейронах взаимодействует с α -синуклеином, участвует в синаптической передаче, деградации белков и патогенезе болезни Паркинсона
MAP1	1,36	0,13	связывается с микротрубочками в аксонах, дендритах и глии, с митотическим веретеном; регулирует митоз и транспорт органелл
Munc-18-1	1,33	0,22	связывается с синтаксином, участвует в экзоцитозе синаптических пузырьков и выбросе нейромедиатора
Контроль/Опыт (уменьшение)			
Синаптофизин	1,33	0,17	участвует в синаптической передаче

1	2	3	4
Нейрофиламент 68	1,51	0,25	синтезируется в перикарионе нейронов, собирается в филаменты, транспортируется вдоль аксонов в синаптические терминали
Протеинкиназа PKC β 1	1,65	0,36	регулирует пролиферацию, дифференцировку, онкогенез, апоптоз и нейротрансмиссию
Синтаксин	1,71	0,40	взаимодействуя с синаптотагмином участвует в докинге синаптических пузырьков и выбросе нейромедиаторов
TDP-43	2,02	0,85	регулирует транскрипцию, сплайсинг, транспорт и стабильность РНК, его аномальное фосфорилирование в нейронах индуцирует образование включений и нейродегенерацию
Протеинкиназа С	6,28	3,32	регулирует клеточный рост, апоптоз, дифференцировку и нейротрансмиссию

Примечание. Приведены средние значения отношения медианных значений флуоресценции подопытных белков к контрольным (или наоборот, контрольных к подопытным в случае уменьшения) и стандартные отклонения (SD).

назы С (в 6,3 раза) и ее изоформы С β 1 (–65%); TDP-43 (ДНК-связывающегося белка, реагирующего на трансактивацию генов) (в два раза), участников синаптической передачи синаптофизина и синтаксина (–33 и –71% соответственно), а также компонента цитоскелета нейрофиламента 68 (–51%).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Фототромботический инфаркт, используемый в настоящем исследовании в качестве модели инсульта, хорошо воспроизводит морфологические изменения в коре головного мозга после окклюзии мелких кровеносных сосудов. Ло-

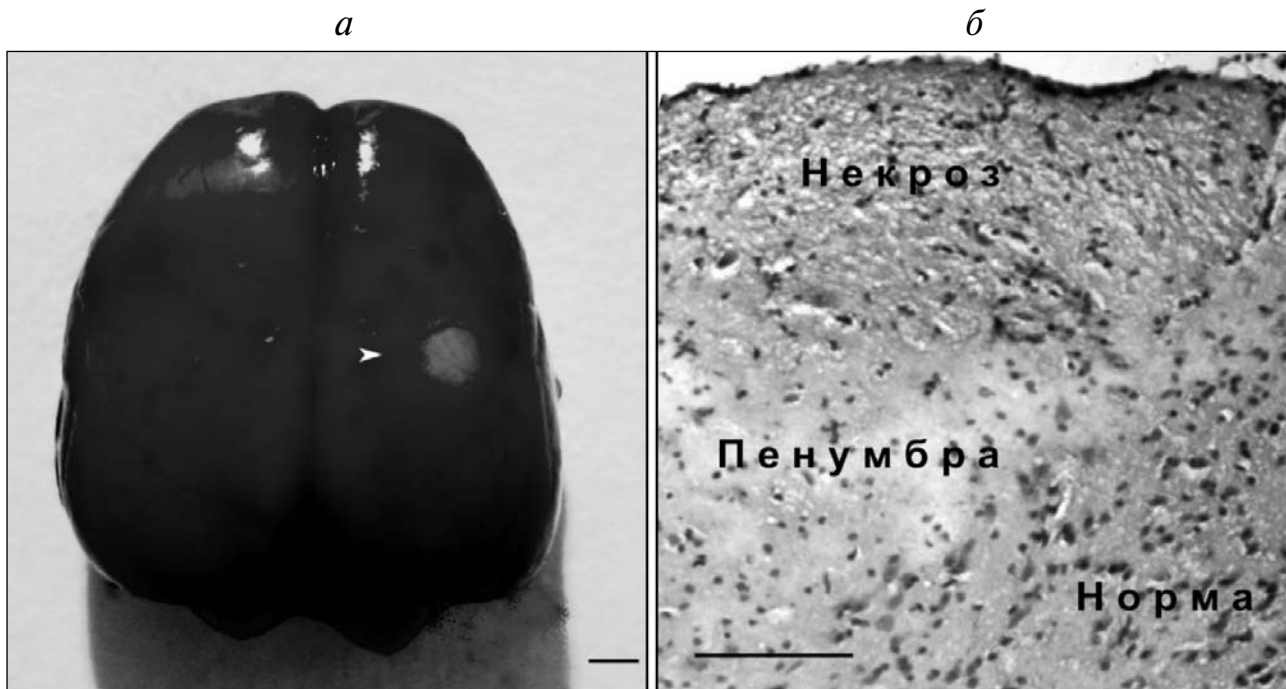


Рис. 1. Локальный фототромботический инфаркт в коре мозга крысы. *a* – Ядро инфаркта в сенсомоторной коре. Кольцевая пенумбра обозначена белой стрелкой. Масштабный отрезок 3 мм; *б* – фронтальный срез, проходящий через ядро инфаркта и пенумбру. Бледноокрашенная зона инфаркта окружена вакуолизированным отечным нейропилем, за пределами которого располагается нормально окрашенная кора. * Зона некроза, # пенумбра. Масштабный отрезок – 100 мкм

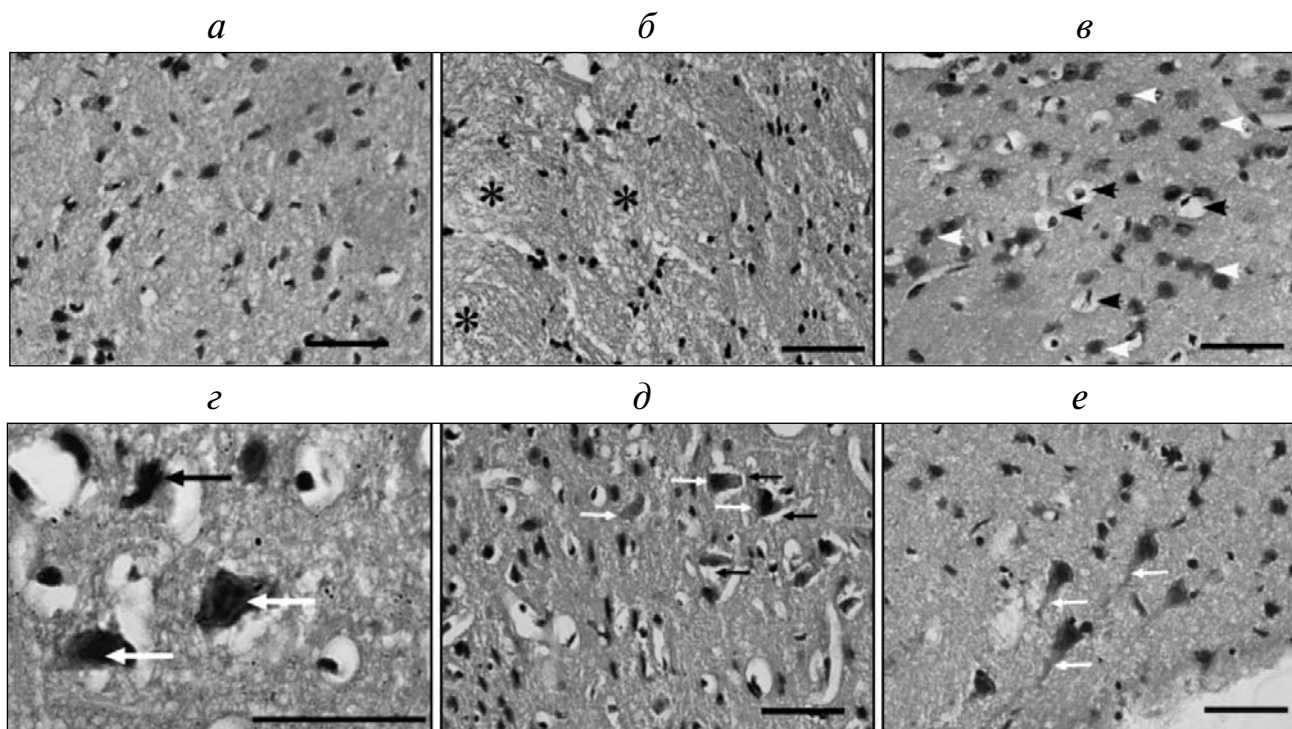


Рис. 2. Морфологические изменения в коре мозга крысы через 1 ч после ФТИ. *a* – Контрольная ткань коры мозга в необлученном полушарии; *б* – ядро инфаркта, * вакуолизированный нейропил; *в* – ядро инфаркта, черные стрелки – перичеллюлярный отек; *г* – ядро инфаркта, черные стрелки – пикнотические нейроны, белые стрелки – гиперхромные нейроны; *д* – пенумбра, черные стрелки – перинеурональный отек, белые стрелки – гиперхромные нейроны; *е* – пенумбра, белые стрелки – набухшие дендриты пирамидных нейронов, Н – неповрежденные нейроны. Масштабные отрезки на *a–в*, *д* и *е* – 50 мкм, на *г* – 20 мкм

кальное фотодинамическое воздействие вызывает в ядре инфаркта типичные ишемические изменения: отек, массивную вакуолизацию ткани и дегенеративные изменения нейронов, глии и кровеносных сосудов. Изменения в пенумбре сходны с таковыми в ядре инфаркта, но менее выражены. Они сильнее вблизи зоны поражения и сходят на нет на периферии пенумбры.

Процессы нейродегенерации и нейропротекции управляются сложной внутриклеточной сигнальной системой, состоящей из сотен и тысяч сигнальных белков. Ее компоненты, внутренние взаимодействия и роль в смерти и выживании клеток пока недостаточно изучены. Методы протеомики, позволяющие одновременно изучить изменения экспрессии сотен клеточных белков, дают новые возможности в изучении таких сложных и многофакторных процессов, как инсульт и последующие реакции организма. В предыдущих протеомных исследованиях были выявлены изменения в экспрессии ряда белков пенумбры, участвующих в биоэнергетике клеток [21]; в антиапоптотических, противовоспалительных и антиоксидантных процессах [22]; а

также протеинкиназ [23] и внеклеточных белков [18].

Использование протеомных микрочипов позволило обнаружить изменения в экспрессии ряда нейрональных и сигнальных белков в пенумбре через 1 ч после ФТИ по сравнению с контрольной тканью контралатеральной коры тех же крыс (табл. 2). Наиболее выраженным было шестикратное снижение уровня протеинкиназы *c* (PKC). PKC регулирует многочисленные клеточные процессы от пролиферации до апоптоза. Ее уровень, как известно, быстро повышается после ишемии, а ингибиторы PKC защищают клетки мозга от аноксии [24] и эксайтотоксического повреждения [25]. Это предполагает участие PKC в нейротоксических процессах. Снижение уровня PKC при ишемической нейродегенерации, о котором сообщили авторы работы [26], согласуется с нашими данными. Оно могло быть результатом деструкции ткани и протеолиза, но, с другой стороны, могло носить защитный характер. Изоформы PKC γ , δ и ϵ , как известно, участвуют в ишемическом повреждении мозга [26, 27]. В наших экспериментах их

уровень повышался на 16–23% (данные не представлены). Поэтому снижение уровня РКС скорее связано со снижением экспрессии изоформ $\beta 1$ и $\beta 2$ на 65 и 27% соответственно (табл. 2). РКС $\beta 1/2$ участвует в глутаматной эксайтотоксичности, и уменьшение их уровня могло снижать цитотоксичность и ишемическое повреждение нейронов в пенумбре [28]. Ингибирование РКС $\beta 1$ также усиливает повреждение астроцитов при ишемии и лишении углеводов [29]. Поэтому можно предположить одновременное участие РКС $\beta 1$ в ишемическом повреждении нейронов и защите астроглии в пенумбре.

Повышение уровня протеинкиназ $\text{W}\alpha$ и ERK5 на 58 и 40% также могло способствовать защите клеток пенумбры после ФТИ. В самом деле, известно, что РКВ α опосредует защиту нейронов от вызванного инсультом апоптоза [30]. ERK5 играет антиапоптотическую и нейропротекторную роль в реакциях клеток на стресс [31].

Уровень белка DYRK1A, который фосфорилирует ряд факторов транскрипции (FKHR, NFAT, STAT3, CREB и др.) и другие белки, повышался на 46%. Литературные данные о роли DYRK1A в сигнальных путях, регулирующих выживаемость и смерть клеток, противоречивы. С одной стороны он может играть, как антиапоптотическую роль, фосфорилируя и инактивируя каспазу 9 [32], так и стимулировать проапоптотический сигнальный путь ASK1/JNK [33]. Он также фосфорилирует и активирует SIRT1, NAD⁺-зависимую протеиндеацетилазу, существенную для энергетического метаболизма и выживания клеток [34].

Повышение уровня белков PINK1 и Parkin, которые контролируют «качество» митохондрий и вызывают митофагию (форма аутофагии, устраняющая поврежденные митохондрии и, тем самым, защищая клетки от стресса, вызванного дисфункцией митохондрий), также может быть приписано к компенсаторным изменениям в пенумбре [35, 36].

При окислительном стрессе в нервной ткани накапливается много поврежденных белков, которые устраняются убиквитин-протеасомной системой [37]. Уровень убиквитина-1 и С-терминальной убиквитингидролазы L1 (UCHL1), участвующей в убиквитин-опосредованном протеолизе и устранении поврежденных белков, повышался в пенумбре на 51 и 78% соответственно, по сравнению с контролем. Сверхэкспрессия UCHL1 служит маркером повреждения головного мозга человека [38]. С этими процессами коррелировало 38%-ное повышение экспрессии синфилина-1, который участвует в убиквитин-опосредованной деградации белков в ней-

ронах, а также в синаптической функции нейронов. Комплексы синфилина-1 с белками PINK1, UCHL1, SIAH и Parkin участвуют в патогенезе болезни Паркинсона [39]. Повышение уровня UCHL1 и его взаимодействие с РКС $\beta 2$ в мозге мышей вносит вклад в нейропротекцию, вызванную ишемическим прекодиционированием [23].

В пенумбре также наблюдалась сверхэкспрессия некоторых белков, участвующих в росте и поддержании целостности нейритов. К ним относятся навигатор роста нейритов NAV3, который участвует в восстановлении связей в нервной ткани после нейродегенерации [40]; белок MAP1, связанный с микротрубочками, заполняющими аксоны и дендриты и регулирующий транспорт органелл вдоль нейритов [41]; а также белок CRMP2, компонент сигнального пути коллапсин/семафорин, который регулирует рост аксонов и образование контактов интернейронов во время нейрогенеза. Показано, что уровень CRMP2 повышается в ишемической коре головного мозга мыши [42]. CRMP2 также модулирует целостность аксонов при ишемической и глутаматной нейротоксичности [43]. Комплекс белков РКС $\beta 2$ -CRMP2 участвует в нейропротекции при ишемическом прекодиционировании [23]. Но в ишемической пенумбре наблюдались разнонаправленные изменения в экспрессии этих белков: снижение уровня РКС $\beta 2$ и повышение уровня CRMP2. Это может указывать на разобщение этого сигнального пути и снижение его нейропротекторной активности. Также наблюдалось 72%-ное повышение экспрессии периферического белка миеллина PMP22, который участвует в формировании миелиновых оболочек и нейроглиальных взаимодействиях. Мутации PMP22 приводят к демиелинизации [44]. Сверхэкспрессия PMP22 в пенумбре, видимо, была необходима для репарации нарушений структуры миелина.

В пенумбре наблюдалось повышение экспрессии ряда синаптических белков: синфилина-1, триптофангидроксилазы, которая опосредует биосинтез серотонина, и глутаматдекарбоксилазы, преобразующей L-глутамат в ГАМК. Уровень связывающегося с синтаксином белков Munc-18-1 и Munc-18-3, компонентов комплекса SNARE, участвующего в экзоцитозе и высвобождении нейротрансмиттеров из синаптических пузырьков [45], повышался на 32 и 53% соответственно. Но при этом уровень синтаксина и синаптофизина, участвующих в синаптической передаче, был снижен на 71 и 33% соответственно, что, возможно, могло быть результатом разрушения синаптических везикул. Возможно, эти белки высвобождались из разобщенных

комплексов с синтаксином. Эти противоречивые данные могут отражать одновременное протекание двух противоположных процессов, связанных с разрушением синапсов и попытками нервных клеток восстановить синаптические структуры.

Двукратное снижение уровня белка TDP-43 в пенумбре может указывать на протекание компенсаторных процессов в этой зоне. Действительно, TDP-43 обычно участвует в транскрипции, сплайсинге, транспорте и стабильности мРНК. Но модифицированный TDP-43 (фосфорилированный, убиквитинированный или усеченный) может опосредовать образование цитоплазматических структурных включений, участвующих в патогенезе таких нейродегенеративных заболеваний, как боковой амиотрофический склероз, лобно-височная дегенерация и болезнь Альцгеймера [46]. Каназава с соавт. (2011 г.) наблюдали сверхэкспрессию TDP-43 в ядре инфаркта после острого ишемического инсульта мозга крыс [47]. Снижение уровня нейрофиламента 68, маркера дезорганизации цитоскелета, также указывает на восстановительные тенденции в пенумбре. Повышенная экспрессия *N*-кадгерина, ответственного за межклеточную адгезию, вероятно, направлена на поддержание целостности ткани пенумбры [48].

Известно, что при инсульте недостаток кислорода и энергетических ресурсов в ядре инфаркта приводит к нарушению ионного гомеостаза, деполяризации, отеку, некрозу и осмотическому лизису клеток. Высвобождение глутамата из

поврежденных клеток активирует NMDA- и AMPA-рецепторы и открывает связанные с ними ионные каналы в окружающих клетках. Последующий вход в клетки ионов Ca^{2+} вызывает некроз или апоптоз. Одновременный выход ионов K^+ индуцирует устойчивую деполяризацию нейронов и глиальных клеток за пределами ядра инфаркта, что далее поддерживает высвобождение глутамата и K^+ . Такой саморазвивающийся эксайтотоксический процесс приводит к распространению повреждения и формированию пенумбры [49, 50]. Дефицит энергии стимулирует генерацию активных форм кислорода в митохондриях, что усиливает окислительное повреждение тканей [51].

С другой стороны, в поврежденной ткани одновременно развиваются процессы, направленные на поддержание выживания клеток и восстановление тканей. На протекание нейропротекторных процессов в ткани пенумбры через 1 ч после ФТИ указывают данные, приведенные на схеме (рис. 3). Мы наблюдали повышенную экспрессию белков, участвующих в поддержании целостности и навигации роста нейритов (NAV3, MAP1, CRMP2 и PMP22); межклеточных взаимодействиях (*N*-кадгерин); поддержании структуры и функций митохондрий (PINK1 и Parkin) и синапсов (глутаматдекарбоксилаза, триптофангидроксилаза, Munc-18-1 и Munc-18-3, и синфилин-1); убиквитинировании и протеолизе поврежденных белков, что обеспечивает очищение ткани (UCHL1, PINK1 и синфилин-1); выживании клеток (PKB α , ERK5 и DYRK1A).

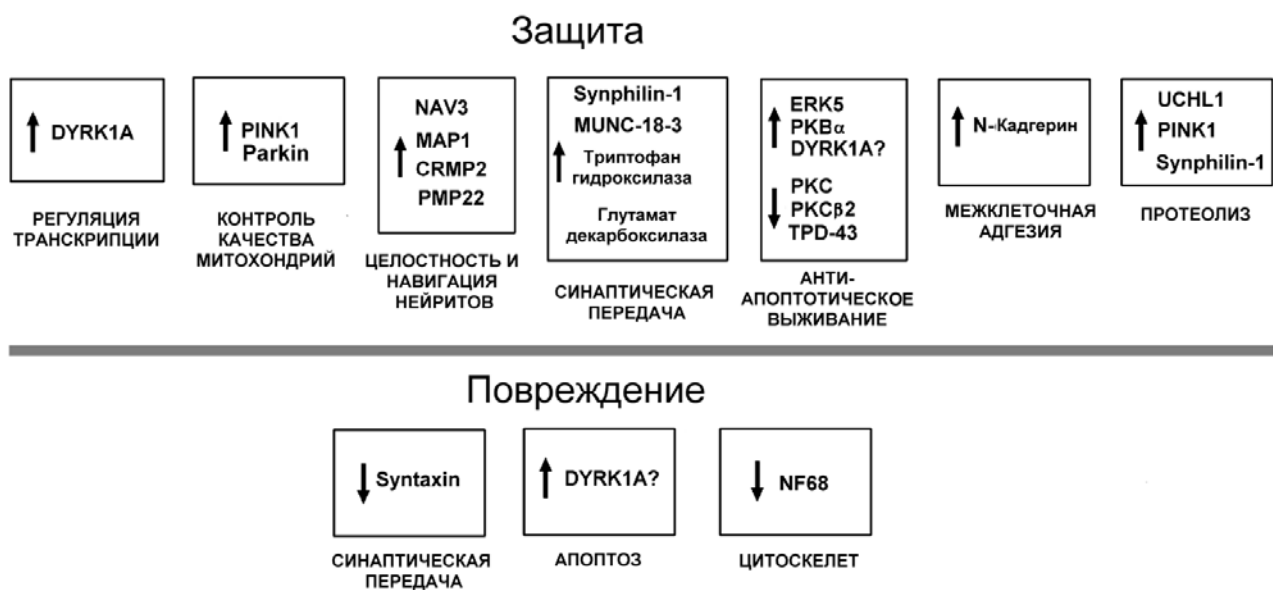


Рис. 3. Схема изменений экспрессии нейрональных и сигнальных белков в пенумбре через 1 ч после ФТИ в коре мозга крысы

Одновременное снижение экспрессии РКС и РКС β 1/2 могло снизить окислительное и эксайтотоксическое повреждение ткани, а уменьшение уровня TDP-43 – предотвратить накопление нейротоксических включений в нейронах. Снижение экспрессии нейрофиламента 68, маркера дезорганизации цитоскелета, также указывало на восстановительную тенденцию.

Таким образом, в настоящей работе определен ряд белков, которые настолько важны для реакции ткани пенумбры что они дополнительно экспрессируются. Ведь многие клеточные белки, играющие важную роль в реакциях клеток, уже достаточно экспрессированы. В ответ на внешнее воздействие или при изменении состояния ткани они активируются, например, путем фосфорилирования или ограниченного протеолиза. Многие из исследованных нами белков малоизвестны и их роль в ишемическом мозге слабо изучена. Это первый этап работы. Необходимо подчеркнуть, что протеомные данные только дают список белков, потенциально участвующих в распространении инфаркта, но не раскрывают механизмы этих изменений, так как сигнальные пути и факторы транскрипции, управляющие экспрессией этих белков, остаются неизвестными. Последующие исследования должны определить сигнальные пути, лежащие в основе этих изменений, а также выявить роль этих и других, связанных с ними белков, в развитии повреждения и в репарации ткани. Вероятно, эффективным лечением последствий инсульта будет не один препарат, а комплекс лекарств, направленных на разные процессы в тканях.

К ограничениям данного метода, как и других биохимических методов, относится необходимость определенного количества биологического материала. Другая сложность состоит в том, что нервная ткань неоднородна, она состоит из нейронов, разных видов глиальных клеток (астроглия, олигодендроглия, микроглия и др.) и кровеносных сосудов. Процессы, протекающие в этих клетках, могут быть различны. Кроме того, выявленные изменения были усреднены по всей ткани пенумбры (2-мм кольцо вокруг ядра ФТИ). Но пенумбра неоднородна. В ней повреждающие процессы доминируют вблизи ядра ФТИ, а защитные – на периферии, где переходная зона переходит в нормальную ткань. Баланс между ними, определяющий судьбу клеток, формирует «границу смерти». Цель противоинсультной терапии заключается в том, чтобы ограничить продвижение этой границы, снижая повреждающие процессы и стимулируя процессы восстановления. Это можно будет достичь на основе глубокого понимания биохимических механизмов данных процессов. Полученные данные также указывают на потенциальные маркеры и мишени для диагностики инфаркта пенумбры и его лечения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 14-15-00068), Минобрнауки России, проект RFMEFI 59414X0002.

Работа А.Б. Узденского поддержана Минобрнауки России (грант «Организация научных исследований № 790»).

Исследования выполнены на оборудовании ЦКБ «Высокие технологии» ЮФУ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Meisel, A., Prass, K., Wolf, T., and Dirnagl, U. (2004) Stroke. In: *Neuroprotection: Models, mechanisms and therapies* (Bahr, M., ed.), Wiley-Blackwell, Hoboken, New Jersey, pp. 9–43.
- Iadecola, C., and Anrather, J. (2011) Stroke research at a crossroad: asking the brain for directions, *Nature Neurosci.*, **14**, 1363–1368.
- Moskowitz, M.A. (2010) Brain protection: maybe yes, maybe no, *Stroke*, **41**, S85–S86.
- Зиганшина Л.Е., Абакумова Т.Р. (2013) Церебролизин в лечении остро́го ише́мического инсульта, *Вестник РАМН*, **1**, 21–29.
- Watson, B.D., Dietrich, W.D., Busto, R., Wachtel, M.S., and Ginsberg, M.D. (1985) Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis, *Ann. Neurol.*, **17**, 497–504.
- Dietrich, W.D., Watson, B.D., Busto, R., Ginsberg, M.D., and Bethea, J.R. (1987) Photochemically induced cerebral infarction. I. Early microvascular alterations, *Acta Neuropathol.*, **72**, 315–325.
- Pevsner, P.H., Eichenbaum, J.W., Miller, D.C., Pivawer, G., Eichenbaum, K.D., Stern, A., Zakian, K.L., and Koutcher, J.A. (2001) A photothrombotic model of small early ischemic infarcts in the rat brain with histologic and MRI correlation, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **45**, 227–233.
- Shanina, E.V., Redecker, C., Reinecke, S., Schallert, T., and Witte, O.W. (2005) Long-term effects of sequential cortical infarcts on scar size, brain volume and cognitive function, *Behav. Brain Res.*, **158**, 69–77.
- Schmidt, A., Hoppen, M., Strecker, J.K., Diederich, K., Schabitz, W.R., Schilling, M., and Minnerup, J. (2012) Photochemically induced ischemic stroke in rats, *Exp. Transl. Stroke Med.*, **4**, 13.
- Романова Г.А., Барсков И.В., Островская Р.У., Гудашева Т.А., Викторов И.В. (1998) Поведенческие и морфологические нарушения, вызванные двусторонним фотоиндуцированным тромбозом мозговых сосудов лобной коры крыс, *Патол. физиол. и эксперим. терапия*, **2**, 8–10.

11. Романова Г.А., Шакова Ф.М., Барсков И.В., Стельмашук Е.В., Генрихс Е.Е., Черемных А.М., Калинина Т.И., Юрин В.Л. (2014) Нейропротективное и антиаггестическое действие производных эритропоэтина при экспериментальном ишемическом повреждении коры головного мозга, *Бюлл. эксперим. биол. мед.*, **158**, 299–302.
12. Узденский А.Б. (2010) *Клеточно-молекулярные механизмы фотодинамической терапии*, Наука, Санкт-Петербург.
13. Brundel, M., de Bresser, J., van Dillen, J.J., Kappelle, L.J., and Biessels, G.J. (2012) Cerebral microinfarcts: a systematic review of neuropathological studies, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **32**, 425–436.
14. Pantoni, L. (2010) Cerebral small vessel disease: from pathogenesis and clinical characteristics to therapeutic challenges, *Lancet Neurol.*, **9**, 689–701.
15. del Zoppo, G.J., and Mabuchi, T. (2003) Cerebral microvessel responses to focal ischemia, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **23**, 879–894.
16. Spisak, S., Tulassay, Z., Molnar, B., and Guttman, A. (2007) Protein microchips in biomedicine and biomarker discovery, *Electrophoresis*, **28**, 4261–4273.
17. Wingren, C., and Borrebaeck, C.A. (2009) Antibody-based microarrays, *Methods Mol. Biol.*, **509**, 57–84.
18. Dayon, L., Turck, N., Garci-Berrococo, T., Walter, N., Burkhard, P.R., Vilalta, A., Sahuquillo, J., Montaner, J., and Sanchez, J.C. (2011) Brain extracellular fluid protein changes in acute stroke patients, *J. Proteome Res.*, **10**, 1043–1051.
19. Demyanenko, S.V., Uzdensky, A.B., Sharifulina, S.A., Lapteva, T.O., and Polyakova, L.P. (2014) PDT-induced epigenetic changes in the mouse cerebral cortex: a protein microarray study, *Biochim. Biophys. Acta*, **1840**, 262–270.
20. Zilles, K. (1985) *The Cortex of the Rat: A Stereotaxis Atlas*, Springer-Verlag, Berlin.
21. Villa, R.F., Gorini, A., Ferrari, F., and Hoyer, S. (2013) Energy metabolism of cerebral mitochondria during aging, ischemia and post-ischemic recovery assessed by functional proteomics of enzymes, *Neurochem. Int.*, **63**, 765–781.
22. Datta, A., Park, J.E., Li, X., Zhang, H., Ho, Z.S., Heese, K., Lim, S.K., Tam, J.P., and Sze, S.K. (2010) Phenotyping of an *in vitro* model of ischemic penumbra by iTRAQ-based shotgun quantitative proteomics, *J. Proteom. Res.*, **9**, 472–484.
23. Bu, X., Zhang, N., Yang, X., Liu, Y., Du, J., Liang, J., Xu, Q., and Li, J. (2011) Proteomic analysis of PKC β II-interacting proteins involved in HPC-induced neuroprotection against cerebral ischemia of mice, *J. Neurochem.*, **117**, 346–356.
24. Hara, H., Onodera, H., Yoshidomi, M., Matsuda, Y., and Kogure, K. (1990) Staurosporine, a novel protein kinase C inhibitor, prevents postischemic neuronal damage in the gerbil and rat, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **10**, 646–653.
25. Felipo, V., Minana, M.D., and Grisolia, S. (1993) Inhibitors of protein kinase C prevent the toxicity of glutamate in primary neuronal cultures, *Brain Res.*, **604**, 192–196.
26. Bright, R., and Mochly-Rosen, D. (2005) The role of protein kinase C in cerebral ischemic and reperfusion injury, *Stroke*, **36**, 2781–2790.
27. Chou, W.H., and Messing, R.O. (2005) Protein kinase C isozymes in stroke, *Trends Cardiovasc. Med.*, **15**, 47–51.
28. Lee, B.K., Yoon, J.S., Lee, M.G., and Jung, Y.S. (2014) Protein kinase C- β mediates neuronal activation of Na⁺/H⁺ exchanger-1 during glutamate excitotoxicity, *Cell Signal.*, **26**, 697–704.
29. Wang, J., Bright, R., Mochly-Rosen, D., and Giffard, R.G. (2004) Cell-specific role for e- an β I-protein kinase C isozymes in protecting cortical neurons and astrocytes from ischemia-like injury, *Neuropharmacology*, **47**, 136–145.
30. Zhao, H., Sapolsky, R.M., and Steinberg, G.K. (2006) Phosphoinositide-3-kinase/akt survival signal pathways are implicated in neuronal survival after stroke, *Mol. Neurobiol.*, **34**, 249–270.
31. Wang, R.M., Zhang, Q.G., Li, C.H., and Zhang, G.Y. (2005) Activation of extracellular signal-regulated kinase 5 may play a neuroprotective role in hippocampal CA3/DG region after cerebral ischemia, *J. Neurosci. Res.*, **80**, 391–399.
32. Laguna, A., Aranda, S., Barallobre, M.J., Barhoum, R., Fernandez, E., Fotaki, V., Delabar, J.M., de la Luna, S., Villa, P., and Arbones, M.L. (2008) The protein kinase DYRK1A regulates caspase-9-mediated apoptosis during retina development, *Dev. Cell*, **15**, 841–853.
33. Choi, H.K., and Chung, K.C. (2011) DYRK1A positively stimulates ASK1-JNK signaling pathway during apoptotic cell death, *Exp. Neurobiol.*, **20**, 35–44.
34. Guo, X., Williams, J.G., Schug, T.T., and Li, X. (2010) DYRK1A and DYRK3 promote cell survival through phosphorylation and activation of SIRT1, *J. Biol. Chem.*, **285**, 3223–3232.
35. Trancikova, A., Tsika, E., and Moore, D.J. (2012) Mitochondrial dysfunction in genetic animal models of Parkinson's disease, *Antioxid. Redox Signal.*, **16**, 896–919.
36. de Vries, R.L., and Przedborski, S. (2013) Mitophagy and Parkinson's disease: be eaten to stay healthy, *Mol. Cell. Neurosci.*, **55**, 37–43.
37. Caldeira, M.V., Salazar, I.L., Curcio, M., Canzoniero, L.M., and Duarte, C.B. (2014) Role of the ubiquitin-proteasome system in brain ischemia: Friend or foe? *Prog. Neurobiol.*, **112**, 50–69.
38. Yamauchi, T., Sakurai, M., Abe, K., Matsumiya, G., and Sawa, Y. (2008) Ubiquitin-mediated stress response in the spinal cord after transient ischemia, *Stroke*, **39**, 1883–1889.
39. Kruger, R. (2004) The role of synphilin-1 in synaptic function and protein degradation, *Cell Tissue Res.*, **318**, 195–199.
40. Maes, T., Barcelo, A., and Buesa, C. (2002) Neuron navigator: a human gene family with homology to unc-53, a cell guidance gene from *Caenorhabditis elegans*, *Genomics*, **80**, 21–30.
41. Halpain, S., and Dehmelt, L. (2006) The MAP1 family of microtubule-associated proteins, *Genome Biol.*, **7**, 224.
42. Chen, A., Liao, W.P., Lu, Q., Wong, W.S., and Wong, P.T. (2007) Up-regulation of dihydropyrimidinase-related protein 2, spectrin alpha II chain, heat shock cognate protein 70 pseudogene 1 and tropomodulin 2 after focal cerebral ischemia in rats—a proteomics approach, *Neurochem. Int.*, **50**, 1078–1086.
43. Hou, S.T., Jiang, S.X., Aylsworth, A., Ferguson, G., Slinn, J., Hu, H., Leung, T., Kappler, J., and Kaibuchi, K. (2009) CaMKII phosphorylates collapsin response mediator protein 2 and modulates axonal damage during glutamate excitotoxicity, *J. Neurochem.*, **111**, 870–881.
44. Quarles, R.H. (2002) Myelin sheaths: glycoproteins involved in their formation, maintenance and degeneration, *Cell. Mol. Life Sci.*, **59**, 1851–1871.
45. Gallwitz, D., and Jahn, R. (2003) The riddle of the Sec1/Munc-18 proteins – new twists added to their interactions with SNAREs, *Trends Biochem. Sci.*, **28**, 113–116.
46. Lee, E.B., Lee, V.M., and Trojanowski, J.Q. (2011) Gains or losses: molecular mechanisms of TDP43-mediated neurodegeneration, *Nature Rev. Neurosci.*, **13**, 38–50.
47. Kanazawa, M., Kakita, A., Igarashi, H., Takahashi, T., Kawamura, K., Takahashi, H., Nakada, T., Nishizawa, M.,

- and Shimohata, T. (2011) Biochemical and histopathological alterations in TAR DNA-binding protein-43 after acute ischemic stroke in rats, *J. Neurochem.*, **116**, 957–965.
48. Zechariah, A.E., Ali, A., Hagemann, N., Jin, F., Doeppner, T.R., Helfrich, I., Mies, G., and Hermann, D.M. (2013) Hyperlipidemia attenuates vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis, impairs cerebral blood flow, and disturbs stroke recovery via decreased pericyte coverage of brain endothelial cells, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **33**, 1561–1567.
49. Back, T., Ginsberg, M.D., Dietrich, W.D., and Watson, B.D. (1996) Induction of spreading depression in the ischemic hemisphere following experimental middle cerebral artery occlusion: effect on infarct morphology, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **16**, 202–213.
50. Puyal, J., Ginet, V., and Clarke, P.G. (2013) Multiple interacting cell death mechanisms in the mediation of excitotoxicity and ischemic brain damage: a challenge for neuroprotection, *Prog. Neurobiol.*, **105**, 24–48.
51. Sims, N.R., and Anderson, M.F. (2002) Mitochondrial contributions to tissue damage in stroke, *Neurochem. Int.*, **40**, 511–526.

EXPRESSION OF NEURONAL AND SIGNALING PROTEINS IN PENUMBRA AROUND THE PHOTOTHROMBOTIC INFARCTION CORE IN RAT CEREBRAL CORTEX

S. V. Demyanenko¹, S. N. Panchenko², A. B. Uzdensky^{1*}

¹ Southern Federal University, Academy of Biology and Biotechnology,
Stachky prosp. 194/1, Rostov-on-Don 344090, Russia;
fax: +7(863)223-0837, E-mail: auzd@yandex.ru

² Rostov State Medical University, Nakhichevansky prosp. 29,
Rostov-on-Don 344022, Russia; E-mail: pansvn@mail.ru

Received January 12, 2015

Revision received March 11, 2015

Photodynamic impact on animal cerebral cortex using water-soluble Bengal Rose as a photosensitizer, which does not cross the blood–brain barrier and remains in blood vessels, induces platelet aggregation, vessel occlusion, and brain tissue infarction. This reproduces ischemic stroke. Irreversible cell damage within the infarction core propagates to adjacent tissue and forms the transition zone, the penumbra. Tissue necrosis in the infarction core is too fast (minutes) to be prevented, but much slower penumbra injury (hours) can be limited. We studied the changes in morphology and protein expression profile in penumbra 1 h after local photothrombotic infarction (PTI) induced by laser irradiation of the cerebral cortex after Bengal Rose administration. Morphological study using standard hematoxylin/eosin staining showed 3-mm infarct core surrounded by 1.5–2 mm penumbra. Morphological changes in penumbra were lesser and decreased towards its periphery. Antibody microarrays against 224 neuronal and signaling proteins were used for proteomic study. The observed upregulation of penumbra proteins involved in maintaining neurite integrity and guidance (NAV3, MAP1, CRMP2, PMP22); intercellular interactions (N-cadherin); synaptic transmission (glutamate decarboxylase, tryptophan hydroxylase, Munc-18-1 and Munc-18-3, and synphilin-1); mitochondria quality control and mitophagy (PINK1 and Parkin); ubiquitin-mediated proteolysis and tissue clearance (UCHL1, PINK1, Parkin, synphilin-1); and signaling proteins (PKB α , ERK5) could be associated with tissue recovery. Downregulation of PKC, PKC β 1/2, and TDP-43 could also reduce tissue injury. These changes in expression of some neuronal proteins were directed mainly to protection and tissue recovery in penumbra. Some upregulated proteins can potentially serve as markers of protection processes in penumbra.

Key words: stroke, neurodegeneration, neuroprotection, penumbra, proteomics