YΔK 616-092.19

DOI: 10.24884/1682-6655-2019-18-4-58-64

Н. С. ЩЕРБАК^{1,2}, А. Г. ГУРБО², Г. Ю. ЮКИНА¹, В. В. ТОМСОН¹, Е. В. ШЛЯХТО^{1, 2}

Влияние ишемического посткондиционирования на изменение уровня иммунореактивности к PECAM-1/CD31 в структурах неокортекса крыс при глобальной ишемии головного мозга

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия 197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия 197341, Россия, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2 e-mail: ShcherbakNS@yandex.ru

Статья поступила в редакцию 23.05.19; принята к печати 11.10.19

Резюме

Введение. Ишемическое посткондиционирование (ИПостК) головного мозга может рассматриваться как перспективный подход к ограничению реперфузионного повреждения в ишемизированной области мозга. Цель – исследовать влияние ИПостК после глобальной ишемии головного мозга на уровень иммунореактивности к PECAM-1/CD31 в структурах слоев II, III и V неокортекса крыс в различные сроки реперфузионного периода. Материал и методы. У самцов крыс Wistar моделировали 10-минутную глобальную ишемию головного мозга с последующим ИПостК в виде реперфузии-ишемии по 15 с/15 с. В ранний (2 суток) и отдаленный (7 суток) реперфузионный периоды оценивали число морфологически неизмененных нейронов и уровень иммунореактивности к PECAM-1/CD31 в структурах слоев II, III и V неокортекса. Результаты. Показано, что применение ИПостК ко 2-м суткам реперфузии способствовало увеличению числа неизмененных нейронов в слоях II и III на 25,8 и 28,2 % (P<0,05), которое не сопровождалось изменением уровня иммунореактивности к РЕСАМ-1/CD31, к 7-м суткам реперфузии отмечалось увеличение числа неизмененных нейронов в слоях II, III и V на 19,2, 22,1, 21,4 % (P<0,05), и наблюдалось понижение уровня иммунореактивности к PECAM-1/CD31 в структурах этих слоев на 27,4, 39,4 и 16,7 % (P<0,05) соответственно, при сравнении с аналогичными показателями в группах без применения ИПостК. Выводы. В механизмах физиологической реакции, формирующейся при применении ИПостК после ишемии головного мозга и приводящей к сохранению числа неизмененных нейронов в отдаленный реперфузионный период, задействован белок PECAM-1/CD31. Это позволяет предположить, что протективный потенциал изучаемого феномена реализуется путем возможного ингибирования миграции нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов и экстравазации лейкоцитов из системного кровотока в поврежденную область головного мозга, т. е. через подавление воспалительного ответа.

Ключевые слова: неокортекс, нейрон, PECAM-1/CD31, ишемия, ишемическое посткондиционирование, крысы Wistar

Для цитирования: Щербак Н. С., Гурбо А. Г., Юкина Г. Ю., Томсон В. В., Шляхто Е. В. Влияние ишемического посткондиционирования на изменение уровня иммунореактивности к РЕСАМ-1/CD31 в структурах неокортекса крыс при глобальной ишемии головного мозга. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2019;18(4):58–64. Doi: 10.24884/1682-6655-2019-18-4-58-64.

UDC 616-092.19

DOI: 10.24884/1682-6655-2019-18-4-58-64

N. S. SHCHERBAK^{1,2}, A. G. GURBO², G. Yu. YUKINA¹, V. V. THOMSON¹, E. V. SHLYAKHTO^{1, 2}

Effect of Ischemic Postconditioining on Change of Immunoreactivity Level to PECAM-1/CD31 in Rat Neocortex Structures after Global Brain Ischemia

¹ Pavlov University, Russia, St. Petersburg
6-8 L'va Tolstogo street, St. Petersburg, Russia, 197022
² Almazov National Medical Research Centre, Russia, St. Petersburg
2 Akkuratova street, St. Petersburg, Russia, 197341
e-mail: ShcherbakNS@yandex.ru

Received 23.05.19; accepted 11.10.19

Summarv

Introduction. Ischemic postconditioning (IPostC) of the brain can be considered as a promising approach to limit reperfusion injury in the ischemic area of the brain. **Objective** – to study the effect of IPostC after global cerebral ischemia on the level of immunoreactivity to PECAM-1/CD31 in the structures of layers II, III and V of the neocortex of rats at different periods of the reperfusion period. **Material and methods.** In male Wistar rats, a 10-minute global cerebral ischemia was modeled

58 **Н. С. ЩЕРБАК** и **др.**

ОРИГИНАЛЬНЫЕ CTATЬИ (экспериментальные исследования) / ORIGINAL ARTICLES (experimental investigations)

followed by IPostC in the form of reperfusion-ischemia at 15sec/15sec. In the early (2 days) and late (7 days) reperfusion periods after damaging ischemia, the number of morphologically unchanged neurons and the level of immunoreactivity to PECAM-1/CD31 in the structures of layers II, III and V of the neocortex were estimated. **Results.** It is shown that the use of IPostC by 2 days of reperfusion contributed to the increase in the number of unchanged neurons in layers II and III of 25.8 and 28.2 % (P<0.05), which was not accompanied by changes in the level of immunoreactivity to PECAM-1/CD31, to 7 days of reperfusion there was an increase in the number of unchanged neurons in layers II, III and V of 19.2, 22,1, 21,4 % (P<0.05) was observed a decrease in the level of immunoreactivity to PECAM-1/CD31 in the structures of these layers of 27.4, 39.4, and 16.7 % (P<0.05), respectively, when compared with similar indicators in groups without the use of IPostC. Conlusions. In the mechanisms of physiological reaction formed in the application of ischemic postconditioning after cerebral ischemia and leading to the preservation of the number of unchanged neurons in the late reperfusion period involved PECAM-1/CD31, which suggests that the protective potential of the phenomenon is realized by possible inhibiting the migration of neutrophils, monocytes and lymphocytes and extravasation of leukocytes from the systemic blood flow into the damaged area of the brain, i.e. through suppression of inflammatory response.

Keywords: neocortex, neuron, PECAM-1/CD31, ischemia, ischemic postconditioning, rats Wistar

For citation: Shcherbak N. S., Gurbo A. G., Yukina G. Yu., Thomson V. V., Shlyakhto E. V. Effect of ischemic postconditioining on change of immunoreactivity level to PECAM-1/CD31 in rat neocortex structures after global brain ischemia. Regional hemodynamics and microcirculation. 2019;18(4):58-64. Doi: 10.24884/1682-6655-2019-18-4-58-64.

Введение

Новым подходом к ограничению реперфузионного повреждения в ишемизированной области головного мозга может рассматриваться феномен ишемического посткондиционирования (ИПостК). Суть ИПостК заключается в активации адаптивных реакций организма путем выполнения коротких ишемических воздействий после длительной ишемии [1, 2]. Ответные реакции различных структур головного мозга, обладающих неодинаковой чувствительностью к повреждающему действию ишемии-реперфузии, при применении ИПостК остаются малоизученными.

Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) является физиологическим барьером между центральной нервной системой и кровеносной, его основными компонентами являются нейроны, эндотелиальные клетки капилляров, перициты и астроциты. Расширение зоны инфаркта после ишемического повреждения обусловлено нарушением микроциркуляции и селективной нейрональной уязвимостью [3]. Нарушение микроциркуляции может быть вызвано формированием капиллярного блока, повреждением ГЭБ, вазоконстрикцией, биохимическими медиаторами, такими как цитокины, лейкотриены, фактор активации тромбоцитов, и протеолитическими энзимами [4, 5].

PECAM-1/CD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1) – трансмембранный гликопротеин, молекула клеточной алгезии, обеспечивающая взаимолействие «клетка – клетка» или «клетка – внеклеточный матрикс», относится к надсемейству иммуноглобулинов и экспрессируется на эндотелиальных клетках, тромбоцитах, Т-лимфоцитах, нейтрофилах, моноцитах, опосредует путь трансэндотелиальной миграции нейтрофилов и является биомаркером эндотелиальной функции [6, 7]. Изменение экспрессии мРНК PECAM-1/CD31 и уровня иммунореактивности к PECAM-1/CD31 в отдельных структурах головного мозга показано при ишемии-реперфузии [1, 7, 8]. Влияние ИПостК на изменение уровня РЕСАМ-1/ CD31 при ишемическом повреждении головного мозга по-прежнему остается малоизученным [1]. Понимание молекулярных механизмов, лежащих в основе формирования эффектов ИПостК, позволит использовать защитные возможности этого феномена в клинической практике и при разработке новых лекарственных препаратов.

Цель – исследовать влияние ишемического посткондиционирования после глобальной ишемии головного мозга на уровень иммунореактивности к PECAM-1/CD31 в структурах слоев II, III и V неокортекса крыс в различные сроки реперфузионного периода.

Материал и методы исследования

Все эксперименты были проведены в соответствии с рекомендациями Этических комитетов ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ им. И. П. Павлова», ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, а также в соответствии с требованиями Постановления Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 29 августа 2014 г. № 51 «Санитарноэпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)».

Моделирование ишемического и реперфузионного повреждения головного мозга. Исследование выполнено на самцах крыс Wistar массой 230-250 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, внутрибрющинно). Обратимую полную глобальную ишемию головного мозга моделировали путем 10-минутной окклюзии плечеголовного ствола, левой подключичной артерии и левой общей сонной артерии по методике, описанной ранее [9]. ИПостК формировали путем снятия и наложения микрохирургических зажимов на артерии непосредственно после полной ишемии мозга. Выбор протокола применения ИПостК был основан на ранее проведенных исследованиях [1, 2] – 3 ишемических воздействия по 15 с/15 с реперфузии/ реокклюзии с последующим периодом реперфузии 2 и 7 суток. Аналогичные манипуляции осуществляли при проведении ложной операции, но без наложения микрохирургических зажимов на артерии. Животные случайным образом были распределены на экспериментальные группы: 1) длительность реперфузионного периода 2 суток: «ЛО2» (n=7) – ложноопериро-

Таблица 1

Число неизмененных нейронов в слоях неокортекса крыс в различных экспериментальных группах $(\bar{x} \pm s_{\bar{x}} \text{ на 1 мм}^2 \text{ на срезе})$

Table 1

The number of unchanged neurons in the layers of the neocortex of rats in different experimental groups $(\bar{x} \pm s_{\bar{x}} \text{ on 1 MM}^2 \text{ on a cut})$

| Экспериментальная группа | Слой коры | | |
|--------------------------|----------------------|----------------------|--------------------|
| | II | III | V |
| ЛО2 | 353±11 | 338±11 | 205±11 |
| ЛО7 | 365±14 | 356±11 | 199±10 |
| Ишемия2 | 229±11* | 209±9* | 189±11 |
| Ишемия7 | 208±11 ^{αα} | 195±10 ^{αα} | 145±12α |
| ИПостК2 | 288±11# | 268±11# | 194±9 |
| ИПостК7 | 248±9 ^φ | 238±11 ^φ | 176±8 ^φ |

 Π р и м е ч а н и е: различия значимы * – по сравнению с показателем в группе «ЛО2» при P<0,01; $^{\alpha}$ – по сравнению с показателем в группе «ЛО7» при P<0,05; $^{\alpha\alpha}$ – при P<0,01; $^{\#}$ – по сравнению с показателем в группе «Ишемия2» при P<0,01; $^{\varphi}$ – по сравнению с показателем в группе «Ишемия7» при P<0,05.

ванные крысы; «Ишемия2» (n=7) – крысы с ишемией мозга; «ИПостК2» (n=6) – крысы с ишемией мозга и ИПостК; 2) длительность реперфузионного периода 7 суток: «ЛО7» (n=7) – ложнооперированные; «Ишемия7» (n=7) – крысы с ишемией мозга; «ИПостК7» (n=6) – крысы с ишемией мозга и ИПостК. Все хирургические вмешательства проводили на термостатируемом операционном столе (TCAT-2LV controller; Physitemp Instruments Inc., Clifton, NJ, США) при постоянном контроле ректальной температуры животных $36,5\pm0,5$ °C.

Гистологический анализ. После завершения реперфузионного периода для морфометрического анализа фронтальные срезы толщиной 3 мкм, соответствующие стереотаксическому атласу головного мозга крысы (брегма –3,2±0,2 мм) [10], окрашивали толуидиновым синим по методу Ниссля. На препаратах под световым микроскопом ДМ-750 (Leica, Германия) при увеличении ×400 (об. 40, ок. 10) подсчитывали число морфологически неизмененных нейронов в слоях II, III и V (occipital cortex) окципитальной области коры головного мозга крысы [10]. Полученный показатель пересчитывали на 1 мм² слоя коры головного мозга.

Иммуногистохимический анализ. Для оценки экспрессии белка PECAM-1/CD31 использовали иммуногистохимический метод [1]. На гистологических срезах мозга проводили иммуногистохимическую реакцию с поликлональными козьими антителами к PECAM-1/CD31 (SantaCruz Biotechnology, Calif. USA, США, разведение 1:100). Анализ уровня иммунореактивности к PECAM-1/CD31 в структурах слоев II, III и V коры затылочной области (occipital cortex) мозга осуществляли на основании измерения оптической плотности продукта реакции, которую выполняли на морфометрической установке, состоящей из светового микроскопа Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Германия), цифровой камеры Baumer CX05e (Baumer Optronic, Германия), компьютера с программным обеспечением «ВидеоТесТ-Морфология» («ВидеоТест», Россия). Результаты анализа выражали в относительных единицах (отн. ед.) оптической плотности. В каждом анализируемом слое головного мозга проводили измерение оптической плотности всех PECAM-1/CD31 иммунопозитивных структур. При каждом измерении вычитали оптическую плотность фона [1].

Результаты обрабатывали статистически с использованием программ «Statistica 6.0» (StatSoft, Inc.) и «Місгоsoft Excel 2003». После проверки распределения на нормальность значимость различий между группами оценивали с помощью t-критерия Стьюдента или U-критерия Манна — Уитни. Результаты представлены в виде среднего арифметического и его стандартной ошибки. Различия учитывали как значимые при Р<0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

В качестве критерия оценки нейропротективной эффективности использованного протокола ИПостК после ишемического повреждения головного мозга использовали число морфологически неизмененных нейронов в слоях II, III и V окципитальной области коры мозга крыс. Было установлено, что примененный протокол ИПостК после полной 10-минутной глобальной ишемии головного мозга на изученном уровне брегма -3.2 ± 0.2 мм способствует значимому увеличению числа неизменных нейронов в слоях II и III неокортекса на 25,8 и 28,2 % (P<0,05) соответственно в ранний реперфузионный период и в слоях II, III и V на 19,2,22,1,21,4% (P<0,05) соответственно – в отдаленный, при сравнении с аналогичными показателями у крыс без применения ИПостК (табл. 1). Результаты работы согласуются с результатами, полученными ранее при применении этого же протокола ИПостК для уровня фронтального среза мозга, соответствующего стереотаксическому атласу головного мозга крысы на уровне брегма -3.6 ± 0.2 мм [2, 10]. Цитопротективный эффект других протоколов ИПостК показан в ряде экспериментальных исследований при различных

Таблица 2

Уровень иммунореактивности к PECAM-1/CD31 в структурах слоев неокортекса крыс в различных экспериментальных группах

Table 2

The level of immunoreactivity to PECAM-1 / CD31 in the structures of the layers of the rat neocortex in various experimental groups

| Экспериментальная группа | Слой неокортекса | | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--|
| | II | III | V | |
| ЛО2 | 0,052± 0,005* | 0,083±0,004 | 0,078± 0,005 | |
| ЛО7 | 0,053± 0,004* | 0,083±0,003 | $0,079 \pm 0,004$ | |
| Ишемия2 | 0,066±0,003 ^α | 0,115±0,003 ^α | 0,091±0,003 ^α | |
| Ишемия7 | 0,086±0,004 ^β | $0,156\pm0,004^{\beta}$ | $0,122\pm0,005^{\beta}$ | |
| ИПостК2 | 0,071±0,005 | 0,120±0,005 | 0,093±0,004 | |
| ИПостК7 | 0,068±0,005+ | 0,112±0,004+ | 0,105±0,004+ | |

 Π р и м е ч а н и я: различия значимы * – по сравнению с показателями в слоях коры внутри группы при P<0,05; $^{\alpha}$ – по сравнению с показателями в группе «ЛО2» при P<0,05; $^{\beta}$ – по сравнению с показателями в группе «Ишемия2» при P<0,01; $^{+}$ – по сравнению с показателями в группе «Ишемия7» при P<0,05.

видах ишемического повреждения головного мозга [11, 12].

В группах ложнооперированных крыс «ЛО2» и «ЛО7» в структурах слоев II, III и V коры головного мозга были обнаружены различные уровни иммунореактивности к РЕСАМ-1/СD31 (табл. 2). При этом в обеих группах в слое II неокортекса отмечался значимо меньший уровень иммунореактивности к PECAM-1/CD31 по сравнению с аналогичными показателями в слоях III и V (P<0,05). Полученные результаты свидетельствуют об особенностях протекания метаболических процессов в каждом слое коры головного мозга крысы, которые могут зависеть от нейроглиального коэффициента и разветвленности микроциркуляторного русла. В других исследованиях также при помощи иммуногистохимического метода в неишемизированной коре головного мозга и в слоях полей и зубчатой извилины гиппокампа были обнаружены PECAM-1/CD31-позитивные структуры у крыс линии Sprague – Dawley и у песчанок монгольских (Meriones unguiculatus) [1, 8, 13, 14]. Кроме того, в проведенном нами ранее исследовании на песчанках монгольских было показано, что самый низкий уровень иммунореактивности PECAM-1/CD31 отмечался в структурах слоя III коры головного мозга [1]. Различия в уровне иммунореактивности к РЕСАМ-1/ CD31 структур отдельных слоев неокортекса у двух видов грызунов могут объясняться видовыми особенностями анатомического строения кровеносной системы головного мозга. У животных, имеющих видовую принадлежность к Meriones unguiculatus, кровоснабжение мозга осуществляется посредством незамкнутого виллизиева круга, а также передних и задних коммуникантных артерий с анастомозами между ними [15].

Ко 2-м суткам реперфузионного периода после 10-минутной глобальной ишемии головного мозга у крыс группы «Ишемия2» в структурах слоев II, III и V коры наблюдалось значимое увеличение уровня иммунореактивности к PECAM-1/CD31 на 27,8,

38,6 и 16,8 % (Р<0,05) соответственно, при сравнении с аналогичными показателями в группе «ЛО2» (табл. 2). Наибольшее нарастание иммунореактивности к PECAM-1/CD31 было установлено в структурах слоев II и III неокортекса, для которых ко 2-м суткам реперфузии отмечалось значимое снижение числа жизнеспособных нейронов. С одной стороны, это может объясняться наличием корреляции между уровнем иммунореактивности к PECAM-1/CD31 и степенью уязвимости нейронов к действию ишемии, показанной в нескольких исследованиях. Так, 7-минутная ишемия переднего мозга у песчанок монгольских в ранний реперфузионный период способствовала увеличению уровня иммунореактивности к PECAM-1/CD31 только в структурах слоев II и III коры мозга, в которых отмечалась гибель нейронов [1]. В другом исследовании, проведенном также на песчанках монгольских, было показано, что уровень иммунореактивности к PECAM-1/CD31 в микрососудах поля СА1, наиболее уязвимого для 5-минутной ишемии, был выше, чем в структурах полей СА2 и САЗ гиппокампа [8]. С другой стороны, в ранний реперфузионный период для слоя V неокортекса крысы уменьшения числа морфологически неизмененных нейронов не было обнаружено, но в этом слое также отмечалось значимое увеличение иммунореактивности к PECAM-1/CD31. Аналогичное отсутствие взаимосвязи между уязвимостью нейронов и нарастанием экспрессии белка PECAM-1/CD31 в структуре головного мозга, подвергшейся ишемическому повреждению, отмечалось в другом исследовании. Так, 5-минутная глобальная ишемия мозга у песчанок монгольских к 4-м суткам реперфузионного периода не приводила к гибели нейронов в полях СА2 и САЗ гиппокампа, однако в данной области отмечалось достоверное увеличение иммунореактивности к PECAM-1/CD31 при сравнении с ложнооперированными животными [8]. Полученные результаты и сведения литературы позволяют предположить, что увеличение иммунореактивности к PECAM-1/CD31 различной степени может свидетельствовать об особенностях восприимчивости структур головного мозга к ишемическому повреждению. Кроме того, это может носить компенсаторно-восстановительный характер и объясняться определенной степенью автономизации отдельной области мозга в ответ на повреждающее действие, позволяющей сохранить структуру мозга в целом.

К 7-м суткам реперфузионного периода в группе «Ишемия7» уровень иммунореактивности к РЕСАМ-1/CD31 в структурах слоев II, III и V значимо нарастал и был выше на 62,3, 87,5 и 54,2 % (Р<0,01) соответственно, при сравнении с таковым группе «ЛО7» (табл. 2). Сведения литературы о корреляции между PECAM-1/CD31 и длительностью реперфузионного периода после повреждающей ишемии противоречивы. Полученные нами результаты согласуются с результатами исследований, демонстрирующих нарастание экспрессии РЕСАМ-1/ CD31 при увеличении реперфузионного периода после повреждающей ишемии [1, 14, 16]. Так, при иммуногистохимическом анализе в коре поврежденной гемисферы было обнаружено увеличение уровня белка PECAM-1/CD31 уже через 6 и 24 ч с последующим нарастанием на 3-й, 7-й и 21-й день реперфузии после 30-минутной фокальной ишемии головного мозга у мышей [16]. Еще в одном исследовании [14] также было обнаружено увеличение уровня белка PECAM-1/CD31, выявленного иммуногистохимическим методом и при помощи Вестерн-блоттинга в молекулярном, полиморфном и слое гранулярных клеток зубчатой извилины гиппокампа на 4-е сутки после моделирования 5-минутной глобальной ишемии у песчанок монгольских. Однако существует исследование, показывающее, что 5-минутная ишемии головного мозга у песчанок монгольских через 12 ч реперфузии не способствует увеличению иммунореактивности к PECAM-1/CD31 в полиморфном, пирамидном и молекулярном слоях полей СА1, СА2 и СА3 гиппокампа. При этом уровень иммунореактивности к PECAM-1/CD31 в этих областях значительно увеличивался к 4-м суткам реперфузионного периода и к 5-м суткам значимо снижался [8].

Ко 2-м суткам реперфузионного периода при применении ИПостК после 10-минутной глобальной ишемии в группе «ИПостК2» уровень иммунореактивности к PECAM-1/CD31 в структурах слоев II, III и V неокортекса был сопоставим с таковым в группе «Ишемия2» (табл. 2). При этом для слоев II и III в группе «ИПостК2» отмечалось увеличение числа неизмененных нейронов по сравнению с группой «Ишемия2» (табл. 1). В отдаленный реперфузионный период после применения ИПостК у крыс группы «ИПостК7» уровень иммунореактивности к PECAM-1/CD31 в структурах слоев II, III и V был значимо ниже на 27,4, 39,4 и 16,7 % (P<0,05), coответственно, по сравнению с аналогичным показателем в группе «Ишемия7». В группе «ИПостК7» отмечалось достоверное увеличение числа морфологически неизмененных нейронов в слоях II, III и V по сравнению с группой «Ишемия7» (табл. 1). Цитопротективный эффект примененного протокола ИПостК после глобальной ишемии головного мозга у крыс в отдаленный реперфузионный период сопровождался изменением уровня иммунореактивности к РЕСАМ-1/CD31 в структурах слоев II, III и V неокортекса, в отличие от раннего реперфузионного периода. Следовательно, в механизмах физиологической реакции, формирующейся при применении ишемического посткондиционирования после ишемии головного мозга и приводящей к сохранению числа неизмененных нейронов в отдаленный реперфузионный период, задействован белок PECAM-1/CD31. Результаты, полученные в данном исследовании, проведенном на крысах Wistar, согласуются с результатами, полученными ранее при применении этого же протокола ИПостК у песчанок монгольских, только для отдаленного реперфузионного периода [1]. Различие в изменении уровня иммунореактивности к PECAM-1/CD31 в структурах слоев неокортекса в ранний реперфузионный период может объясняться неодинаковой реакцией в ответ на примененный протокол ИПостК, что, вероятно, обусловлено особенностями формирования адаптивно-приспособительных реакций в нервной ткани у двух видов грызунов со своим типом церебрального кровообращения при ишемическом повреждении.

Известно, что использование протективного потенциала ИПостК в клинической практике сдерживается не только малоизученностью данного феномена, но и отсутствием исследований, демонстрирующих воспроизводимость полученных результатов на различных экспериментальных моделях, видах животных, а также в зависимости от пола и возраста [17]. В данном исследовании было изучено влияние разработанного нами ранее протокола ИПостК [1] на изменение иммунореактивности к PECAM-1/CD31 при глобальной ишемии головного мозга у крыс. Эффект при применении одного и того же протокола ИПостК на уровень экспрессии PECAM-1/CD31 в структурах слоев неокортекса в отдаленный реперфузионный период после 10-минутной глобальной ишемии у крыс и 7-минутной ишемии переднего мозга у песчанок монгольских является однонаправленным. Это свидетельствует о том, что у животных, принадлежащих к разным систематическим группам, видовые различия касаются лишь степени выраженности, но не направленности адаптивных физиологических реакций, формирующихся при применении ИПостК.

РЕСАМ-1/СD31 обладает существенными молекулярно-биологическими свойствами и, вследствие этого, играет значительную роль во многих физиологических функциях организма. Известно, что РЕСАМ-1/СD31 в процессе воспаления обеспечивает экстравазацию лейкоцитов и усиливает миграцию нейтрофилов и лейкоцитов [6]; ингибирует апоптоз путем активации или подавления синтеза белков сигнальных путей [18]; участвует в сигнальной трансдукции и регулирует работу ионных каналов [19]. Кроме того, развивающиеся и зрелые клетки эндотелия сосудов экспрессируют РЕСАМ-1/СD31, поэтому этот белок часто рассматривают как биомаркер ангиогенеза кровеносных сосудов [7]. Однако

использование этой методологии имеет некоторое ограничение, поскольку неясно, наблюдаемое увеличение экспрессии PECAM-1/CD31 связано с развитием новых сосудов, или повышенная экспрессия происходит в клетках эндотелия исходных сосудов. Кроме того, недавно показано участие РЕСАМ-1/ CD31 в регулировании функционирования иммунных клеток и в ингибировании тромбоцитов, что негативно отражается на тромбопоэзе [19].

Выводы

- 1. Структуры в различных слоях коры головного мозга крыс Wistar обладают различным уровнем иммунореактивности к PECAM-1/CD31.
- 2. Полная 10-минутная глобальная ишемия головного мозга у крыс Wistar приводит к гибели нейронов слоев II, III и V коры, которая нарастает в отдаленный реперфузионный период и сопровождается увеличением уровня иммунореактивности к PECAM-1/CD31 в структурах этих слоев коры головного мозга.
- 3. Цитопротективный эффект ИПостК для слоев II, III и V коры головного мозга у крыс Wistar в отдаленный реперфузионный период сопровождается понижением уровня иммунореактивности к РЕСАМ-1/ CD31 в структурах этих слоев.

Таким образом, основываясь на результатах, полученных в представленном исследовании проведенном на крысах Wistar, и данных нашего недавнего исследования, проведенного на песчанках монгольских с применением идентичного протокола ИПостК [1], а также учитывая основные возможные механизмы реализации нейропротективного эффекта ИПостК головного мозга [20] и функциональную роль PECAM-1/CD31, можно предположить, что протективный потенциал изучаемого феномена в отдаленный реперфузионный период после глобальной ишемии головного мозга для слоев II, III и V коры неокортекса реализуется путем возможного ингибирования миграции нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов и экстравазации лейкоцитов из системного кровотока в поврежденную область головного мозга, т. е. через подавление воспалительного ответа.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии конфликта интере-COB. / The authors declare no conflict of interest.

Литература / References

- 1. Щербак Н. С., Русакова А. Г., Галагудза М. М. и др. Морфофункциональная характеристика микроциркуляторного русла и нейронов неокортекса после ишемического посткондиционирования // Морфология. – 2016. – Т. 49, № 5. – C. 21–27. [Shcherbak NS, Rusakova AG, Galagudza MM, Yukina GYu, Barantsevich ER, Tomson VV, Shlyakhto EV. Morphofunctional Characteristics of the Microcirculatory Bed and Neurons in the Neocortex after Ischemic Postconditioning. Morfologiia. 2016;49(5):21-27. (In Russ.)]. Doi: 10.1007/ s11055-016-0318-6.
- 2. Щербак Н. С., Овчинников Д. А., Галагудза М. М. и др. Влияние ишемического посткондиционирования на экспрессию белка Bcl-2 в нейронах неокортекса при глобальной ишемии-реперфузии головного мозга у крыс // Трансляц. медицина. -2016. -T. 3, № 1. -C. 63–72. [Shcherbak NS,

- Ovchinnikov DA, Galagudza MM, Yukina GYu, Barantsevich ER, Thomson VV, Shlyakhto EV. Influence Ischemic Postconditioning on Bcl-2 protein expression of neocortex neurons in global cerebral ischemia-reperfusion. Translyacionnaya medicina. 2016;3(1):63-72. (In Russ.)].
- 3. Hossmann KA. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. Ann Neurol. 1994;36(4):557-565. Doi: 10.1002/ana.410360404.
- 4. Васина Л. В., Петрищев Н. Н., Власов Т. Д. Эндотелиальная дисфункция и ее основные маркеры // Регионар. кровообрашение и микроииркуляция. – 2017. – Т. 16, № 1 (61). - C. 4-15. [Vasina LV, Petrishchev NN, Vlasov TD. Markers of endothelial dysfunction. Regionarnoe krovoobraŝenie i mikrocirkulâciâ. 2017;16(1(61):4–15. (In Russ.)].
- 5. Ge H, Wen Y, Yang G, Betz AL. Increased expression of intercellular adhesion molecule-1 in mouse focal cerebral ischemia model. Chin Med J. 2000;113(1):75-79.
- 6. Newman PJ. The biology of PECAM-1. J Clin Invest. 1997;99(1):3-8. Doi: 10.1172/JCI119129.
- 7. Marti HJ, Bernaudin M, Bellail A, Schoch H, Euler M, Petit E, Risau W. Hypoxia-induced vascular end othe lialgrowth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia. Am J Pathol. 2000;156(3):965–976. Doi: 10.1016/S0002-9440(10)64964-4.
- 8. Hwang IK, Kim DW, Yoo KY, Jung BK, Song JH, Jung JY, Choi SY, Kang TC, Lee JY, Kwon YG, Won MH. Ischemia-induced changes of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 in the hippocampal CA1 region in gerbils. Brain Res. 2005;1048(1-2):251-257. Doi: 10.1016/j. brainres. 2005.04.049.
- 9. Щербак Н. С., Галагудза М. М., Кузьменков А. Н. и др. Новый способ моделирования обратимой глобальной ишемии головного мозга у крыс // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2011. – Т. 152, № 11. – С. 592–595. [Shcherbak NS, Galagudza MM, Kuzmenkov AN et al. A new rat model of reversible global cerebral ischemia. Exp Biol Med. 2012 Mar; 152(5):656– 658. (In Russ.)]. Doi: 10.1007/s10517-012-1600-4.
- 10. Paxinos G, Watson Ch. The rat brain in stereotaxic coordinates. N.Y. Academic Press, 1998:474.
- 11. Ding ZM, Wu B, Zhang WQ, Lu XJ, Lin YC, Geng YJ, Miao YF. 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. Doi: 10.3390/ijms13056089.
- 12. Xing B, Chen H, Zhang M, Zhao D, Jiang R, Liu X, Zhang S. Ischemic postconditioning inhibits apoptosis after focal cerebral ischemia/reperfusion injury in the rat. Stroke. 2008;39(8):2362-2369. Doi: 10.1161/STROKEAHA. 107.507939.
- 13. Otsuka S, Sakakima H, Sumizono M, Takada S, Terashi T, Yoshida Y. The neuroprotective effects of preconditioning exercise on brain damage and neurotrophic factors after focal brain ischemia in rats. Behav Brain Res. 2016;303:9–18. Doi: 10.1016/j.bbr.2016.01.049.
- 14. Yoo KY, Hwang IK, Kim YS, Kwon DY, Won MH. Change in platelet endothelial cell adhesion molecule-1 immunoreactivity in the dentate gyrus in gerbils fed a folatedeficient diet. Genes Nutr. 2008;2(4):331–336. Doi: 10.1007/ s12263-007-0064-z.
- 15. Seal JB, Buchh BN, Marks JD. New variability in cerebrovascular anatomy determines severity of hippocampal injury following forebrain ischemia in the Mongolian gerbil. Brain Res. 2006;1073-1074:451-459. Doi: 10.1016/j. brainres.2005.12.024.
- 16. Deddens LH, van Tilborg GA, van der Toorn A, de Vries HE, Dijkhuizen RM. PECAM-1-targeted micron-sized particles of iron oxide as MRI contrast agent for detection of

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ (экспериментальные исследования) / ORIGINAL ARTICLES (experimental investigations)

vascular remodeling after cerebral ischemia. Contrast Media Mol Imaging. 2013;8(5):393–401. Doi: 10.1002/cmmi.1536.

17. Fisher M, Feuerstein G, Howells DW, Hurn PD, Kent TA, Savitz SI, Lo EH; STAIR Group. Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations. Stroke. 2009;40(6):2244–2250. Doi: 10.1161/STROKEAHA. 108.541128.

18. Brown S, Heinisch I, Ross E, Shaw K, Buckley CD, Savill J. Apoptosis disables CD31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment. Nature. 2002;418(6894):200–203. Doi: 10.1038/nature00811.

19. Feng YM, Chen XH, Zhang X. Roles of PECAM-1 in cell function and disease progression. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2016;20(19):4082–4088.

20. Ma XD, Song JN, Zhang M, An JY, Zhao YL, Zhang BF. Advances in research of the neuroprotective mechanisms of cerebral ischemic postconditioning. Int J Neurosci. 2015 Mar;125(3):161–169. Doi: 10.3109/00207454.2014.917413.

Сведения об авторах

Шербак Наталия Сергеевна — д-р биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории неотложной кардиологии НИИ сердечно-сосудистых заболеваний ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова» МЗ РФ, ведуший научный сотрудник лаборатории нанотехнологий Института экспериментальной медицины ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» МЗ РФ, e-mail: ShcherbakNS@yandex.ru.

Гурбо Анна Геннадьевна — лаборант-исследователь научноисследовательского отдела микроциркуляции и метаболизма миокарда Института экспериментальной медицины ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» МЗ РФ, e-mail: rusak.92.92@ mail ru

Юкина Галина Юрьевна – канд. биол. наук, зав. лабораторией патоморфологии Научно-исследовательского центра ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова» МЗ РФ, e-mail: pipson@inbox.ru.

Томсон Владимир Викторович – д-р мед. наук, профессор, директор Научно-исследовательского центра ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова» МЗ РФ, e-mail: nic.spb@mail.ru.

Шляхто Евгений Владимирович — д-р мед. наук, профессор, академик РАН, генеральный директор ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» МЗ РФ, зав. кафедрой терапии факультетской с курсом эндокринологии, кардиологии и функциональной диагностики с клиникой ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова» МЗ РФ, e-mail: e.shlyakhto@almazovcentre ru

Authors information

Shcherbak Natalia S. – Doctor of Biological Sciences, Senior Researcher Urgent Cardiology Laboratory of Institute of Cardiovascular Diseases First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, Leading Researcher Nanotechnology Laboratory of Institute Experimental Medicine Almazov National Medical Research Centre, e-mail: ShcherbakNS@yandex.ru.

Gurbo Anna G. – researcher of Laboratory of microcirculation and metabolism of the myocardium of Institute Experimental Medicine Almazov National Medical Research Centre, e-mail: rusak.92.92@mail.ru.

Yukina Galina Yu. – Candidate of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Pathomorphology of the Research Center Pavlov State Medical University, St. Petersburg, e-mail: pipson@inbox.ru.

Thomson Vladimir V. – Doctor of Medical Sciences, Professor, Director of the Research Center Pavlov State Medical University, St. Petersburg, e-mail: nic.spb@mail.ru.

Shlyakhto Eugeniy V. – Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, General Director of Almazov National Medical Research Centre, Head of the department of faculty therapy with a course of endocrinology, cardiology and functional diagnostics with a clinic First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, e-mail: e.shlyakhto@almazovcentre.ru.