

УДК 616-092.19

DOI: 10.24884/1682-6655-2020-19-2-59-66

Н. С. ЩЕРБАК, Г. Ю. ЮКИНА, Е. Г. СУХОРИУКОВА,
В. В. ТОМСОН

Влияние ишемического посткондиционирования на реакцию микроглии неокортекса при глобальной ишемии головного мозга у крыс

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
e-mail: ShcherbakNS@yandex.ru

Статья поступила в редакцию 14.03.20; принята к печати 22.04.20

Резюме

Введение. Ишемическое посткондиционирование (ИПостК) представляет собой новую концепцию в стратегии защиты головного мозга. Практически все исследования в этой области сосредоточены на изучении функционирования и выживаемости нейронов, в то время как ненейронные клетки, подвергшиеся влиянию ИПостК, остаются неизученными. **Цель** – исследовать влияние ИПостК после глобальной ишемии головного мозга на изменение микроглии в неокортексе крыс Wistar в различные периоды реперфузии. **Материалы 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 Iba-1-позитивных ядросодержащих микроглиоцитов в затылочной области (*occipital cortex*) коры головного мозга. **Результаты.** Показано, что глобальная ишемия головного мозга у крыс ко 2-м суткам реперфузионного периода в затылочной области неокортекса приводит к 25,9 % ($P<0,05$) гибели нейронов и увеличению на 30,9 % ($P<0,05$) числа Iba-1-позитивных клеток микроглии; к 7-м суткам реперфузии отмечается достоверное увеличение гибели нейронов на 34,5 % ($P<0,05$) и увеличение на 65,2 % ($P<0,05$) числа Iba-1-позитивных клеток микроглии по сравнению с аналогичными показателями в ложнооперированных группах. Установлено, что применение ИПостК ко 2-м суткам реперфузии способствует увеличению числа неизмененных нейронов в затылочной области коры головного мозга на 18,3 % ($P<0,05$), которое не сопровождается значимым изменением числа Iba-1-позитивных клеток микроглии, к 7-м суткам реперфузии отмечается увеличение числа неизмененных нейронов в проанализированной области головного мозга на 23,5 % ($P<0,05$), которое сопровождается уменьшением числа Iba-1-позитивных микроглиоцитов на 32,5 % ($P<0,05$) при сравнении с аналогичными показателями в группах без применения ИПостК. **Выводы.** Результаты проведенной работы позволяют предположить, что цитопротективный эффект ИПостК для нейронов затылочной области неокортекса крыс линии Wistar в отдаленный реперфузионный период реализуется посредством блокирования инфильтрации ишемизированной области мозга как резидентными, так и рекрутируемыми клетками иммунной системы.

Ключевые слова: неокортекс, нейрон, микроглиоциты, Iba-1, ишемия, ишемическое посткондиционирование, крысы Wistar

Для цитирования: Щербак Н. С., Юкина Г. Ю., Сухорукова Е. Г., Томсон В. В. Влияние ишемического посткондиционирования на реакцию микроглии неокортекса при глобальной ишемии головного мозга у крыс. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2020;19(2):59–66. Doi: 10.24884/1682-6655-2020-19-2-59-66.

UDC 616-092.19

DOI: 10.24884/1682-6655-2020-19-2-59-66

N. S. SHCHERBAK, G. Yu. YUKINA, E. G. SUKHORUKOVA,
V. V. THOMSON

Effect of ischemic postconditioning on reaction of neocortex microglia after global brain ischemia in rats

Pavlov University, Saint Petersburg, Russia
6-8, L'va Tolstogo street, Saint Petersburg, Russia, 197022
e-mail: ShcherbakNS@yandex.ru

Received 14.03.20; accepted 22.04.20

Summary

Introduction. Ischemic postconditioning (IPostC) is a new concept in the brain protection strategy. Almost all researches in this area focus on the functioning and survival of neurons, while non-neuronal cells affected by IPostC remain unexplored. **The aim** is to study the IPostC effect on changes in microglia in the neocortex of Wistar rats after global brain ischemia

during various periods of reperfusion. *Materials and methods.* Male Wistar rats were used as a model of a 10-minute global brain ischemia with a subsequent IPostC; the reperfusion-ischemia cycle was 15 s/15 s. In the early (2 days) and late (7 days) reperfusion periods, the number of morphologically unchanged neurons and Iba-1-positive nucleated microglia in the occipital cortex was estimated. *Results.* It has been shown that global brain ischemia in rats leads to 25.9% ($P < 0.05$) neuron death and an increase of 30.9% ($P < 0.05$) in the number of Iba-1-positive microglia cells by the 2nd day of the reperfusion period in the occipital neocortex; by the 7th day of reperfusion, there was observed a neuron death significant increasing by 34.5% ($P < 0.05$) and the number of Iba-1-positive microglia cells increasing of 65.2% ($P < 0.05$) compared to similar indicators in sham-operated groups. The IPostC by 2 days of reperfusion was found to increase the number of unchanged neurons in the occipital region of the cerebral cortex by 18.3% ($P < 0.05$), which is not accompanied by a significant change in the number of Iba-1-positive microglial cells; by 7 days of reperfusion the increase number of unchanged neurons was found to be 23.5% ($P < 0.05$) in the analysed brain region, which is accompanied by a decrease in the number of Iba-1-positive microglia by 32.5% ($P < 0.05$) comparing with similar indicators in groups without IPostC. *Conclusions.* The results of this work suggest that the cytoprotective effect of IPostC for neurons of the occipital neocortex of Wistar rats in the long-term reperfusion period is caused by blocking the infiltration of the ischemic brain region by both resident and recruited cells of the immune system.

Keywords: neocortex, neuron, microglia, Iba-1, ischemia, ischemic postconditioning, Wistar rats.

For citation: Shcherbak N. S., Yukina G. Yu., Sukhorukova E. G., Thomson V. V. Effect of ischemic postconditioning on reaction of neocortex microglia after global brain ischemia in rats. *Regional hemodynamics and microcirculation.* 2020;19(2):59–66. Doi: 10.24884/1682-6655-2020-19-2-59-66.

Введение

Ишемическое посткондиционирование (ИПостК) представляет собой новую концепцию в стратегии защиты головного мозга, основанную на применении не повреждающих кратковременных механических окклюзий церебральных артерий в период реперфузии после повреждающей ишемии [1]. ИПостК способно снижать степень повреждений вызванных реперфузией. В ранее проведенных нами исследованиях и в публикациях других авторов [2, 3] показано, что применение ИПостК на моделях ишемического повреждения головного мозга у различных видов экспериментальных животных способствует сохранению морфологически неизмененных нейронов, уменьшению зоны инфаркта, улучшению неврологического дефицита. Подавляющее большинство исследований ИПостК головного мозга до сих пор сосредоточены на изучении протективных эффектов и механизмов, направленных непосредственно на нейрон. При этом влияние ИПостК на клетки микро- и макроглии, эндотелия, а также взаимодействие этих клеток с нейронами остаются малоизученными.

Микроглия в ответ на вредные раздражители, в том числе ишемическое повреждение, претерпевает ряд преобразований, включая пролиферацию, изменение морфологических характеристик формы клеточного тела, длины отростков, уровень выделения провоспалительных цитокинов и экспрессию различных антигенов на клеточной поверхности [4, 5]. Активация микроглии имеет двойственное значение. С одной стороны, микроглия, являясь резидентными макрофагами головного мозга, защищает от вторгающихся микроорганизмов, участвует в восстановлении и регенерации поврежденных нейронов путем выделения ряда факторов, способствующих достижению гомеостаза [6]. В то же время микроглия может приводить к дисфункции и гибели нейронов путем выделения большого количества цитотоксических и воспалительных медиаторов. Развитие нейровоспаления включает в себя активацию микроглии с последующим высвобождением цитокинов, хемокинов, оксида азота, образованием активных форм кислорода, что приводит к изменению проницаемости гематоэнцефалического барьера и прогрессированию повреждения [7, 8]. Одним из возможных способов нейропротекции может

быть воздействие на ключевые механизмы развития нейровоспаления. К настоящему времени проведено всего лишь несколько исследований, посвященных изучению влияния ИПостК на реакцию микроглии при ишемическом и реперфузионном повреждении головного мозга, при этом результаты этих исследований противоречивы [9–11].

Специфическим маркером микроглии является кальций-связывающий белок Iba-1 (ionized calcium-binding adapter molecule-1), который высоко экспрессируют клетки активированной и «покоящейся» микроглии [6]. Показано, что белок Iba-1 принимает участие в ряде сигнальных путей микроглии и, предположительно, участвует в его подвижности, а также задействован в процессе фагоцитоза [12]. Сведения о количестве и гистологической локализации микроглии в структурах мозга, их морфологической характеристике очень важны для определения роли микроглии в механизмах формирования адаптивно-приспособительных реакций при применении ИПостК в различные реперфузионные периоды после ишемического повреждения головного мозга.

Цель – исследовать влияние ишемического посткондиционирования после глобальной ишемии головного мозга на изменение микроглии в неокортексе крыс Wistar в различные периоды реперфузии.

Материалы и методы исследования

Все эксперименты были проведены в соответствии с принципами Европейской конвенции (Страсбург, 1986 г.), и Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными (1996) и Этического комитета ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ им. И. П. Павлова» Минздрава России, а также в соответствии с требованиями Постановления Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 29.08.2014 г. № 51 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)».

Экспериментальные животные. Исследование выполнено на самцах крыс Wistar в возрасте 4–5 месяцев и массой тела 250–290 г (питомник «Рапполово» РАН, Ленинградская область), наркотизированных хлоралгидратом (450 мг/кг, внутривенно). Животные

содержались в условиях 12/12-часового свето-темнового режима при температуре 22 ± 1 °C и получали стандартный корм и питьевую воду *ad libitum*.

Моделирование обратимой глобальной ишемии головного мозга. Обратимую полную глобальную ишемию головного мозга у крыс моделировали по методике, описанной ранее, путем 10-минутной окклюзии магистральных артерий: плечеголового ствола, левой подключичной артерии и левой общей сонной артерии с последующим реперфузионным периодом длительностью 2 и 7 суток [13]. ИПостК создавали путем трехкратного, по 15 с, наложения и снятия микрохирургических зажимов на артерии непосредственно после полной ишемии мозга. Выбор протокола индуцирования ИПостК был основан на ранее проведенных исследованиях [2]. При проведении ложной операции осуществляли аналогичные манипуляции, но без наложения микрохирургических зажимов на артерии. Животные случайным образом были распределены на экспериментальные группы: 1) длительность реперфузионного периода – 2 суток: «ЛО2» (n=7) – ложнооперированные 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.

Гистологический анализ. После завершения реперфузионного периода животных из каждой группы повторно наркотизировали, извлекали головной мозг и нарезали его на сегменты, используя фронтальную матрицу для головного мозга мелких грызунов (WPI, США). Срезы мозга фиксировали в 10 %-м нейтральном формалине и заливали в парафин по стандартной методике. Фронтальные срезы головного мозга толщиной 3 мкм, соответствующие стереотаксическому атласу головного мозга крысы (брегма – $3,6 \pm 0,2$ мм), окрашивали гематоксилином и эозином для обзорного исследования препаратов. Для морфометрического анализа препараты окрашивали толуидиновым синим по методу Ниссля.

Иммуногистохимический анализ. Иммуногистохимическим методом, используя первичные поликлональные козы антитела к антигену Iba-1, маркеру микроглии (ab107159; AbCam, Великобритания) выявляли микроглиоциты по методике, описанной ранее [14]. После депарафинирования и регидратации срезы были подвергнуты процедуре теплового демаскирования в цитратном буфере pH 6,1 (Aligent Technologies, США). Инкубацию с первичными антителами к Iba-1 в разведении 1:2000 проводили в течение 45 мин при комнатной температуре. Разбавление первичных антител до рабочей концентрации проводили при помощи разбавителя антител, содержащего компонент, уменьшающий фоновую реакцию (Antibody diluent with background reducing component (Aligent Technologies, США). Для связывания первичных антител применяли набор реагентов R.T.U. VECTASTAIN Universal Quick Kit Catalog № PK-7800 (США). Для подавления неспецифической фоновой реакции использовали реагент Protein Block из набора Reveal Polyvalent HPR

DAB Detection System (Spring Bioscience, США). Визуализацию продукта реакции проводили при помощи хромогена DAB+ (Diagnostic BioSystems, Нидерланды). Препараты докрашивали гематоксилином Майера (Bio-Optica, Италия).

Анализ полученных препаратов и фотосъемку выполняли, используя микроскоп Leica DM750 и цифровую фотокамеру ICC50 (Leica, Германия), с помощью программного обеспечения ImageScope M (компания «Системы для микроскопии и анализа», Москва, Россия) на нескольких срезах головного мозга при увеличении $\times 400$ (об. 40, ок. 10), в поле зрения $0,33 \times 0,25$ мм подсчитывали количество морфологически неизмененных нейронов и Iba-1-позитивных ядросодержащих микроглиоцитов в затылочной области (*occipital cortex*) коры головного мозга. Полученный показатель пересчитывали на 1 мм^2 коры головного мозга. Нейроны оценивали в соответствии с существующими критериями оценки: четко очерченное ядро эллипсоидной или округлой формы; ясно различимые ядрышки; ядро немного темнее, чем окружающий нейропил; четкие границы перикариона нейронов.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программ «Statistica 6.0» (StatSoft, Inc.) и «Microsoft Excel 2003». Вычисляли среднее арифметическое значение и его стандартную ошибку ($M \pm m$). После проверки распределения на нормальность значимость различий между группами оценивали с помощью t-критерия Стьюдента или U-критерия Манна – Уитни. Различия учитывали как значимые при $P < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

При морфологическом исследовании затылочной области (*occipital cortex*) коры головного мозга крыс Wistar цитоархитектоническое строение характеризовалось наличием всех 6 слоев клеток различной величины. При этом отмечалось отсутствие четких границ между слоями и преимущественное развитие слоев I–III и V–VI. Различий в плотности нейронов в двух ложнооперированных группах – «ЛО2» и «ЛО7» – обнаружено не было (таблица).

После проведения иммуногистохимической реакции в группах ложнооперированных крыс «ЛО2» и «ЛО7» во всех слоях неокортекса отмечались типичные Iba-1-позитивные клетки микроглии, имеющие характерную для микроглиоцитов структурную организацию. В слоях неокортекса преобладали микроглиоциты с маленьким клеточным телом продолговато- или овально-звездчатой, изредка веретенообразной, формы, и в большинстве своем они были с длинными тонкими разветвленными отростками. Средняя плотность ядросодержащих Iba-1-позитивных микроглиоцитов в неокортексе групп крыс «ЛО2» и «ЛО7» составляла $71,5 \pm 4,2$ и $73,9 \pm 3,6$ соответственно на единицу площади. Кроме того, все слои неокортекса проанализированной области содержали Iba-1-позитивные структуры в виде тонких отростков и участков цитоплазмы микроглиоцитов.

Глобальная полная 10-минутная ишемия головного мозга ко 2-м суткам реперфузионного периода

Число морфологически неизмененных нейронов и Iba-1-позитивных микроглиоцитов в неокортексе крыс Wistar в различные периоды реперфузии после глобальной ишемии головного мозга с последующим применением ишемического посткондиционирования ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ на 1 мм² на срезе)

The number of morphologically unchanged neurons and Iba-1-positive microglial cells in the neocortex of Wistar rats during various periods of reperfusion after global brain ischemia followed by the use of ischemic postconditioning ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ on 1 mm² on a cut)

Экспериментальная группа	Число клеток	
	морфологически неизмененные нейроны	Iba-1-позитивные микроглиоциты
«ЛО2»	383,6±24,2	71,5±4,2
«ЛО7»	395,3±25,6	73,9±3,6
«Ишемия2»	284,2±22,8*	93,6±6,2*
«Ишемия7»	258,9±23,8 ^а	122,1±5,6 ^{а, β}
«ИПостК2»	336,2±21,6 ^β	87,8±6,0
«ИПостК7»	319,7±22,5 ^γ	82,4±4,2 ^γ

Примечание: различия значимы: * – по сравнению с показателем в группе «ЛО2» при $P < 0,05$; ^а – по сравнению с показателем в группе «ЛО7» при $P < 0,05$; ^β – по сравнению с показателем в группе «Ишемия2» при $P < 0,05$; ^γ – по сравнению с показателем в группе «Ишемия7» при $P < 0,05$.

приводила к формированию диффузного повреждения. В анализируемой области неокортекса наблюдался периваскулярный и перицеллюлярный отек, отмечалось морфологическое изменение нейронов в виде их набухания или сморщивания, наличия хроматолиза, гиперхроматоза и кариолизиса. Общая плотность морфологически неизмененных нейронов неокортекса в группе «Ишемия2» значимо уменьшалась на 25,9 % ($P < 0,05$) по сравнению с аналогичным показателем в группе «ЛО2» (таблица). В отдаленный реперфузионный период полная глобальная 10-минутная ишемия способствовала значительному нарастанию уменьшения числа морфологически неизмененных нейронов неокортекса на 34,5 % ($P < 0,05$) при сравнении с таковым в группе ложнооперированных животных «ЛО7» (таблица). Ко 2-м суткам реперфузии после глобальной ишемии в неокортексе крыс группы «Ишемия2» наблюдалось достоверное увеличение числа микроглиоцитов на 30,9 % ($P < 0,05$) по сравнению с показателем в группе ЛО2 (таблица). При этом во всех слоях неокортекса Iba-1-позитивные клетки микроглии претерпевали морфологические изменения. При визуальной качественной оценке у большей части клеток отмечалось увеличение клеточного тела, утолщение и укорочение отростков, также наблюдалось небольшое число микроглии с округлым телом клетки, единичные микроглиоциты сохраняли свою форму. Увеличение реперфузионного периода до 7-х суток сопровождалось нарастанием числа микроглиоцитов на 65,2 и 30,4 % ($P < 0,05$) по сравнению с таковым в группе «ЛО7» и «Ишемия2» соответственно (таблица). Большинство микроглиоцитов характеризовались наличием гипертрофированного клеточного тела округло-овальной формы с утолщенными и укороченными отростками, встречались микроглиоциты с веретеновидной формой тела. Кроме того, наблюдались амебоидные микроглиоциты, при этом часть клеток микроглии сохраняли характерную для интактного неокортекса форму.

Применение ишемических посткондиционирующих стимулов после 10-минутной глобальной

ишемии ко 2-м суткам реперфузии способствовало значимому увеличению числа морфологически неизмененных нейронов в неокортексе на 18,3 % ($P < 0,05$) при сравнении с аналогичным показателем в группе «Ишемия2». В отдаленный реперфузионный период после применения ИПостК также отмечалось существенное увеличение неизмененных нейронов на 23,5 % ($P < 0,05$) при сравнении с таковым в группе «Ишемия7» (таблица). После применения ИПостК ко 2-м суткам реперфузионного периода у крыс группы «ИПостК2» значимого изменения в количестве микроглиоцитов неокортекса на единицу площади по сравнению с аналогичным показателем в группе «Ишемия2» не обнаружено (таблица). При качественной визуальной оценке различий в морфологической характеристике Iba-1-позитивных клеток микроглии в группах «Ишемия2» и «ИПостК2» не наблюдалось. К 7-м суткам реперфузионного периода после применения ИПостК, в группе «ИПостК7», число микроглиоцитов существенно снижалось на 32,5 % ($P < 0,05$) при сравнении с группой «Ишемия7» (таблица). При визуальном анализе морфологических изменений микроглиоцитов отмечалось уменьшение размера клеточного тела и увеличение разветвленности отростков.

Исследование проведено на модели обратимой полной глобальной ишемии головного мозга у крыс. Результаты, полученные с использованием данной модели, необходимы при разработке новых способов защиты головного мозга в ряде ситуаций клинической практики: при внезапной остановке сердца, при проведении кардиохирургических операций в условиях экстракорпорального кровообращения, при проведении операций на сосудах головы и шеи, при асфиксии новорожденных.

Глобальная полная 10-минутная ишемия головного мозга у крыс, сформированная путем окклюзии магистральных артерий, отходящих от дуги аорты, способствовала развитию типичного мозаично-диффузного повреждения нейронов неокортекса. Гибель нейронов нарастала с увеличением продолжительности периода реперфузии, что объясняется феноменом

отсроченной гибели нейронов [15]. Полученные нами результаты [2, 3, 16] согласуются с результатами других исследований, в которых показано, что нейроны неокортекса уязвимы к повреждающему действию обратимой глобальной ишемии головного мозга. При помощи иммуногистохимического анализа нами было показано, что обратимая глобальная ишемия головного мозга у крыс Wistar в ранний и отдаленный реперфузионный периоды сопровождалась увеличением числа Iba-1-позитивных микроглюцитов и изменением их морфологической характеристики. Наблюдаемые изменения морфологии микроглюцитов в виде гипертрофии клеточного тела, изменения его формы соответствуют сведениям литературы [14, 17], в которой описаны морфологические характеристики микроглюцитов неокортекса крысы в норме и при различных типах ишемического повреждения головного мозга. Микроглия в зависимости от полученного сигнала и локального окружения может претерпевать различные изменения в морфологии и функции. По морфологическим признакам подразделяют от трех до пяти основных типов микроглии: покоящаяся с тонкими ветвящимися отростками, промежуточная с утолщенными и укороченными отростками, активированная с гипертрофированным клеточным телом, амeboидная и реактивная без псевдоподий и ветвящихся отростков [17, 18]. Наблюдаемые нами изменения морфологии и числа микроглюцитов указывают на то, что микроглиальные клетки трансформировались из покоящего в активированное состояние в ответ на ишемию-реперфузию. При этом увеличение числа Iba-1-позитивных микроглюцитов возрастало с повышением дефицита нейронов в неокортексе и было максимальным в отдаленный реперфузионный период. В других исследованиях, проведенных с использованием различных маркеров микроглии [19–21], было также показано, что при глобальном ишемическом повреждении головного мозга изменения в морфологии и функции микроглии различных структур либо тесно коррелируют с развитием отсроченной гибели нейронов, либо ей предшествуют. Так, после моделирования 5-минутной ишемии переднего мозга у монгольских песчанок число дегенерирующих нейронов в зубчатой извилине гиппокампа, выявленных при помощи флюоресцентной Fluoro-Jade В-окраски, отмечался через 6 ч после ишемии и заметно нарастал к 1-м суткам. В ранние сроки реперфузии микроглюциты в слоях зубчатой извилины были гипертрофированы, отмечалось увеличение их числа, при этом наивысший уровень иммунореактивности Iba-1-позитивных структур был отмечен на 2-е сутки реперфузионного периода [19]. Однако авторы статьи наблюдаемое увеличение числа микроглюцитов указали только в качественном описании, при этом не приводя конкретные значения. В другом исследовании [20], используя моноклональные антитела к рецептору комплемента типа 3 (OX-42), белку главного комплекса гистосовместимости класса II (МНС II), и к двум белкам 62 и 70 кДа микроглюцитов крыс (MUC 101 и 102 соответственно) изучали микроглиальную реакцию после 30-минутной глобальной ишемии головного мозга у крыс Wistar,

индуцированной при помощи 4-сосудистой модели. В 1-е сутки после ишемии во фронтотрипаретальной области коры головного мозга поврежденных нейронов обнаружено не было, но наблюдались МНС II-позитивные клетки микроглии, которые почти отсутствовали в покоящейся микроглии. К 7-м суткам реперфузионного периода в коре наблюдался значимый дефицит нейронов, и отмечалось увеличение числа OX-42-, MUC 101- и MUC-102-позитивных микроглюцитов [20]. У песчанок монгольских 5-минутная ишемия переднего мозга в поле СА1 гиппокампа через 30 мин реперфузии приводила к значительному увеличению уровня оптической плотности Iba-1-позитивных структур, которое понижалось через 3 ч, затем, к 7-м суткам реперфузионного периода, иммунореактивность достигла максимального уровня и к 10-м суткам периода существенно снижалась [21]. Известно, что гибель нейронов в поле СА1 гиппокампа после 5–7-минутной ишемии развивается со 2-го по 7-й день реперфузионного периода [2, 15]. Кроме того, микроглиальная активация существенным образом меняется не только в зависимости от области головного мозга и длительности реперфузии, но также зависит от степени ишемического повреждения и возраста экспериментального животного [22, 23]. Так, было показано, что у песчанок монгольских глобальная ишемия переднего мозга, моделируемая путем окклюзии двух общих сонных артерий на 5, 10 и 15 мин, к 4-м суткам реперфузионного периода способствовала нарастанию числа Iba-1-позитивных микроглюцитов в слоях неокортекса в зависимости от длительности ишемии [22]. В исследованиях на старых монгольских песчанках было обнаружено, что после моделирования 5-минутной ишемии переднего мозга активация микроглии происходит позже, но интенсивнее, чем у взрослых животных [23]. Основываясь на результатах исследований, доказывающих, что активация микроглии предшествует гибели нейронов, можно предположить о ее ведущей роли в механизмах реализации феномена отсроченной гибели нейронов [15, 20, 21].

Применение ИПостК после полной глобальной обратимой ишемии головного мозга у крыс способствовало значимому увеличению числа морфологически неизмененных нейронов неокортекса в раннем и отдаленном реперфузионных периодах. Цитопротективный эффект использованного протокола ИПостК, а также других протоколов применения коротких ишемических воздействий после повреждающей ишемии был показан ранее в исследованиях на различных моделях ишемического повреждения головного мозга у нескольких видов экспериментальных животных [1–3]. Уменьшение дефицита морфологически неизмененных нейронов после применения ИПостК ко 2-м суткам реперфузионного периода сопровождалось незначительным снижением числа микроглюцитов без выраженных изменений их морфологической характеристики по сравнению с группой без применения ИПостК. В отдаленный реперфузионный период после применения ИПостК было установлено снижение числа микроглюцитов в окципитальной области коры головного мозга крыс.

Гетерогенность активированных клеток микроглии и их некоторое снижение ко 2-м суткам с последующим значимым уменьшением к 7-м суткам реперфузии позволяет сделать предположение о том, что применение ИПостК, вероятно, уменьшает и смещает пик активации микроглии, что способствует увеличению числа морфологически неизменных нейронов. В ишемизированном головном мозге в процессе развития нейровоспаления происходит увеличение нейтрофилов и макрофагов, сопровождаемое избытком свободных радикалов, способствующих нарастанию повреждения. Макрофаги ишемизированного головного мозга могут быть сформированы как из микроглии, так и из циркулирующих моноцитов [9]. Известно, что Iba-1 также является селективным маркером макрофагов [14]. Результаты нашего исследования позволяют сделать предположение о том, что ИПостК в отдаленный период реперфузии способствует сдерживанию увеличения числа клеток микроглии и макрофагов, таким образом предотвращая вторичное повреждение головного мозга. Результаты по уменьшению числа клеток микроглии после применения ИПостК, полученные в нашем исследовании, согласуются с результатами других исследований, проведенных на других моделях ишемического повреждения и видах кондиционирования. Так, в исследовании [9] при использовании молекулярного маркера CD45 было показано, что применение ИПостК после 45-минутной фокальной ишемии головного мозга у мышей к 3-м суткам реперфузии приводило к уменьшению зоны инфаркта и снижению в зоне пенумбры числа как микроглиоцитов, так и макрофагов моноцитарного происхождения. Ранее при поиске способов идентификации субпопуляций моноцитов/макрофагов при ишемическом повреждении головного было обнаружено, что макрофаги, сформировавшиеся из циркулирующих моноцитов, могут быть идентифицированы по высокому уровню экспрессии антигена CD45 (CD45^{hi}), в то время как для клеток микроглии характерен низкий уровень экспрессии этого белка [24]. После ишемического повреждения сетчатки глаза у крыс линии Sprague-Dawley применение монооксида углерода (CO) в виде посткондиционирования ко 2-м суткам реперфузии приводило к цитопротективному эффекту для ганглиозных клеток сетчатки и значимому снижению числа амебоидной и разветвленной микроглии, идентифицированной при помощи Iba-1 [10]. Дальнейшие исследования должны будут решить вопрос о том, что уменьшение числа Iba-1-позитивных микроглиоцитов при применении различных типов кондиционирования при ишемическом повреждении обусловлено подавлением активации резидентной микроглии или осуществляется за счет ингибирования рекрутируемых циркулирующих моноцитов. Однако существует исследование, в котором было показано, что ИПостК в виде однократного воздействия реперфузией/реокклюзией по 10 мин, выполненное после 100-минутной фокальной ишемии головного мозга у крыс, к 3-м суткам реперфузии способствовало уменьшению объема инфаркта головного мозга. При этом в зоне пенумбры при проведении качественной визуальной

оценки Iba-1-позитивных микроглиоцитов отмечалось смещение их числа в разветвленную морфологию. Кроме того, после применения ИПостК в зоне пенумбры при проведении двойной иммуноцитохимической реакции с антителами к Iba-1 и к CD206, как маркеру макрофагов M2-фенотипа, было установлено увеличение числа Iba-1/CD206-позитивных клеток [11]. Поскольку известно, что M1-макрофаги обладают провоспалительными свойствами, обеспечивают защиту от патогенов, однако при этом являются нейродеструктивными; M2-клетки, напротив, обеспечивают нейропротекцию. Авторы выдвинули предположение, что протективный эффект ИПостК может реализоваться за счет поляризации микроглии до полезного фенотипа [11].

В нашем исследовании для рассмотрения изменения микроглии применяли иммуногистохимический метод с последующей количественной оценкой числа Iba-1-позитивных микроглиоцитов и качественным анализом их морфологической характеристики в неокортексе крыс. Белок Iba-1 специфически и конститутивно экспрессируется во всех клетках микроглии [6, 12, 14]. Активация микроглии связана с повышенной экспрессией белка Iba-1, поэтому многие авторы уровень иммунореактивности к Iba-1 в отдельных областях головного мозга используют как критерий уровня активации микроглии [19, 23]. Однако, по мнению других авторов [25], морфологические изменения клеток микроглии могут возникать без существенного изменения уровня иммунореактивности к Iba-1, поэтому денситометрия не дает никакой конкретной информации о характере морфологических изменений. Также в качестве критерия используют стадии активации микроглии в интересующей области мозга с последующим представлением в процентах от общего числа клеток микроглии [25]. Данный метод также имеет свои недостатки: во-первых, многие авторы, впервые представляющие описание активированных клеток микроглии отдельных областей мозга при различных воздействиях, выделяют от 3 до 5 типов клеток микроглии; во-вторых, исследователь для анализа может брать произвольную стадию активации, что не позволяет сопоставлять полученные результаты с результатами других исследований; в третьих, есть некоторый процент субъективизма при интерпретации морфологических характеристик клеток для определения стадии активации микроглии. Дальнейшие исследования, посвященные изучению активации микроглии и ее изменений при применении ИПостК, помимо дополнительной информации о морфологических характеристиках микроглиоцитов, таких как площадь тела клетки, размер клетки, соотношение размеров клеток, как критерий степени активации, длина и толщина отростков, должны проводиться в сочетании с другими молекулярными маркерами, связанными с активацией микроглии. Кроме того, внимание исследователей должно быть сфокусировано на изучении изменений микроглии в структурах головного мозга, обладающих разной чувствительностью к действию ишемии, в различные сроки реперфузионного периода, при различных типах ишемического повреждения мозга, видах животных,

а также в зависимости от пола и возраста. К тому же предстоит выяснить, ингибирует ли ИПостК активацию клеток микроглии или этот ингибирующий эффект является индикатором других защитно-адаптивных реакций организма, индуцированных ИПостК, способствующих уменьшению гибели нейронов.

Выводы

Основываясь на полученных нами результатах, можно сделать следующие выводы.

1. Полная 10-минутная глобальная ишемия головного мозга у крыс Wistar приводит к дефициту морфологически неизмененных нейронов в коре, который с увеличением реперфузионного периода нарастает и сопровождается увеличением числа Iba-1-позитивных клеток микроглии и их морфологическими преобразованиями.

2. Цитопротективный эффект примененного протокола ИПостК для неокортекса крыс Wistar в отдаленный реперфузионный период сопровождается уменьшением числа Iba-1-позитивных микроглиоцитов.

Таким образом, результаты проведенной работы позволяют предположить, что цитопротективный эффект ИПостК для нейронов неокортекса крыс линии Wistar в отдаленный реперфузионный период после полной глобальной ишемии головного мозга реализуется через механизм ингибирования аккумуляции как резидентной микроглии, так и циркулирующих адаптивных иммунных клеток в ишемизированной области мозга, предотвращая вторичное повреждение.

Финансирование работы

Работа выполнена в рамках темы государственного задания «Совершенствование методов, направленных на ограничение ишемического повреждения миокарда и головного мозга и выявление механизмов эффективного функционального восстановления», номер госрегистрации № АААА-А18-118070690075-6.

Конфликт интересов / Conflict of interest

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

Литература / References

1. Zhao H. Ischemic postconditioning as a novel avenue to protect against brain injury after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009;29:873–885. Doi: 10.1038/jcbfm.2009.13.
2. 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. – С. 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. *Neurosci Behav Physiol.* 2016;47:841–845. (In Russ.)]. Doi: 10.1007/s11055-017-0479-y.
3. 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.

4. Calcia MA, Bonsall DR, Bloomfield PS, Selvaraj S, Barichello T, Howes OD. Stress and neuroinflammation: a systematic review of the effects of stress on microglia and the implications for mental illness. *Psychopharmacology (Berl).* 2016;233(9):1637–1650. Doi: 10.1007/s00213-016-4218-9.

5. Структурная организация микроглиоцитов стриатума после транзиторной фокальной ишемии / Д. Э. Коржевский, О. В. Курик, Е. Г. Сухорукова, Т. Д. Власов // *Морфология.* – 2012. – Т. 141, № 2. – С. 28–32. [Korzhevskii DE, Kirik OV, Sukhorukova EG, Vlasov TD. Structural organization of microgliosis striatum after transient focal ischemia. *Morfologiya.* 2012;141(2):28–32. (In Russ.)].

6. Frick LR, Williams K, Pittenger C. Microglial dysregulation in psychiatric disease. *Clin Dev Immunol.* 2013;608654. Doi: 10.1155/2013/608654.

7. Nakajima K, Kohsaka S. Functional roles of microglia in the brain. *Neurosci. Res.* 1993;17:187–203. Doi: 10.1016/0168-0102(93)90047-T.

8. Boje KM, Arora PK. Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain Res.* 1992;587:250–256. Doi: 10.1016/0006-8993(92)91004-X.

9. Joo SP, Xie W, Xiong X, Xu B, Zhao H. Ischemic postconditioning protects against focal cerebral ischemia by inhibiting brain inflammation while attenuating peripheral lymphopenia in mice. *Neuroscience.* 2013;243:149–157. Doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.03.062.

10. Ulbrich F, Goebel U, Böhringer D, Charalambous P, Lagrèze WA, Biermann J. Carbon monoxide treatment reduces microglial activation in the ischemic rat retina. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2016;254(10):1967–1976. Doi: 10.1007/s00417-016-3435-6.

11. Esposito E, Hayakawa K, Ahn BJ, Chan SJ, Xing C, Liang AC, Kim KW, Arai K, Lo EH. Effects of ischemic postconditioning on neuronal VEGF regulation and microglial polarization in a rat model of focal cerebral ischemia. *J Neurochem.* 2018;146(2):160–172. Doi: 10.1111/jnc.14337.

12. Ohsawa K, Imai Y, Kanazawa H, Sasaki Y, Kohsaka S. Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia. *J Cell Sci.* 2000;113:3073–3084.

13. 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, Ovchinnikov DA, Mitrofanova LB, Barantsevich ER, Shlyakhto EV. 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.

14. Сухорукова Е. Г., Курик О. В., Коржевский Д. Э. Применение иммуногистохимического метода для выявления микроглии головного мозга в парафиновых срезах // *Бюл. эксперим. биологии и медицины.* – 2010. – Т. 149, № 6. – С. 709–712. [Suchorukova EG, Kirik OV, Korzhevskii DE. The use of immunohistochemical method for detection of brain microglia in paraffin sections. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2010;149(6):768–770. (In Russ.)].

15. Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.* 1982;239:57–69. Doi: 10.1016/0006-8993(82)90833-2.

16. Pulsinelli WA, Buchan AM. The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. *Stroke.* 1988;19:913–914. Doi: 10.1161/01.STR.19.7.913.

17. Davis EJ, Foster TD, Thomas WE. Cellular forms and functions of brain microglia. *Brain Res. Bull.* 1994;34:73–78. Doi: 10.1016/0361-9230(94)90189-918.

18. Хожай Л. И., Отеллин В. А. Реактивные изменения микроглии в неокортексе и гиппокампе у крыс после воздействия острой перинатальной гипоксии // *Морфология*. – 2013. – Т. 143, № 1. – С. 23–27. [Khozhai LI, Otellin VA. Reactive microglial changes in rat neocortex and hippocampus after exposure to acute perinatal hypoxia. *Morphology*. 2013;143(1):23–27. (In Russ.)].

19. Moon JB, Lee CH, Park CW, Cho JH, Hwang IK, Yoo KY, Choi JH, Shin HC, Won MH. Neuronal degeneration and microglial activation in the ischemic dentate gyrus of the gerbil. *J Vet Med Sci*. 2009;71(10):1381–1386. Doi: 10.1292/jvms.001381.

20. Gehrmann J, Bonnekoh P, Miyazawa T, Hossmann KA, Kreutzberg GW. Immunocytochemical study of an early microglial activation in ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1992;12(2):257–269. Doi: 10.1038/jcbfm.1992.36.

21. Hwang IK, Yoo KY, Kim DW, Choi SY, Kang TC, Kim YS, Won MH. Ionized calcium-binding adapter molecule 1 immunoreactive cells change in the gerbil hippocampal CA1 region after ischemia/reperfusion. *Neurochem Res*. 2006;31(7):957–965. Doi: 10.1007/s11064-006-9101-3.

22. Lee JC, Ahn JH, Lee DH, Yan BC, Park JH, Kim IH, Cho GS, Kim YM, Lee B, Park CW, Cho JH, Lee HY, Won MH. Neuronal damage and gliosis in the somatosensory cortex induced by various durations of transient cerebral ischemia in gerbils. *Brain Res*. 2013;1510:78–88. Doi: 10.1016/j.brainres.2013.03.008.

23. Lee CH, Yoo KY, Choi JH, Park OK, Hwang IK, Kim SK, Kang IJ, Kim YM, Won MH. Neuronal damage is much delayed and microgliosis is more severe in the aged hippocampus induced by transient cerebral ischemia compared to the adult hippocampus. *J Neurol Sci*. 2010;294(1–2):1–6. Doi: 10.1016/j.jns.2010.04.014.

24. Gliem M, Mausberg AK, Lee JI, Simiantonakis I, van Rooijen N, Hartung HP, Jander S. Macrophages prevent hemorrhagic infarct transformation in murine stroke models. *Ann Neurol*. 2012;71(6):743–752. Doi: 10.1002/ana.23529.

25. Hovens I, Nyakas C, Schoemaker R. A novel method for evaluating microglial activation using ionized calcium-binding adaptor protein-1 staining: cell body to cell size ratio. *Neuroimmunol. Neuroinflamm*. 2014;1:82–88. Doi: 10.4103/2347-8659.139719.

Информация об авторах

Шербак Наталия Сергеевна – д-р биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории неотложной кардиологии НИИ сердечно-сосудистых заболеваний, старший научный сотрудник лаборатории биофизики кровообращения Института биомедицины ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: ShcherbakNS@yandex.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» Минздрава России, Санкт-Петербург, e-mail: pipson@inbox.ru.

Сухорукова Елена Геннадьевна – канд. мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории патоморфологии Научно-исследовательского центра ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: len48@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» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: nic.spb@mail.ru.

Author information

Shcherbak Natalia S. – Dr. of Sci. (Biol.), Senior Researcher Urgent Cardiology Laboratory of Institute of Cardiovascular Diseases, Senior Researcher Blood Circulation Biophysics Laboratory of Institute of Biomedicine, Pavlov University, Saint Petersburg, Russia, e-mail: ShcherbakNS@yandex.ru.

Yukina Galina Yu. – Cand. of Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Pathomorphology of the Research Center, Pavlov University, Saint Petersburg, Russia, e-mail: pipson@inbox.ru.

Sukhorukova Elena. G. – Cand. of Sci. (Med.), Senior Researcher of the Laboratory of Pathomorphology of the Research Center, Pavlov University, Saint Petersburg, Russia, e-mail: len48@inbox.ru.

Thomson Vladimir V. – Dr. of Sci. (Med.), Professor, Director of the Research Center, Pavlov University, Saint Petersburg, Russia, e-mail: nic.spb@mail.ru.