

*Н.С.Щербак<sup>1,3</sup>, А.Г.Русакова<sup>1,3</sup>, М.М.Галагудза<sup>3</sup>, Г.Ю.Юкина<sup>2</sup>, Е.Р.Баранцевич<sup>3</sup>,  
В.В.Томсон<sup>2</sup>, Е.В.Шляхто<sup>1</sup>*

## МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОЦИРКУЛЯТОРНОГО РУСЛА И НЕЙРОНОВ НЕОКОРТЕКСА ПОСЛЕ ИШЕМИЧЕСКОГО ПОСТКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ

<sup>1</sup> Лаборатория неотложной кардиологии (зав. — проф. Е.М.Нифонтов), Институт сердечно-сосудистых заболеваний;  
<sup>2</sup> Научно-исследовательский центр (дир. — проф. В.В.Томсон), Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П.Павлова; <sup>3</sup> Институт экспериментальной медицины (дир. — д-р мед. наук М.М.Галагудза), Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А.Алмазова, Санкт-Петербург

Исследована экспрессия белка PECAM-1/CD31 (биомаркера эндотелиальной функции и процессов неоваскуляризации) в микрососудах слоев II, III и V коры большого мозга у песчанок монгольских (*Meriones unguiculatus*) в ранний (2 сут) и отдаленный (7 сут) реперфузионный период после 7-минутной ишемии переднего мозга, ишемического посткондиционирования (ИПостК), а также у ложнооперированных животных (n=60). У последних наименьший уровень PECAM-1/CD31-иммунореактивности отмечался в структурах слоя III коры большого мозга. Обратимое ишемическое повреждение мозга проявлялось уменьшением числа морфологически неизмененных нейронов неокортекса с увеличением длительности реперфузионного периода, при этом в слоях II, III и V коры, также наблюдалось увеличение уровня PECAM-1/CD31-иммунореактивности с существенным нарастанием в отдаленный реперфузионный период. ИПостК, выполненное в виде трех стимулирующих воздействий реперфузии—ишемии по 15/15с, способствовало значимому увеличению числа морфологически неизмененных нейронов и PECAM-1/CD31-иммунореактивности в слоях II и III в ранний реперфузионный период. В отдаленный реперфузионный период после ИПостК число неизмененных нейронов в слоях II, III и V коры увеличивалось, а уровень PECAM-1/CD31-иммунореактивности значимо снижался. Результаты позволяют сделать вывод о том, что цитопротективный эффект ИПостК при ишемии переднего мозга осуществляется благодаря физиологическому механизму адаптации, приводящему к увеличению PECAM-1/CD31-иммунореактивности в микрососудах коры в раннем реперфузионном периоде и снижению — в позднем.

**Ключевые слова:** неокортекс, нейроны, PECAM-1/CD31, ишемия—реперфузия, ишемическое посткондиционирование

Ишемическое посткондиционирование (ИПостК) головного мозга — способ эндогенной нейропротекции, эффект которого формируется при выполнении коротких ишемических стимулирующих воздействий после повреждающей ишемии. Морфологические изменения органов и тканей, а также физиологические механизмы формирования адаптации при ИПостК остаются малоисследованными. До сих пор не изучено влияние ИПостК на ангиогенез, воспаление и функционирование гематоэнцефалического барьера при ишемическом и реперфузионном повреждении головного мозга.

Одним из основных белков межклеточных контактов эндотелиальных клеток является относящийся к суперсемейству иммуноглобулинов гликопротеин PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1), также известный как CD31. PECAM-1/CD31 в основном представлен на латеральных поверхностях эндотелиальных клеток, тромбоцитах и большинстве лейкоцитов. PECAM-1/CD31 играет важную роль в обеспечении эмиграции нейтрофилов при воспалении [12], а также является регулятором проангиогенных свойств эндотелиальных клеток [14], биомаркером эндотелиальной функции [9]. Исследований,

### Сведения об авторах:

Щербак Наталья Сергеевна (e-mail: [ShcherbakNS@yandex.ru](mailto:ShcherbakNS@yandex.ru)), Русакова Анна Геннадьевна (e-mail: [rusak.92.92@mail.ru](mailto:rusak.92.92@mail.ru)), Шляхто Евгений Владимирович (e-mail: [e.shlyakhto@almazovcentre.ru](mailto:e.shlyakhto@almazovcentre.ru)), лаборатория неотложной кардиологии,

Институт сердечно-сосудистых заболеваний; Юкина Галина Юрьевна (e-mail: [pipson@inbox.ru](mailto:pipson@inbox.ru)),

Томсон Владимир Викторович (e-mail: [nic.spb@mail.ru](mailto:nic.spb@mail.ru)), Научно-исследовательский центр, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П.Павлова, 197022, Санкт-Петербург, ул. Л.Толстого, 6–8

Галагудза Михаил Михайлович (e-mail: [galagoudza@mail.ru](mailto:galagoudza@mail.ru)), Баранцевич Евгений Робертович (e-mail: [professorerb@yandex.ru](mailto:professorerb@yandex.ru)), Институт экспериментальной медицины, Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А.Алмазова, 197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, 2

посвященных изучению влияния ИПостК на изменение экспрессии PECAM-1/CD31 в структурах головного мозга при ишемическом и реперфузионном повреждении, до сих пор нет.

Цель настоящей работы — исследование морфофункциональных изменений микроциркуляторного русла и нейронов в слоях II, III и V неокортекса при различной продолжительности реперфузии после ИПостК при обратимой ишемии переднего мозга у монгольских песчанок.

**Материал и методы.** Все эксперименты были проведены в соответствии с рекомендациями этических комитетов ГБОУ ВПО ПСПбГМУ им. И.П.Павлова и ФГБУ «СЗФМИЦ им. В.А.Алмазова» Минздрава РФ, а также 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)».

Исследование выполнено на песчанках-самцах (*Meriones unguiculatus*) массой 60–80 г, наркотизированных хлоралгидратом (450 мг/кг, внутривенно). Обратимую ишемию переднего мозга моделировали путем двусторонней окклюзии общих сонных артерий на 7 мин с последующей реперфузией в течение 2 и 7 сут. ИПостК моделировали путем снятия и наложения микрохирургических зажимов на общие сонные артерии в раннем реперфузионном периоде согласно выбранному протоколу эксперимента на основании ранее выполненных исследований [2] — 3 стимулирующих воздействия по 15/15 с реперфузии/реокклюзии непосредственно после 7-минутной ишемии головного мозга. При проведении ложной операции осуществляли аналогичные манипуляции, но без наложения микрохирургических зажимов на артерии. Животные были разделены на следующие экспериментальные группы: 1) ЛО2 (n=10) — ложнооперированные животные, содержащиеся после операции в течение 2 сут; 2) ЛО7 (n=10) — ложнооперированные животные, содержащиеся после операции в течение 7 сут; 3) И2 (n=10) — 7-минутная ишемия с последующей реперфузией в течение 2 сут; 4) И7 (n=10) — 7-минутная ишемия с реперфузией в течение 7 сут; 5) ИПостК2 (n=10) — 7-минутная ишемия с ИПостК и реперфузией в течение 2 сут; 6) ИПостК7 (n=10) — 7-минутная ишемия с ИПостК и реперфузией в течение 7 сут. Все хирургические вмешательства проводили на термостатируемом операционном столе (TCAT-2LV Controller; Physitemp Instruments Inc., США) при температуре  $37,0 \pm 0,5$  °C. В послеоперационном периоде до момента выхода животных из наркоза их температура также поддерживалась на постоянном уровне за счет внешнего источника тепла. После завершения периода реперфузии животных из каждой группы повторно наркотизировали, извлекали головной мозг и разрезали его на сегменты, используя фронтальную матрицу для головного мозга мелких грызунов (WPI, США). Срезы мозга фиксировали в 10% нейтральном формалине и заливали в парафин по стандартной методике. Для общегистологической оценки фронтальные срезы толщиной 5 мкм, соответствующие стереотаксическому атласу монгольской песчанки (брегма  $-1,7 \pm 0,2$  мм) [8], окрашивали гематоксилином — эозином. Для морфометрического анализа препараты окрашивали толуидиновым синим, на которых под световым микроскопом ДМ-750 (Leica, Германия) на нескольких срезах головного мозга при об. 40, ок. 10

подсчитывали количество морфологически неизмененных нейронов в слоях II, III и V затылочной области (occipital cortex) коры головного мозга. Полученный показатель пересчитывали на 1 мм<sup>2</sup> слоя коры головного мозга. Нейроны отбирали по следующим признакам: четко очерченное ядро эллипсоидной или круглой формы; ясно различимые ядрышки, расположенные в центре ядра; ядро немного темнее, чем окружающая нейропил; цитоплазма нейронов четко отграничена от окружающего нейропила [16]. Для оценки иммунореактивности белка PECAM-1/CD31 использовали иммуногистохимический метод. После стандартной процедуры депарафинирования и регидратации срезов проводили тепловое демаскирование антигена в цитратном буфере pH 6.0 (DiagnosticBioSystems, США) в течение 60 мин и инкубацию 30 мин при комнатной температуре, на первом этапе — с поликлональными козыми антителами к PECAM-1/CD31 (SantaCruz Biotechnology, США, разведение 1:100). Для выявления комплекса антиген—антитело применяли набор реагентов Super Sensitiv Polymer-HRP IHC Detection System (BioGenex, США). Препараты докрашивали гематоксилином Джилла (Bio-Optica, Италия). Анализ PECAM-1/CD31-иммунореактивности структур в слоях II, III и V затылочной области (occipital cortex) коры головного мозга проводили на основании измерения оптической плотности продукта реакции, которую осуществляли с помощью морфометрической установки, состоящей из светового микроскопа Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Германия), цифровой камеры Baumer CX05e (Baumer Optronic, Германия), компьютера с программным обеспечением «ВидеоТестТ-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-иммунореактивных структур. При каждом измерении вычитали оптическую плотность фона.

Результаты обрабатывали статистически с использованием программ Statistica 6.0 (StatSoft, Inc.) и Microsoft Excel 2003 с вычислением среднего арифметического значения и его стандартной ошибки. После проверки распределения на нормальность значимость различий между группами оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Различия считали значимыми при  $P < 0,05$ .

**Результаты исследования.** Кора головного мозга песчанок монгольских имеет 6 слоев клеток как у всех млекопитающих. Для изучаемой области коры головного мозга было характерно преимущественное развитие слоев I–III и V–VI и практическое отсутствие слоя IV. При этом отмечалось отсутствие четких границ между слоями.

Слои II, III и V коры головного мозга существенно варьируют по плотности расположения нейронов, при этом различий в двух ложнооперированных группах — ЛО2 и ЛО7 обнаружено не было (таблица). Ко 2-м суткам реперфузионного периода после 7-минутной ишемии переднего мозга в группе И2 в затылочной области коры головного мозга развивалось преимущественно диффузное и местами очаговое повреждение. Отмечались периваскулярный и перическулярный отек, набухание нейронов, хроматолиз,

**Количество морфологически неизменных нейронов в слоях коры мозга монгольских песчанок в различные периоды реперфузии после глобальной ишемии головного мозга с последующим применением ишемического посткондиционирования ( $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$  на 1 мм<sup>2</sup> среза)**

| Экспериментальная группа | Слои коры головного мозга |                     |                      |
|--------------------------|---------------------------|---------------------|----------------------|
|                          | II                        | III                 | V                    |
| ЛО2                      | 407±15                    | 365±15              | 218±14               |
| ЛО7                      | 418±12                    | 343±14              | 221±14               |
| И2                       | 223±8*                    | 205±9**             | 198±15               |
| И7                       | 164±10 <sup>β</sup>       | 126±11 <sup>β</sup> | 159±10 <sup>ββ</sup> |
| ИПостК2                  | 293±12 <sup>#</sup>       | 296±19 <sup>#</sup> | 206±16               |
| ИПостК7                  | 263±9 <sup>+</sup>        | 265±8 <sup>+</sup>  | 191±12 <sup>++</sup> |

\* Различия значимы по сравнению с показателем в группе ЛО2 при  $P < 0,01$ ; \*\* при  $P < 0,05$ ; <sup>β</sup> по сравнению с показателем в группе ЛО7 при  $P < 0,001$ ; <sup>ββ</sup> при  $P < 0,05$ ; <sup>#</sup> по сравнению с показателем в группе И2 при  $P < 0,01$ ; <sup>+</sup> по сравнению с показателем в группе И7 при  $P < 0,001$ ; <sup>++</sup> при  $P < 0,05$ .

Примечание. Расшифровку обозначений экспериментальных групп животных см. в разделе «Материал и методы».

гиперхроматоз, кариолизис, наличие гиперхромных сморщенных клеток. При морфометрическом анализе было обнаружено значимое уменьшение числа неизменных нейронов в слоях II и III на 45,2 ( $P < 0,01$ ) и 22,6 ( $P < 0,05$ ) соответственно, а в слое V это уменьшение было не значимо (на 9,1%,  $P > 0,05$ ) по сравнению с таковым в группе ЛО2. К 7-м суткам реперфузионного периода обратимая 7-минутная ишемия (группа И7) приводила к существенному нарастанию уменьшения числа морфологически неизменных нейронов в слоях II, III и V на 60,8 ( $P < 0,001$ ), 63,1 ( $P < 0,001$ ) и 27,9% ( $P < 0,05$ ) соответственно по сравнению с аналогичными показателями в группе ЛО7 (см. таблицу).

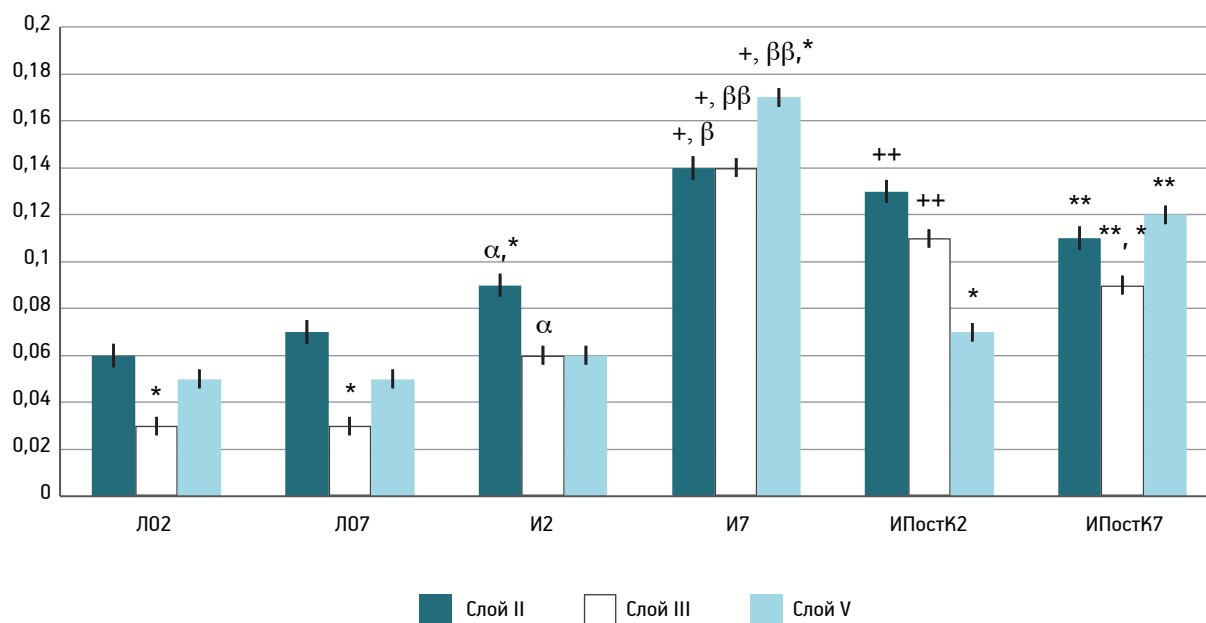
При применении ИПостК-стимулов ко 2-м суткам реперфузионного периода после 7-минутной ишемии (группа ИПостК2) происходило значимое увеличение числа морфологически неизменных нейронов только в слоях II и III на 31,3 ( $P < 0,01$ ) и 44,23% ( $P < 0,01$ ) соответственно по сравнению с таковым в группе И2. К 7-м суткам реперфузии после 7-минутной ишемии с последующим применением ИПостК2-стимулов (группа ИПостК7) уменьшение нейронов было менее выражено, чем в группе И7. Так, в группе ИПостК7 обнаружено значимое увеличение количества морфологически неизменных нейронов в слоях II, III и V на 60,4 ( $P < 0,001$ ), 109,8 ( $P < 0,001$ ) и 19,9% ( $P < 0,05$ ) соответственно по сравнению с таковым в группе И7 (см. таблицу).

Иммунореактивные РЕСАМ-1/CD31-структуры в слоях головного мозга наблюдали в виде трубчатых, трубчато-разветвленных или единичных мелких или продолговатых образований неправильной формы. Уровень иммунореактивности РЕСАМ-1/CD31 в структурах слоев II, III и V коры головного мозга не различался в двух ложнооперированных группах — ЛО2 и ЛО7 (рису-

нок). При этом в обеих группах самый низкий уровень РЕСАМ-1/CD31-иммунореактивности отмечался в структурах слоя III коры головного мозга при сравнении с аналогичными показателями для структур слоев II и V ( $P < 0,05$ ).

Обратимая 7-минутная ишемия переднего мозга способствовала изменению РЕСАМ-1/CD31-иммунореактивности в микрососудах слоев коры головного мозга. Ко 2-м суткам реперфузионного периода в микрососудах слоев как II, так и III коры мозга наблюдалось значимое увеличение уровня РЕСАМ-1/CD31-иммунореактивности на 50% по сравнению с аналогичными показателями в группе ЛО2 (см. рисунок). К 7-м суткам реперфузионного периода (группа И7) уровень РЕСАМ-1/CD31-иммунореактивности в структурах слоев II, III и V значимо нарастал на 55,6 ( $P < 0,01$ ), 133,3 ( $P < 0,001$ ) и 183,3% ( $P < 0,001$ ) соответственно по сравнению с таковым в группе И2 и был выше в 2,0 ( $P < 0,001$ ), 4,7 ( $P < 0,001$ ) и 3,4 раза ( $P < 0,001$ ) соответственно, чем в группе ЛО7 (см. рисунок). При визуальной оценке общего количества РЕСАМ-1/CD31-иммунореактивных структур в слоях мозга различий в группах ЛО2 и И2, а также в группах ЛО7 и И7 не наблюдалось.

После применения ИПостК ко 2-м суткам реперфузионного периода (группа ИПостК2) уровень РЕСАМ-1/CD31-иммунореактивности значительно увеличивался только в микрососудах слоев II и III на 44,4 ( $P < 0,01$ ) и 83,3% ( $P < 0,01$ ) по сравнению с таковым в группе И2. В отдаленный реперфузионный период после ИПостК (группа ИПостК7) уровень РЕСАМ-1/CD31-иммунореактивности в микрососудах слоев II, III и V был значимо ниже на 21,4 ( $P < 0,05$ ), 35,7 ( $P < 0,05$ ) и 29,4% ( $P < 0,05$ ) соответственно, чем в группе И7 (см. рисунок). При визуальной оценке общего количества РЕСАМ-1/CD31-иммунопозитивных микрососудов в слоях



Уровень экспрессии белка PECAM-1/CD31 в слоях II, III и V коры мозга песчанок монгольских при применении ишемического посткондиционирования после ишемии переднего мозга с различной продолжительностью реперфузионного периода.

По горизонтальной оси — группы животных; по оси ординат — оптическая плотность (отн. ед.). Различия значимы: \* по сравнению с показателями в слоях коры внутри группы при  $P < 0,05$ ; <sup>α</sup> по сравнению с показателями в группе ЛО2 при  $P < 0,01$ ; <sup>β</sup> по сравнению с показателями в группе И2 при  $P < 0,01$ ; <sup>ββ</sup> при  $P < 0,001$ ; + по сравнению с показателями в группе ЛО7 при  $P < 0,001$ ; ++ по сравнению с показателями в группе И2 при  $P < 0,01$ ; \*\* по сравнению с показателями в группе И7 при  $P < 0,05$ . Вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки

мозга различий в группах И2 и ИПостК2, а также в группах И7 и ИПостК7 не наблюдалось.

**Обсуждение полученных данных.** Выявленный в данном исследовании низкий уровень выраженности слоев коры головного мозга песчанок согласуется с данными других авторов, полученными при сравнительном анализе цитоархитектоники коры головного мозга грызунов [15, 16]. Известно, что в разных отделах и участках полушарий большого мозга общая толщина коры, а также количество ее слоев и подслоев, число, плотность расположения и размеры нейронов значительно варьируют [1]. Существуют и значительные функциональные регионарные особенности микрососудов коры головного мозга. Нами обнаружено, что в группах ложнооперированных песчанок в микрососудах слоев II, III и V коры большого мозга наблюдались различные уровни иммунореактивности белка PECAM-1/CD31, которые можно объяснить вариабельностью плотности расположения нейронов, степенью васкуляризации, наличием в сосудах тромбоцитов и лейкоцитов, а также функциональными особенностями каждого конкретного слоя. Полученные нами результаты согласуются с результатами других исследований, в которых была обнаружена экспрессия белка PECAM-1/CD31 в эндотелии кровеносных сосудов неишемизированных головного мозга и миокарда [3, 13].

Обратимая ишемия переднего мозга монгольских песчанок сопровождалась повышением экспрессии белка PECAM-1/CD31 в микрососудах коры головного мозга. При этом в ранний реперфузионный период увеличение уровня экспрессии этого белка отмечалось в микрососудах мелкоклеточных слоев II и III коры большого мозга. В этих же слоях в анализируемом периоде наблюдалось наиболее значимое снижение числа морфологически неизмененных нейронов. В отдаленном реперфузионном периоде отмечалось нарастание уровня PECAM-1/CD31-иммунореактивности в структурах слоев II, III и V коры головного мозга. При этом дефицит морфологически неизмененных нейронов в слоях II и III нарастал, но обнаруживался и в слое V — крупных пирамидных нейронов. Нарастание гибели нейронов объясняется феноменом отсроченной гибели нейронов, а также согласуется с результатами других исследований, в которых показано, что крупные пирамидные нейроны слоя V гибнут в отдаленном реперфузионном периоде [7, 15]. Установленное увеличение PECAM-1/CD31-иммунореактивности различной степени в микрососудах изученных слоев коры головного мозга может свидетельствовать об особенностях регионарной восприимчивости неокортекса к ишемическому и реперфузионному повреждению переднего мозга у монгольских песча-



нок. Показано увеличение экспрессии PECAM-1/CD31 на различных экспериментальных моделях ишемического и реперфузионного повреждения головного мозга у грызунов [4, 9–11]. При этом в ряде исследований установлено увеличение PECAM-1/CD31-иммунореактивности с увеличением продолжительности реперфузии [4, 6]. Также следует отметить, что уровень PECAM-1/CD31-иммунореактивности может коррелировать со степенью уязвимости нейронов к повреждающему действию ишемии — реперфузии. Так, были показаны различия в уровне PECAM-1/CD31-иммунореактивности в микрососудах полей CA1 и CA2–3 гиппокампа в ответ на 5-минутную ишемию переднего мозга у песчанок [6].

Применение ИПостК-стимулирующих воздействий после повреждающей ишемии переднего мозга у песчанок способствовало уменьшению гибели нейронов в мелкоклеточных слоях коры головного мозга как в раннем, так и в позднем реперфузионном периоде. Обнаруженный нами цитопротективный эффект ИПостК согласуется с результатами исследований, в которых показано, что применение различных протоколов ИПостК при 5–15-минутной продолжительности тестовой ишемии приводит к протективному эффекту для отдельных структур головного мозга [2, 5].

Известно, что PECAM-1/CD31 является биомаркером эндотелия и широко применяется для оценки процессов неоваскуляризации при экспериментальном инфаркте головного мозга [9]. Нами показано, что в ранний реперфузионный период цитопротективный эффект ИПостК в слоях II и III коры большого мозга сопровождался увеличением в них уровня PECAM-1/CD31-иммунореактивности. В отдаленном реперфузионном периоде после ИПостК отмечалось понижение нарастающей PECAM-1/CD31-иммунореактивности в структурах всех изученных слоев коры большого мозга. Данные настоящего исследования согласуются с результатами других авторов, полученными при изучении фармакологического посткондиционирования изофлюраном при экспериментальном инфаркте миокарда у крыс. Было показано, что это воздействие приводит к уменьшению зоны инфаркта и увеличению экспрессии PECAM-1/CD31 в миокарде крыс в ранней фазе реперфузионного периода [3]. При использовании метода полимеразной цепной реакции и иммуногистохимического анализа было показано, что в ранний реперфузионный период в поврежденном полушарии большого мозга при фокальной ишемии и в гиппокампе после глобальной ишемии отмечается увеличение уровня мРНК гена PECAM-1/CD31 с последующим

понижением. При этом уровень PECAM-1/CD31-иммунореактивности существенно увеличивается в отдаленном реперфузионном периоде [4, 6]. Авторы предположили, что уровень PECAM-1/CD31-иммунореактивности в исследуемых областях головного мозга может быть связан с увеличением количества нейтрофилов [4, 6].

Обнаруженные нами изменения уровня PECAM-1/CD31-иммунореактивности в микрососудах изученных слоев коры головного мозга монгольских песчанок могут найти следующее объяснение. Примененное ИПостК после повреждающей ишемии переднего мозга в раннем реперфузионном периоде способствует увеличению уровня PECAM-1/CD31-иммунореактивности в слоях коры большого мозга можно объяснить наличием интенсивного ангиогенеза. Многие авторы сходятся во мнении, что такие эндогенные способы нейропротекции, как ишемическое пре- и посткондиционирование, имеют одинаковые механизмы [5]. Исходя из этого, наши данные согласуются с результатами, полученными при прекодиционировании в виде физической нагрузки — бегом по дорожке при скорости 25 м/мин в течение 30 мин 5 сут в неделю в течение 3 нед перед моделированием фокальной ишемии головного мозга у крыс, которое способствовало уменьшению объема инфаркта головного мозга и увеличению уровня экспрессии белка PECAM-1/CD31 по сравнению с аналогичными показателями в группе без прекодиционирования [13]. В отдаленном реперфузионном периоде PECAM-1/CD31-иммунореактивность в слоях коры головного мозга нарастает, вероятно, из-за увеличения количества нейтрофилов. ИПостК после ишемии в отдаленный реперфузионный период способствует понижению PECAM-1/CD31-иммунореактивности структур коры большого мозга. Полученные результаты позволяют сделать предположение, что ИПостК в отдаленный реперфузионный период способствует подавлению увеличения количества нейтрофилов и моноцитов, таким образом предотвращая вторичное повреждение головного мозга.

Основываясь на полученных нами результатах, можно сделать следующие выводы: 1) микрососуды в различных слоях коры головного мозга песчанок монгольских обладают неодинаковой PECAM-1/CD31-иммунореактивностью; 2) обратимая ишемия переднего мозга песчанок проявляется гибелью нейронов слоев II, III и V коры, которая нарастает в отдаленный реперфузионный период и сопровождается увеличением уровня PECAM-1/CD31-иммунореактивности в структурах этих слоев; 3) цитопротективный эффект

ИПостК приводит к изменению уровня PECAM-1/CD31-иммунореактивности структур слоев коры большого мозга в зависимости от длительности реперфузионного периода.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Адрианов О.С. О принципах структурно-функциональной организации мозга (избранные труды). М.: Медицина, 1999.
2. Щербак Н.С., Русакова А.Г., Галагудза М.М. и др. Изменение экспрессии белка Bcl2 в нейронах полей гиппокампа после применения ишемического посткондиционирования головного мозга // Морфология. 2015. Т. 148, вып. 5. С. 21–27.
3. Agnić I., Vukojević K., Saraga-Babić M. et al. Isoflurane post-conditioning stimulates the proliferative phase of myocardial recovery in an ischemia-reperfusion model of heart injury in rats // *Histol. Histopathol.* 2014. Vol. 29, № 1. P. 89–99.
4. Deddens L.H., van Tilborg G.A., van der Toorn A. et al. PECAM-1-targeted micron-sized particles of iron oxide as MRI contrast agent for detection of vascular remodeling after cerebral ischemia // *Contrast Media Mol. Imaging.* 2013. Vol. 8, № 5. P. 393–401.
5. Ding Z.M., Wu B., Zhang W. Q. et al. 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. Vol. 13, № 5. P. 6089–6101.
6. Hwang I.K., Kim D.W., Yoo K.Y. et al. Ischemia-induced changes of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 in the hippocampal CA1 region in gerbils // *Brain. Res.* 2005. Vol. 1048, № 1–2. P. 251–257.
7. Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia // *Brain Res.* 1982. Vol. 239. P. 57–69.
8. Loskota W.J., Lomax P., Verity M.A. A Stereotaxic Atlas of the Mongolian Gerbil Brain // Ann Arbor, Mich. USA. Ann Arbor Sci. Publishers, 1974.
9. Marti H.J., Bernaudin M., Bellail A. et al. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia // *Am. J. Pathol.* 2000. Vol. 156, № 3. P. 965–976.
10. Matsuda F., Sakakima H., Yoshida Y. The effects of early exercise on brain damage and recovery after focal cerebral infarction in rats // *Acta. Physiol (Oxf.)*. 2011. Vol. 201, № 2. P. 275–287.
11. Mora-Lee S., Sirerol-Piquer M.S., Gutierrez-Perez M. et al. Histological and ultrastructural comparison of cauterization and thrombosis stroke models in immune-deficient mice // *J. Inflamm.* 2011. Vol. 8, № 1. P. 28–33.
12. Newman P.J. Respective series: cell adhesion in vascular biology // *J. Clin. Invest.* 1997. Vol. 100. P. 25–29.
13. Otsuka S., Sakakima H., Sumizono M. et al. The neuroprotective effects of preconditioning exercise on brain damage and neurotrophic factors after focal brain ischemia in rats // *Behav. Brain Res.* 2016. Vol. 303. P. 9–18.
14. Park S., DiMaio T.A., Scheef E.A. et al. PECAM-1 regulates proangiogenic properties of endothelial cells through modulation of cell-cell and cell-matrix interactions // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2010. Vol. 299. P. 1468–1484.
15. Pulsinelli W.A., Buchan A.M. The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation // *Stroke.* 1988. Vol. 19. P. 913–914.
16. Stummer W., Weber K., Tranmer B. et al. Reduced mortality and brain damage after locomotor activity in gerbil forebrain ischemia // *Stroke.* 1994. Vol. 25. P. 1862–1869.

Поступила в редакцию 15.04.2016

# MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF THE MICROVASCULATURE AND NEURONS IN NEOCORTEX AFTER ISCHEMIC POSTCONDITIONING

N.S. Shcherbak<sup>1,3</sup>, A.G. Rusakova<sup>1,3</sup>, M.M. Galagudza<sup>3</sup>, G. Yu. Yukina<sup>2</sup>, Ye. R. Barantsevich<sup>3</sup>, V.V. Tomson<sup>2</sup>, Ye. V. Shlyakhto<sup>1,3</sup>

PECAM-1/CD31 (biomarker of endothelial function and neovascularization) was used to assess protein expression in microvessels of cortical layers II, III and V in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) in the early (Day 2) and late (Day 7) reperfusion period after a 7-minute forebrain ischemia and subsequent ischemic postconditioning (IPostC), as well as in sham-operated animals (n=60). The latter demonstrated the lowest level of immunoreactivity to PECAM-1/CD31 in the structures in cortical layer III. Reversible ischemic brain damage manifested itself in the reduction of number of morphologically unchanged neocortical neurons and extension of the reperfusion period; in addition to that, an increase in the level of immunoreactivity to PECAM-1/CD31 was observed in layers II, III and V of the cortex and it was significantly augmented towards the late reperfusion period. IPostC, performed by three stimulating cycles of ischemia-reperfusion lasting 15/15 seconds, resulted in a significant increase in the number of morphologically unchanged neurons in cortical layers II and III in the early reperfusion period. In the late reperfusion period, after IPostC, the number of unchanged neurons in layers II, III and V of the cortex was increased, while the level of immunoreactivity for PECAM-1/CD31 in these structures was significantly decreased. These results allow to conclude that the cytoprotective effect of IPostC under ischemia was implemented through the physiological mechanism of adaptation, which enhanced immunoreactivity for PECAM-1/CD31 in microvessels of the cerebral cortex in the early reperfusion period, and inhibited it in the late reperfusion period.

**Key words:** neocortex, neurons, PECAM-1/CD31, ischemia-reperfusion, ischemic postconditioning

<sup>1</sup> Laboratory of Urgent Cardiology, Institute of Cardiovascular Diseases, <sup>2</sup> Research Center, I.P. Pavlov First State Medical University, St. Petersburg; <sup>3</sup> Institute of Experimental Medicine, Federal Almazov North-West Medical Research Centre, St. Petersburg