

С.П. Сергеева<sup>1</sup>, А.В. Люндуп<sup>1</sup>, В.В. Береговых<sup>1</sup>, П.Ф. Литвицкий<sup>1</sup>, А.А. Савин<sup>2</sup>,  
Л.Р. Горбачева<sup>3</sup>, Е.В. Киселева<sup>4</sup>, И.Д. Бреславич<sup>3</sup>, К.И. Куценко<sup>5,6</sup>, Л.В. Шишкина<sup>7</sup>

<sup>1</sup> Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> Московский государствен ный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова, Москва, Российская Федерация

<sup>3</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация

<sup>4</sup> Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Российская Федерация

<sup>5</sup> Бюро судебно-медицинской экспертизы Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Российская Федерация

<sup>6</sup> Международный юридический институт, Москва, Российская Федерация

<sup>7</sup> Научно-исследовательский институт нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко, Москва, Российская Федерация

## Закономерности экспрессии белков c-fos, ERK1/2, MAP2, NOTCH1 в нейронах коры головного мозга человека после ишемического инсульта

**Обоснование.** Поиск новых направлений патогенетически обоснованной терапии и реабилитации пациентов после ишемического инсульта (ИИ) является актуальной задачей. Для ее решения необходимы новые знания о закономерностях экспрессии после ИИ в нейронах коры головного мозга белков, обеспечивающих механизмы нейропластичности. К ним относят c-fos, ERK1/2, MAP2, NOTCH1. **Цель исследования** — выявить закономерности экспрессии белков c-fos, ERK1/2, MAP2, NOTCH1 в нейронах коры головного мозга человека после ИИ. **Методы.** Анализировали парафиновые срезы образцов коры головного мозга 9 пациентов, умерших в срок от 2 до 6 сут после развития ИИ в бассейне левой средней мозговой артерии (ЛСМА) из трех зон: 1 — зоны, прилежащей непосредственно к очагу некротической ткани; 2 — зоны, отдаленной от предыдущей на 4–7 см; 3 — зоны контралатерального полушария, симметричной очагу ИИ. Контрольные образцы получены от погибших в результате несчастного случая (3 человека). Оценку экспрессии белков NSE, c-fos, ERK1/2, MAP2, NOTCH1 нейронами проводили непрямым иммунопероксидазным иммуногистохимическим методом. **Результаты.** Выявлено увеличение плотности и уменьшение доли поврежденных нейронов при удалении от ишемического очага, наибольшую долю c-fos протеин-позитивных нейронов в зоне 2, NOTCH1 позитивных нейронов — в зоне 1, меньшими долями ERK1/2 и MAP2 позитивных нейронов по сравнению с контрольными только в образцах зоны 1. **Заключение.** При развитии ИИ контралатеральное очагу полушарие является зоной повышенной активации интактной ткани, тогда как участки коры,

прилежащие непосредственно к очагу и отдаленные от него, имеют признаки патологической активации. При этом для зоны 1 характерно снижение диапазона адапционного ответа ткани, а для зоны 2 — его расширение. Поэтому ключевой мишенью для терапевтического воздействия является зона 2.

**Ключевые слова:** инсульт, *c-fos*, *ERK1/2*, *MAP2*, *NOTCH1*

**Для цитирования:** Сергеева С.П., Люндуп А.В., Береговых В.В., Литвицкий П.Ф., Савин А.А., Горбачева Л.Р., Киселева Е.В., Бреславич И.Д., Купенко К.И., Шишкина Л.В. Закономерности экспрессии белков *c-fos*, *ERK1/2*, *MAP2*, *NOTCH1* в нейронах коры головного мозга человека после ишемического инсульта. *Вестник РАМН*. 2020;00(0):XXX–XXX. doi: XXXX

S.P. Sergeeva<sup>1</sup>, A.V. Lyundup<sup>1</sup>, V.V. Beregovykh<sup>1</sup>, P.F. Litvitsky<sup>1</sup>, A.A. Savin<sup>2</sup>, L.R. Gorbacheva<sup>3</sup>, E.V. Kiseleva<sup>4</sup>, I.D. Breslavich<sup>3</sup>, K.I. Kucenko<sup>5,6</sup>, L.V. Shishkina<sup>7</sup>

<sup>1</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

<sup>4</sup> Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

<sup>5</sup> Bureau of Forensic Medicine of Moscow Healthcare Department, Moscow, Russian Federation

<sup>6</sup> International Legal Institute, Moscow, Russian Federation

<sup>7</sup> N.N. Burdenko Scientific Research Neurosurgery, Moscow, Russian Federation

## **C-fos, ERK1/2, MAP2, NOTCH1 Proteins Expression Patterns in Human Cerebral Cortex Neurons after Ischemic Stroke**

**Background:** the search for protein (these include *c-fos*, *ERK1/2*, *MAP2*, *NOTCH1*) expression that provide neuroplasticity mechanisms of the cerebral cortex after ischemic stroke (IS) patterns is an urgent task. **Aims** — to reveal *c-fos*, *ERK1/2*, *MAP2*, *NOTCH1* proteins expression patterns in human cerebral cortex neurons after IS. **Materials and methods.** We studied 9 left middle cerebral artery (LMCA) IS patients cerebral cortex samples from 3 zones: 1 — the zone adjacent to the necrotic tissue focus; 2 — zone remote from the previous one by 4–7

cm; 3 — zone of the contralateral hemisphere, symmetric to the IS focus. Control samples were obtained from 3 accident died people. Identification of targeted proteins NSE, c-fos, ERK1/2, MAP2, NOTCH1 was performed by indirect immunoperoxidase immunohistochemical method. **Results.** Moving away from the ischemic focus, there is an increase in the density of neurons and a decrease in the damaged neurons proportion, the largest share of c-fos protein positive neurons in zone 2, NOTCH1 positive neurons in zone 1, smaller fractions of ERK1/2 and MAP2 positive neurons compared to the control only in samples of zone 1. **Conclusions.** With the IS development, the contralateral hemisphere is intact tissue increased activation zone, while the zones 1 and 2 have pathological activation signs. In zone 1 of the range, the adaptive response of the tissue decreases, and in zone 2 it expands. Therefore, a key target for therapeutic intervention is zone 2.

**Keywords:** stroke, c-fos protein, MAP2 protein, NOTCH1 protein

**For citation:** Sergeeva SP, Lyundup AV, Beregovykh VV, Litvitsky PF, Savin AA, Gorbacheva LR, Kiseleva EV, Breslavich ID, Kucenko KI, Shishkina LV: C-fos, ERK1/2, MAP2, NOTCH1 Proteins Expression Patterns in Human Cerebral Cortex Neurons after Ischemic Stroke. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2020;00(0):XXX–XXX. doi: XXX

## Обоснование

При развитии ишемического инсульта (ИИ) головного мозга происходит перераспределение морфологических и функциональных связей между нейронами. От этого в большой мере зависит клиническое восстановление пациента [1]. Реализацию этого процесса обеспечивает ряд механизмов, которые могут быть инициированы различными стимулами или, напротив, отсутствием таковых [2–4]. Любая точка внутриклеточного сигнального пути в каждый момент времени может быть представлена как точка бифуркации сигнала в рамках «вилки возможностей»: обучение клетки (ее адаптация к изменившимся условиям микроокружения) или реализация процесса клеточной гибели при невозможности адаптации [5, 6]. Выявлен ряд ключевых этапов, по которым принято судить о состоянии поврежденной клетки. Так, этап активации синтеза ERK1/2 преимущественно связывают с механизмами, обеспечивающими адаптацию нейронов при воздействии на них повреждающих стимулов, дифференцировкой и спраутингом [7–9]. Известно, что ERK1/2 может индуцировать транскрипцию раннего гена c-Fos, которому отводят важную роль в синаптической пластичности, обеспечении процессов обучения и памяти [10]. Определение уровней протеинов c-Fos и ERK используют в качестве маркеров активации нейронов [11, 12]. На моделях локальной ишемии-реперфузии головного мозга у крыс показано, что экспрессия c-fos начинается сразу после начала периода реперфузии и регистрируется как в перинфарктной зоне, так и в удаленных от очага ишемии зонах мозга [13]. Ключевой позицией в оценке пластичности коры считается выявление локализации MAP2, которая влияет на процессы изменения структуры цитоскелета, регуляции транспорта веществ, необходимых для синаптической передачи сигналов. Есть данные об участии MAP2 в регуляции ею

механизмов перестройки дендритов и шипикового аппарата [14]. Активация Notch1 сигнального пути играет важную роль в реализации процессов пространственного обучения, памяти, синаптической пластичности как в норме, так при физических нагрузках и после экспериментального травматического повреждения головного мозга у крыс. Это обеспечивается путем регуляции механизмов взаимодействия соседних зрелых клеток, а также определения направления дифференцировки прогениторных клеток [15, 16]. Учитывая клиническую актуальность поиска новых направлений патогенетически обоснованной терапии и реабилитации пациентов после ИИ, представляется актуальной цель настоящего исследования.

**Цель исследования** — выявить закономерности экспрессии белков c-fos, ERK1/2, MAP2, NOTCH1 в нейронах коры головного мозга человека после ишемического инсульта.

## Методы

### *Дизайн исследования*

Проведено обсервационное одноцентровое одномоментное выборочное контролируемое нерандомизированное исследование.

### *Критерии соответствия*

Включены пациенты с впервые случившимся ИИ в бассейне ЛСМА, законные представители которых подписали форму информированного согласия на проведение патологоанатомического исследования. Критерии не включения: геморрагический характер нарушения мозгового кровообращения, повторный эпизод нарушения мозгового кровообращения по ишемическому типу, наличие черепно-мозговых травм, онкологических и аутоиммунных заболеваний в анамнезе, аллергических, воспалительных реакций, не связанных с ИИ на момент его развития.

### *Условия проведения*

Материал получали из банка данных патологоанатомического отделения ГБУЗ ГКБ 36 им. Ф.И. Иноземцева в виде парафиновых блоков. Образцы головного мозга группы контроля (3 человека) также в виде парафиновых блоков получали из банка данных Бюро судебно-медицинской экспертизы Департамента здравоохранения города Москвы.

### *Продолжительность исследования*

Запланированная продолжительность включения в исследование составила 1 год. Парафиновые блоки из банка данных патологоанатомического отделения ГБУЗ ГКБ 36 им. Ф.И. Иноземцева были получены в 2012 г., из банка данных Бюро судебно-медицинской экспертизы Департамента здравоохранения города Москвы — в 2017 г. Иммуногистохимическое исследование проведено в 2019 г.

### *Описание медицинского вмешательства*

Выполнение настоящей работы не влияло на проведение патологоанатомического исследования, не предполагало вмешательства или изменения его протокола и заключалось в дополнительном гистологическом и иммуногистохимическом исследовании предоставленных из банка данных образцов ткани.

### ***Исходы исследования***

**Основной исход исследования.** Исследование не предполагало прижизненного медицинского вмешательства, как фактор воздействия рассматривается развившаяся у пациентов ишемия головного мозга. Цель исследования была достигнута при помощи оценки значений количественных показателей уровня экспрессии белков c-fos, ERK1/2, MAP2, NOTCH1 в нейронах коры головного мозга человека после ишемического инсульта. В качестве ключевого показателя, отражающего данные функции системы организма, было принято процентное содержание нейронов с положительной иммуногистохимической реакцией против вышеуказанных белков.

**Дополнительные исходы исследования.** У всех пациентов в зоне 3 присутствовала равнозначная и сопоставимая ткань, поэтому изменения в зонах 1 и 2 являются маркерами изучаемого ишемического воздействия, а не индивидуальными особенностями.

### ***Методы регистрации исходов***

Образцы тканей головного мозга фиксировали в 10% забуференном формалине. После отмывания фиксатора в проточной воде проводили стандартную гистологическую проводку образцов путем обезвоживания в этиловом спирте. Затем кусочки ткани пропитывали парафином и заливали в парафиновые блоки по стандартной методике [17–19]. Срезы толщиной 5 мкм изготавливали на ротационном микротоме Leica RM2125RT (Германия) и растягивали на непокрытых предметных стеклах и стеклах с полилизинным покрытием для иммунологических исследований Vision biosystems plus slides (Великобритания). Затем адгезировали при +56 °С в течение 30 мин. Полученные срезы депарафинизировали, окрашивали гематоксилином и эозином по Нисслию, дегидратировали и просветляли в ксилоле (Microm HMS 70). Срезы заключали под покровные стекла в синтетической монтирующей среде (Shandon-Mount). Срезы на покрытых поли-L-лизином стеклах подготавливали к иммуногистохимическому и иммунофлуоресцентному окрашиванию, для этого сначала проводили депарафинизацию, затем — демаскировку антигена в Tris-EDTA pH 10.0 буфере в микроволновой печи при мощности 100W в течение 10 мин, охлаждали до комнатной температуры, отмывали в PBS.

Выявление целевых белков NSE, c-fos, ERK1/2, MAP2, NOTCH1 проводили непрямой иммунопероксидазным иммуногистохимическим методом. Для иммунофенотипирования использовали моноклональные антитела к указанным белкам человека (Vision biosystems novocastra, Великобритания), а также пероксидазную детекционную систему Peroxidase Detection System for Novocastra (Leica Microsystems, Германия), включающую вторичные универсальные биотинилированные антитела и стрептавидин-пероксидазный комплекс. Визуализация реакции осуществлялась DAB-хромогеном. Иммуногистохимические реакции проводили согласно протоколам,

прилагаемым к используемым антителам. При завершении окрашивания выполняли фоновое контрастирование срезов гематоксилином Майера. В качестве отрицательного контроля вторичных антител не добавляли первичные антитела. Контроль специфичности реакции проводили с помощью неиммунной сыворотки, а также антител к виментину (Dako, Дания).

Полученные гистологические и иммуногистохимические препараты изучали с помощью светового микроскопа Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Германия) с использованием цифровой фотокамеры Canon PowerShot, программного обеспечения AxioVision LE (Carl Zeiss, Германия), а также флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse TE-2000. Визуальную оценку и морфометрический анализ срезов проводили на полученных с использованием вышеуказанного оборудования (объектив  $\times 40$ , апертура 0,9) цифровых фотографиях коры головного мозга размером изображения  $1300 \times 1030$  пикселей, реальным размером  $220 \times 174$  мкм ( $38\,280$  мкм<sup>2</sup>) семи неперекрывающихся полей зрения в каждой из трех зон (1 — зоны, прилежащей непосредственно к очагу некротической ткани; 2 — зоны, отдаленной от предыдущей на 4–7 см; 3 — зоны контралатерального полушария, симметричной очагу ИИ) на каждом из трех последовательных срезов мозга человека из группы исследования ( $n = 189$  полей зрения для каждой зоны) и семи полей зрения каждого из трех срезов в группе контроля (3 человека, 63 поля зрения) [20, 21]. Морфометрическое исследование включало определение: общей численной плотности (абсолютное количество изучаемых элементов на единицу площади среза) нейронов (NSE-позитивных клеток) на  $1$  мкм<sup>2</sup>; общей численной плотности морфологически измененных, потенциально нефункциональных нейронов на единицу площади  $1$  мкм<sup>2</sup>; процентного содержания морфологически измененных нейронов от их общего числа; общей численной плотности клеточных элементов на  $1$  мкм<sup>2</sup> (окрашивание гематоксилином-эозином по Нисслю); процентного содержания нейронов с положительной иммуногистохимической реакцией против вышеуказанных белков.

### *Этическая экспертиза*

Исследование в рамках диссертационной работы «Закономерности изменения механизмов регуляции апоптоза нейронов в остром периоде ишемического инсульта» одобрено Межвузовским комитетом по этике, выписка из протокола заседания от 26.09.2019 № 08-19.

### *Статистический анализ*

**Принципы расчета размера выборки.** Расчет размера выборки проводился на этапе планирования исследования, уровень значимости для отклонения нулевой гипотезы был задан 0,05, мощность — 80%. Для группы исследования  $n = 189$  полей зрения для каждой зоны (что соответствовало семи неперекрывающимся полям зрения каждого из трех срезов в каждой из трех зон у каждого из 9 человек группы исследования); для группы контроля  $n = 63$  (семь полей зрения каждого из трех срезов у каждого из 3 человек).

**Методы статистического анализа данных.** 1. Для анализа подсчета клеток различного типа использовалась пакетная обработка фотографий срезов в приложении ImageJ. Последующая статистическая обработка полученных данных выполнена в ПК

Statistica 6.0. 2. Выборки представлены в виде медиана (1-я квартиль, 3-я квартиль). 3. Для сравнения выборок использовали непараметрические критерии статистического анализа — критерий Манна–Уитни, для расчета корреляции — непараметрический коэффициент корреляции Спирмана.

## Результаты

### *Объекты (участники) исследования*

Материалом для патоморфологического исследования были образцы ткани головного мозга (поля 1–8 по Бродману) 9 пациентов, умерших в стационаре в срок от 2 до 6 сут после развития ИИ в бассейне левой средней мозговой артерии (ЛСМА). Контрольные образцы были получены от людей, погибших в результате несчастного случая (3 человека). Исследовали кору головного мозга из трех зон (рис. 1): 1 — зоны, прилежащей непосредственно к очагу некротической ткани; 2 — зоны, отдаленной от предыдущей на 4–7 см; 3 — зоны контралатерального полушария, симметричной очагу ИИ (см. рис. 1). В группе контроля исследовали один образец ткани коры головного мозга поля 1–8 по Бродману. Анализировали семь случайных неперекрывающихся полей зрения в каждой из трех зон ( $n = 189$  полей зрения для каждой зоны) на трех отдельных срезах у каждого из 9 человек группы исследования и семи полей зрения в каждом из трех срезов у каждого из 3 человек группы контроля ( $n = 63$ ).

### *Основные результаты исследования*

Общая численная плотность нейронов (NSE-позитивных клеток) во всех исследуемых зонах достоверно отличалась от группы контроля, в которой она составила 1489 (1436,8; 1567,4) единиц на  $1 \text{ мкм}^2$  (ед./ $\text{мкм}^2$ ). Так, в зоне 1 она составила 418 (339,6; 496,3) ед./ $\text{мкм}^2$ , в зоне 2 — 835,9 (783,7; 940,4) ед./ $\text{мкм}^2$ , в зоне 3 — 1097,2 (1018,8; 1201,7) ед./ $\text{мкм}^2$  ( $p < 0,01$  для всех зон). При этом прослеживалась достоверная динамика увеличения общей численной плотности нейронов при удалении от ишемического очага ( $p < 0,01$ ). Наибольшее процентное содержание поврежденных нейронов отмечалось в зоне 1 (92,9 (88,9; 95,5)%), далее оно уменьшалось по мере удаления от очага и во зоне 2 составило 75 (71,4; 78,6)%, а в зоне 3 — 15 (10,3; 19,5)%. В контрольных образцах оно было наименьшим (10,3 (6,7; 13,5)%) и достоверно отличалось от всех зон исследования ( $p < 0,01$ ). При этом общая численная плотность поврежденных нейронов была наибольшей в зоне 2 и достигала 627 (574,7; 705,3) ед./ $\text{мкм}^2$ , тогда как в зоне 1 — лишь 391,8 (339,6; 470,2) ед./ $\text{мкм}^2$ . Это можно объяснить тем, что в зоне 1 общее количество нейронов на единицу площади было значительно снижено, поэтому, хотя поврежденные нейроны значимо преобладали в этой зоне, количественный показатель был достоверно меньшим ( $p < 0,01$ ). В зоне 3 и контрольных образцах также наблюдались значимые ( $p < 0,05$ ) отличия по данным показателям (156,7 (104,5; 209) ед./ $\text{мкм}^2$  и 13,9 (9,8; 18,6)% соответственно для общей численной плотности и для доли поврежденных нейронов).

Общая численная плотность клеточных элементов на единицу площади была наибольшей в зоне 1 и составляла 1462,9 (1175,5; 1724,1) ед./ $\text{мкм}^2$ , это происходило за счет лейкоцитарной инфильтрации. В других зонах лейкоцитарной инфильтрации не наблюдалось, там показатели были равны 1306,2 (1149,4; 1462,9) и 1724,1 (1593,5; 1880,9) ед./ $\text{мкм}^2$  соответственно для зон 2 и 3, что достоверно отличалось ( $p < 0,01$ ) от группы

контроля (2298,9 (2089,9; 2534) ед./мкм<sup>2</sup>).

Доля экспрессирующих белок c-fos нейронов была наибольшей в зоне 2 (36,4 (31,3; 42,4)%), что достоверно отличалось как от группы контроля (18,8 (15,3; 23,8)%), так и от показателей других зон (27,8 (20; 33,3)% и 32,6 (28,2; 38,1)% соответственно для зон 1 и 3) ( $p < 0,01$ ) (рис. 2).

Показатели экспрессии ERK1/2 и MAP2 в NSE-позитивных клетках имели схожие паттерны и достоверно отличались от группы контроля (соответственно 75 (69; 78)% и 86,7 (78; 92,5)%) только в образцах зоны 1 (57,1 (52,9; 61,5)% и 76,9 (68,8; 82,4)%). При этом для зон 1 и 2 были выявлены достоверные положительные корреляционные связи между долей ERK1/2 и c-fos-позитивных нейронов (для зон 1 и 2  $r = 0,277$  и  $r = 0,211$  соответственно,  $p < 0,01$ ) (рис. 3, 4).

Наибольшая представленность NOTCH1-позитивных нейронов отмечалась в зоне 1 и составляла 42,1 (36,4; 46,7)%, далее их доля достоверно снижалась ( $p < 0,01$ ) по мере удаления рассматриваемого образца от очага ишемии до 38,5 (34,4; 43,2)% во зоне 2 и до 33,3 (28,2; 39,5)% в зоне 3. Во всех исследованных зонах отличия от контрольного образца (30,8 (25,4; 35,8)%) были достоверными ( $p < 0,01$ ) (рис. 5).

Учитывая, что в общей выборке по критерию летального исхода присутствовали пациенты, умершие как на 1-е сут после поступления в стационар, так и к 6-м сут исследования, был проведен сравнительный анализ между этими подвыборками. Достоверные различия обнаружены лишь по четырем из всех исследованных параметров. Так, были выявлены достоверные различия общей численной плотности поврежденных нейронов во всех зонах исследования. Для зоны 1 значения общей численной плотности поврежденных нейронов составили 444,1 (313,5; 496,3) ед./мкм<sup>2</sup> и 365,7 (313,5; 444,1) ед./мкм<sup>2</sup>, соответственно для летальных исходов на 1-е и к 7-м сут исследования; в зоне 2 — 679,2 (627; 731,5) ед./мкм<sup>2</sup> и 600,8 (548,6; 705,3), в зоне 3 — 156,7 (130,6; 235,1) и 130,6 (78,4; 182,9) ед./мкм<sup>2</sup>. Из этих данных видно, что с течением времени от момента развития сосудистой катастрофы количество поврежденных нейронов в коре головного мозга снижалось. Это происходило на фоне отсутствия достоверных отличий в общей численной плотности нейронов, что можно объяснить либо их восстановлением, либо замещением. Значения доли поврежденных нейронов как расчетного показателя отношения общей численной плотности поврежденных нейронов к общей численной плотности нейронов полностью повторяли паттерны различий первой и были равны для зоны 1 — 100 (94,4; 100)% и 86,7 (81,8; 90,5)%, для зоны 2 — 78,1 (75; 83,3)% и 71,85 (67,6; 75)% и для зоны 3 — 16 (12,5; 22,5)% и 12,65 (7,9; 17,1)%. Общая численная плотность клеточных элементов имела различия в образцах коры головного мозга пациентов с летальным исходом на 1-е и к 7-м сут исследования только в зоне 2, где она увеличивалась с течением времени с 1253,9 (1123,3; 1358,4) до 1332,3 (1175,5; 1515,2) ед./мкм<sup>2</sup> ( $p < 0,01$ ). При проведении корреляционного анализа получены достоверные зависимости между следующими параметрами: доли c-fos- и ERK1/2-позитивных нейронов ( $r = 0,277$  и  $r = 0,211$ ,  $p < 0,01$  для зон 1 и 2 соответственно), доли ERK1/2-позитивных нейронов и ОЧП поврежденных нейронов в контроле ( $r = -0,289$ ;  $p < 0,05$ ), доли NOTCH1- и MAP2-позитивных нейронов в контроле ( $r = 0,260$ ;  $p < 0,05$ ).



**Резюме основного результата исследования**

Для острейшего периода ИИ характерно увеличение общей численной плотности и уменьшение доли поврежденных нейронов при удалении от ишемического очага, что сопровождается наибольшей долей c-fos протеин-позитивных нейронов в зоне 2, наибольшей представленностью NOTCH1-позитивных нейронов в зоне 1, меньшими долями ERK1/2- и MAP2-позитивных нейронов по сравнению с контрольными только в образцах зоны 1.

**Обсуждение основного результата исследования**

Для острейшего периода ИИ характерно увеличение общей численной плотности и уменьшение доли поврежденных нейронов при удалении от ишемического очага. При этом значения в образцах контралатерального очагу полушария достоверно отличаются от значений контрольных образцов. То есть при развитии локального ишемического повреждения изменения затрагивают весь головной мозг. Это связано с особенностями функционирования многоуровневых нейронных сетей: для обеспечения одной функции активируются нейроны, расположенные в разных участках головного мозга [1]. При повреждении какого-либо элемента вся сеть перестраивается либо деградирует, что сопровождается локальной активацией либо инициацией механизмов клеточной гибели [22]. Для активации и адаптивной перестройки нейрона под действием внешнего стимула требуется достаточное энергообеспечение [23], в противном случае инициированный сигнальный путь может изменить направление и привести клетку к гибели [24]. Так, в зоне 1 в условиях максимального по сравнению с зонами 2 и 3 субстратного дефицита и гипоксии наблюдались максимальные потери нейронов. При этом здесь выявлена минимальная доля c-fos-позитивных нейронов. Хотя экспрессия этого белка инициируется при изменении микроокружения нейрона [25], при столь выраженном дефиците энергии и субстратов ведет, как мы предполагаем, не к адаптивной перестройке системы, а к ее гибели [26]. Таким образом, для зоны 1 характерны повышенная ригидность и выраженное снижение диапазона адаптационного ответа ткани: любой внешний стимул с наибольшей вероятностью приводит клетку к реализации механизмов клеточной гибели. На уровне цитоархитектоники это выражается снижением клеточной плотности, отсутствием дифференциации на слои, а также значительным преобладанием поврежденных клеточных элементов. Наибольшая по сравнению с другими зонами доля NOTCH1-позитивных нейронов в зоне 1, вероятно, связана с ролью Notch1-сигнального пути в регуляции межклеточных взаимодействий [16]. Возможно, увеличение его экспрессии в зоне 1 связано с максимально выраженной потерей межклеточных нейрон-нейрональных и нейрон-астроглиальных взаимодействий и «автоматическим включением» системы их восстановления — попыткой, которая в условиях энергодефицита и ригидности системы ведет к ее гибели. Для зоны 1 также отмечена достоверная корреляционная связь между долями c-fos- и ERK1/2-позитивных нейронов. Этот результат соответствует экспериментальным данным других исследователей, которые показали возможность индукции ERK1/2-транскрипции раннего гена c-Fos [10]. Известно, что c-Fos и ERK используют в качестве маркеров активации нейронов [11, 12], однако, вероятно, в условиях суженного адаптационного диапазона зоны 1 она может

быть реализована клеточной гибелью. Вероятно, этим можно объяснить и сниженные в этой зоне (по сравнению с контрольными образцами и другими зонами) доли c-Fos- и ERK1/2-позитивных нейронов. Исходя из вышесказанного, объяснимым фактом является и минимальная доля MAP2-позитивных нейронов в зоне 1. Для накопления в нейроне MAP2, оказывающего влияние на структуру цитоскелета, регуляцию транспорта веществ, необходимых для синаптической передачи сигналов, обеспечивающего перестройку дендритов и шипикового аппарата [14] необходима нейромедиаторная и электросинаптическая стимуляция нейрона. Эти процессы должны быть обеспечены энергией, субстратами, целостностью участка нейронной сети, чего нет в периферической зоне пенумбры. Зона 2 отличалась наибольшей долей c-fos протеин-позитивных нейронов. Как и в зоне 1, этот показатель достоверно коррелировал с долей ERK1/2-позитивных нейронов, что свидетельствует об инициированном повреждении активации [11]. Учитывая, что общая численная плотность нейронов здесь была на порядок больше, чем в зоне 1, и приближалась по значениям к зоне 3, а также значительно увеличивалась доля морфологически сохранных и MAP2-позитивных нейронов, можно сделать вывод о состоянии повышенной лабильности и расширенного адаптационного диапазона именно этого участка коры. Представленность NOTCH1-позитивных нейронов здесь была выше, чем в контрольных образцах и зоне 3, что может свидетельствовать об инициации потенцирования межклеточной коммуникации. Показатели экспрессии ERK1/2 достоверно не отличались от группы контроля, но при этом как в зоне 3, так и в контроле не выявлено корреляции между долями ERK1/2- и c-fos-позитивных нейронов. Это позволяет предложить использование указанного критерия для отличия между активацией ткани мозга непосредственно поврежденной и опосредованной активацией интактной ткани. Следовательно, можно заключить, что зона 2 — это зона расширенного адаптационного диапазона, обладающего повышенной лабильностью нервной ткани. Ее элементы, по нашему мнению, более чувствительны к внешним стимулам, нежели в интактной ткани, и обладают расширенным диапазоном ответа. Это обеспечивает, с одной стороны, интенсивное формирование новых межнейронных и нейроглиальных взаимодействий, но с другой — в любой момент при незначительном колебании метаболического обеспечения переключение на реализацию апоптоз-индуцирующих клеточных каскадов. Зона 3, по нашему мнению, является зоной повышенной активации интактной ткани. Однако, учитывая ее иммуногистохимические характеристики, ее лабильность ниже, чем таковая зоны 2. Достоверные отличия изученных показателей этой зоны от контрольных образцов, на наш взгляд, можно объяснить не повреждающим эффектом ишемии (так как зона ишемии локальна и находится в противоположном полушарии: в зоне 3 уровень субстратного и энергообеспечения не уменьшался ниже критических величин), а адаптивными процессами, направленными на формирование новых нейронных сетей, которые будут обеспечивать восполнение или замещение утраченной в результате ИИ функции пациента.

### Ограничения исследования

Все пациенты, чьи образцы ткани головного мозга были взяты из соответствующих банков данных, получали объем медицинской помощи в соответствии со стандартом медицинской помощи больным с инсультом (при оказании специализированной помощи), что не учитывалось при исследовании. Также не учитывались факт, продолжительность и

характеристики интенсивной терапии.

### Заключение

Ранее проведенные исследования показывают, что экспрессия ERK1/2, сопряженная с экспрессией c-fos, может быть использована в качестве маркера активации нейронов на моделях локальной ишемии-реперфузии головного мозга у крыс. Активация Notch1 сигнального пути свидетельствует об интенсивности поиска межклеточного взаимодействия, а MAP2, оказывая влияние на структуру цитоскелета, регулируя транспорт веществ, обеспечение синаптической передачи, — о его реализации. При развитии локального ишемического повреждения изменения указанных параметров затрагивают весь головной мозг. Контралатеральное очагу полушарие является зоной повышенной активации интактной ткани, тогда как участки коры, прилежащие непосредственно к очагу (зона 1) и отдаленные от него (зона 2), имеют признаки патологической активации. При этом для зоны 1 характерна повышенная ригидность (снижение диапазона адаптационного ответа ткани), а для зоны 2 — повышенная лабильность (расширение адаптационного диапазона). Поэтому ключевой мишенью для терапевтического воздействия является зона 2.

## Дополнительная информация

**Источник финансирования.** Исследование и публикация статьи осуществлены на личные средства авторского коллектива.

**Конфликт интересов.** Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

**Участие авторов.** С.П. Сергеева — поисково-аналитическая работа, построение дизайна, координирование исследования, работа с пациентами, исследование гистологических препаратов, оформление сопутствующей документации, написание статьи; А.В. Люндуп — поисково-аналитическая работа, координирование исследования, обеспечение лабораторной базы исследования; В.В. Береговых — поисково-аналитическая работа, редактирование текста, научное консультирование; А.А. Савин — обеспечение клинической базы исследования, консультирование по клиническим аспектам исследования, поисково-аналитическая работа; П.Ф. Литвицкий — консультирование по патофизиологическим аспектам исследования, построение дизайна, поисково-аналитическая работа, редактирование статьи; Л.Р. Горбачева — поисково-аналитическая работа, консультирование по морфологическим аспектам, редактирование; Е.В. Киселева — выполнение иммуногистохимического исследования; И.Д. Бреславич — статистическая обработка, формулирование концепции; К.И. Куценко — обеспечение патоморфологической базы исследования, работа с банком данным; Л.В. Шишкина — обеспечение лабораторной базы исследования, научное консультирование в чтении гистологических препаратов.

## Литература

1. Pool EM, Leimbach M, Binder E, et al. Network dynamics engaged in the modulation of motor behavior in stroke patients. *Human brain mapping*. 2018;39(3):1078–1092. doi: 10.1002/hbm.23872.
2. Kim DH, Lee HE, Kwon KJ, et al. Early immature neuronal death initiates cerebral ischemia-induced neurogenesis in the dentate gyrus. *Neuroscience*. 2015;284:42–54. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.09.074.
3. Schuldiner O, Yaron A. Mechanisms of developmental neurite pruning. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2015;72(1):101–119. doi: 10.1007/s00018-014-1729-6.
4. Maor-Nof M, Yaron A. Neurite pruning and neuronal cell death: spatial regulation of shared destruction programs. *Current opinion in neurobiology*. 2013;23(6):990–996. doi: 10.1016/j.conb.2013.06.007.

5. Шерстнев В.В., Юрасов В.В., Сторожева З.И., и др. Нейрогенез и апоптоз в зрелом мозге при формировании и упрочении долговременной памяти // *Нейрохимия*. — 2010. — Т. 27. — № 2. — С. 130–137. [Sherstnev VV, Yurasov VV, Storozheva ZI, et al. Neurogenesis and apoptosis in the mature brain during formation and consolidation of long-term memory. *Neurochemical Journal*. 2010;4(2):109–115. (In Russ.)]

6. Авдеев Д.Б., Акулинин В.А., Степанов А.С., и др. Плейотропные ферменты апоптоза и синаптическая пластичность гиппокампа белых крыс после окклюзии общих сонных артерий // *Сибирский медицинский журнал*. — 2018. — Т. 33. — № 3. — С. 102–110. doi: 10.29001/2073-8552-2018-33-3-102-110. [Avdeev DV, Akulinin VA, Stepanov AS, et al. Pleiotropic enzymes of apoptosis and synaptic plasticity in albino rat hippocampus after occlusion of common carotid arteries. *The Siberian Medical Journal*. 2018;33(3):102–110. (In Russ.)]

7. Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004;68:320–344. doi: 10.1128/membr.68.2.320-344.2004.

8. Pernet V, Hauswirth WW, Di Polo A. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 mediates survival, but not axon regeneration, of adult injured central nervous system neurons *in vivo*. *Journal of neurochemistry*. 2005;93(1):72–83. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03002.x.

9. Kim SY, Han YM, Oh M, et al. DUSP4 regulates neuronal differentiation and calcium homeostasis by modulating ERK1/2 phosphorylation. *Stem Cells and Development*. 2014;24(6):686–700. doi: 10.1089/scd.2014.0434.

10. Kaczmarek L. From c-Fos to MMP-9: in control of synaptic plasticity to produce healthy and diseased mind, a personal view. *Postepy Biochemii*. 2018;64(2):101–109. doi: 10.18388/pb.2018\_119.

11. Gao YJ, Ji RR. C-Fos and pERK, which is a better marker for neuronal activation and central sensitization after noxious stimulation and tissue injury? *The Open Pain Journal*. 2009;2:11–17. doi: 10.2174/1876386300902010011.

12. Liu W, Wu W, Lin G, et al. Physical exercise promotes proliferation and differentiation of endogenous neural stem cells via ERK in rats with cerebral infarction. *Molecular Medicine Reports*. 2018;18(2):1455–1464. doi: 10.3892/mmr.2018.9147.

13. Xiao P, Liu XW, Zhao NN, et al. Correlations of neuronal apoptosis with expressions of c-Fos and c-Jun in rats with post-ischemic reconditioning damage. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2018;22(9):2832–2838. doi: 10.26355/eurrev\_201805\_14984.

14. Samandari H, Nabavizadeh F, Ashabi G. Age-related difference in protective effect of early post-conditioning on ischemic brain injury: possible involvement of MAP-2/Synaptophysin role. *Metabolic Brain Disease*. 2019;34(6):1771–1780. doi: 10.1007/s11011-019-00484-3.

15. Tu M, Zhu P, Hu S, et al. Notch1 signaling activation contributes to adult hippocampal neurogenesis following traumatic brain injury. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. 2017;23:5480. doi: 10.12659/MSM.907160.

16. Zhang X, Yang C, Gao J, et al. Voluntary running-enhanced synaptic plasticity, learning and memory are mediated by Notch1 signal pathway in C57BL mice. *Brain Structure and Function*. 2018;223(2):749–767. doi: 10.1007/s00429-017-1521-0.

17. Меркулов Г.А. Курс патологогистологической техники. — СПб: Медгиз, 1961. — 340 с. [Merkulov GA. Course of histopathological technology. St. Petersburg, Medgiz, 1961. 340 p. (In Russ).]

18. Саркисов Д.С., Перов Ю.Л., Лысенко Л.В. Микроскопическая техника. — М.: Медицина, 1996. [Sarkisov DS, Perov YuL, Lysenko LV. Microscopic technology. Moscow: Medicine; 1996. (In Russ).]

19. Мальков П.Г., Франк Г.А., Москвина Л.В., и др. Основы обеспечения качества в гистологической лабораторной технике: руководство / под ред. П.Г. Малькова, Г.А. Франка. — М.: У Никитских ворот, 2011. — 108 с. [Malkov PG, Frank GA, Moskvina LV, et al. Fundamentals of quality assurance in histological laboratory technology. guidelines. Ed. by Malkova P.G., Franka G.A. Moscow: U Nikitskih vorot; 2011. 108 p. (In Russ).]

20. Мыщик А.В., Акулинин В.А., Степанов С.С., Ларионов П.М. Влияние ишемии на нейроглиальные взаимоотношения лобной коры большого мозга человека // Омский научный вестник. — 2013. — № 1. — С. 74–77. [Mytsik AV, Akulinin VA, Stepanov SS, Larionov PM. Ischemia influence of the neuroglial relations of frontal cortex of the human brain. *Omskiy Nauchniy vestnik*. 2013;1:74–77. (In Russ).]

21. Мыщик А.В. Использование программы ImageJ для автоматической морфометрии в гистологических исследованиях // Омский научный вестник. — 2011. — № 2. — С. 187–189. [Mytsik AV. Using ImageJ software application for automated morphometry of histological studies. *Omskiy Nauchniy vestnik*. 2011;2:187–189. (In Russ).]

22. McDowell JJ. Behavioral and neural Darwinism: selectionist function and mechanism in adaptive behavior dynamics. *Behavioural Processes*. 2010;84(1):358–365. doi: 10.1016/j.beproc.2009.11.011.

23. Leigh R, Knutsson L, Zhou J, van Zijl PC. Imaging the physiological evolution of the ischemic penumbra in acute ischemic stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2018;38(9):1500–1516. doi: 10.1177/0271678X17700913.

24. Cunha RA. How does adenosine control neuronal dysfunction and neurodegeneration? *Journal of Neurochemistry*. 2016;139(6):1019–1055. doi: 10.1111/jnc.13724.

25. Neyazi B, Schwabe K, Alam M, et al. Neuronal expression of c-Fos after epicortical and intracortical electric stimulation of the primary visual cortex. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 2016;77:121–128. doi: 10.1016/j.jchemneu.2016.06.004.

26. Chen X, Shen J, Wang Y, et al. Up-regulation of c-Fos associated with neuronal apoptosis following intracerebral hemorrhage. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2015;35(3):363–376. doi: 10.1007/s10571-014-0132-z.

#### Контактная информация

**Сергеева Светлана Павловна**, к.м.н. [*Svetlana P. Sergeeva*, MD, PhD]; адрес: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2 [address: 8, bld. 2, Trubetskaya str., 119991, Moscow, Russia]; e-mail: svetlanapalna@mail.ru, SPIN-код: 4257-9498, ORCID: 0000-0002-0083-1213

**Людуп Алексей Валерьевич**, к.м.н. [*Alexey V. Lyundup*, MD, PhD]; e-mail: lyundup@gmail.com, SPIN-код: 4954-3004, ORCID: 0000-0002-0102-5491

**Береговых Валерий Васильевич**, д.т.н., профессор, академик РАН [*Valery V. Beregovykh*, MD, PhD, Professor, Academician of the RAS]; e-mail: beregovykh@ramn.ru, SPIN-код: 5940-7554, ORCID: 0000-0002-0210-4570

**Савин Алексей Алексеевич**, д.м.н., профессор [*Aleksey A. Savin*, MD, PhD, Professor]; e-mail: lasavin@mail.ru, SPIN-код: 9162-6720, ORCID: 0000-0002-6340-8623

**Литвицкий Петр Францевич**, д.м.н., профессор, чл.-корр. РАН [*Petr F. Litvitskiy*, MD, PhD, Professor, Corresponding Member of the RAS]; e-mail: litvicki@mma.ru, SPIN-код: 6657-5937, ORCID: 0000-0003-0151-9114

**Горбачева Любовь Руфэлевна**, д.б.н., профессор [*Liubov R. Gorbacheva*, PhD, Professor]; e-mail: gorbacheva@mail.bio.msu.ru, SPIN-код: 4394-0575, ORCID: 0000-0002-3910-8831

**Киселева Екатерина Владимировна**, к.б.н. [*Ekaterina V. Kiseleva*, PhD]; e-mail: evkiseleva@mail.ru, SPIN-код: 7421-8496, ORCID: 0000-0002-2270-6595

**Бреславич Илья Дмитриевич**, ассистент [*Ilya D. Breslavich*]; e-mail: br\_i@inbox.ru, SPIN-код: 9615-9237, ORCID: 0000-0002-9321-9102

**Куценко Кирилл Игоревич**, к.м.н. [*Kirill I. Kutsenko*, MD, PhD]; e-mail: ceamler@gmail.com, SPIN-код: 8964-3717, ORCID: 0000-0001-9299-5153

**Шишкина Людмила Валентиновна**, к.м.н. [*Lyudmila V. Shishkina*, MD, PhD]; e-



Рисунки

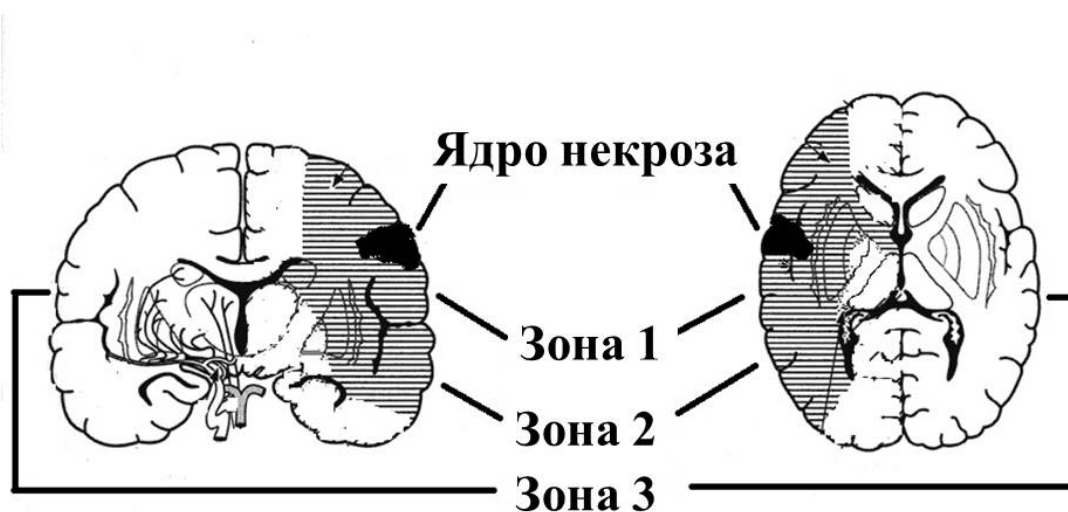


Рис. 1. Схематичное изображение исследованных зон коры головного мозга.

Article



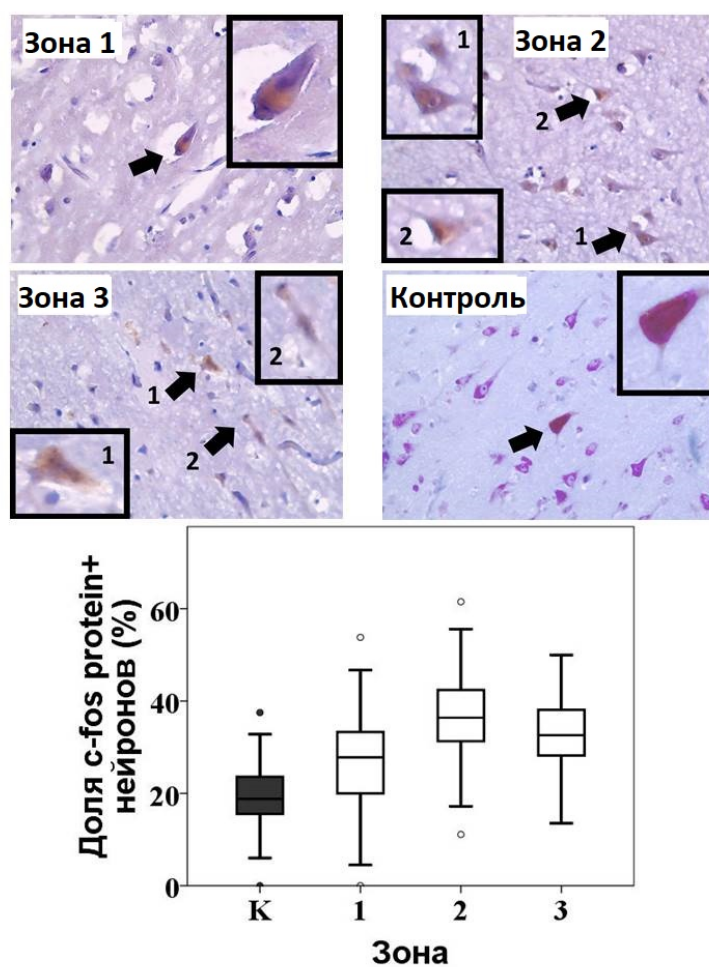


Рис. 2. Нейроны, экспрессирующие белок c-fos

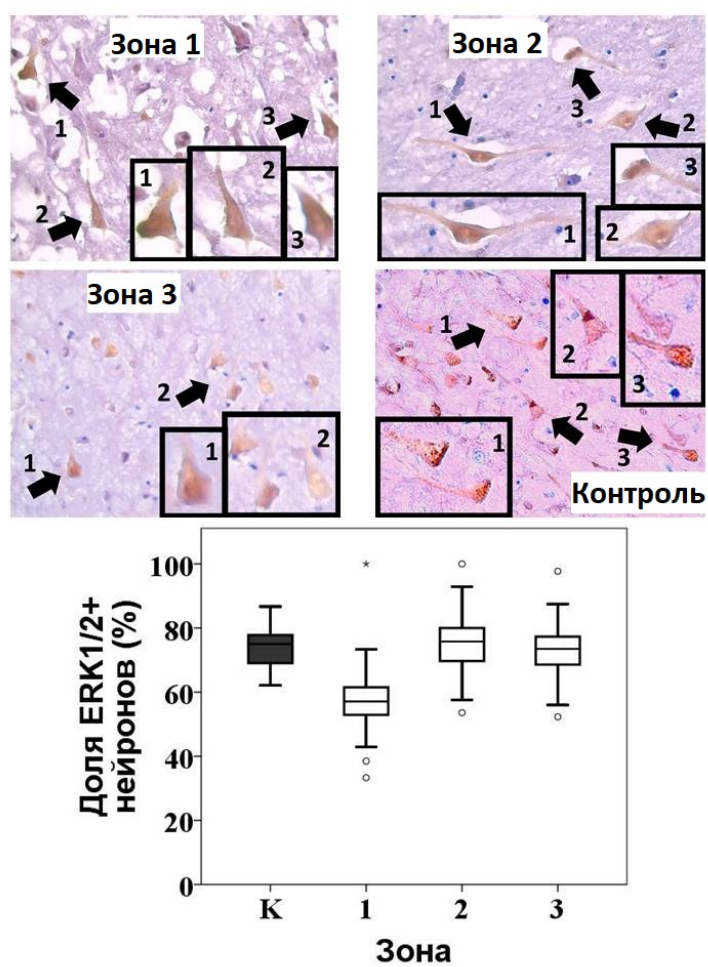


Рис. 3. Нейроны, экспрессирующие белок ERK1/2

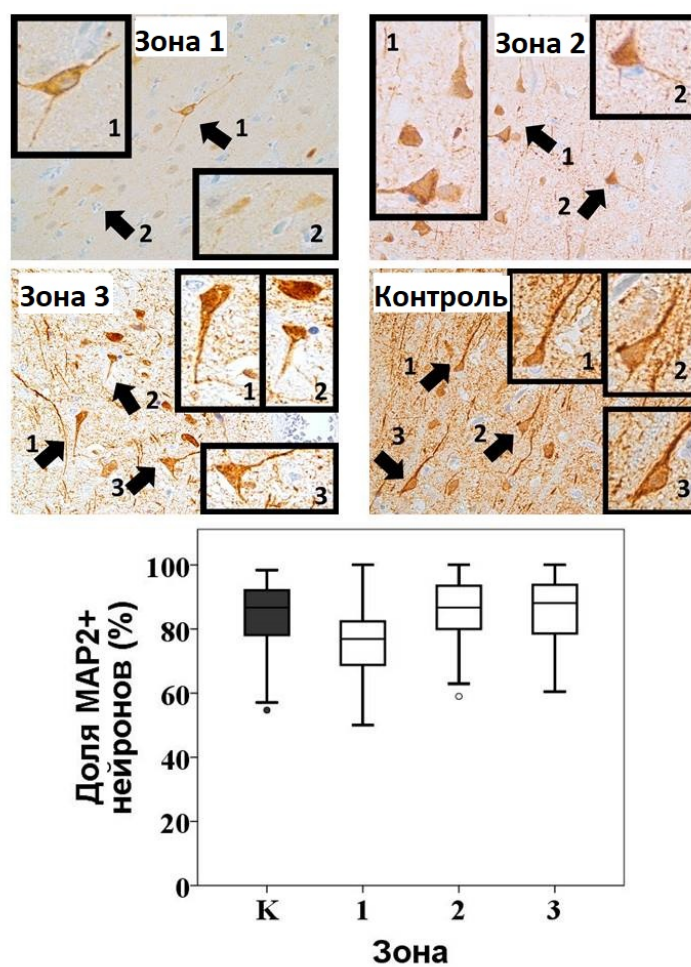


Рис. 4. Нейроны, экспрессирующие белок MAP-2

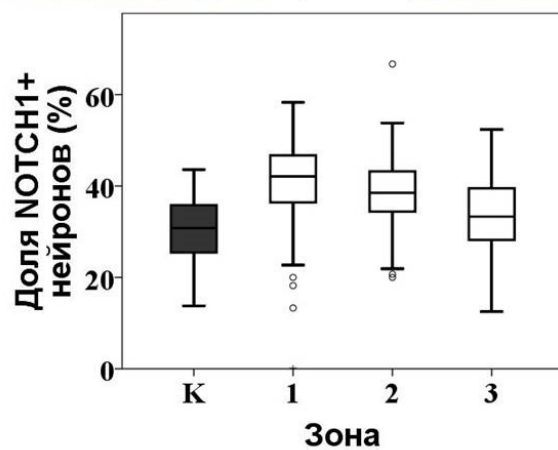
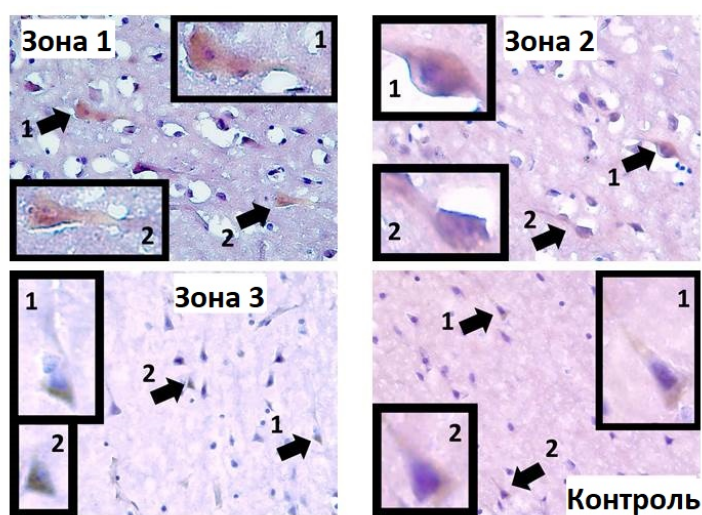


Рис. 5. Нейроны, экспрессирующие белок NOTCH1