

Кортизол как фактор, определяющий регуляцию апоптоза нейронов коры головного мозга в остром периоде ишемического инсульта (клинико-патоморфологическое исследование)

Сергеева С.П.¹, Савин А.А.², Литвицкий П.Ф.³, Горбачева Л.Р.¹, Люндуп А.В.^{1,4}, Бреславич И.Д.¹, Савин Л.А.²

¹ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва; ²ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, Москва; ³ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва;

⁴ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы», Москва

¹Россия, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1; ²Россия, 127473, Москва, ул. Делегатская, 20, стр. 1;

³Россия, 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2; ⁴Россия, 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

В ответ на развитие ишемического инсульта (ИИ) происходит закономерная активация стресс-реализующей системы. Особенности ее активации влияют на исход острого периода, прогноз восстановления и могут быть скорректированы. При этом остается неизученным вопрос роли стресс-реализующей системы в патогенезе ИИ.

Цель исследования — изучить влияние концентрации кортизола периферической крови на регуляцию апоптоза нейронов коры головного мозга в остром периоде ИИ.

Материал и методы. Проведено проспективное клинико-патоморфологическое исследование, в которое были включены 9 пациентов с ИИ в бассейне левой средней мозговой артерии, поступивших в стационар и умерших в острейшем периоде ИИ при отсутствии инфекционных осложнений, аллергических реакций, онкологических заболеваний и которым не был проведен тромболизис. Исследовали кору головного мозга. На срезах непрямым иммунопероксидазным иммуногистохимическим методом выявляли нейронспецифическую енолазу (neuron-specific enolase, NSE), белок p53 (protein 53, p53), каспазу 3 (casp3), каспазу 8 (casp8), Fas-рецептор (CD95), Fas-лиганд (CD178), Fas-апоптоз-ингибиторную молекулу 2 (Fas apoptotic inhibitory molecule 2, FAIM2). Всего обработано 567 полей зрения для группы пациентов после ИИ и 63 поля зрения для группы контроля (три человека). До наступления летального исхода в крови методом иммуноферментного анализа были определены концентрации растворимых форм лиганда (sFasL) и рецептора (sFas) Fas, кортизола, адренокортикотропного гормона, адреналина, норадреналина (группу контроля составили 28 человек).

Результаты. Выявлены значимые корреляционные связи доли casp3-позитивных нейронов с концентрацией в периферической крови кортизола в зонах 2 ($r=0,263$; $p<0,01$) и 3 ($r=0,383$; $p<0,01$). В зоне 2 отмечены значимые отрицательные корреляционные связи с концентрациями sFas ($r=-0,177$; $p<0,05$) и sFasL ($r=-0,164$; $p<0,05$), в зоне 3 — значимые положительные корреляционные связи с соотношением концентраций sFasL и sFas ($r=0,240$; $p<0,01$). Доля Fas-позитивных нейронов в коре головного мозга значимо коррелировала с концентрацией растворимой формы этой молекулы (для зоны 1 — $r=0,222$, для зоны 2 — $r=0,438$, для зоны 3 — $r=0,289$; $p<0,01$) и соотношением концентраций sFasL и sFas (соответственно $r=0,231$, $r=0,266$ и $r=0,281$; $p<0,01$) в периферической крови.

Заключение. Концентрация кортизола в периферической крови является фактором, определяющим регуляцию апоптоза нейронов коры головного мозга в остром периоде ИИ.

Ключевые слова: апоптоз; инсульт; кортизол; адренокортикотропный гормон; стресс; адреналин; норадреналин.

Контакты: Светлана Павловна Сергеева; svetlanapalna@mail.ru

Для ссылки: Сергеева СП, Савин АА, Литвицкий ПФ, Горбачева ЛР, Люндуп АВ, Бреславич ИД, Савин ЛА. Кортизол как фактор, определяющий регуляцию апоптоза нейронов коры головного мозга в остром периоде ишемического инсульта (клинико-патоморфологическое исследование). Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2024;16(1):49–56. DOI: 10.14412/2074-2711-2024-1-49-56

Cortisol as a cerebral cortex neurons apoptosis regulator in acute phase of ischemic stroke (clinical and pathological study)

Sergeeva S.P.¹, Savin A.A.², Litvitsky P.F.³, Gorbacheva L.R.¹, Lyundup A.V.^{1,4}, Breslavich I.D.¹, Savin L.A.²

¹Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia, Moscow; ²A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Ministry of Health of Russia, Moscow; ³I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Ministry of Health of Russia, Moscow; ⁴Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow

¹1, Ostrovitianova St., Moscow 117997, Russia; ²20, Delegatskaya St., Build. 1, Moscow 127473, Russia;

³8, Trubetskaya St., Build. 2, Moscow 119991, Russia; ⁴6, Miklukho-Maklaya St., Moscow 117198, Russia

In response to ischemic stroke (IS) a natural activation of the stress-realizing system occurs. The features of this activation influence the outcome of the acute period and the prognosis of recovery and can be adjusted. At the same time, the role of the stress-realizing system in the pathogenesis of IS is still unexplored.

Objective: to investigate the effect of peripheral blood cortisol concentration on the regulation of apoptosis of neurons of the cerebral cortex in the acute phase of IS.

Material and methods. A prospective clinical and pathological study was performed. It included 9 patients with IS in the left middle cerebral artery territory who were admitted to hospital and died in the hyperacute phase of IS and had no infectious complications, allergic reactions or oncological diseases and who did not undergo thrombolysis. The cerebral cortex was examined. Neuron-specific enolase (NSE), protein 53 (p53), caspase 3, caspase 8, Fas receptor (CD95), and Fas apoptotic inhibitory molecule 2 (FAIM2) were determined on the slices using an indirect immunoperoxidase immunohistochemical staining method. A total of 567 microscopic fields were analysed for the group of patients with IS and 63 fields for the control group (three people). Before death, the blood concentrations of sFas, sFasL, cortisol, adrenocorticotrophic hormone, adrenaline and norepinephrine were determined by enzyme immunoassay (the control group consisted of 28 people).

Results. Significant correlation was found between the proportion of casp3-positive neurons and the concentration of cortisol in peripheral blood in zones 2 ($r=0.263$; $p<0.01$) and 3 ($r=0.383$; $p<0.01$). In the 2nd zone, significant negative correlation was found with the concentrations of sFas ($r=-0.177$; $p<0.05$) and sFasL ($r=-0.164$; $p<0.05$); in the 3rd zone, significant positive correlation was found with the ratio of the concentrations of sFasL and sFas ($r=0.240$; $p<0.01$). The proportion of Fas-positive neurons in the cerebral cortex correlated significantly with the concentration of the soluble form of this molecule (for the 1st zone — $r=0.222$, for the 2nd zone — $r=0.438$, for the 3rd zone — $r=0.289$; $p<0.01$) and the ratio of the concentrations of sFasL and sFas (respectively: $r=0.231$, $r=0.266$ and $r=0.281$; $p<0.01$) in the peripheral blood.

Conclusion. Peripheral blood cortisol concentration is a factor that determines the regulation of apoptosis of neurons in the cerebral cortex in the acute phase of IS.

Keywords: apoptosis; stroke; cortisol; adrenocorticotrophic hormone; stress; adrenaline; norepinephrine.

Contact: Svetlana Pavlovna Sergeeva; svetlanapalna@mail.ru

For reference: Sergeeva SP, Savin AA, Litvitsky PF, Gorbacheva LR, Lyundup AV, Breslavich ID, Savin LA. Cortisol as a cerebral cortex neurons apoptosis regulator in acute phase of ischemic stroke (clinical and pathological study). *Nevrologiya, neiropsikhiatriya, psikhosomatika* = *Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics*. 2024;16(1):49–56. DOI: 10.14412/2074-2711-2024-1-49-56

Ишемический инсульт (ИИ) — распространенное заболевание, которое имеет значимые для общества медико-социальные и экономические последствия [1]. Установлено, что во все периоды его развития (острейший, острый, восстановительный) одним из основных механизмов гибели нейронов головного мозга является апоптоз — сложный энергозависимый процесс регулируемого разрушения клетки [2]. В нейронах головного мозга при ИИ могут реализовываться механизмы апоптоза каспазозависимого, а также каспазозависимых внутреннего и внешнего путей [3]. В регуляции клеточной гибели, как проапоптотическому, большое значение придают транскрипционному фактору p53. Он связан с инициацией каспазозависимого и внутреннего каспазозависимого путей апоптоза [4]. Ранее мы публиковали данные об изменениях морфологической структуры коры головного мозга после ИИ и особенностях экспрессии нейронами и астроцитами фактора p53 [5], эта работа позволила сформулировать новые вопросы и послужила отправной точкой для представленного исследования. Каспаза-3 (casp3) считается универсальным индикатором апоптотической активности клетки, ее активация играет значимую роль в апоптозе нейронов и считается терминальным событием, предшествующим гибели клетки [6]. Внешний путь активации casp3 является casp8-зависимым и инициируется посредством связывания лигандов смерти с их рецепторами. Одними из таких являются лиганд и рецептор системы Fas. Существуют растворимые формы ее лиганда (sFasL) и рецептора (sFas), которые образуются в основном в результате шеддинга и альтернативного сплайсинга. При этом мембранные рецепторы могут быть активированы как растворимыми, так

и мембраносвязанными лигандами. В свою очередь растворимые формы рецепторов могут связывать и нейтрализовать лиганды [7]. В ряде работ отмечена значимость системы Fas/FasL в патогенезе острого периода и развития отдаленных последствий ИИ: объем повреждения нервной ткани при различной патологии был связан с концентрацией растворимых факторов Fas в крови и тяжестью состояния, в других работах было отмечено повышение уровней Fas и FasL в скомпрометированных участках головного мозга при моделировании различных неврологических расстройств, в том числе ИИ, у животных [8]. В то же время установление факта инициации апоптоза, а также активации в клетке апоптоз-индуцирующих каскадов не всегда означает, что эта клетка погибнет вообще или погибнет посредством реализации апоптоза. Апоптотический сигнал может оказывать эффекты, способствующие восстановлению и адаптации клеточной популяции к условиям, запустившим механизмы апоптоза [9]. Описано семейство Fas-ингибирующих молекул, наибольший интерес из которых в аспекте поднятой проблемы представляет молекула Faim2, повышение экспрессии которой приводит к уменьшению Fas-ассоциированного апоптоза нейронов при различных патологических состояниях [10].

Необходимо отметить также, что в условиях энергодефицита апоптоз не может быть полноценно реализован, в результате чего клетка переходит на реализацию другого варианта гибели, требующего меньше энергии и, вероятно, имеющего значение для ухудшения клинических проявлений инсульта и тяжести состояния пациента [11]. Исходя из вышесказанного, значимой представляется задача регулирования в нейронах головного мозга при развитии

ИИ апоптоза и процессов, сопряженных с его инициацией. Для этого требуется изучение влияния отдельных факторов на его реализацию и клиническую картину болезни. Ранее нами были получены данные о влиянии концентрации гормонов стресс-реализующей системы на исход острого периода ИИ и о морфологических изменениях головного мозга пациентов после ИИ [5, 12], которые свидетельствовали в пользу того, что в качестве одного из таких факторов может выступать концентрация кортизола в периферической крови. Показано, что концентрация кортизола оказывает влияние на реализацию нейронами апоптоза в культуре клеток и на животных моделях [13]. Концентрация кортизола в периферической крови увеличивается при развитии депрессии, что ассоциировано с активацией процессов гибели нейронов в головном мозге [14]. При этом почти у 40% пациентов, перенесших инсульт, развивается депрессия, что значительно ухудшает прогноз их восстановления [15]. В то же время ряд авторов рассматривают ИИ как стрессовое воздействие, в ответ на которое происходит закономерная активация стресс-реализующей системы. Особенности ее активации влияют на исход острого и прогноз восстановительного периода [16]. При этом существуют клинические способы, позволяющие регулировать интенсивность ответа стресс-реализующей системы, а также преобладающей оси (симпатоадреналовой, что считается протективным, или гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой, с ее основным медиатором кортизолом, что ухудшает прогноз) [17, 18].

Цель настоящей работы — изучить влияние концентрации кортизола периферической крови на регуляцию апоптоза нейронов коры головного мозга в остром периоде ИИ (клинико-патоморфологическое исследование).

Материал и методы. Материалом исследования были образцы ткани коры головного мозга девяти пациентов (пять мужчин и четыре женщины) с впервые перенесенным ИИ в бассейне левой средней мозговой артерии, поступивших в специализированный стационар в течение острейшего периода и умерших в период до 7 сут пребывания в стационаре, которым не была проведена реканализационная терапия и у которых на момент пребывания в стационаре не было аллергических реакций, инфекционных, онкологических и аутоиммунных заболеваний. Образцы ткани пациентов, умерших после ИИ, получали из биобанка патологоанатомического отделения клинической больницы №36 им. Ф.И. Иноземцева, группы контроля (три человека) — из биобанка «Бюро судебно-медицинской экспертизы Департамента здравоохранения г. Москвы» в виде парафиновых блоков. Выполнение научной работы не влияло на факт проведения патологоанатомического исследования, не предполагало изменения его протокола и заключалось в дополнительном гистологическом и иммуногистохимическом исследовании образцов, предоставленных из биобанков.

Исследовали три зоны коры головного мозга: зона 1 прилежала непосредственно к очагу некротической ткани, зона 2 была отдалена от предыдущей на 4–7 см, зона 3 находилась в контралатеральном полушарии и была симметрична очагу ИИ. В группе контроля исследовали один образец ткани коры головного мозга области кровоснабжения левой средней мозговой артерии. Срезы толщиной 5 мкм изготавливали на ротационном микротоме Leica RM2125RT (Leica,

Германия). Полученные срезы изучали с помощью светового микроскопа AxioScope A1 (Carl Zeiss, Германия), оснащенного цифровой фотокамерой Canon Power Shot, с использованием программного обеспечения AxioVision LE (Carl Zeiss, Германия). Визуальную оценку и морфометрический анализ коры головного мозга проводили на полученных с использованием вышеуказанного оборудования цифровых фотографиях (объектив $\times 40$, апертура 0,9) с размером изображения 1300×1030 пикселей, реальным размером захваченной области 220×174 мкм (38×280 мкм²). Исследовали семь случайных полей зрения каждого из трех срезов каждой из трех зон у каждого из девяти человек группы пациентов с ИИ (189 полей зрения для каждой из трех зон). Всего обработано 567 полей зрения для группы пациентов после ИИ. В группе контроля у каждого из трех человек было обработано по семь полей зрения каждого из трех срезов ($n=63$).

На срезах непрямым иммунопероксидазным иммуногистохимическим методом выявляли нейронспецифическую енолазу (neuron-specific enolase, NSE), белок p53 (protein 53, p53), casp3, casp8, Fas-рецептор (CD95), Fas-лиганд (CD178), Fas-апоптоз-ингибиторную молекулу 2 (Fas apoptotic inhibitory molecule 2, FAIM2). Для иммунофенотипирования использовали моноклональные антитела к указанным белкам человека (Vision BioSystems Novocastra, Великобритания) и пероксидазную детекционную систему Peroxidase Detection System for Novocastra (Leica Microsystems, Германия), включающую вторичные универсальные биотинилированные антитела и стрептавидин-пероксидазный комплекс. Визуализация реакции осуществлялась с использованием DAB-хромогена. Для фонового контрастирования срезов применяли гематоксилин Майера.

У всех вышеуказанных пациентов при поступлении в стационар оценивали выраженность неврологического дефицита в баллах по Шкале инсульта Национального института здоровья (National Institutes of Health Stroke Scale, NIHSS), а также при помощи стандартных тест-систем и многоканального спектрофотометра Multiscan EX (LabSystems, Финляндия) методом иммуноферментного анализа в периферической крови определяли содержание sFas, sFasL, кортизола, адренкортикотропного гормона (АКТГ), адреналина, норадреналина. Участие в исследовании не изменяло плана диагностических и лечебных мероприятий: все пациенты получали объем медицинской помощи в соответствии со стандартом медицинской помощи больным с инсультом (при оказании специализированной помощи). Исследование соответствовало требованиям Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2000) и было одобрено Межвузовским комитетом по этике (выписка из протокола заседания от 26.09.2019 № 08-19), все участники были включены в исследование после подписания ими формы информированного согласия, одобренной этическим комитетом. Группу контроля для оценки лабораторных показателей составили 28 относительно здоровых сопоставимых по возрасту с группой исследования человек (15 мужчин и 13 женщин).

Статистическая обработка данных проводилась при помощи программного обеспечения Statistica 6.0 (StatSoft, США). Для проверки гипотезы о законе распределения дан-

ных применяли критерий Пирсона, критерий χ^2 и критерий Колмогорова—Смирнова. При неподтверждении нормальности распределения у выборки указывали медиану, в скобках приводили нижний и верхний квартили (Me [25-й; 75-й перцентили]). Для работы с такими выборками использовали непараметрические методы. При подтверждении нормальности распределения количественные данные представляли в виде среднего (M) $\pm$ стандартное отклонение (SD). Для сравнения средних использовали параметрические методы анализа. Оценка уровня значимости различия двух выборок (p-уровень) проводилась при помощи t-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. Средний возраст, включенных в исследование пациентов составил $66,9 \pm 9,9$ года, в группе контроля — $63,2 \pm 8,4$ года. Средний балл по шкале NIHSS при поступлении в стационар у пациентов с ИИ составил $14,1 \pm 3,3$. Основными заболеваниями системы кровообращения у всех пациентов, включенных в основную группу исследования, были артериальная гипертензия и атеросклероз. Основной причиной наступления летального исхода у пациентов, включенных в исследование, явилось развитие тромбоэмболии легочной артерии.

В таблице приведены концентрации исследованных показателей периферической крови в группе пациентов с ИИ и контрольной группе. Значимые различия выявлены по следующим из них: sFasL, кортизол, АКТГ ($p < 0,01$).

При окрашивании срезов коры головного мозга пациентов, умерших после ИИ, гематоксилином и эозином и выполнении иммуногистохимической реакции для выявления NSE были обнаружены изменения, характер которых зависел от удаленности зоны исследования от ишемического очага. Так, в зоне 1, прилежащей к области некротических изменений, и в зоне 2, находящейся на расстоянии 5–7 см от первой, цитоархитектоника была значительно изменена: отмечалась утрата дифференцированных слоев коры головного мозга.

В зоне 3 и в контрольной группе кора головного мозга имела характерную организацию. Как в ипсилатеральном (зоны 1 и 2), так и в контралатеральном очагу (зона 3) полушарии обращало на себя внимание диффузное «запустение» участков коры мозга. Выраженность указанных изменений в ипсилатеральном полушарии была большей и наиболее выраженной в зоне 1.

Во всех зонах исследования с использованием иммуногистохимической реакции для выявления NSE, рутинных методик окрашивания гематоксилином и эозином, по Ниссли и световой микроскопии были выявлены морфологические изменения, характерные для ишемического повреждения: в зоне 1 повреждению подверглись 90 [83,3; 94,7] % нейронов, в зоне 2 — 74,2 [69; 78,1] %, в зоне 3 доля поврежденных нейронов составляла 13,9 [9,8; 18,6] %, что также значительно отличалось от контрольных показателей (12,1 [8,3; 15,4] %). В очаге некроза и прилежащей к нему зоне 1 наблюдалась лейкоцитарная инфильтрация.

Во всех исследуемых зонах были выявлены изменения регионарного кровотока: венозная гиперемия, стаз, агрегация эритроцитов, периваскулярный отек, набухание эндотелиоцитов.

О реализации механизмов апоптоза в нейронах на гистологических срезах коры головного мозга пациентов,

умерших после ИИ, и в группе контроля судили по наличию в них белков p53, casp8, casp3, которые выявляли при помощи иммуногистохимического исследования (см. рисунок, а–в). В дублирующих срезах выполняли иммуногистохимическую реакцию для определения NSE.

В контрольных образцах доля p53-позитивных нейронов составила 20,4 [14,8; 25] %. В образцах всех зон после церебральной ишемии были выявлены значимые отличия от группы контроля ($p < 0,01$). В зоне 1 отмечалась максимальная представленность p53-позитивных нейронов, их доля составляла 85 [80; 90,9] %, что было значительно больше ($p < 0,01$), чем в зоне 2 (33,3 [27,6; 40,5] %). В зоне 3 доля p53-позитивных нейронов была значительно меньше ($p < 0,01$), чем во второй, и составила 26,1 [18,2; 33,3] %.

Максимальное процентное содержание нейронов, экспрессирующих casp3 (88,2 [81,3; 94,1] %), отмечалось в образцах зоны 1. По мере удаления от очага ишемии оно значительно уменьшалось до 50 [41,9; 55,6] % в зоне 2 и до 39,3 [34; 44,4] % в зоне 3. Во всех зонах образцов коры головного мозга после ИИ отличия от показателей группы контроля (19,7 [13,4; 26,3] %) были значимыми ($p < 0,01$).

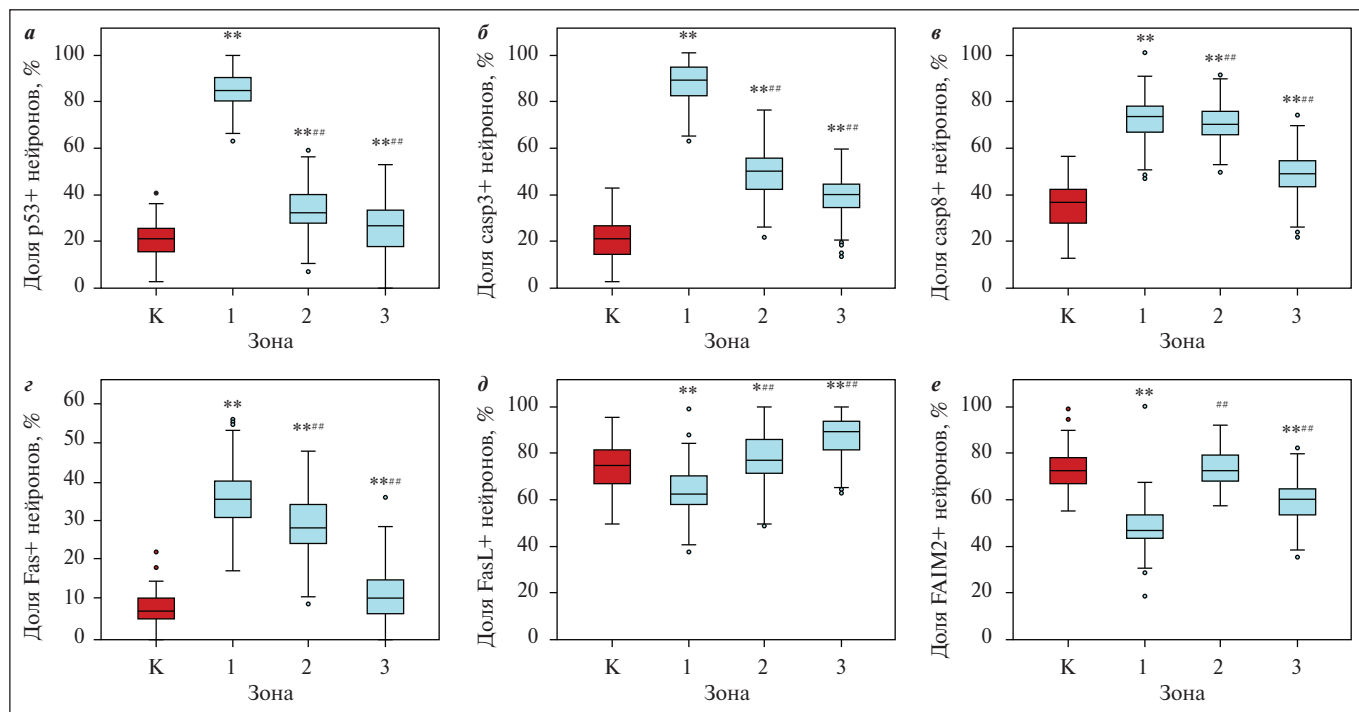
Casp8 в образцах зоны 1 была выявлена в 73,1 [66,7; 78,6] % нейронов, в зоне 2 — в 70,4 [65,6; 75,8] %, что значительно ($p < 0,01$) отличалось от зоны 1. В зоне 3 процентное содержание casp8-позитивных нейронов составило 48,5 [42,9; 54,5] %. Это также значительно отличалось как от показателей образцов зоны 2, так и от группы контроля (36,2 [28; 42,2] %).

Концентрации гормонов стресс-реализующей системы и растворимых регулирующих апоптоз факторов системы Fas в периферической крови пациентов в острейшем периоде ИИ и в группе контроля

Concentrations of hormones of the stress-realizing system and soluble apoptosis-regulating factors of the Fas system in the peripheral blood of patients in the acute phase of IS and in the control group

Показатель	Пациенты после ИИ	Группа контроля
sFas, пг/мл	124,3 $\pm$ 51,0	92,3 $\pm$ 26,6
sFasL, пг/мл	477,4 $\pm$ 220,4*	208,3 $\pm$ 67,1
sFasL/sFas, д. ед.	3,8 $\pm$ 0,5*	2,3 $\pm$ 0,3
Кортизол, нмоль/л	556,1 $\pm$ 54,0*	247,0 $\pm$ 45,7
АКТГ, пг/мл	17,6 $\pm$ 3,9*	7,9 $\pm$ 1,9
Адреналин, пг/мл	56,8 $\pm$ 21,8	62,1 $\pm$ 27,7
Норадреналин, пг/мл	126,4 $\pm$ 35,2	127,0 $\pm$ 14,5

Примечание. д. ед. — доля единицы (безразмерная величина); * — $p < 0,01$ по сравнению с контрольным значением.



Доля p53 (а), casp3 (б), casp8 (в), Fas (г), FasL (д), FAIM2 (е) -позитивных нейронов в образцах коры головного мозга пациентов после ИИ и группы контроля (К).

* – p-уровень отличия данных от контроля (*p<0,05; **p<0,01);

– p-уровень отличия данных от предыдущей зоны (*p<0,05; **p<0,01)

Proportion of p53 (a), casp3 (b), casp8 (c), Fas (d), FasL (e), FAIM2 (f)-positive neurons in cerebral cortex samples from patients with IS and the control group (K).

* – p-level of the difference between the data and the control (*p<0.05; **p<0.01);

– p-level of the difference between the data and the previous zone (*p<0.05; **p<0.01)

Таким образом, для острейшего периода ИИ характерно увеличение доли нейронов, которые экспрессируют белки, реализующие апоптоз, в коре головного мозга по сравнению с группой контроля. Характерной закономерностью является уменьшение доли p53-, casp8-, casp3-позитивных клеток по мере удаления от ядра ишемии.

Доля нейронов, экспрессирующих мембранные формы рецепторов Fas, в исследуемой зоне 1 была наибольшей (35,3 [30,4; 40] %) и значимо (p<0,01) отличалась от группы контроля (7 [4,5; 10,3] %). В зонах 2 и 3 их количество значимо снижалось соответственно до 28,6 [24,1; 34,3] и 10,4 [6,1; 15,2] %. При этом только в зоне 3 увеличение доли Fas-позитивных нейронов соответствовало увеличению доли casp8 позитивных нейронов (r=0,174; p<0,05; см. рисунок, г–е).

Экспрессия мембранных форм лигандов Fas была выявлена на 63,6 [58,3; 70] % NSE-позитивных клеток в зоне 1, что значимо (p<0,01) отличалось от контрольных образцов (75,5 [66,7; 81,5] %) в меньшую сторону, тогда как для зон 2 и 3 было характерно значимое увеличение доли нейрональных клеток, экспрессирующих FasL, – соответственно до 78,1 [71,4; 85,7] % (p<0,05) и 89,1 [81,4; 93] % (p<0,01). Увеличение доли FasL-позитивных нейронов по мере удаления от ишемического очага может быть механизмом саногенеза для предотвращения взаимодействия с FasL других клеточных элементов путем активации на них рецепторов смерти.

Доля FasL-позитивных ненейрональных клеток в группе контроля была наименьшей (11,8 [8,7; 16,3] %), что значимо отличалось от показателей образцов группы исследования. Так, для зоны 3 значение этого показателя составило 15,4 [10; 20] %, далее доля FasL-позитивных ненейрональных клеток значимо увеличивалась (p<0,01) по мере приближения к ишемическому очагу и в зоне 2 составила 19 [14,3; 23,8] %, а в зоне 1 – 29,7 [26,4; 34,6] %.

Максимальная представленность FasL-позитивных ненейрональных клеток в зоне 1 может быть объяснена лейкоцитарной инфильтрацией.

В зоне 3 прослеживалась следующая закономерность: уменьшение доли Fas- и casp8-позитивных нейронов с увеличением доли FasL-позитивных ненейрональных клеток (соответственно r=-0,160; p<0,05 и r=-0,211; p<0,01). Корреляционные связи между этим параметром и долей casp3-позитивных нейронов не выявлены. Следовательно, в этой зоне Fas-опосредованный апоптоз не является основным механизмом гибели нейронов.

Доля FAIM2-позитивных нейронов в зоне 2 составляла 73 [67,9; 78,9] % и значимо не отличалась от показателей образцов в группе контроля (72,4 [66,1; 76,8] %). В остальных зонах исследования отличия от контроля были значимыми (p<0,01), а значения показателей – меньшими. Так, в зонах 1 и 3 они составили 47,1 [42,9; 52,9] и 59 [52,9; 63,8] % соответственно. При этом в контрольной группе была прямая значимая корреляционная связь между долей экспрес-

сирующих FAIM2 нейронов и долей p53-позитивных нейронов ($r=0,282$; $p<0,05$), а в зоне 3 — обратная ($r=-0,177$; $p<0,05$). Для зоны 2 был получен отрицательный коэффициент корреляции доли FAIM2-позитивных нейронов и доли нейронов, экспрессирующих casp3 ($r=-0,183$; $p<0,05$), а в зоне 1 — мембранную форму FasL ($r=-0,148$; $p<0,05$). Это свидетельствует в пользу того, что после ишемического повреждения головного мозга в нейронах его коры конкурируют за возможность реализации механизмы адаптации и программируемой гибели. В контрольных образцах наблюдаются параллельное сосуществование и синергия этих процессов.

Распространенность и локализация нейронов, экспрессирующих реализующие апоптоз белки p53, casp8, casp3, в коре головного мозга не коррелировала с тяжестью неврологического дефицита, выраженного в баллах по шкале NIHSS, ни для одной исследуемой зоны. Это свидетельствует о стереотипном ответе на ишемическое повреждение независимо от его клинической тяжести.

Не было выявлено значимых связей между долями p53-, casp8-, casp3-позитивных нейронов.

На долю p53- и casp8-позитивных нейронов не оказывала влияния концентрация в периферической крови ни одного из исследованных эффекторов стресс-реализующих систем и регулирующих апоптоз факторов.

В зонах 2 и 3 выявлены значимые корреляционные связи доли casp3-позитивных нейронов с концентрацией кортизола в периферической крови. При этом с повышением концентрации кортизола увеличивалась доля нейронов, экспрессирующих casp3, как в зоне 2 ($r=0,263$; $p<0,01$), так и в зоне 3 ($r=0,383$; $p<0,01$). В зоне 2 отмечены значимые отрицательные корреляционные связи с концентрациями sFas ($r=-0,177$; $p<0,05$) и sFasL ($r=-0,164$; $p<0,05$), в зоне 3 — значимые положительные корреляционные связи с соотношением концентраций sFasL и sFas ($r=0,240$; $p<0,01$).

Доля Fas-позитивных нейронов значимо коррелировала с концентрацией растворимой формы этой молекулы и соотношением концентраций sFasL и sFas в периферической крови. Это обосновывает возможность перекрестного прогнозирования и экстраполяции данных о динамике концентрации растворимых форм и представленности в нейронах коры головного мозга мембранных форм рецепторов и лигандов системы Fas. Так, для sFasL коэффициенты корреляции составили для зоны 1 — $r=0,222$, для зоны 2 — $r=0,438$, для зоны 3 — $r=0,289$, $p<0,01$; для соотношения концентраций sFasL и sFas — соответственно $r=0,231$, $r=0,266$ и $r=0,281$, $p<0,01$. При этом для мембранной формы рецептора системы Fas, а также для FAIM2 корреляционные связи с вышеуказанными показателями были незначимыми.

Таким образом, в острейшем периоде ИИ увеличение эффективности атаки растворимыми регулирующими механизмы реализации апоптоза лигандами соответствует усилению экспрессии нейронами лигандов смерти системы Fas и сопряженных с рецептором Fas молекул FAIM2, связанных с ингибированием сигнальных путей программируемой гибели клетки.

При корреляционном анализе с показателями концентраций гормонов стресс-реализующей системы в периферической крови были выявлены следующие значимые корреляционные связи.

Доля Fas-позитивных нейронов в образцах коры головного мозга не коррелировала ни с одним из исследованных параметров.

В зоне 2 наблюдалось максимальное количество значимых корреляционных связей. Так, доля FasL-позитивных нейронов значимо коррелировала с концентрацией АКТГ ($r=-0,362$; $p<0,01$), кортизола ($r=-0,212$; $p<0,01$), норадреналина ($r=0,410$; $p<0,01$). В этой же зоне выявлена отрицательная корреляционная связь концентрации кортизола с долей FAIM2-позитивных нейронов ($r=-0,177$; $p<0,05$).

В зоне 1 из всех рассмотренных параметров коррелировали лишь концентрация АКТГ в периферической крови и доля FasL-позитивных нейронов ($r=-0,152$; $p<0,05$). В зоне 3 доля FasL-позитивных нейронов значимо коррелировала с концентрацией в периферической крови адреналина ($r=0,219$; $p<0,01$), норадреналина ($r=0,230$; $p<0,01$), АКТГ ($r=-0,264$; $p<0,01$).

Доля FasL-позитивных нейронов в коре головного мозга значимо коррелировала с тяжестью неврологического дефицита, выраженного в баллах по шкале NIHSS, во всех исследуемых зонах (соответственно для зон 1, 2 и 3: $r=0,191$, $r=0,427$, $r=0,294$; $p<0,01$). Также с тяжестью неврологического дефицита коррелировала доля FAIM2-позитивных нейронов в зоне 2.

Обсуждение. Исходя из полученных результатов, можно заключить, что для острейшего периода ИИ характерно наличие противоположных закономерностей экспрессии FasL и Fas в нейронах коры головного мозга. Они заключаются в снижении представленности Fas-позитивных нейронов и увеличении доли FasL-позитивных нейронов по мере удаления от ишемического очага. Наименьшая доля FAIM2-позитивных нейронов в зоне 1 обеспечивает наибольшую вероятность развития Fas-регулируемого апоптоза расположенных в ней нейронов. Максимальная доля FAIM2-позитивных нейронов в зоне 2 связана с большей (по сравнению с зоной 3) представленностью в ней рецептора Fas, связанного с этим белком. Также это может свидетельствовать о том, что здесь наиболее активно реализуются процессы нейропластичности, направленные на формирование новых и перераспределение старых межнейронных взаимодействий. Важным результатом стало и выявление значимых различий между значением исследуемых показателей группы контроля и расположенной в контралатеральном очагу полушарии зоной 3. Это свидетельствует о том, что изменения при локальной церебральной ишемии затрагивают противоположное полушарие.

Полученные факты позволяют сделать выводы о том, что при ишемическом повреждении головного мозга увеличивается эффективность атаки регулирующими апоптоз лигандами рецепторов Fas (в периферической крови увеличивается соотношение концентраций растворимых форм лигандов и рецепторов), в том числе и на поверхности нейронов. При этом в зоне 1 низкая доля FAIM2-позитивных нейронов может свидетельствовать о высокой вероятности их ответа на такое лиганд-рецепторное взаимодействие развитием клеточной гибели, т. е. диапазон возможных адаптационных решений (возможных вариантов изменения функционирования нейрона при изменении среды микроокружения) в этой зоне сужен. Таким образом, в зоне 1 по сравнению с другими исследованными зо-

нами ответ нейронов на любую стимуляцию характеризуется максимальной ригидностью. Следовательно, эта зона не является перспективной терапевтической мишенью, попытки сохранения в ней жизнеспособности нейронов, вероятно, нецелесообразны. Основная терапевтическая задача состоит в оптимизации отграничения за счет нее ишемического очага от жизнеспособной функционально активной нервной ткани.

Для зоны 2 характерно (однако в меньшей степени по сравнению с зоной 1) увеличение эффективности атаки регулируемыми апоптоз лигандами рецепторов Fas. При этом максимальная доля FAIM2-позитивных нейронов свидетельствует о большей, чем в других зонах, возможности нейронов отвечать на регулирующий апоптоз стимул не активацией сигнальных каскадов, ведущих клетку к самоуничтожению, а тех, которые ведут к адаптивным перестройкам ее структуры и функции (выживание, синаптогенез, спраунтинг, прунинг). Таким образом, в зоне 2 по сравнению с другими исследованными зонами ответ нейронов на стимуляцию характеризуется широким диапазоном возможных адаптационных решений. Зона 2, с ее максимальной чувствительностью к воздействию регулирующих апоптоз факторов и максимальным диапазоном адаптационного ответа, обладает наибольшим нейропластическим потенциалом для восстановления утраченных функциональных межнейронных связей. В этой зоне также отмечена значимая корреляция доли casp3-позитивных нейронов с концентрацией кортизола в периферической крови. При этом с повышением концентрации кортизола увеличивалась доля нейронов, экспрессирующих casp3. Учитывая адаптивный резерв этой зоны и негативное влияние на него повышения концентрации кортизола, с клинической точки зрения в реабилитационной практике целесообразным представляется применение медикаментозной и немедикаментозной терапии, косвенно направленной на относительное снижение уровня этого гормона в крови: своевременное выявление и лечение депрессии, использование методов когнитивно-поведенческой психотерапии для формирования активных копинг-стратегий, характери-

зующихся преобладанием симпатoadренальной оси при ответе на стрессовое воздействие [18–20].

В зоне 3 за счет наименьшей представленности нейронов, экспрессирующих рецепторы смерти Fas, и наибольшей – нейронов, экспрессирующих FasL, снижена вероятность взаимодействия рецепторов смерти на нейронах со своими лигандами с последующей реализацией внутриклеточных сигнальных каскадов, ведущих к гибели. Это подтверждается тем, что в зоне 3 выявлена наименьшая доля p53-, casp3-, casp8-позитивных нейронов. Доля FAIM2-позитивных нейронов в этой зоне значимо меньше, чем в зоне 2, что свидетельствует о меньшем диапазоне возможных адаптационных решений в зоне 3 по сравнению с зоной 2.

Таким образом, максимальное модулирующее действие на регуляцию механизмов апоптоза гормоны стресс-реализующей системы оказывают в зоне 2, при этом (учитывая отрицательный коэффициент корреляции его концентрации с долей FAIM2-позитивных нейронов) повышение концентрации кортизола приводит к сужению диапазона адаптационных решений и повышает вероятность реализации программируемой клеточной гибели (исходя из положительных значений коэффициентов корреляции концентрации кортизола с долей нейронов, экспрессирующих реализующие апоптоз белки).

Заключение. Концентрация кортизола в периферической крови является фактором, определяющим регуляцию апоптоза нейронов коры головного мозга в остром периоде ИИ.

Высокие значения концентрации кортизола и АКТГ в периферической крови ассоциированы с увеличением доли нейронов, реализующих механизмы апоптоза. Концентрация растворимой формы Fas и соотношение концентраций sFasL и sFas в периферической крови значимо коррелирует с долей Fas-позитивных нейронов, что обосновывает возможность перекрестного прогнозирования и экстраполяции данных о динамике концентрации растворимых форм и представленности в нейронах коры головного мозга мембранных форм рецепторов и лигандов системы Fas.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ризаев ЖА, Хайдаров НК. Клиническое, эпидемиологическое и этиопатогенетическое исследование ишемического инсульта. *Журнал неврологии и нейрохирургических исследований*. 2020;1(1):11–5. doi: 10.26739/2181-0982-2020-1-2 [Rizaev JA, Khaydarov NK. Clinical, epidemiological and etiopathogenetic study of ischemic stroke. *Zhurnal neurologii i neyrokhirurgicheskikh issledovaniy = Journal of Neurology and Neurosurgery Research*. 2020;1(1):11–15. doi: 10.26739/2181-0982-2020-1-2 (In Russ.)].
2. Lossi L. The concept of intrinsic versus extrinsic apoptosis. *Biochem J*. 2022 Feb 11;479(3):357–84. doi: 10.1042/BCJ20210854
3. Mohtasham N, Mahmoudabadi RZ, Mohajertehran F. Extrinsic and intrinsic pathways of apoptosis and related molecules in ischemic stroke. *Central Asian J Med Pharm Sci Innovat*. 2021;1(4):194–204. doi: 10.22034/CAJMPSCI.2021.04.04
4. Almeida A, Sanchez-Moran I, Rodriguez C. Mitochondrial-nuclear p53 trafficking controls neuronal susceptibility in stroke. *IUBMB Life*. 2021 Mar;73(3):582–91. doi: 10.1002/iub.2453. Epub 2021 Mar 2.
5. Сергеева СП, Савин АА, Шишкина ЛВ, Виноградов ЕВ. Головной мозг после ишемического инсульта: клинико-гистологическое исследование. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2017;117(3–2):66–70. doi: 10.17116/jnevro20171173266-70 [Sergeeva SP, Savin AA, Shishkina LV, Vinogradov EV. The brain after ischemic stroke: a clinical/histological study. *Zhurnal neurologii i psikiatrii imeni S.S. Korsakova*. 2017;117(3–2):66–70. doi: 10.17116/jnevro20171173266-70 (In Russ.)].
6. Ostapchenko VG, Snir J, Suchy M, et al. Detection of Active Caspase-3 in Mouse Models of Stroke and Alzheimer's Disease with a Novel Dual Positron Emission Tomography/Fluorescent Tracer [68Ga] Ga-TC3-OGDOTA. *Contrast Media Mol Imaging*. 2019;2019(6403274):1–17. doi: 10.1155/2019/6403274
7. Devel L, Guedeney N, Bregant S, et al. Role of metalloproteases in the CD95 signaling pathways. *Front Immunol*. 2022 Dec 5;13:1074099. doi: 10.3389/fimmu.2022.1074099
8. Lorente L, Martin MM, Perez-Cejas A, et al. Blood soluble Fas concentrations and ischemic stroke patient mortality. *Expert Rev Mol Diagn*. 2022 Dec;22(12):1117–21. doi: 10.1080/14737159.2022.2165913. Epub 2023 Jan 9.

9. Ichim G, Tait SW. A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. *Nat Rev Cancer*. 2016 Aug;16(8):539–48. doi: 10.1038/nrc.2016.58. Epub 2016 Jul 1.
10. Falkenburger B, Reich A. The two sides of Faim2: modulation of cell death and regeneration. *J Neurol Neuromed*. 2017;2(1):14–8.
11. Mao R, Zong N, Hu Y, et al. Neuronal Death Mechanisms and Therapeutic Strategy in Ischemic Stroke. *Neurosci Bull*. 2022 Oct;38(10):1229–47. doi: 10.1007/s12264-022-00859-0. Epub 2022 May 5.
12. Сергеева СП, Савин АА, Литвицкий ПФ и др. Закономерности активации стресс-реализующей системы и ее влияние на течение и исход острого периода ишемического инсульта. *Вестник новых медицинских технологий*. 2022;16(2):6–12. [Sergeeva SP, Savin AA, Litvitskiy PF. Stress system activation and its influence on the clinical course and outcome of acute ischemic stroke in patients. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy = Journal of New Medical Technologies*. 2022;16(2):6–12 (In Russ.)].
13. Xu B, Lang LM, Li SZ, et al. Cortisol Excess-Mediated Mitochondrial Damage Induced Hippocampal Neuronal Apoptosis in Mice Following Cold Exposure. *Cells*. 2019 Jun 18;8(6):612. doi: 10.3390/cells8060612
14. Lucassen PJ, Heine VM, Muller MB, et al. Stress, depression and hippocampal apoptosis. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2006 Oct;5(5):531–46. doi: 10.2174/187152706778559273
15. Парфенов ВА. Постинсультная депрессия: распространенность, патогенез, диагностика и лечение. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*. 2012;4(4):84–8. doi: 10.14412/2074-2711-2012-428 [Parfenov VA. Poststroke depression: prevalence, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Nevrologiya, neyropsikhiatriya, psikhosomatika = Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics*. 2012;4(4):84–8. doi: 10.14412/2074-2711-2012-428 (In Russ.)].
16. Котов СВ, Исакова ЕВ, Егорова ЮВ. Постинсультная депрессия и возможности антидепрессантов в повышении эффективности нейрореабилитации. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*. 2020;12(6):110–6. doi: 10.14412/2074-2711-2020-6-110-116 [Kotov SV, Isakova EV, Egorova YuV. Post-stroke depression and the abilities of antidepressants to enhance the effectiveness of neurorehabilitation. *Nevrologiya, neyropsikhiatriya, psikhosomatika = Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics*. 2020;12(6):110–6. doi: 10.14412/2074-2711-2020-6-110-116 (In Russ.)].
17. Ли С, Розыбакиева З, Асимов М, Багирова Ф. Психотерапия на базе копинг-стратегии. Сравнение современных методов. *Валеология: Здоровье, Болезнь, Выздоровление*. 2022;(4):141–6. [Lee S, Rozybakieva Z, Asimov M, Bagiyarova F. Psychotherapy based on coping strategy. Comparison of modern methods. *Valeologiya: Zdorov'ye, Bolezni, Vyzdorovleniye = Valeology: Health – Illness – Recovery*. 2022;(4):141–6 (In Russ.)].
18. De Kloet ER, Joëls M. The cortisol switch between vulnerability and resilience. *Mol Psychiatry*. 2023 Jan 4. doi: 10.1038/s41380-022-01934-8. Epub ahead of print.
19. Perez-Tejada J, Garmendia L, Labaka A, et al. Active and Passive Coping Strategies: Comparing Psychological Distress, Cortisol, and Proinflammatory Cytokine Levels in Breast Cancer Survivors. *Clin J Oncol Nurs*. 2019 Dec 1;23(6):583–90. doi: 10.1188/19.CJON.583-590
20. Hinwood M, Ilicic M, Gyawali P, et al. Psychological Stress Management and Stress Reduction Strategies for Stroke Survivors: A Scoping Review. *Ann Behav Med*. 2023 Feb 4;57(2):111–30. doi: 10.1093/abm/kaac002

Поступила/отрецензирована/принята к печати

Received/Reviewed/Accepted

09.09.2023/15.01.2024/19.01.2024

Заявление о конфликте интересов/Conflict of Interest Statement

Исследование не имело спонсорской поддержки. Конфликт интересов отсутствует. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать. Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами.

The investigation has not been sponsored. There are no conflicts of interest. The authors are solely responsible for submitting the final version of the manuscript for publication. All the authors have participated in developing the concept of the article and in writing the manuscript. The final version of the manuscript has been approved by all the authors.

Сергеева С.П. <https://orcid.org/0000-0002-0083-1213>

Савин А.А. <https://orcid.org/0000-0003-2413-7311>

Литвицкий П.Ф. <https://orcid.org/0000-0003-0151-9114>

Горбачева Л.Р. <https://orcid.org/0000-0002-3910-8831>

Людуп А.В. <https://orcid.org/0000-0002-0102-5491>

Бреславич И.Д. <https://orcid.org/0000-0002-9321-9102>

Савин Л.А. <https://orcid.org/0000-0002-3557-8780>