

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи



Вадюхин Матвей Анатольевич

**Нейроваскулярные и иммунные аспекты клеточно-тканевого ответа при
инфаркте головного мозга в разные периоды постнатального онтогенеза**

1.5.23. Биология развития, эмбриология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Демяшкин Григорий Александрович

Москва – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	18
1.1. Введение	18
1.2. Нейроваскулярные взаимодействия и их роль в формировании головного мозга в эмбриональном периоде	21
1.3. Нейрогенез, ангиогенез и клеточная пластичность в постнатальном периоде: сходство с механизмами эмбрионального развития	27
1.4. Роль нейроваскулярных взаимодействий в реализации пластичности головного мозга	33
1.5. Взаимодействие компонентов нейроваскулярной единицы в постэмбриональном периоде в нормальных условиях	38
1.6. Взаимодействие компонентов нейроваскулярной единицы в постэмбриональном периоде при патологических состояниях	43
1.7. Иммунные механизмы клеточно-тканевого ответа при ишемическом инсульте	46
1.8. Нарушение нейроваскулярных и иммунных взаимодействий при ишемическом инсульте	52
1.9. Заключение по обзору литературы	59
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	62
2.1. Дизайн исследования	62
2.2. Методы исследования	65
2.2.1. Гистологическое исследование	66
2.2.2. Иммуногистохимическое исследование	67
2.2.3. Мультиплексное иммунофлуоресцентное исследование	68
2.2.4. Молекулярно-генетический анализ	73
2.2.5. Статистическая обработка результатов исследования	74
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	76

3.1. Клиническая характеристика пациентов	77
3.1.1. Группа I: пациенты с верифицированным ишемическим инсультом	77
3.1.2. Группа II: пациенты с условно интактным головным мозгом	88
3.2. Гистологическое исследование	91
3.3. Иммуногистохимическая характеристика ангиогенеза	105
3.3.1. Иммуногистохимическая характеристика распределения CD31- позитивных эндотелиальных клеток	105
3.3.2. Иммуногистохимическая характеристика распределения VEGF-A- позитивных клеток	109
3.4. Мультиплексное иммунофлуоресцентное исследование	114
3.4.1. Мультиплексный анализ ко-локализации NeuN [^] NSE [^] Caspase 3	114
3.4.2. Мультиплексный анализ ко-локализации CD31 [^] CD105 [^] TGF- β	123
3.4.3. Мультиплексный анализ ко-локализации CD68 [^] CD163 [^] TGF [^] Vimentin....	130
3.4.4. Мультиплексный анализ ко-локализации CD45 [^] CD56 [^] CD3.....	143
3.5. Молекулярно-генетический анализ	152
3.5.1. Экспрессия участников сигнальных путей PI3K/Akt/mTOR и PI3K/Akt/FOXO3a.....	152
3.5.2. Экспрессия про- и противовоспалительных цитокинов.....	156
3.5.3. Экспрессия участников сигнальных путей NF κ B и TGF- β	162
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	168
4.1. Нервная ткань как динамическая развивающаяся система: от эмбриогенеза к постнатальному онтогенезу.....	168
4.2. Влияние возраста на морфологическую организацию коры головного мозга в норме и при ишемическом повреждении	171
4.3. Изменение взаимодействия компонентов нейроваскулярной единицы в динамике постнатального онтогенеза в норме и при ишемическом повреждении	177
4.4. Возрастная трансформация воспалительной регуляции и иммунной пластичности в нервной ткани при ишемическом повреждении	182

4.5. Возраст-ассоциированные ограничения нейропластичности и регенераторного потенциала нервной ткани	190
4.6. Возрастные ограничения терапевтической чувствительности коры головного мозга при ишемическом инсульте	195
ГЛАВА 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	200
ВЫВОДЫ	202
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	204
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	205
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	207

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Ишемический инсульт (ИИ) остается одной из наиболее значимых медицинских и социально-экономических проблем современности, занимая одну из лидирующих позиций по уровню заболеваемости, инвалидизации и смертности взрослого населения. По данным ВОЗ, ежегодно инсульт поражает более 15 миллионов человек [34, 114]. Несмотря на активное развитие методов реперфузионной терапии (включая тромболитические / эндоваскулярные вмешательства) и нейропротекции, эффективность лечения ишемического инсульта остается ограниченной, что связано, в том числе, с высокой гетерогенностью патологических процессов, происходящих в ишемизированной ткани. Важную роль в определении прогноза и исходов ИИ исследователи отводят мультимодальному вторичному повреждению, уровням компенсаторно-адаптационного потенциала, пластичности нервной ткани, нейро- и ангиогенеза в зоне пенумбры [146].

Понимание закономерностей эмбрионального развития компонентов нейроваскулярной единицы позволяет раскрыть механизмы физиологической регуляции нейрогенеза и ангиогенеза в постнатальном онтогенезе, а также возраст-ассоциированных особенностей клеточно-тканевого ответа при ишемическом повреждении. Так, после рождения сохраняется сопряженная регуляция пролиферации / миграции нейрональных предшественников и ангиогенеза под контролем каскадов Notch, Wnt/ β -catenin, Sonic hedgehog, VEGF, TGF- β , и др., участвующих в поддержании локального гомеостаза и обновлении клеточного пула, определяя компенсаторно-адаптационный и пластический потенциал нервной ткани в течение всей жизни [185, 261].

Конкретные механизмы изменений в головном мозге, обуславливающие более тяжелое клиническое течение ИИ среди пожилых пациентов остаются

дискутабельными и малоизученными. Увеличение количества сопутствующих заболеваний по мере старения сопровождается дисрегуляцией сигнальных путей, ответственных за модуляцию клеточно-тканевого ответа, степень воспалительной реакции и др. [272] Кроме того, с возрастом замедляется трансформация стволовых клеток нейрогенной ниши, формирование новых нейронов и элементов нейроглии, что служит морфологическим субстратом снижения пластической функции головного мозга у пожилых пациентов [29]. Однако, на молекулярном уровне взаимоотношения перечисленных возраст-ассоциированных физиологических механизмов с элементами патогенеза ишемического повреждения противоречивы.

Заложенные еще на эмбриональном этапе механизмы регуляции нейрогенеза, ангиогенеза и клеточно-тканевого ответа, ответственные за реализацию компенсаторно-адаптационного потенциала и нейропластичности в постнатальном онтогенезе как в нормальных условиях, так и при ишемическом инсульте, наиболее полно раскрываются в контексте фундаментальных положений биологии развития.

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время, экспериментальные исследования играют ключевую роль в изучении патогенеза ишемического повреждения головного мозга (модели окклюзии церебральных артерий, фотохимические и термические индукторы ишемии) [148]. Несмотря на условную возможность трансляции полученных у лабораторных животных данных на человека, некоторые механизмы патогенеза, включая таксис и миграцию иммунных клеток, активацию микроглии, очаговую нейрональную гибель, отек, и др. могут существенно различаться вследствие межвидового несоответствия геномики, протеомики, метаболомики и др. [105] Это может служить причиной низкой воспроизводимости результатов, полученных в исследованиях на животных, при переходе к клиническим испытаниям, включая многочисленные неудачи применения нейропротекторных субстратов. В связи с этим, уникальным представляется получение новых данных в комплексных

исследованиях, проведенных на аутопсийных образцах головного мозга человека, что позволит изучить ключевые звенья патогенеза ИИ, а также определить вероятные причины неэффективности апробированных на животных нейротропных лекарственных средств и конкретные молекулярные мишени для разработки таргетной нейропротекторной терапии.

По данным мировой литературы, при ИИ в зоны некроза и пенумбры мигрируют различные популяции иммунных клеток (субпопуляции Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, клеток макрофагального ряда, нейтрофилы и др.) в сочетании с активацией микроглии, однако практически отсутствуют исследования, посвященные иммунофенотипированию клеточного воспалительного инфильтрата и изменению локального гомеостаза нервной ткани в зависимости от его популяционного состава [124, 145, 172]. Ряд авторов отводит особую роль в патогенезе ИИ эндотелиальным клеткам кровеносных сосудов и связанной с ними регуляции проницаемости гематоэнцефалического барьера [92, 134]. Так, двойственные эффекты этих сложно регулируемых систем по-прежнему остаются предметом дискуссий и заключаются как в повышении проницаемости гемокapилляров, отеке и усугублении ишемии, так и в активации ангиогенеза в рамках компенсаторно-адаптационной реакции, приводящей к усилению прорегенераторных эффектов и улучшению клинического течения ИИ. Кроме того, комплексные исследования, посвященные анализу взаимодействия компонентов нейроваскулярной единицы и иммунных аспектов клеточно-тканевой реакции в ответ на ишемическое повреждение немногочисленны и противоречивы. При этом, в большинстве опубликованных на сегодняшний день экспериментальных и клинических исследований отсутствует распределение выборки по возрасту, что приводит к большому количеству ложноположительных результатов и низкой трансляционной эффективности нейротропных препаратов, вероятно связанных с возраст-ассоциированными различиями в степени нейрогенеза, ангиогенеза и клеточно-тканевого ответа.

Таким образом, понимание взаимоотношений между различными популяциями клеток как ключевого звена регуляции локального гомеостаза в коре головного мозга, а также влияние на них возрастных изменений нейрогенеза и ангиогенеза в норме и при ишемическом повреждении может способствовать не только пониманию молекулярных механизмов этих изменений, но и разработке персонализированных стратегий нейротропной терапии и реабилитации при различных состояниях, связанных с нейродегенерацией и нейровоспалением.

Цель и задачи исследования

Цель исследования – выявление взаимодействия нейроваскулярных и иммунных факторов при инфаркте коры головного мозга в разные периоды постнатального онтогенеза.

Задачи исследования:

1. Провести сравнительный морфологический анализ возрастных изменений вещества головного мозга в разные периоды постнатального онтогенеза в норме и при ишемии.
2. Провести количественную и качественную оценку ко-локализации маркеров NeuN⁺NSE⁺caspase-3, а также экспрессии *PIK3CA*, *AKT2*, *MTOR*, *FOXO3A* в веществе головного мозга в разные периоды постнатального онтогенеза в норме и при ишемии.
3. Оценить количественные и качественные характеристики эндотелиальных клеток (CD31, CD105), продуцирующих VEGF-A и TGF- β , в веществе головного мозга в разные периоды постнатального онтогенеза в норме и при ишемии.
4. Провести иммунофенотипическую оценку макрофагов на основании ко-локализации маркеров CD68⁺CD163⁺TGF- β , анализ уровней экспрессии генов *IL-1*, *IL-6*, *IL-10*, *TNF- α* , участников триггерных сигнальных путей TGF- β (*SMAD2*,

SMAD3, *MMP2*, *MMP9*) и NFκB (*RELA(p65)*) в веществе головного мозга в разные периоды постнатального онтогенеза в норме и при ишемии.

5. Провести анализ ко-локализации маркеров иммунных клеток CD3⁺CD45⁺CD56 и уровней экспрессии *IFN-γ* в веществе головного мозга в разные периоды постнатального онтогенеза в норме и при ишемии.

Научная новизна

В данном диссертационном исследовании на основании сравнительного морфологического анализа особенностей гистоархитектоники коры головного мозга в норме и при ишемическом инсульте выявлены закономерности нейрогенеза, ангиогенеза и клеточно-тканевого ответа в постнатальном онтогенезе.

Впервые на основании ко-локализации маркеров зрелых и метаболически активных нейронов (NeuN, NSE) и апоптотической гибели (*caspase-3*) показана модуляция интенсивности нейрогенетического потенциала и пластичности нервной ткани в норме и в условиях нейродегенерации. Установлено, что при ишемии коры головного мозга снижается экспрессия NeuN и NSE на фоне резкого увеличения доли *caspase-3*⁺ нейронов, что указывает на «скрытое» повреждение клеток с сохраненной цитоархитектоникой и истощение механизмов нейрогенеза, особенно выраженные в старших возрастных группах. Был разработан индекс *caspase-3*⁺/NeuN⁺ нейронов, отражающий угнетение нейрогенетического потенциала в зоне пенумбры в когорте пожилых пациентов. Кроме того, при анализе экспрессии ключевых генов PI3K/Akt-сигналинга обнаружено преобладание проапоптотических и провоспалительных эффектов вследствие активации оси PI3K/Akt/FOXO3A у пожилых людей, что указывает на возрастную инволюцию нейрогенетического, пластического и репаративного потенциала нервной ткани.

Впервые при анализе ко-локализации CD31⁺CD105⁺TGF-β, экспрессии участников триггерных сигнальных путей TGF-β (*SMAD2*, *SMAD3*, *MMP2*, *MMP9*)

и NFκB (*RELA(p65)*) показана активация эндотелиальных клеток, приводящая к выраженному VEGF-А-зависимому ангиогенезу, особенно у лиц молодого возраста. Это сопровождается увеличением продукции TGF-β и NFκB как ключевых триггеров синтеза провоспалительных цитокинов и миграции иммунных клеток в рамках клеточно-тканевого ответа на ишемическое повреждение.

Впервые, у молодых обнаружено доминирование CD68⁺CD163⁺ фенотипа макрофагов в воспалительном инфильтрате, что указывает на высокий потенциал тканевой пластичности и репарации нервной ткани. Напротив, преобладание провоспалительного CD68⁺CD163⁻ фенотипа макрофагов у пожилых способствует вторичному повреждению нейронов. Среди других участников иммунного воспаления обнаружили увеличение количества НК и НКТ клеток у лиц молодого возраста и усиленную миграцию Т-лимфоцитов у пожилых. Установленные различия в соотношении НК/НКТ/Т-клеток и степени ко-локализации CD3⁺CD45⁺CD56 при инфаркте мозга отражают механизмы возрастной модуляции клеточно-тканевого ответа, в том числе определяя характер вторичного повреждения нейронов.

Теоретическая и практическая значимость работы

В диссертационном исследовании продемонстрирована возраст-ассоциированная динамика нейрогенеза и ангиогенеза, а также раскрыты компенсаторно-адаптационные механизмы клеточно-тканевого ответа вещества головного мозга в условиях ишемии, значимость которых, в том числе, важна для понимания патогенеза нейродегенеративных и нейровоспалительных заболеваний.

Дополнены фундаментальные знания о биологии развития нервной ткани, а именно способности элементов нейроваскулярной единицы к поддержанию локального гомеостаза, регулирующего нейрогенез, выживаемость, адекватный метаболизм и репарацию нейронов (NeuN, NSE, caspase-3). Направленность модуляции сигнальных путей PI3K/Akt/mTOR и PI3K/Akt/FOXO3a в нервной ткани

различается в зависимости от периода постнатального онтогенеза. Так, у лиц пожилого возраста наблюдается угнетение нейрогенеза и метаболической активности нейронов, нейродегенерация, активация участников каскада апоптотической гибели и смещение PI3K/Akt-сигналинга в сторону FOXO3A-зависимых проапоптотических программ, что отражает возрастную инволюцию нейропластичности, особенно усугубляемую в условиях ишемии.

Не менее важным теоретическим результатом является описание возрастных особенностей биологии развития кровеносных сосудов, компенсаторного потенциала ангиогенеза, в том числе его роли в реализации пластичности нервной ткани в физиологических условиях и при ишемическом повреждении. При старении в нервной ткани происходит дисрегуляция нейроваскулярных взаимодействий и угнетение эмбриональных программ нейрогенеза и ангиогенеза, которые можно рассматривать в качестве факторов, предрасполагающих к развитию нейродегенеративных состояний. Установленная роль TGF- β как медиатора, связывающего повреждение компонентов гематоэнцефалического барьера с запуском воспалительного каскада и миграцией иммунных клеток различных фенотипов (NK- и NKT-клетки, Т-лимфоциты, макрофаги), раскрывает единую возраст-модулируемую систему клеточно-тканевого ответа головного мозга, в которой изменения степени нейро- и ангиогенеза, нейровоспаления, дегенерации и клеточной гибели формируют взаимосвязанный патогенетический континуум.

Практическая значимость исследования заключается в повышении точности морфологической диагностики и клинического прогнозирования у пациентов с ишемическим инсультом: применение оценки ко-локализации маркеров NeuN[^]NSE[^]caspase-3 для выявления скрытого нейронального повреждения, а также маркеров CD3, CD45, CD56, CD68, CD163 для верификации фенотипов иммунных клеток, уточняет объем ишемического повреждения и характер нейровоспаления. Полученные в настоящем исследовании данные являются фундаментом для формирования персонализированных подходов к лечению и

реабилитации пациентов с ишемическим инсультом, а также при других состояниях, связанных с нейродегенерацией и нейровоспалением.

В результате проведенного исследования **решена актуальная научная задача** – выявлены возрастные особенности нейроваскулярных взаимодействий, раскрыты механизмы клеточно-тканевого ответа, определяющие направление и выраженность пластических и репаративных процессов коры головного мозга в норме и при ишемическом инсульте.

Методология и методы исследования

Диссертационное исследование проведено ретроспективно с использованием архивного аутопсийного материала (парафиновых блоков) и цифровой медицинской документации. Фрагменты лобной доли коры головного мозга получены от 154 пациентов с установленным диагнозом МКБ-10: I63.3 / I63.4 Инфаркт мозга, подтвержденным клинико-anamнестическими данными, методами нейровизуализации (КТ / МРТ головного мозга), а также результатами патологоанатомического исследования. Кроме того, для сравнения, от 30 пациентов были получены фрагменты головного мозга, которые можно считать условно интактными. Методология исследования соответствует принципам, изложенным в Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации.

В исследовании использовали следующий комплекс методов: гистологический, морфометрический, иммуногистохимический (в том числе иммунофлуоресцентный), молекулярно-генетический и статистический.

Личный вклад автора

Все этапы проведенного научного исследования: постановка цели и задач, выбор методов, получение, анализ и статистическая обработка результатов, формулирование основных положений и выводов, теоретической и практической

значимости, а также новизны полученных результатов, выполнены автором самостоятельно. Автором лично проведен подбор и анализ научной литературы в русле выбранной темы, разработан дизайн исследования, скомплектованы базы данных и цифровой архив изображений, к анализу привлечен комплекс современных методов биологии развития, эмбриологии. В ходе реализации научной работы диссертант лично выполнял анализ медицинской документации, гистологическое (окрашивание гематоксилином и эозином, окрашивание по Нисслю), иммуногистохимическое (с антителами к CD31, VEGF), морфометрическое исследования, мультиплексный иммунофлуоресцентный анализ (ко-локализация NeuN⁺NSE⁺Caspase 3, CD31⁺TGF- β ⁺CD105, CD68⁺CD163⁺TGF- β ⁺Vimentin, CD45⁺CD56⁺CD3), молекулярно-генетический анализ (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IFNG, RELA/p56, SMAD2, SMAD3, MMP2, MMP9, PI3K, AKT2, MTOR, FOXO3A), интерпретировал полученные результаты и проводил статистический анализ. Диссертантом в соавторстве подготовлены к печати публикации по теме диссертационной работы.

Положения, выносимые на защиту

1. Возрастные различия нейрогенеза и пластичности коры головного мозга как в норме, так и при ишемическом инсульте формируются как результат сочетанного изменения нейрональной метаболической активности (NeuN, NSE), интенсивности апоптотической гибели (caspase-3) и профиля сигнальных путей PI3K/Akt/mTOR и PI3K/Akt/FOXO3a: в молодом возрасте сохраняется пул NeuN⁺NSE⁺ нейронов на фоне сбалансированной активации mTOR и FOXO3A, обеспечивая более высокий репаративный потенциал, тогда как у пожилых наблюдается практически полная утрата NeuN/NSE-сигналинга, резкое увеличение доли caspase-3⁺ нейронов и доминирование проапоптотической оси PI3K/Akt/FOXO3A, что отражает истощение механизмов нейрогенеза и пластичности в зоне пенумбры.

2. Ишемическое повреждение коры головного мозга у лиц молодого возраста сопровождается усилением компенсаторного ангиогенеза, что проявляется увеличением количества CD31⁺/CD105⁺ эндотелиальных клеток и экспрессией проангиогенного VEGF-A в эндотелии и нейронах. Ишемия вызывает активацию участников сигнальных путей TGF- β и NF- κ B, что приводит к гиперпродукции провоспалительных цитокинов, наиболее выраженной у пожилых.

3. Характер нейровоспаления при ишемическом инсульте определяется возраст-ассоциированным смещением баланса: у молодых в коре головного мозга доминируют CD68⁺CD163⁺ макрофаги, CD45⁺CD56⁺CD3⁻ NK- и CD45⁺CD56⁺CD3⁺ NKT-клетки, что указывает на высокий потенциал тканевой пластичности и репарацию нервной ткани. В коре головного мозга пожилых пациентов NK/NKT-клетки замещаются профилем CD45⁺CD56⁻CD3⁺ Т-лимфоцитов. Установленные различия формируют единую концепцию возрастной модуляции нейровоспаления и определяют характер иммуно-опосредованного повреждения нейронов зоны пенумбры после ишемического инсульта.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация на тему «Нейроваскулярные и иммунные аспекты клеточно-тканевого ответа при инфаркте головного мозга в разные периоды постнатального онтогенеза» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук соответствует паспорту научной специальности 1.5.23. Биология развития, эмбриология; области исследования диссертационной работы соответствуют пунктам: 1, 2, 3, 13.

Внедрение результатов диссертации в практику

Результаты диссертационного исследования внедрены в лечебный процесс Клиники нервных болезней им. А.Я. Кожевникова Университетской клинической

больницы № 3 Клинического центра ФГАОУ ВО Первый МГМУ И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) (акт № 726 от 17.10.2025), а также внедрены в учебный процесс Института трансляционной медицины и биотехнологии Научно-технологического парка биомедицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) при изучении дисциплины «Биология развития, эмбриология», читаемой аспирантам по научной специальности 1.5.23. Биология развития, эмбриология (акт № 745 от 17.10.2025).

Степень достоверности и апробация результатов

Степень обоснованности результатов обеспечена достаточным объемом репрезентативного материала. В работе применены современные методы статистического анализа. Выполнено сопоставление собственных данных с результатами, полученными другими исследователями по изучаемой проблеме. На основании разработанных критериев включения и исключения сформированы группы пациентов, от которых был получен архивный аутопсийный материал (n=184).

В работе использованы методы оценки достоверности различий, зарекомендовавшие себя как наиболее эффективные статистические модели, чаще всего используемые в медицине. Данные были формализованы и внесены в электронные таблицы Microsoft Excel, сформированы базы данных клинических характеристик пациентов, включенных в исследование, а также результатов проведенного комплекса исследований, содержащие всю необходимую информацию согласно дизайну.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программного пакета TIBCO Statistica версии 14.0.1 (TIBCO Software Inc., USA). Распределение количественных переменных оценивали с использованием критерия Шапиро-Уилка. Гомогенность дисперсий проверяли

критерием Левена. При нормальном распределении и равенстве дисперсий для сравнения двух групп применяли двусторонний t-критерий Стьюдента; для сравнения трех и более независимых групп использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с апостериорным тестом Тьюки. При распределении данных, отличном от нормального, применяли критерий Краскела-Уоллиса с post-hoc критерием Данна с поправкой на множественные сравнения. Для категориальных переменных использовали χ^2 -критерий Пирсона при соблюдении условий применимости; при ожидаемых частотах <5 применяли точный критерий Фишера. В исследованиях морфологического блока для парных сравнений использовали U-тест Манна–Уитни с поправкой Бонферрони. Данные с нормальным распределением представляли в виде среднего \pm стандартного отклонения (SD); данные с ненормальным распределением – в виде медианы и межквартильного размаха (IQR). Статистически значимыми считали различия при $p \leq 0,05$.

Фактический материал, проанализированный в диссертации, полностью соответствует первичной документации.

Основные результаты диссертационного исследования были доложены и всесторонне обсуждены на международных и всероссийских конференциях: Всероссийской научной конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (г. Москва, 2025 г.); Международной научно-практической конференции «Инновационные технологии в образовательном процессе морфологических дисциплин» (г. Минск, 2025 г.); LXX Международной научно-практической конференции «Advances in Science and Technology» (г. Москва, 2025 г.).

Апробация работы состоялась 16 декабря 2025 (протокол №13) на заседании межкафедральной конференции Института трансляционной медицины и биотехнологии Научно-технологического парка биомедицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет).

Публикации по теме диссертации

По результатам исследования автором опубликовано 7 работ, в том числе 2 научные статьи в научных изданиях, индексируемых в наукометрической базе данных RSCI; 2 статьи в изданиях, индексируемых в международных базах Web of Science, Scopus, PubMed, 3 публикации в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций (из них 1 зарубежной конференции).

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа представляет собой рукопись на русском языке объемом 244 страницы машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, главы описания материалов и методов, главы с результатами собственного исследования, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа иллюстрирована 10 таблицами и 62 рисунками. Список цитируемой литературы включает 303 источника, из которых 33 отечественных, 270 – зарубежных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Введение

Развитие нервной системы – один из наиболее сложных и тонко регулируемых процессов в биологии многоклеточных организмов. Формирование нейроваскулярных и иммунных взаимодействий в центральной нервной системе (ЦНС) начинается уже на ранних этапах эмбриогенеза и продолжается в постнатальном онтогенезе, определяя структурно-функциональную целостность и адаптационный потенциал мозговой ткани [39]. Современные исследования в области нейробиологии свидетельствуют о том, что механизмы, обеспечивающие рост, дифференцировку и интеграцию компонентов нейроваскулярной единицы в головном мозге при эмбриональном развитии, в значительной степени сохраняются и в зрелой нервной системе, играя crucialную роль в процессах адаптации и восстановления после повреждений, включая последствия ишемического инсульта [132, 181].

Постнатальный период характеризуется не только продолжающимся созреванием нейронов, нейроглии и кровеносных сосудов, но и их высокой пластичностью, позволяющей компенсировать повреждения, связанные как с внешними (травмы, экзогенная интоксикация), так и с внутренними причинами (гипоксия / ишемия, геморрагический и ишемический инсульт, новообразования головного мозга, инфекции, цереброваскулярные заболевания и др.) [8, 233]. Координированное функционирование структурных элементов нейроваскулярной единицы (нейронов, астроцитов, эндотелиальных клеток, перицитов и микроглии) имеет решающее значение для поддержания локального гомеостатического баланса [29]. При его нарушении, как это наблюдается при ишемическом повреждении головного мозга, запускаются каскады воспалительных и иммунных реакций, изменяющих микроокружение и определяющих модуляцию компенсаторных, регенераторных и метаболических процессов [178].

Исследования последних лет показали, что молекулярные пути, контролируемые нейрогенез в эмбриогенезе, такие как сигнальные оси Wnt и Hedgehog, активируются также при реактивном нейрогенезе в постнатальном и взрослом мозге, особенно в контексте ишемического повреждения [296]. Эти сигнальные системы участвуют в регуляции активности нейрональных стволовых клеток, ангиогенеза и ремоделирования внеклеточного матрикса [259]. Интересно, что в условиях ишемии наблюдается инициация ряда генетических программ, характерных для эмбрионального развития, что указывает на эволюционно сохраненную способность ЦНС к частичной активации таких процессов как нейрогенез и ангиогенез [196, 294].

Сосудистый компонент нейроваскулярной единицы играет не только трофическую, но и регуляторную роль в поддержании нейронального гомеостаза. Так, эндотелиальные клетки гемокapилляров экспрессируют нейротрофические факторы, способствующие не только выживанию нейронов, но и их дифференцировке в нейрогенных нишах [29]. Одновременно кровеносные сосуды выступают важнейшим регулятором иммунного интерфейса в головном мозге, модулируя проницаемость гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) для клеток периферической иммунной системы [205]. Было показано, что после ишемического инсульта происходит временное нарушение проницаемости ГЭБ, ведущее к активации микроглии, привлечению лейкоцитов из просвета кровеносных сосудов, изменению профиля локальной воспалительной реакции [55].

Недавние исследования демонстрируют, что клеточную воспалительную инфильтрацию в головном мозге после ишемии нельзя рассматривать исключительно как повреждающий фактор. Ряд авторов показывает, что микроглия и инфильтрирующие макрофаги обладают двойственной функцией: они могут усиливать повреждение посредством экспрессии провоспалительных цитокинов, но также инициировать репаративные процессы, выделяя нейротрофины и проангиогенные факторы [224]. Так, смена фенотипа микроглии с про- на противовоспалительный отражает тонкую регуляцию, сходную с таковой в

эмбриогенезе, когда последовательная активация определенных сигнальных каскадов задает вектор морфогенетического развития нервной ткани. В связи с этим, иммунофенотипирование клеточного воспалительного инфильтрата и определение фенотипических паттернов нейровоспаления представляется особенно актуальным.

Кроме того, возрастные различия клеточно-тканевого ответа на ишемическое повреждение головного мозга представляют собой отдельное направление исследований в области нейробиологии и биологии развития. В единичных исследованиях было показано, что у новорожденных животных наблюдается высокая степень спонтанного восстановления архитектоники нейроваскулярной единицы, что связывают с сохранением высокой пролиферативной активности нейрональных стволовых клеток и пластичности нейроваскулярного микроокружения [156]. В противоположность этому, пластический и регенераторный потенциал головного мозга лиц пожилого возраста значительно ограничен вследствие угнетения нейрогенеза, снижения компенсаторной сосудистой реактивности и хронического нейровоспаления (инфламмаджинга) [204, 251]. Перечисленные различия реактивности головного мозга определяют необходимость изучения клеточно-тканевого ответа на инфаркт мозга на разных периодах постнатального онтогенеза с целью выявления возрастных закономерностей реализации компенсаторно-адаптационных механизмов.

Таким образом, нейроваскулярные и иммунные взаимодействия представляют собой интегрированную систему, определяющую исход повреждений нервной ткани как при ишемическом инсульте, так и при других нейродегенеративных и нейровоспалительных заболеваниях. Их изучение в контексте возрастной инволюции пластического потенциала способствуют не только лучшему пониманию фундаментальных принципов биологии развития нервной ткани, но и раскрытию эндогенных репаративных механизмов, которые могут послужить основой для дальнейшей разработки новых терапевтических стратегий восстановления головного мозга после ишемического инсульта.

1.2. Нейроваскулярные взаимодействия и их роль в формировании головного мозга в эмбриональном периоде

Формирование головного мозга является одним из наиболее сложных и тонко регулируемых процессов в эмбриональном периоде. Уже на ранних стадиях нейруляции закладываются основы нейроваскулярных взаимодействий, обеспечивающих дальнейшую интеграцию между процессами нейрогенеза и ангиогенеза [289]. Происходит формирование взаимозависимой системы, в которой нейроны и эндотелиальные клетки посредством сигналинга определяют пространственно-временные закономерности дальнейшего роста, дифференцировки и морфогенеза структур головного мозга.

Эмбриональное развитие головного мозга начинается с формирования нервной трубки. На этом этапе особую роль играют градиенты морфогенов, таких как Sonic Hedgehog (Shh), Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), Wnt и Fibroblast Growth Factors (FGFs), сигналинг которых определяет осевую полярность и обеспечивает сегментацию нейроэпителия [257, 301]. Уже во время стадии замыкания нервной трубки происходит сочетанное формирование кровеносных сосудов мезодермального происхождения под влиянием проангиогенных факторов роста, например – васкулярного эндотелиального фактора роста (VEGF) [43]. Так, ранний ангиогенез является необходимым условием для дальнейшего нормального формирования структур головного мозга.

Принимая во внимание тот факт, что на ранних стадиях формирования ЦНС нейроэпителий пребывает в среде с низкой концентрацией кислорода, на молекулярном уровне это способствует экспрессии гипоксия-индуцируемого фактора (HIF-1 α). Это приводит к активации транскрипции нижележащих проангиогенных медиаторов (VEGF_{A-D}, синтаза оксида азота eNOS, высвобождаемый тромбоцитами фактор роста PDGF, Angiopoietin-1 и др.), биологические эффекты которых обеспечивают усиление ангиогенеза и разрастание сети кровеносных сосудов в направлении зон с наиболее выраженной

пролиферацией [150, 232]. Таким образом, возникающая на ранних стадиях развития головного мозга гипоксия представляет собой физиологический стимул для ангиогенеза и метаболической адаптации нервной ткани [243].

Так, формирование сосудистой сети головного мозга начинается с появления первичных гемокапилляров, инвазия которых в нейроэпителий приводит к формированию комплекса кровеносных сосудов, направленному на обеспечение адекватного уровня метаболической поддержки нейрогенеза. На молекулярном уровне эндотелиальные клетки активно экспрессируют специфические рецепторы VEGFR-2 (Flk-1/KDR), Tie-2 и EphrinB2, ответственные за индукцию ангиогенеза и определение направления роста кровеносных сосудов [10, 150]. Параллельно происходит активация сигнальных каскадов Notch и Delta-like ligands, регулирующих соотношение между клетками-«типперами» (*от англ. tip cells*), отвечающими за формирование инвагинаций сосудистой стенки, и клетками-«столбами» (*от англ. stalk cells*), обеспечивающими их стабилизацию и дальнейшее удлинение [31, 180].

На фоне активного разрастания сети кровеносных сосудов происходит увеличение метаболизма, обеспечивающего интенсивную пролиферацию и дифференцировку нейральных стволовых клеток (НСК), локализованных преимущественно в нейрогенных нишах вентрикулярной зоны. Так, под влиянием сигналинга Shh, FGF и Wnt происходит последовательное формирование нейронов, глиальных клеток и олигодендроцитов [75, 244, 248]. Следует отметить, что пространственная организация зон нейрогенеза происходит в областях с наибольшим количеством кровеносных сосудов, обеспечивающих высокие концентрации кислорода, метаболитов и морфогенетических индукторов. Кроме того, в некоторых исследованиях было доказано, что эндотелиальные клетки синтезируют ряд паракринных факторов (например, BDNF, NT-3, PEDF), которые напрямую регулируют направленную дифференцировку НСК и их миграцию из нейрогенных ниш [237].

Система нейроваскулярных взаимодействий в эмбриональном периоде развития головного мозга обеспечивает не только метаболическую поддержку нейрогенеза, но и сигнальную координацию последующего роста и дифференцировки нейронов и кровеносных сосудов. Предшественники астроцитарных клеток и перициты начинают взаимодействовать с эндотелием гемокapилляров уже на ранних этапах ангиогенеза, формируя зачатки гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). Так, под влиянием сигнальных путей TGF- β и Angiopoietin-1 происходит постепенное увеличение количества и плотности межклеточных контактов, экспрессия протеинов плотных контактов (claudin-5, occludin, ZO-1), критически необходимых для поддержания барьерной функции и определения селективной проницаемости ГЭБ на всех этапах онтогенеза, включая постнатальный период и старение в частности [254]. В течение всей жизни организма перечисленные функции ГЭБ определяют степень нейрогенеза и формирования новых нейрональных связей посредством регуляции локальной концентрации нейротрофических / пронеурогенных факторов роста и ионных градиентов, обеспечивающих дифференцировку НСК в нейрогенных нишах, созревание нейронов и глиальных клеток в постнатальном онтогенезе [237].

По данным некоторых исследований известно, что в период с 8-й по 20-ю неделю гестации (у человека) происходят ключевые этапы формирования отделов головного мозга – коры больших полушарий, базальных ганглиев, мозжечка и ствола мозга. В это время сеть кровеносных сосудов продолжает активно расширяться в соответствии с региональными потребностями нервной ткани развивающихся структур. Немногочисленные исследования в области нейробиологии демонстрируют, что паттерны сосудистого роста строго согласованы с топографией нейрогенеза: в зонах высокой нейрональной активности наблюдается локальное увеличение экспрессии VEGF, Ang-2 и Ephrin-B2, способствующих усилению ангиогенеза [2, 287]. В то же время разрастание сосудистой сети может ограничивать нейрогенез посредством модуляции

сигналинга Notch, PDGF и Wnt, обеспечивая строгую регуляцию пролиферации и дифференцировки НСК [48].

Немаловажным фактором поддержания межнейронных и нейроваскулярных связей в головном мозге в эмбриональном периоде является взаимодействие эндотелиальных клеток с радиальными глиоцитами. Последние выполняют не только структурную (каркасную), но и регуляторную роль, направляя миграцию нейронов и кровеносных сосудов в развивающейся коре [164]. Радиальная глия экспрессирует молекулы ламин и интегрины, взаимодействующие с эндотелием и внеклеточным матриксом (вероятно, посредством активации сигнального каскада TGF- β), что обеспечивает стабилизацию растущих кровеносных сосудов и их правильную топографию относительно слоев коры головного мозга. Этот процесс также регулируется сигналингом молекулярных каскадов VEGF, Notch и PI3K/Akt, ответственных за синхронизацию роста сосудистой сети и нейрональных цепей [43].

Учитывая приведенные данные, можно предположить, что сигнальный путь Wnt/ β -catenin имеет важное значение на различных этапах развития головного мозга, обеспечивая молекулярную регуляцию нейроваскулярных взаимодействий, включая формирование кровеносных сосудов и ГЭБ, а также процессы нейрогенеза как в нейрогенных нишах, так и вне их [38]. Активация Wnt-сигналинга в эндотелиальных клетках индуцирует экспрессию проангиогенных факторов и специфических барьерных белков (белков плотных контактов), тогда как в нейральных стволовых клетках этот путь контролирует пролиферацию и дифференцировку. Это также сопровождается активацией каскада TGF- β , который регулирует созревание перицитов и стабилизацию сосудистой стенки, предотвращая избыточный ангиогенез [149, 235]. Дисбаланс между этими crucialными сигнальными системами способствует формированию грубых дефектов нейро- и ангиогенеза, гипоплазии и нарушению архитектоники нервной ткани как на эмбриональном этапе развития, так и во взрослом возрасте при некоторых патологиях ЦНС [296].

На поздних стадиях эмбриогенеза происходит формирование нейроваскулярной единицы (НВЕ) – функционального комплекса, в состав которого большинство авторов включают нейроны, астроциты, перициты, микроглию и эндотелиальные клетки, подчеркивая значимость взаимодействия между нейрональным и сосудистым компонентами [9, 298]. Перечисленные компоненты обеспечивают точную взаимосвязанную регуляцию локальной перфузии в зависимости от степени нейрональной активности, а на молекулярном уровне – модуляцию многочисленных сигнальных путей, координирующих нейро- и ангиогенез, что делает НВЕ основным морфологическим субстратом будущей нейроваскулярной регуляции у взрослого организма в течение всего постнатального онтогенеза, включая процессы старения, а также реализации механизмов тканевой пластичности, репарации и регенерации нервной ткани в ответ на повреждение [195, 225].

Кроме того, в позднем эмбриональном периоде происходит увеличение экспрессии нейротрофических факторов, таких как NGF, BDNF и GDNF, которые способствуют заключительному созреванию межнейронных синаптических связей и стабилизации стенки кровеносных сосудов [106]. Таким образом, к моменту рождения формируется сложная интеграционная система, обеспечивающая метаболическую, структурную и сигнальную взаимосвязь между компонентами НВЕ, нарушение функционирования которой в постнатальном онтогенезе может служить молекулярным субстратом апоптотической гибели нейронов и развития нейродегенеративных заболеваний [146].

Кроме того, сигнальные каскады, описанные выше как регуляторы нейро- и ангиогенеза на эмбриональном этапе развития, отличаются высокой избирательностью и иерархичностью. Так, сигнальный белок Shh, секретируемый преимущественно в вентральных отделах головного мозга (включая теленцефалон, или конечный мозг), регулирует пространственную организацию, пролиферацию и дифференцировку клеток-предшественников, тем самым определяя морфологию, размеры и фенотип формирующихся нейронов, тогда как сигнальные пути BMP и

Wnt преимущественно задают программы роста и паттернизации в дорсальных отделах мозга [301]. Взаимодействие между этими сигнальными системами обеспечивает пространственную специфику развития отделов головного мозга, определяя топографию формирования зон сосудистого роста, нейрогенеза, а также будущих функциональных центров. Некоторые авторы также дополняют эту концепцию предположениями о регуляторной роли матриксных металлопротеиназ (особенно MMP-2, MMP-9), которые контролируют remodelирование внеклеточного матрикса и миграцию клеток, однако эта информация нуждается в уточнении и проведении соответствующих молекулярных исследований [15].

Особое место в процессах организации и функционирования нейроваскулярной единицы занимает адаптационная клеточная пластичность, высокая степень которой в нервной ткани доказана результатами многочисленных исследований и сохраняется даже на постнатальном этапе онтогенеза в рамках компенсаторно-адаптационного потенциала головного мозга [68]. Так, исследования последних лет показали, что в условиях гипоперфузии и / или гипоксии компоненты НВЕ эмбриона способны изменять фенотип и напрямую замещать дефицитарные функции – феномен, получивший название трансдифференцировки [93, 293]. Эти данные свидетельствуют о высокой пластичности клеточных популяций в развивающемся головном мозге и об их способности к перекрестной дифференцировке под влиянием локальных факторов микроокружения.

Развитие головного мозга в эмбриональном периоде характеризуется исключительной динамикой и взаимосвязью нейрогенеза и ангиогенеза. Так, нейроваскулярные взаимодействия определяют не только морфогенетическое строение мозга, но и формирование его функциональной организации, обеспечивая способность нервной ткани к адаптации и регенерации, сохраняющуюся и в постнатальном онтогенезе. Нарушения регуляции этих процессов на эмбриональной стадии приводят к тяжелым структурным аномалиям, а в постнатальном периоде проявляются снижением пластичности и устойчивости к

различным повреждениям. Таким образом, изучение молекулярных и регуляторных механизмов нейроваскулярного взаимодействия является ключом к пониманию патогенеза цереброваскулярных и нейродегенеративных заболеваний, а также основой для разработки стратегий, направленных на стимуляцию регенерации и восстановление нервной ткани.

1.3. Нейрогенез, ангиогенез и клеточная пластичность в постнатальном периоде: сходство с механизмами эмбрионального развития

Вопрос о возможности образования новых нейронов во взрослом мозге по-прежнему остается крайне дискуссионным среди нейробиологов. Зрелый головной мозг традиционно считался органом с ограниченными возможностями к регенерации, однако за последние десятилетия были накоплены данные, демонстрирующие сохранение способности головного мозга млекопитающих (в т.ч. человека) к нейрогенезу в рамках реализации механизмов клеточной пластичности на протяжении всего постнатального периода [1, 21, 87, 132]. Кроме того, в экспериментальных условиях авторы доказали увеличение количества новых нейронов в обонятельных луковицах и гиппокампе на фоне выраженной активации пронейрогенных генов и клеток-предшественниц с соответствующих нейрогенных нишах: в латеральных стенках боковых желудочков (субвентрикулярная зона, СВЗ) и в зубчатой извилине гиппокампа (субгранулярная зона, СГЗ) [29, 110, 303]. Тем не менее, некоторые авторы ставят под сомнение возможность роста и дифференцировки НСК в головном мозге взрослого человека [213]. Однако, сам термин «нейрогенез» не ограничен процессами образования новых нейронов и, по мнению большинства отечественных и зарубежных авторов, включает в себя также: способность нейронов к репарации / регенерации и замещению функций поврежденных клеток как компонентов реализации клеточной пластичности, интеграцию уже существующих нейронов с созданием новых межнейронных связей, генерацию и модуляцию функций нейроглиальных

клеток, некоторые аспекты нейроваскулярных взаимодействий и др. [181, 244] Некоторые исследователи называют нейрогенезом весь жизненный цикл клеток нервной ткани, включая механизмы дегенерации и клеточной гибели [75, 188]. Такое представление о нейрогенезе представляется наиболее оправданным в контексте исследования, посвященного возрастным особенностям нейроваскулярных взаимодействий в условиях реализации механизмов клеточной пластичности при ишемическом повреждении.

Хотя во взрослом возрасте интенсивность этих процессов снижается, нейрогенез и ангиогенез в головном мозге продолжают постоянно, обеспечивая обновление структуры и поддержание функций нервной ткани как в норме, так и при различных патологических состояниях. Реализация связанных с ними компенсаторно-адаптационных механизмов связана с модуляцией молекулярных сигнальных путей, практически аналогичных таковым на этапе эмбрионального развития головного мозга, а именно – каскады Wnt, Notch, Sonic Hedgehog, VEGF и TGF- β [248, 288, 296].

Во многих исследованиях было доказано, что после рождения нейрогенез у млекопитающих продолжается преимущественно в двух специализированных зонах — субвентрикулярной зоне (СВЗ) боковых желудочков и субгранулярной зоне (СГЗ) гиппокампа (т.н. нейрогенных нишах) [25]. В этих областях в течение длительного времени обнаруживаются популяции НСК, способных к пролиферации и дифференцировке в нейроны, астроциты и олигодендроциты [22]. Молекулярные механизмы регуляции активности НСК также включают упомянутые выше сигнальные пути Notch, Wnt/ β -catenin и Shh, которые являются чувствительными к локальным изменениям факторов микроокружения (градиент кислорода, сигналинг с эндотелия гемокapилляров и глиальных клеток и др.) [187, 208].

Как и в эмбриональном периоде, путь Notch является ключевым регулятором выживаемости клеток в нейрогенных нишах в постнатальном онтогенезе. Кроме того, активация Notch1 предотвращает преждевременную дифференцировку НСК,

обеспечивая контролируемое обновление клеточного состава и созревание популяций нервных клеток [143]. На молекулярном уровне его паракринное взаимодействие с лигандом Delta-like 1 инициирует в соседних клетках транскрипцию генов *Hes* и *Hey*, которые подавляют синтез пронейрогенных факторов, таких как *Ascl1/Mash1*, *NeuroD* и *Neurog2* [186]. Эта регуляторная система, аналогично эмбриональной, направлена на обеспечение пространственно-временной координации нейрогенеза в постнатальном периоде онтогенеза.

Сигнальный путь Wnt/ β -catenin также несет ответственность за локальную регуляцию пролиферации и дифференцировки нейрональных предшественников в СВЗ и СГЗ в постнатальном онтогенезе. Так, активация рецепторов Frizzled и LRP5/6 вызывает накопление β -катенина в цитоплазме с последующей его транслокацией в ядро, где он индуцирует экспрессию генов, участвующих в регуляции роста и пластичности нейронов [117, 223]. Важно упомянуть, что по некоторым данным Wnt-сигналинг не только способствует нейрогенезу во взрослом головном мозге, но и координирует его с ангиогенезом посредством регуляции экспрессии VEGF, таким образом изменяя проницаемость ГЭБ и индуцируя формирование новых гемокapилляров в зонах активного созревания нервных клеток [278].

Участники сигнального пути Sonic Hedgehog (Shh) остаются активным и в зрелой нервной ткани. Некоторые исследования продемонстрировали роль Shh-сигналинга в регуляции деления НСК и ангиогенеза, а также обеспечении процессов миграции нейробластов [52, 301]. В связи с этим, авторы обнаружили высокие уровни экспрессии Shh в астроцитах и нейронах гиппокампа, а рецепторный белок Patched-1 (Ptch1) был детектирован на поверхности эндотелиальных клеток и перицитов [52]. Взаимодействие этих компонентов запускает активацию транскрипционного фактора Gli1, который регулирует экспрессию генов, ответственных за выживание клеток и ремоделирование кровеносных сосудов. Таким образом, Shh-путь выступает универсальным модулятором нейроваскулярного сопряжения и клеточной пластичности,

поддерживая равновесие между регенерацией и стабильностью клеток нервной ткани не только в нейрогенных нишах, но и за их пределами.

Ангиогенез в головном мозге на постнатальном этапе онтогенеза аналогичен таковому при эмбриональном развитии, однако лимитирован уровнями метаболической поддержки и соответствующим сигналингом. Одними из ключевых регуляторов ангиогенеза остаются факторы семейства VEGF – основные стимуляторы роста кровеносных сосудов, синтезируемые эндотелиальными клетками, нейронами, астроцитами и микроглией, особенно в условиях локальной гипоксии [290]. Их взаимодействие с рецепторами VEGFR-1 и VEGFR-2 приводит к активации эндотелиоцитов, усилению их пролиферации и миграции с последующим формированием новых гемокapилляров, при этом задействуются механизмы, во многом сходные с ангиогенезом в эмбриональном периоде. Некоторые авторы на основании экспериментальных данных не исключают также нейротрофическую функцию этого фактора роста, которая тем не менее еще требует уточнения в будущих исследованиях [230]. Однако избыточная экспрессия VEGF способствует нарушению целостности и проницаемости ГЭБ, в связи с чем в постэмбриональном периоде происходит активация соответствующих антагонистов, включая Thrombospondin-1 и PEDF [79, 280, 288].

Кроме того, важную роль в ремоделировании кровеносных сосудов головного мозга в постнатальном периоде выполняют перициты, которые обеспечивают не только механическую поддержку эндотелия и структурной организации сосудистой стенки, но и выполняют ряд специфических функций – участвуют в регуляции проницаемости ГЭБ и дифференцировки НСК посредством экспрессии TGF- β и ангиопоэтинов [149, 235]. Исследования последних лет показали, что перициты также обладают фенотипической пластичностью, демонстрируя способность к трансформации в фибробластоподобные клетки или даже в нейроноподобные элементы в патологических условиях, что свидетельствует о crucialной роли этой популяции клеток в обеспечении клеточно-тканевой пластичности головного мозга [63]. Данный феномен

подчеркивает сохранение в зрелом мозге потенциала перекрестной дифференцировки, которая ранее считалась характерной только для эмбрионального этапа развития ЦНС.

Существенную роль в регуляции постнатального ангиогенеза играет сигнальный путь TGF- β и его нижележащие эффекторы в сочетании с рецептором ALK1 и кофактором эндоглина (Eng), которые контролируют созревание кровеносных сосудов и стабилизацию межклеточных контактов, включая регуляторное влияние на проницаемость ГЭБ [229]. В единичных исследованиях было показано, что нарушение этого сигналинга может сопровождаться локальным образованием микрогеморрагий, отеком, гипоперфузией, наиболее выраженным в старшем возрасте [221].

Клеточная пластичность нервной ткани головного мозга взрослого человека в первую очередь проявляется способностью дифференцированных клеток изменять фенотип под воздействием внешних стимулов [242]. Так, одним из наиболее ярких примеров является реактивная астроцитарная трансформация, при которой астроциты после повреждения мозга частично утрачивают специфические функции и приобретают свойства клеток-предшественниц с высокой экспрессией Sox2 и Nestin [72, 283]. В дальнейшем эти клетки могут служить источником новых субпопуляций нейронов и глии, особенно при сопутствующей стимуляции FGF2 и EGF [253]. Это приводит к частичному замещению утраченных элементов и локальных функций нервной ткани и является одним из основных механизмов реализации клеточной пластичности в головном мозге в ответ на повреждение.

Подобные процессы происходят и в кровеносных сосудах. Так, в эндотелиальных клетках гемокapилляров головного мозга в условиях гипоксии и / или нейровоспаления происходит выраженная активация эмбриональных программ роста и дифференцировки, включая экспрессию регуляторов Notch1, EphrinB2 и Dll4, что способствует формированию новых капилляров по механизму пространственного распределения прогениторных (Tip-cells) и зрелых (Stalk-cells) эндотелиальных клеток [88]. Это сопровождается активацией генов, ответственных

за ремоделирование внеклеточного матрикса (например, MMP-2 и MMP-9), что облегчает инвазию клеток и ускоряет разрастание сети кровеносных сосудов [271].

Неизменным после рождения остается и нейроваскулярное взаимодействие, которое сохраняет функциональную значимость в зрелом головном мозге, аналогичную таковой в эмбриональном периоде. Так, синаптически активные нейроны способны к секреции вазоактивных субстратов (NO, простагландины, аденозин), тем самым регулируя локальную перфузию и адекватность метаболической поддержки [111]. Астроциты и микроглия при этом играют роль посредников, передающих сигналы от нейронов к клеткам эндотелия кровеносных сосудов через многочисленные межклеточные контакты, что формирует основу для выделения нейроваскулярного комплекса в единую интегрированную систему – нейроваскулярную единицу [29, 298].

Старение головного мозга сопровождается постепенным снижением активности сигнальных систем регуляции нейрогенеза и ангиогенеза, что связано с уменьшением уровней экспрессии их участников. Так, продемонстрированное в недавних работах снижение активности Wnt/ β -catenin и Shh, а также хроническая активация NF- κ B и TGF- β в рамках инфламмаджинга (см. ниже) способствует нарушению регуляции нейроваскулярных взаимодействий и, как следствие, к ослаблению регенераторного / пластического / компенсаторно-адаптационного потенциала нервной ткани [144, 215]. Тем не менее даже в пожилом возрасте головной мозг сохраняет определенную способность к пластическим перестройкам, как структурным, так и функциональным, что определяет некоторые перспективы для терапевтической стимуляции эндогенных механизмов восстановления даже в условиях нейродегенерации и нейровоспаления.

Таким образом, нейроваскулярные взаимодействия и механизмы реализации клеточной пластичности в головном мозге на постнатальном этапе онтогенеза представляют собой продолжение эмбриональных программ развития, адаптированных к условиям возрастной изменчивости нервной ткани, включая такие патологические состояния как нейродегенерация и нейровоспаление.

Перечисленные нейроваскулярные и регуляторные аспекты обеспечивают реализацию пластической функции в ЦНС и способствуют адаптации, репарации и частичной регенерации структур головного мозга при повреждении. Понимание сходств и различий организации этих процессов в разные периоды онтогенеза имеет фундаментальное значение и может послужить базисом для разработки новых возраст-ориентированных стратегий регенеративной терапии при нейродегенеративных и цереброваскулярных заболеваниях головного мозга.

1.4. Роль нейроваскулярных взаимодействий в реализации пластичности головного мозга

Клеточно-тканевая пластичность головного мозга представляет собой совокупность адаптивных свойств нервной ткани, обеспечивающих ее способность изменять структуру, функциональные связи и молекулярные механизмы в ответ на внешние или внутренние стимулы [19]. Это фундаментальное свойство нервной ткани лежит в основе процессов обучения, памяти, регенерации и компенсации после повреждения. В более широком смысле под пластичностью понимается способность компонентов нервной ткани изменять фенотип, морфологию и / или функциональные параметры с сохранением интегративных свойств нейронных связей и межклеточных взаимодействий [246].

Нейроваскулярные взаимодействия играют crucialную роль в формировании и реализации механизмов клеточно-тканевой пластичности в головном мозге как на ранних этапах эмбрионального развития, так и в постнатальном онтогенезе [137]. Результатами многочисленных исследований доказано, что система микроциркуляции не просто выполняет роль транспортной сети, обеспечивающей метаболическую поддержку (особенно в нейрогенных нишах), но и активно участвует в регуляции процессов нейрогенеза, миграции нейробластов и созревания синаптических связей [13]. В период эмбриогенеза закладываются основы нейроваскулярной интеграции, в рамках которой

эндотелиальные клетки, перициты, астроциты и нейроны формируют единый функциональный комплекс – нейроваскулярную единицу, регулирующую развитие и последующую пластичность нервной ткани [66].

Формирование НВЕ является фундаментальным процессом развития ЦНС в онтогенезе и представляет собой многочисленные механизмы локальной регуляции между нейрональными, глиальными и эндотелиальными клетками. Уже на ранних стадиях эмбриогенеза происходит координированное сочетание роста аксональных отростков нейронов и формирования сети кровеносных сосудов, обеспечивая развитие межнейронных связей, метаболически поддерживаемое системой микроциркуляции. Синхронизация этих процессов достигается посредством изменения концентраций общих сигнальных молекул, таких как VEGF, BDNF и ангиопоэтины [61, 100].

Круциальным сенсорным фактором метаболического состояния и адекватности перфузии в нейроваскулярной единице служит HIF-1 α [12]. В условиях низкого содержания кислорода он активирует экспрессию VEGF, способствуя ангиогенезу и нейропротекции [263]. В эмбриональном мозге именно этот механизм обеспечивает адаптацию нервной ткани к быстро меняющимся метаболическим потребностям растущих тканей, а во взрослом мозге – активацию высокоэнергетических регенераторных процессов при различных повреждениях.

VEGF и его рецепторы (VEGFR1/2), а также FGF-2 и EGF в совокупности обеспечивают координированное развитие сосудистой и нервной систем, стимулируя ангиогенез и способствуя выживанию и дифференцировке нейральных клеток-предшественниц [125]. Было доказано, что VEGF синтезируется не только эндотелиальными клетками, но и нейроглией, активируя в них сигнальные пути MAPK и ERK (ответственные за регуляцию выживаемости нейронов), что приводит к модуляции экспрессии нейротрофинов и факторов синаптогенеза [43].

Так, эндотелиальные клетки являются источником нейротрофических факторов, включая BDNF, NGF и IGF-1. Эти молекулы активируют рецепторы TrkB и PI3K/Akt-сигналинг в нейронах, что способствует индукции механизмов

клеточной выживаемости и стимулирует рост дендритных отростков [35, 194, 236]. Сосудистые сигналы также могут изменять уровень экспрессии синаптических белков, таких как PSD-95 и Synapsin I, тем самым влияя на силу синаптической передачи [255].

На тканевом уровне пластичность реализуется через механизмы структурной перестройки межнейронных связей. Кроме того, в некоторых исследованиях было показано, что функциональная активность и обучение могут вызывать увеличение объема серого вещества за счет роста дендритных отростков нейронов, утолщения синаптических окончаний и неоваскуляризации [104]. Белое вещество мозга также обладает пластической функцией, связанной с изменением миелинизации аксональных отростков, регулируемой активностью олигодендроцитов и сигналами нейрональной активности. Этот процесс способствует оптимизации скорости и синхронности передачи сигналов между нейронами [108].

Клеточная пластичность также включает способность зрелых клеток мозга изменять свое функциональное состояние и, в некоторых случаях, фенотип. В нейроваскулярных нишах головного мозга взрослого человека сохраняются популяции нейтральных и сосудистых стволовых клеток, преимущественно в субвентрикулярной зоне и гиппокампе, где они участвуют в восстановлении нейронных сетей после повреждений и в формировании новых связей в процессе обучения [29, 64, 107]. Более того, клетки нейроглии, особенно астроциты и микроглия, демонстрируют выраженную фенотипическую пластичность, изменяя экспрессию рецепторов на своей поверхности, цитокинов и молекул внеклеточного матрикса в зависимости от метаболических или воспалительных сигналов микроокружения [166, 281].

Кроме того, на клеточном уровне пластичность реализуется через процессы синаптической перестройки, нейрогенеза, глиальной реактивности и изменения метаболического статуса клеток. Синаптическая пластичность, как показано во множестве исследований, включает долговременную потенцию (LTP) и долговременную депрессию (LTD) – механизмы, изменяющие силу передачи

сигналов между нейронами [57]. Эти процессы зависят от активности ионов кальция, фосфорилирования белков (CaMKII, CREB, PKC) и локального синтеза белка в дендритных шипиках [23]. На молекулярном уровне активируются сигнальные пути BDNF/TrkB, NMDA-рецепторный каскад и MAPK/ERK, которые регулируют перестройку цитоскелета и экспрессию генов, ответственных за формирование новых синаптических контактов [32, 118].

Особое значение имеет участие фактора Shh, который секретируется астроцитами и эндотелием и активирует одноименный сигнальный каскад через рецептор Smoothed. Это приводит к индукции экспрессии белков, регулирующих проницаемость ГЭБ, что способствует выживанию нейронов, например в условиях гипоксии [119]. Одновременно Shh усиливает экспрессию факторов роста, таких как BDNF и GDNF, которые критически важны для стабилизации синаптических связей и реализации LTP, лежащей в основе процессов обучения и памяти [128].

Путь Wnt/ β -catenin также играет критическую роль в установлении нейроваскулярной архитектуры, регулируя формирование ГЭБ и морфогенез сети кровеносных сосудов в зрелом головном мозге [262]. Так, активация Wnt-лигандов стимулирует экспрессию белков Claudin-5 и Occludin, обеспечивающих плотные контакты эндотелия, что создает основу для регуляции проницаемости сосудов и избирательного метаболического обмена в головном мозге [91]. Этот же путь регулирует пролиферацию нейральных клеток-предшественниц и их направленную миграцию в развивающемся мозге [44].

Другим сигнальным каскадом, регулирующим процессы дифференцировки как нейрональных, так и эндотелиальных клеток, является Notch. Экспрессия рецепторов Notch1 и DLL4 обеспечивает поддержание баланса между ангиогенезом и стабилизацией сосудистой сети, предотвращая избыточный рост гемокapилляров и поддерживая структурную целостность стенки кровеносных сосудов [143]. Эти же сигналы участвуют в ограничении избыточного нейрогенеза.

Ключевая роль в поддержании пластичности нервной ткани принадлежит взаимодействию нейронов и глиальных клеток с системой микроциркуляции.

Астроциты, образующие «эндфуты» на поверхности гемокapилляров, регулируют кровоток и метаболизм, синтезируя вазоактивные вещества – простагландины, NO и эндотелин [80]. Эти сигналы обеспечивают согласование церебральной перфузии с локальной нейрональной активностью, формируя основу нейроваскулярной саморегуляции. Кроме того, астроциты и перициты участвуют в передаче сигналов через экзосомы и микровезикулы, содержащие микроРНК и белки, регулирующие экспрессию генов, связанных с пластичностью [121].

Кроме того, эпигенетическая регуляция (модификации гистонов, метилирование ДНК и экспрессия микроРНК) обеспечивает долговременную модуляцию экспрессии генов, ответственных за поддержание межнейронных связей и синаптогенеза [206]. Таким образом, эпигенетические механизмы лежат в основе устойчивых адаптаций, возникающих как при обучении на ранних этапах постнатального онтогенеза, так и в ходе восстановления после повреждений в головном мозге взрослого человека [8, 98].

Интересным направлением исследований в последние десятилетия является участие воспалительного сигналинга от иммунных клеток в регуляции клеточно-тканевой пластичности [135]. Молекулы, традиционно относящиеся к иммунной системе, такие как TNF- α , IL-1 β и компоненты комплемента (C1q, C3), участвуют в процессах ремоделирования синапсов и регуляции проницаемости гематоэнцефалического барьера [172]. Кроме того, показано, что при повреждении или старении микроглия реагирует на изменения нейрональной активности, синтезируя про- и противовоспалительные цитокины, которые в зависимости от состояния нейроваскулярной единицы могут как усиливать, так и подавлять процессы нейропластичности [45, 260].

Перечисленная совокупность данных свидетельствует о том, что заложенные в эмбриогенезе нейроваскулярные взаимодействия формируют универсальную платформу для реализации пластических процессов в головном мозге в постнатальном онтогенезе. Эти связи обеспечивают интеграцию метаболической, сосудистой и нейрональной активности, определяя способность мозга

адаптироваться к изменениям среды в рамках реализации компенсаторно-адаптационного потенциала нервной ткани. Перечисленные выше молекулярные механизмы формируют взаимосвязанную сеть регуляции, поддерживающую баланс между ангиогенезом, нейрогенезом и синаптической перестройкой. Их комплексное изучение открывает новые перспективы для разработки терапевтических стратегий, направленных на стимуляцию эндогенной пластичности и восстановление когнитивных функций при нейродегенеративных, нейровоспалительных и цереброваскулярных патологиях головного мозга в постнатальном периоде онтогенеза.

1.5. Взаимодействие компонентов нейроваскулярной единицы в постэмбриональном периоде в нормальных условиях

После завершения эмбрионального развития головного мозга НВЕ становится ключевой морфофункциональной структурой, обеспечивающей поддержание локального гомеостаза, метаболическую и сигнальную интеграцию между нервной и кровеносной системами. Она представляет собой сложный динамический комплекс, включающий нейроны, астроциты, эндотелиальные клетки, перициты и микроглию, объединенные общим метаболизмом и сигналингом [295]. В нормальных условиях НВЕ обеспечивает оптимизацию церебрального кровотока, контроль проницаемости ГЭБ, регуляцию энергетического обмена и реализацию механизмов нейрональной пластичности [173].

Основной принцип функционирования НВЕ заключается в так называемом нейроваскулярном сопряжении – способности кровеносных сосудов локально реагировать на изменения нейрональной активности. Работа нейронов сопровождается синтезом в них вазоактивных медиаторов (глутамат, NO, простагландины, аденозин), которые передаются через отростки астроцитов к эндотелию гемокapилляров [256]. Этот механизм (функциональная гиперемия)

обеспечивает увеличение локального притока крови и доставку кислорода и глюкозы к активным областям головного мозга [184]. Эндотелиальные клетки в ответ секретируют NO / eNOS, простаглицлин и другие вазодилатирующие вещества, регулируя тонус артериол [291].

Ключевая роль в передаче сигнала от нейронов к сосудам принадлежит астроцитам, отростки которых напрямую контактируют со стенкой гемокapилляров практически на всем ее протяжении. Астроциты реагируют на глутаматергическую активность повышением внутриклеточного Ca^{2+} , активируя фосфолипазу A_2 , способствуя образованию арахидоновой кислоты и ее метаболитов – простаглицлинов и эпоксидов, регулирующих сосудистый тонус [53, 227]. Кроме того, астроциты ответственны за транспорт глюкозы и ионов, а также за поддержание осмотического и энергетического транскапиллярного баланса [51, 138]. Так, способность астроцитов к быстрой модуляции метаболического профиля и переходу от гликолиза к окислительному фосфорилированию, позволяет контролировать метаболическую поддержку нейронов активированных зон коры головного мозга [16, 28].

В то же время эндотелиальные клетки сосудов головного мозга в постнатальном онтогенезе выполняют не только роль барьерного и транспортного элемента, но и являются участниками межклеточной коммуникации. Они экспрессируют рецепторы для нейротрансмиттеров (включая глутаматные и пуринергические), принимают молекулярную сигнализацию от нейронов и астроцитов, регулируя в ответ проницаемость ГЭБ [51]. Эндотелиальные клетки синтезируют ряд факторов, поддерживающих выживаемость нейронов, включая VEGF, BDNF и IGF-1, а также участвуют в регуляции антиоксидантной защиты за счет экспрессии эндогенных ферментов – супероксиддисмутазы (SOD) и каталазы [171]. Посредством секреции молекул адгезии (ICAM-1, VCAM-1) эндотелиальные клетки также взаимодействуют с микроглией и лейкоцитами, что обеспечивает быстрое развитие контролируемого нейровоспаления в ответ на повреждение ГЭБ [158].

Перициты, покрывающие гемокapилляры, выполняют стабилизирующую и сигнальную функцию. Они регулируют диаметр сосудов микроциркуляторного русла, участвуя в формировании плотных межклеточных контактов и контролируя избирательную проницаемость ГЭБ [228]. Перициты синтезируют ангиопоэтины, TGF- β и PDGF-B, ответственные за стабилизацию сосудистой стенки и поддержание структурно-функциональной целостности ГЭБ. Кроме того, эти клетки способны к фагоцитозу и участвуют в удалении продуктов метаболизма, тем самым поддерживая локальный гомеостаз [56]. Современные исследования показали, что перициты обладают выраженной фенотипической пластичностью: в физиологических условиях они сохраняют покойный статус, но при метаболическом или механическом стрессе могут трансформироваться в активные ангиогенные фенотипы [62].

Микроглия в нормальном мозге выполняет функции иммунного мониторинга и трофической поддержки. В условиях физиологического покоя отростки этих клеток реагируют на изменения состояния микросреды, контролируя активность нейронов, синапсов и кровеносных сосудов [151]. Клетки микроглии также продуцируют нейротрофические факторы, включая NGF, BDNF и GDNF, тем самым потенцируя нейрогенез, синаптическую перестройку и стабилизацию гематоэнцефалического барьера [84, 170]. В нормальных условиях микроглия взаимодействует с эндотелиальными клетками через рецепторы CX3CR1 и CD200R, контролируя проницаемость ГЭБ для иммунных клеток, предотвращая развитие воспаления и поддерживая противовоспалительный статус [77].

Функциональная интеграция всех компонентов НВЕ обеспечивается через сложные сигнальные каскады. Среди которых ключевую роль играют сигнальные пути Wnt/ β -catenin, Notch, TGF- β и PI3K/Akt, которые в эмбриональном периоде контролировали развитие структур головного мозга. Так, в постэмбриональном онтогенезе сигналинг Wnt/ β -catenin обеспечивает стабильность ГЭБ, контролируя экспрессию белков плотных контактов (claudin-5, occludin и ZO-1), а также регулируют взаимодействие эндотелиальных клеток с перицитами [37]. Путь Notch

также регулирует межклеточные взаимодействия эндотелия и перицитов, определяя морфологию гемокapилляров и их ответ на механические стимулы [268]. В физиологических условиях сигнальный путь TGF- β обеспечивает стабилизацию сосудистой стенки, одновременно подавляя активность NF- κ B и экспрессию провоспалительных цитокинов, запуская тем самым механизмы противовоспалительной защиты [249]. Путь PI3K/Akt, активируемый под действием факторов роста, обеспечивает нейропротекцию, регуляцию энергетического обмена и антиапоптотические эффекты в клетках НВЕ [127, 211].

Энергетическая взаимосвязь между компонентами НВЕ реализуется через механизм метаболического сопряжения. Нейроны преимущественно используют аэробное окисление глюкозы, тогда как астроциты метаболизируют глюкозу до лактата, который затем транспортируется в нейроны по градиенту концентрации через белки-переносчики MCT1 и MCT2 [142]. Этот процесс, известный как лактатный шаттл «астроцит – нейрон», обеспечивает эффективное использование энергетических субстратов и предотвращает оксидативное повреждение.

Нормальная активность НВЕ обеспечивает селективный транспорт веществ через ГЭБ. Эндотелиальные клетки экспрессируют специализированные транспортеры глюкозы (GLUT1), аминокислот (LAT1) и жирных кислот (MCTs), а также системы активного выведения ксенобиотиков (P-gp, MRPs) [76, 277]. Благодаря этому ГЭБ в нормальных условиях обеспечивает стабильность биохимического состава межклеточной среды, необходимого для эффективной синаптической передачи и возбудимости нейронов. Астроциты, в свою очередь, регулируют локальные концентрации ионов K^+ и Na^+ , а также уровень внеклеточного глутамата через транспортеры EAAT1/2, предотвращая эксайтотоксичность [50].

Кроме того, в постэмбриональном периоде онтогенеза взаимодействие компонентов НВЕ обеспечивает синаптическую и структурную пластичность нервной ткани. Эндотелий и астроциты выделяют BDNF и VEGF, усиливающие рост дендритных шипиков и формирование новых синаптических контактов [241].

Микроглия участвует в так называемом «синаптическом прунинге» – избирательном устранении синапсов с низкой активностью, что повышает эффективность межнейронной коммуникации [240]. Таким образом, НВЕ в норме функционирует не только как гомеостатический барьер, но и как регулятор нейрональной гистоархитектоники, способствующий когнитивной пластичности.

По данным единичных экспериментальных исследований возрастные изменения структуры и функций НВЕ проявляются постепенным снижением ее компенсаторно-адаптационного потенциала [231]. Было показано, что с возрастом уменьшается плотность перicyтов, нарушается экспрессия белков плотных контактов и повышается проницаемость ГЭБ. Это сопровождается снижением продукции нейротрофических факторов, активацией микроглии и ослаблением нейроваскулярного сопряжения [144]. Тем не менее при сохранении сбалансированного взаимодействия компонентов НВЕ головной мозг остается способным к частичной метаболической компенсации и поддержанию функциональной целостности, однако точные механизмы регуляции компонентов НВЕ, изменяемые при старении, остаются малоизученными.

Таким образом, НВЕ в постэмбриональном периоде онтогенеза представляет собой интегрированную систему, в которой нейроны, кровеносные сосуды и глиальные клетки функционируют в тесной взаимосвязи, обеспечивая метаболическую стабильность, нейропротекцию и адаптивную пластичность головного мозга. Нарушение функций одного или нескольких компонентов этой чувствительной системы приводит к модуляции нижележащего сигналинга, модулирующего как клеточный метаболизм, так и межклеточную коммуникацию. Понимание фундаментальных закономерностей взаимодействия компонентов НВЕ на протяжении постнатального онтогенеза является необходимой предпосылкой для анализа ее дисфункции в норме (в том числе при старении) и усугубления при патологических состояниях (при нейродегенерации, нейровоспалении, цереброваскулярных заболеваниях и др.).

1.6. Взаимодействие компонентов нейроваскулярной единицы в постэмбриональном периоде при патологических состояниях

В постэмбриональном периоде онтогенеза сохранение целостности и функциональной активности НВЕ является необходимым условием стабильности работы ЦНС. Нарушения в согласованном функционировании ее компонентов лежат в основе большинства нейровоспалительных и нейродегенеративных заболеваний [195]. При патологических воздействиях эта тонко организованная система утрачивает состояние физиологического равновесия, создавая условия для развития воспалительных реакций, оксидативного стресса и эндотелиальной дисфункции, что приводит к прогрессирующей нейрональной гибели и частичному угнетению пластической функции нервной ткани.

Одним из наиболее ранних проявлений нарушения нейроваскулярного взаимодействия является дисфункция ГЭБ. Под действием провоспалительных медиаторов (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ) и реактивных форм кислорода происходит деградация белков плотных контактов (claudin-5, occludin, ZO-1), что приводит к увеличению проницаемости гемокapилляров и миграции иммунных клеток за пределы кровеносного русла [58]. Эндотелиальные клетки в этих условиях теряют полярность, изменяют экспрессию транспортных белков (GLUT1, LAT1, P-gp), участвуя в продукции провоспалительных цитокинов и усиливая локальную воспалительную реакцию [94]. Перициты, в норме поддерживающие стабильность сосудистой стенки, также подвергаются апоптозу или трансформируются в активный профиброгенный фенотип, что также усугубляет нарушение микроциркуляции [228, 235]. Кроме того, перечисленные изменения способствуют трансудации жидкости из русла кровеносных сосудов в нервную ткань с развитием отека, который, в свою очередь, способствует сдавлению гемокapилляров (особенно венул), усугублению гипоперфузии и увеличению выхода жидкости в периваскулярное пространство, замыкая порочный круг [69].

При заболеваниях, связанных с нейровоспалением (таких как рассеянный склероз, менингит, энцефалит, аутоиммунные васкулиты) микроглия и астроциты становятся центральными участниками патологического ремоделирования НВЕ. Микроглиальные клетки из состояния покоя переходят в активный M1-подобный фенотип, характеризующийся повышенной экспрессией CD68, iNOS и секретирующий цитокины IL-6, TNF- α , IL-12 [299]. Эти медиаторы усиливают активацию NF- κ B и MAPK-сигнальных путей в эндотелиальных клетках, что сопровождается усилением адгезии лейкоцитов и их миграции через стенку кровеносных сосудов [169]. Астроциты при этом претерпевают реактивную гипертрофию (глиоз), усиливая экспрессию GFAP и аквапорина-4, способствуя формированию глиального рубца [199]. Хотя эта адаптационная реакция направлена на ограничение нейровоспаления, длительная реактивность астроцитов приводит к подавлению регенераторных процессов и нарушению синаптической коммуникации в нервной ткани.

Особое значение в реализации эффектов нейроваскулярных нарушений имеют сигнальные пути NF- κ B и TGF- β , ответственные за регуляцию воспаления и ремоделирование. Активация каскада NF- κ B в микроглии, астроцитах и эндотелиальных клетках в ответ на цитокиновую стимуляцию и оксидативный стресс, индуцирует экспрессию генов провоспалительных цитокинов и молекулы адгезии (ICAM-1, VCAM-1) [201]. В случае длительной активации это способствует инициации перехода к хроническому воспалению и иммунной гибели нейронов [136]. TGF- β также выполняет двойственную роль: с одной стороны, он ограничивает острую воспалительную реакцию, а с другой – способствует развитию фиброзных изменений и утолщению базальной мембраны сосудов, нарушая их эластичность и чувствительность к факторам регуляции, синтезируемым другими компонентами НВЕ [86]. В контексте хронических нейродегенеративных заболеваний TGF- β также может участвовать в поддержании длительной активации астроцитов, индуцируя синтез внеклеточного матрикса [250].

При нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз и сосудистая деменция, НВЕ также подвергается системной перестройке. Одним из ранних признаков этих состояний является накопление патологических белков (β -амилоида, α -синуклеина или TDP-43) в эндотелии и перицитах, что нарушает межклеточные взаимодействия [95]. Кроме того, β -амилоид может связываться с рецептором RAGE на поверхности эндотелия, активируя NF- κ B и повышая экспрессию провоспалительных цитокинов [222]. В ответ на эти сигналы микроглия реагирует усилением фагоцитарной активности, а также, по некоторым данным, при хронической стимуляции теряет способность к эффективной утилизации белковых комплексов, переходя в нейротоксический фенотип [122].

В ряде экспериментальных исследований показано, что при нейродегенеративных процессах эндотелиальные клетки утрачивают чувствительность к VEGF и способность адекватно реагировать на гипоксические стимулы, что в дальнейшем приводит лишь к усилению ишемизации [162]. Кроме того, происходит нарушение баланса между экспрессией проангиогенных и антиангиогенных факторов (VEGF, Ang-1/2, PEDF), что приводит к частичной редукции микроциркуляторного русла и усугублению метаболического дефицита. При этом происходит деградация перицитов и сокращение их контактов с сосудистой стенкой, что способствует потере барьерной функции ГЭБ [60].

На основании вышесказанного можно предполагать, что астроциты являются посредниками в передаче сигналинга между нейронами и гемокapиллярами. При нейродегенеративных состояниях эти клетки теряют полярность и способность к регуляции ионного обмена [138]. Кроме того, нарушается экспрессия транспортеров глутамата EAAT1/2, что приводит к накоплению аминокислот в межклеточном пространстве и развитию эксайтотоксичности [175]. Также, в условиях гипоперфузии астроциты переходят на анаэробный метаболизм, снижая эффективность лактатного шаттла «астроцит – нейрон», тем самым усугубляя энергетический дефицит нейронов [96].

По данным ряда авторов, хроническое нейровоспаление сопровождается нарушением сигналинга между микроглией и эндотелием. В норме связь между ними осуществляется через систему CX3CL1/CX3CR1, обеспечивающую противовоспалительный контроль. При воспалении уровень CX3CL1 снижается, что приводит к избыточной активации микроглии. В ответ на это эндотелиальные клетки начинают экспрессировать MCP-1 и IL-8, усиливая рекрутинг моноцитов и нейтрофилов, облегчая их миграцию через ГЭБ и усугубляя инфильтрацию нервной ткани иммунными клетками [168].

Результатом нарушения координации взаимодействий компонентов НВЕ является замыкание порочного круга, при котором эндотелиальная дисфункция, нейровоспаление и дегенерация нейронов взаимно усиливают друг друга. Кроме того, увеличение проницаемости ГЭБ облегчает доступ токсических веществ и иммунных клеток из системного кровотока в нервную ткань, а гиперактивация микроглии и астроцитов усугубляет повреждение нейронов и эндотелиальных клеток.

Таким образом, при нейровоспалительных и нейродегенеративных заболеваниях НВЕ из интегрирующей системы трансформируется в источник взаимно усиливающих друг друга патологических сигналов. Ее дисфункция сопровождается дестабилизацией ГЭБ, угнетением ангиогенеза, утратой метаболического сопряжения и хронизацией нейровоспаления. Восстановление нормальных взаимодействий между компонентами НВЕ рассматривается как одно из наиболее перспективных направлений терапии упомянутых заболеваний.

1.7. Иммунные механизмы клеточно-тканевого ответа при ишемическом инсульте

Ишемический инсульт представляет собой одно из наиболее распространенных и социально значимых заболеваний ЦНС, характеризующееся сложным каскадом патофизиологических реакций, включающих энергетический

дефицит, апоптоз нервных клеток с развитием некроза и воспаления [154]. Современные исследования подтвердили, что иммунологические реакции играют ключевую роль в определении исхода ишемического повреждения головного мозга, регулируя баланс между процессами деструкции и репарации [124]. Так, клеточный иммунный ответ при ишемическом инсульте носит многофазный характер, включая модуляцию как врожденных, так и адаптивных механизмов, с развитием сначала острой фазы воспаления (деструктивный этап), а затем длительной фазы репарации и ремоделирования ткани как ведущих механизмов компенсации повреждения в рамках пластичности нервной ткани [124].

По данным многочисленных экспериментальных и клинических исследований острое нарушение кровообращения и развитие зоны ишемии запускает каскад клеточных и молекулярных реакций, ведущих к активации врожденного иммунитета. Наиболее ранним участником клеточно-тканевого ответа на ишемическое повреждение выступает микроглия – резидентные макрофаги, которые уже в течение нескольких минут трансформируются в активный фенотип [167]. В ответ на повреждение эти клетки претерпевают морфологическую трансформацию, сопровождающуюся индукцией экспрессии в них молекул МНС II и активацией генов, кодирующих синтез провоспалительных медиаторов, включая фактор некроза опухоли- α (TNF- α), интерлейкин-1 β (IL-1 β), интерлейкин-6 (IL-6) и др. Эти молекулы в сочетании с высокими концентрациями активных форм кислорода (в рамках оксидативного стресса) не только повышают проницаемость ГЭБ и способствуют таксису периферических иммунных клеток в зону ишемии, но и повреждают соседние нервные клетки (вторичное повреждение нейронов), что усугубляет течение ишемического инсульта и расширяет первичное ядро инфаркта за счет нейронов пенумбры [167].

Нарушение целостности ГЭБ является одним из ключевых факторов развития нейровоспаления после ишемического инсульта. Так, повышенная проницаемость ГЭБ способствует миграции лейкоцитов, моноцитов и лимфоцитов, что усиливает клеточно-тканевую ответ и запускает неспецифические механизмы

деструкции [209]. Это способствует не только утилизации фрагментов разрушенных клеток, но и формированию токсической микросреды для еще сохранившихся соседних нейронов, что не противоречит мнению других авторов [146].

По данным большинства исследований первыми клетками, мигрирующими в зону инфаркта мозга в течение первых часов, являются нейтрофилы [67]. Происходит массивное высвобождение протеолитических ферментов, включая эластазу и металлопротеиназы, что способствует деградации внеклеточного матрикса и усугубляет состояние ГЭБ [7, 134]. Тем не менее, нейтрофилы также способны к синтезу антиоксидантных ферментов и утилизации клеточного детрита, что подчеркивает их функциональную двойственность при ишемическом инсульте [245].

Интересным этапом клеточно-тканевого ответа на ишемическое повреждение является активация и миграция из сосудистого русла моноцитов, которые в нервной ткани дифференцируются в макрофаги. В зависимости от локального гомеостаза, микроокружения и концентраций цитокинов они могут трансформироваться в различные фенотипы: классически активированные макрофаги фенотипа M1, продуцирующие провоспалительные цитокины, поддерживают воспалительную реакцию и участвуют в развитии деструктивных процессов, тогда как альтернативно активированные макрофаги фенотипа M2 способствуют репарации тканей, ангиогенезу и фагоцитозу фрагментов погибших клеток [177]. Результаты недавних исследований указывают на то, что данная классификация является условной, а фенотипический спектр макрофагов в головном мозге значительно шире и динамичнее [224]. Так, миграция и функции макрофагов, а также конкретные подтипы, участвующие в различных фазах воспалительного процесса после инсульта, остаются предметом активных исследований и нуждаются в уточнении.

Особое внимание в единичных работах авторы уделяли изучению роли натуральных киллеров (NK) и NKT-клеток, которые вероятно представляют собой

регуляторное звено между компонентами врожденного и адаптивного иммунитета [83]. Известно, что НК-клетки инфильтрируют нервную ткань в первые дни после ишемии и способны потенцировать вторичную (иммунную) гибель нейронов посредством секреции неспецифических цитотоксических факторов – интерферона- γ , перфорина и гранзима В [42]. Тем не менее некоторые данные указывают на их ведущую роль в регуляции активности других участников клеточной воспалительной реакции и стимуляции ангиогенеза, что подчеркивает функциональную неоднозначность этой популяции, которая нуждается в уточнении. Аналогично, роль НКТ-клеток при ишемическом повреждении головного мозга до сих пор не имеет однозначной оценки: с одной стороны, эти клетки могут усиливать воспалительную инфильтрацию посредством секреции высоких концентраций IFN- γ , однако, также они способны к угнетению воспаления и потенцированию репарации через экспрессию противовоспалительного IL-10 [300]. Это еще раз подчеркивает их двойственную роль при ишемическом повреждении нервной ткани, подтверждая предположение о регуляторном значении их присутствия в головном мозге, однако эта теория до сих пор не была окончательно доказана и нуждается в уточнении.

В некоторых исследованиях было показано, что компоненты адаптивного иммунитета становятся участниками воспалительной реакции на более поздних стадиях ишемического повреждения. Т-лимфоциты различных субпопуляций ($CD4^+$, $CD8^+$, T_{reg} -клетки) начинают мигрировать в нервную ткань, как правило, через 2 – 5 суток после инфаркта мозга [247]. При этом $CD8^+$ цитотоксические Т-лимфоциты способны индуцировать апоптоз ишемизированных нейронов, тогда как $CD4^+$ Т-клетки участвуют в регуляции последующего течения воспалительной реакции. Особенно важную роль играют T_{reg} -лимфоциты, ответственные за ограничение воспаления и регенерацию нервных и эндотелиальных клеток посредством секреции IL-10 и TGF- β . Однако баланс между провоспалительными ($Th1$, $Th17$) и противовоспалительными ($Th2$, T_{reg}) лимфоцитами в зоне инфаркта

мозга остается неустойчивым, а его смещение, вероятно, во многом определяет исход ишемического инсульта в отдаленные сроки [20, 284].

На молекулярном уровне воспалительная реакция при ишемическом инсульте координируется несколькими ключевыми сигнальными путями. Одним из центральных механизмов является активация участников пути NF-κB, преимущественно в микроглии, астроцитах и эндотелиальных клетках в ответ на гипоксию и цитокиновую стимуляцию. Так, NF-κB регулирует экспрессию генов, ответственных за синтез провоспалительных медиаторов, молекул адгезии и ферментов эндогенной редокс-системы [234]. По некоторым данным, его модуляция потенцирует деструкцию нервной ткани на ранних сроках после ишемического инсульта, однако в отдаленной перспективе сигналинг может быть направлен на регенерацию и нейропротекцию посредством регуляторного влияния на выработку нейротрофических факторов, ответственных за стимуляцию нейрогенеза [274]. В связи с этим, пространственно-временная регуляция активности NF-κB-сигнального пути при ишемическом инсульте, включая источники его активации и клеточную специфичность, остается недостаточно изученной.

Другими авторами показана двойственная роль сигналинга TGF-β. Так, в остром периоде ишемического инсульта нижележащие эффекторы TGF-β могут ограничивать воспалительную реакцию, подавляя активацию микроглии и инфильтрирующих лимфоцитов, однако в хронической фазе экспрессия участников этого пути способствует формированию глиального рубца и фиброза, препятствующих нейрональной регенерации [189, 207]. Механизмы активации TGF-β и его влияние на баланс между нейровоспалением и репарацией компонентов нервной ткани остаются предметом активных дискуссий в научном сообществе.

Кроме того, опубликованные недавно данные указывают на тесное взаимодействие воспалительных каскадов с сигнальными путями, ответственными за нейро- и ангиогенез – в частности, Wnt/β-catenin, Notch и PI3K/Akt [36, 210]. Их

сигналинг обеспечивает сопряжение между иммунными и нейроваскулярными аспектами клеточно-тканевого ответа, определяя степень деструкции / регенерации и функционального восстановления после ишемического инсульта как факторов адаптации и пластичности нервной ткани. Напротив, их дисрегуляция может привести к хронизации нейровоспаления и прогрессирующей дегенерации структур головного мозга.

Особый акцент некоторые авторы делают на участии астроцитов в иммунных реакциях в головном мозге после ишемического инсульта. Ранее считалось, что астроциты выполняют лишь поддерживающую функцию, однако теперь исследователи все чаще заявляют об их активном участии в модуляции клеточного воспалительного ответа посредством синтеза цитокинов, хемокинов и факторов роста [266]. Так, в ответ на гипоперфузию, в астроцитах происходит усиление экспрессии GFAP, способствующего глиозу и формированию глиального рубца, направленное на ограничение клеточной воспалительной инфильтрации. Тем не менее, вероятно, это также препятствует регенерации аксонов и неоваскуляризации [267]. Более того, было доказано, что взаимодействие астроцитов с микроглией и эндотелиальными клетками определяет формирование иммунного микроклимата в ишемизированной нервной ткани, что во многом определяет исход компенсаторно-адаптационных и пластических процессов [68, 165].

По мнению большинства исследователей, в отдаленные сроки после ишемического инсульта воспалительно-деструктивный этап постепенно сменяется активацией репаративных механизмов, к которым можно отнести ангиогенез, ремиелинизацию, нейрогенез, синаптогенез и др. [139] В этот период макрофаги и микроглия трансформируются в противовоспалительный M2-фенотип, активно секретируя IL-10, IGF-1 и TGF- β , которые стимулируют формирование коллатеральной системы кровообращения и дифференцировку нейрональных предшественников в нейрогенных нишах [224]. Следует отметить, что длительная дисрегуляция воспалительной реакции в ряде случаев может приводить к хронизации нейровоспаления и прогрессированию нейродегенеративных

процессов, что, вероятно, особенно характерно для пациентов пожилого возраста, однако требует подтверждения результатами масштабных комплексных исследований.

Таким образом, иммунные механизмы при ишемическом инсульте представляют собой многокомпонентную и динамически изменяющуюся систему, включающую взаимодействие компонентов врожденного и адаптивного иммунитета, последовательную смену клеточных фенотипов и модуляцию соответствующих сигнальных каскадов. Несмотря на значительный прогресс в понимании механизмов нейровоспаления, многие аспекты – включая пространственно-временные аспекты миграции и функций отдельных популяций макрофагов, NK- и NKT-клеток, а также сигналинга NF-κB и TGF-β – остаются недостаточно изученными и требуют дальнейших экспериментальных и клинических исследований как в моделях ишемического инсульта, так и при других состояниях, связанных с нейровоспалением и нейродегенерацией. Таким образом, углубленное изучение перечисленных процессов в постнатальном онтогенезе позволит не только раскрыть фундаментальные закономерности клеточно-тканевых взаимодействий (включая раскрытие взаимосвязи между компонентами НВЕ и иммунными клетками), но и определить новые мишени для направленной иммуномодулирующей терапии в зависимости от сроков развития ишемического инсульта и возраста пациента.

1.8. Нарушение нейроваскулярных и иммунных взаимодействий при ишемическом инсульте

Авторами предложено большое количество различных классификаций ишемического инсульта, однако наиболее распространенными являются различные варианты клинических и морфологических стадий / периодов. Так, для клинических исследований популярны классификации острого ишемического инсульта (острого нарушения мозгового кровообращения, ОНМК) по времени от

начала заболевания (острейший период – первые 3 сут; острый период – до 28 сут; ранний восстановительный период – до 6 мес.; поздний восстановительный период – до 2 лет; период остаточных явлений – после 2 лет.), SSS-TOAST – по этиопатогенезу (5 патогенетических подтипов: обусловленный атеросклеротическим поражением крупных артерий (атеротромботический); обусловленный кардиогенной тромбоэмболией (кардиоэмболический); обусловленный окклюзией мелких артерий (лакунарный); обусловленный другой установленной причиной (другой установленной этиологии); обусловленный неустановленной причиной (неустановленной этиологии)), CASCADE у детей – по анатомической области (Инсульт вследствие артериопатии мелких сосудов мозга (АМС); Инсульт вследствие унилатеральной фокальной церебральной артериопатии детства (УФЦА); Инсульт вследствие билатеральной церебральной артериопатии (БЦА) детства; Инсульт вследствие аорто-цервикальной артериопатии (АЦА); Кардиоэмболический инсульт; Инсульт вследствие другой установленной или неустановленной этиологии; Мультифакториальный инсульт) и др. [18] Относительно морфологических стадий ученые до сих пор не пришли к единому консенсусу, в связи с чем, наиболее рациональной представляется классификация, используемая во многих публикациях: острая (ишемически-некротическая), подострая (воспалительно-деструктивная) и репаративная (восстановительная) стадии, каждая из которых сопровождается специфическими патоморфологическими изменениями и нейроваскулярными / иммунными взаимодействиями [65]. Тем не менее, временные границы между перечисленными стадиями условные и значительно варьируют при сравнении результатов, опубликованных ранее.

На острой (ишемически-некротической) стадии, продолжающейся, по некоторым данным, от 24 часов до 4-х суток (некоторые авторы также выделяют острейшую стадию, продолжающуюся до 12 часов), роль основного патогенетического фактора выполняет энергетический дефицит вследствие ишемии (недостаток кислорода и глюкозы для нормального метаболизма) [192].

Угнетение окислительного фосфорилирования способствует накоплению лактата, снижению внутриклеточного pH и нарушению ионного гомеостаза. В результате развивается стойкая деполяризация нейронов, сопровождающаяся массивным высвобождением глутамата и активацией NMDA-рецепторов, что приводит к притоку Ca^{2+} в клетки и запуску каскада эксайтотоксичности [27, 103]. Одновременно происходит постепенная активация микроглии и эндотелиальных клеток, накопление свободных радикалов (оксидативный стресс) и провоспалительных цитокинов (IL-1 β , TNF- α , IL-6), что сопровождается повреждением и нарушением селективной проницаемости гематоэнцефалического барьера [209]. Эндотелиальные клетки теряют структурную полярность, снижается экспрессия в них белков плотных контактов (claudin-5, occludin), способствуя увеличению проницаемости гемокapилляров и развитию отека. Кроме того, перициты могут терять связь с сосудистой стенкой и подвергаться апоптозу, что способствует усилению вазогенного отека и нарушению микроциркуляции, тем самым усугубляя трофический дефицит нейронов и нейроглии [59].

Начало воспалительно-деструктивной (подострой) стадии определяется сроками инфильтрации нервной ткани лейкоцитами и мигрирующими моноцитами, а также активацией микроглии (от 2 дней до 2 недель, чаще от 3 до 7 дней) [161]. По данным других исследований, это происходит уже через несколько часов после локального прекращения перфузии. Так, первыми в эту зону мигрируют нейтрофилы (обычно уже в течение первых 12–24 часов), высвобождающие многочисленные факторы деструкции ЭЦМ – металлопротеиназы (MMP-2, MMP-9), эластазу и миелопероксидазу, способствующие разрушению базальной мембраны сосудов и усугубляющие повреждение ГЭБ [273]. В то же время эти клетки синтезируют провоспалительные цитокины, увеличивая миграцию и инфильтрацию нервной ткани лейкоцитами и мигрирующими моноцитами, трансформирующиеся в макрофаги после выхода за пределы микроциркуляторного русла [191].

Микроглиальные клетки также приобретают активный M1-фенотип, экспрессируя CD68, iNOS и вырабатывая цитотоксические медиаторы, включая NO и супероксидный анион [152]. Дисрегуляция этих процессов способствует усугублению ишемии и потенцирует вторичное повреждение и гибель нейронов, расширение ядра инфаркта и распространение клеточного воспалительного инфильтрата в соседние структуры головного мозга.

В то же время уже на подострой стадии происходит активация механизмов репарации и восстановления, направленных на ограничение воспаления и поддержание локального гомеостаза. Недавние данные показали, что на этом этапе в зоне пенумбры активируются не только микроглиальные клетки, но и рекрутированные макрофаги альтернативного M2-фенотипа, которые продуцируют противовоспалительные и трофические факторы – TGF- β , IGF-1, IL-10, VEGF – стимулируя ангиогенез и ремоделирование нервной ткани [224]. В то же время эндотелиальные клетки экспрессируют VEGF и Ангиопоэтин-1, инициируя реактивный ангиогенез, направленный на компенсаторное восстановление перфузии преимущественно зоны пенумбры посредством формирования новых коллатеральных сетей. Этот процесс по своей механике аналогичен таковому в эмбриональном периоде развития головного мозга и сопровождается миграцией эндотелиальных клеток, формированием незрелых выростов сосудистой стенки, которые постепенно удлиняются и стабилизируются при участии перицитов и астроцитов [113].

В публикациях других авторов сроки перехода к стадии репарации (восстановления) варьируют, что вероятно связано с различиями компенсаторно-адаптационного и пластического потенциала нервной ткани. Тем не менее, большинство авторов предполагают, что репаративная стадия продолжается от 2 недель до 2 месяцев и более [161]. Механизмы ремоделирования нервной ткани преимущественно регулируются сигнальными путями NF- κ B и TGF- β , роль которых остается аналогичной таковой в периоде эмбрионального развития. На основании вышесказанного можно говорить о том, что активация NF- κ B в ранние

сроки после ишемического повреждения инициирует экспрессию провоспалительных цитокинов и молекул адгезии (ICAM-1, VCAM-1), обеспечивая рекрутинг иммунных клеток и потенцируя воспалительную реакцию (переход от острой к подострой стадии). Однако на более поздних этапах активность участников этого сигнального пути переключается на стимуляцию ангиогенеза и синтез нейротрофинов, таких как BDNF и GDNF, что способствует переходу от подострой стадии к механизмам репарации [265]. В то же время сигналинг TGF- β выполняет противовоспалительную и профиброгенную функции: нижележащие эффекторы этого каскада подавляют экспрессию провоспалительных цитокинов, регулируют активацию микроглии и стимулируют восстановление микроциркуляторного русла, однако при избыточной активации TGF- β некоторые авторы наблюдали развитие патологического глиоза и низкую нейрогенетическую активность [282].

На основании данных в специализированной научной литературе можно говорить, что процессы репарации и восстановления в головном мозге после ишемического повреждения во многом напоминают эмбриональные программы развития. Так, некоторые авторы показали, что в реактивных зонах в ответ на гипоперфузию происходит активация генов, ответственных за регуляцию ангиогенеза и нейрогенеза (VEGF, FGF2, Wnt3a, Shh, Sox2, Nestin и др.), что свидетельствует об их непосредственном участии в определении компенсаторного и пластического потенциала нервной ткани [147]. По данным экспериментальных исследований также было продемонстрировано, что в нейрогенных нишах субвентрикулярной зоны и гиппокампа инициируется пролиферация НСК, а нейробласты мигрируют в ишемически-поврежденные области, где часть из них дифференцируется в зрелые нейроны и астроциты [11]. Происходящие в то же время активация ангиогенеза и пролиферация нейроглии, регулируемые факторами роста, цитокинами и компонентами внеклеточного матрикса, обеспечивают условия для регенерации всех компонентов НВЕ и восстановления

нейроваскулярных взаимодействий в рамках реализации клеточно-тканевой пластичности нервной ткани [226].

Немногочисленные исследования показали, что астроциты, тем не менее, играют двойственную роль в процессах репарации после ишемического повреждения. С одной стороны, эти клетки формируют глиальный барьер, ограничивающий распространение воспаления и стабилизирующий стенку кровеносных сосудов; с другой – их чрезмерная активация при участии микроглии в ряде случаев приводит к формированию плотного глиального рубца, препятствующего росту аксонов, синаптогенезу и реинтеграции межнейрональных связей [165]. В то же время тесное взаимодействие микроглии и астроцитов приводит к накоплению высоких концентраций VEGF, TGF- β и ангиопоэтина-1, способствуя восстановлению целостности сосудистой стенки и селективной проницаемости ГЭБ [129]. Это еще раз подчеркивает критическую роль взаимодействия компонентов НВЕ и его регуляции, как ключевых факторов, определяющих исход ишемического инсульта в долгосрочной перспективе.

По данным других авторов микроглия также претерпевает функциональную перестройку: в первые дни после ишемического события эти клетки приобретают нейротоксический M1-фенотип, направленный на утилизацию клеточного детрита, однако впоследствии регуляторное влияние от компонентов НВЕ приводит к постепенной трансформации клеток микроглии в M2-фенотип, стимулирующий репарацию [126]. Ключевым регулятором этого перехода, вероятно, является сигналинг IL-4, IL-10 и TGF- β , при частичном участии Notch и STAT3-каскадов. Совместное тонко регулируемое накопление M2-макрофагов и микроглиальных клеток определяет не только эффективный фагоцитоз фрагментов поврежденных клеток, но и синтез ферментов эндогенной антиоксидантной защиты и факторов роста, формируя условия для ремоделирования нервной ткани и восстановления утраченных нейроваскулярных взаимодействий [102].

Так, одним из наиболее важных элементов репаративной стадии становится реорганизация нейроваскулярного сопряжения. По некоторым данным,

эндотелиальные клетки и перициты формируют новые кровеносные сосуды для обеспечения коллатерального кровообращения, в то время как нейроны, реагируя на улучшение локальной перфузии, образуют новые функциональные связи с другими нейронами и астроцитами [176]. Этот процесс регулируется модулируемым влиянием PI3K/Akt и MAPK/ERK1/2-сигналинга, ответственных за поддержание клеточной выживаемости, энергетического обмена и ангиогенеза [99, 210]. Постепенно в зонах репарации формируются новые НВЕ, которые становятся морфологической основой восстановления микроциркуляции и функциональной активности структур головного мозга в рамках реализации пластического потенциала, аналогичного таковому при эмбриональном развитии.

На основании результатов единичных исследований, можно предполагать, что характер и эффективность компенсаторно-адаптационных механизмов во многом зависят от возраста. Некоторыми авторами подтверждено, что в раннем постнатальном периоде степень ангио- и нейрогенеза наивысшая ввиду формирования большого количества функциональных межнейронных связей, что поддерживается высокой степенью пластичности микроглии и астроцитов, а также эффективным ангиогенезом [251]. По мере взросления (и особенно при старении) регенераторные механизмы ослабевают: снижается чувствительность компонентов НВЕ к факторам роста, нарушается регуляция сигналинга NF- κ B и TGF- β , а по некоторым данным нейровоспаление приобретает хронический характер (инфламмаджинг) [82]. Не исключено, что это обуславливает неполное восстановление структуры НВЕ после воздействия различных повреждающих факторов, включая ишемию.

Таким образом, ишемический инсульт сопровождается комплексным нарушением нейроваскулярных и иммунных взаимодействий, которое развивается поэтапно. Несмотря на отсроченную активацию репаративных программ, аналогичных таковым при эмбриональном развитии, их эффективность ограничивается возрастом, масштабом повреждения и дискоординацией сигнальных каскадов. Комплексное фундаментальное исследование молекулярных

механизмов, лежащих в основе этих процессов, открывает перспективы для разработки направленных стратегий нейроваскулярной и иммуномодулирующей терапии ишемического инсульта [37, 108, 159].

1.9. Заключение по обзору литературы

Проведенный анализ данных специализированной научной литературе демонстрирует общность фундаментальных механизмов эмбрионального развития головного мозга и постэмбриональных процессов реализации компенсаторно-адаптационного и пластического потенциала нервной ткани. Регуляция нейрогенеза, ангиогенеза и репарации в зрелых структурах головного мозга аналогична таковой в эмбриональном периоде. В частности, сигнальные каскады Wnt/ β -catenin, Notch, Sonic Hedgehog (Shh), VEGF, TGF- β , PI3K/Akt/mTOR определяют нейроваскулярные взаимодействия и в постнатальном онтогенезе, обеспечивая поддержание структурной целостности и функциональной адаптации нервной ткани. При этом модуляция перечисленных путей в условиях повреждения (в том числе ишемического) отражает своеобразную реактивацию эмбриональных программ роста и регенерации, по своей сути представляющую собой воспроизведение ранних этапов морфогенеза, но, вероятно, уже в условиях зрелого микроокружения и сниженной пластичности.

Головной мозг в постэмбриональном периоде сохраняет строго локализованные зоны нейрогенеза (нейрогенные ниши) – субвентрикулярную и субгранулярную области, которые в нормальных условиях обеспечивают обновление популяций нейронов и клеток нейроглии, а при патологических состояниях, вероятно, становятся основным источником новых нейронов. Эффективность перечисленных нейрогенетических процессов определяется взаимодействием между компонентами НВЕ, ключевую роль в котором играют эндотелиальные клетки и астроциты. Регуляция осуществляется сигналингом множества молекулярных факторов – VEGF, FGF2, BDNF, Ang-1, TGF- β , а также

внутриклеточных каскадов PI3K/Akt, MAPK/ERK, TGF- β /SMAD, NF κ B и др. Однако, в отличие от эмбрионального периода, в зрелом головном мозге эти процессы протекают в условиях ограниченного пролиферативного потенциала, а их эффективность значительно варьирует, что, вероятно, связано с возрастными особенностями.

Ключевую роль в патогенезе ишемического инсульта занимает дисрегуляция нейроваскулярных и иммунных взаимодействий. Компоненты НВЕ – нейроны, эндотелиальные клетки, астроциты, микроглия и перициты – формируют единую интегрированную систему, обеспечивающую метаболическую стабильность и регуляцию нейровоспаления при различных патологических состояниях. Не исключено, что возрастные особенности нейроваскулярных взаимодействий могут быть причиной обнаруженных другими авторами различий компенсаторно-адаптационного и пластического потенциала нервной ткани, что особенно актуализирует проведение новых комплексных исследований с раскрытием основных механизмов регуляции локального гомеостаза. Кроме того, практически отсутствуют убедительные сведения о возраст-ассоциированной модуляции взаимодействия компонентов НВЕ, а также о регуляторном влиянии на него нейротрофического, проангиогенного, про- и противовоспалительного сигналинга, а также нижележащих эффекторов молекулярных каскадов PI3K/Akt, SMAD/TGF- β , NF- κ B и др. Иммунные аспекты клеточно-тканевого ответа на ишемическое повреждение также нуждаются в уточнении. Несмотря на немногочисленные данные о распределении клеточного воспалительного инфильтрата и регуляторном влиянии сигналинга TGF- β и NF- κ B, малоизученными остаются фенотипические характеристики иммунных клеток, их пространственно-временное распределение и регуляторное влияние на компоненты НВЕ в рамках реализации клеточно-тканевого ответа при ишемическом повреждении.

Несмотря на значительный прогресс в изучении отдельных аспектов патогенеза инсульта, комплексные исследования, направленные на интеграцию данных о нейроваскулярных и иммунных взаимодействиях в контексте возрастных

изменений, остаются фрагментарными и дискутабельными. Кроме того, большинство исследований на сегодняшний день проведены в экспериментальных условиях, в связи с чем новые данные, полученные на образцах нервной ткани человека, представляются особенно ценными и интересными.

На основании данных в мировой специализированной литературе и собственных наблюдений, интересным представляется проведение дальнейших исследований в этой области с использованием комплекса современных методов биологии развития. Сочетание маркеров нейрогенеза (NeuN, NSE, caspase-3), эндотелиальных и проангиогенных факторов (CD31, CD105, VEGF-A, TGF- β), различных фенотипов иммунных клеток (CD68, CD163, CD3, CD45, CD56), а также участников сигнальных путей PI3K/Akt, TGF- β /SMAD, NF- κ B позволит впервые комплексно охарактеризовать фундаментальные закономерности возрастной модуляции нейроваскулярных и иммунных взаимодействий в норме и при ишемическом повреждении.

Изучение механизмов взаимодействия компонентов НВЕ и регулирующих их молекулярных сигнальных систем, позволит уточнить ключевые звенья патогенеза ишемического повреждения, объяснить низкую трансляционную эффективность ряда нейропротекторных стратегий, а также заложить основу для разработки персонафицированных, возраст-ориентированных подходов к нейропротекции и реабилитации нервной ткани при различных нейродегенеративных и нейровоспалительных состояниях. Перечисленные положения определяют научную значимость выбранного направления, а проведение подобных комплексных исследований позволяет уточнить знания о фундаментальных процессах биологии развития головного мозга.

Таким образом, необходимо проведение исследования возраст-ассоциированных особенностей реализации фундаментальных механизмов нейрогенеза, ангиогенеза, клеточно-тканевого ответа в норме и при ишемическом инсульте является актуальной, перспективной и малоизученной областью современной биологии развития и нейробиологии.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Диссертационное исследование проведено на базе федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет).

2.1. Дизайн исследования

Проведенное исследование является ретроспективным, клинические данные пациентов проанализированы на основании медицинской документации (цифровых историй болезни и протоколов патоморфологического исследования). Комплекс морфологических, молекулярно-биологических и молекулярно-генетических методов проведен на архивном аутопсийном материале – парафиновые блоки фрагментов лобной доли коры головного мозга. В соответствии с дизайном исследования и возрастной классификацией Всемирной организации здравоохранения, пациенты ($n = 184$), были распределены на группы и подгруппы следующим образом:

Группа I ($n = 154$) – аутопсийный материал лобной доли коры головного мозга пациентов с верифицированным ишемическим инсультом, разделенные по возрастам:

- Подгруппа I ($n = 38$) – пациенты молодого возраста (18 – 44 лет);
- Подгруппа II ($n = 51$) – пациенты среднего возраста (45 – 59 лет);
- Подгруппа III ($n = 65$) – пациенты пожилого возраста (60 – 74 лет).

Группа II ($n = 30$) – пациенты с условно интактной корой головного мозга без признаков ишемического повреждения (для контрольных сравнений), разделенные по возрастам:

- Подгруппа I (n = 10) – пациенты молодого возраста (18 – 44 лет);
- Подгруппа II (n = 10) – пациенты среднего возраста (45 – 59 лет);
- Подгруппа III (n = 10) – пациенты пожилого возраста (60 – 74 лет).

Критерии включения в группу I:

1. Подтвержденный диагноз МКБ-10: I63.3, I63.4 Инфаркт мозга с поражением лобной доли коры головного мозга (в бассейне передней и/или средней мозговых артерий), установленный прижизненно (клинико-анамнестически и / или методами нейровизуализации: КТ / МРТ) и / или верифицированный патологоанатомически при аутопсии.

2. Гистологически верифицированный инфаркт мозга (некроз) в лобной доле коры головного мозга (односторонний / двусторонний).

3. Документально подтвержденная или высоковероятная кардиоэмболическая и/или атеротромботическая этиология ишемического инсульта в соответствии с классификацией TOAST. Сопутствующей отягощенной соматической патологией является: фибрилляция предсердий, стеноз/окклюзия артерий сердца, эндокардит, стеноз/окклюзия экстра- / интракраниальных артерий, в том числе значимая атеросклеротическая окклюзия.

4. Инфаркт мозга (ишемический инсульт) острейшего (до 3 суток) или начального этапа острого периода, подтвержденный при аутопсии не позднее чем через 7 суток с установленного / предполагаемого начала заболевания (как в стационарных условиях, так и вне стационара).

5. Пациенты с инфарктом мозга (ишемическим инсультом) молодого (18 – 44 лет), среднего (45 – 59 лет) и пожилого (60 – 74 лет) возрастов.

6. Пациенты, чья смерть наступила в условиях оказания стационарной помощи, получали стандартный объем реперфузионной (по клиническим показаниям), нейропротекторной и симптоматической терапии, согласно действующим Клиническим рекомендациям «Ишемический инсульт и

транзиторная ишемическая атака» (2024 г.), разработанным Всероссийским обществом неврологов и др. [18]

7. Получено информированное добровольное согласие родственников пациентов на патологоанатомическое исследование и использование материала в научных целях.

Критерии включения в группу II: травма, несовместимая с жизнью (травматическое повреждение ствола головного мозга, массивное кровотечение), разрыв аневризмы сердца или аорты, разрыв варикозно расширенных вен пищевода, летальные нарушения ритма сердца или электротравма без ишемического поражения корковых структур головного мозга.

Критерии исключения для обеих групп:

1. Нарушение мозгового кровообращения по геморрагическому типу любой локализации и этиологии, черепно-мозговая травма, инфаркт мозга без вовлечения лобной доли коры головного мозга (в стволе мозга, мозжечке, подкорковой локализации), отсутствие клинической или патологоанатомической верификации инфаркта мозга.

2. Смешанный генез (по TOAST – криптогенный тип) или неverified этиология заболевания, а также сочетание кардиоэмболии с лакунарным или иным редким типом генеза, не позволяющее выделить доминирующий механизм.

3. Наличие выраженной сопутствующей патологии ЦНС, искажающей морфологическую картину: болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, мультисистемная атрофия, рассеянный склероз и др., новообразования головного мозга (вторичные / первичные), травматическое повреждение головного мозга в анамнезе.

4. Активный гематологический, аутоиммунный и / или опухолевый процесс, в том числе сопровождающийся дисрегуляцией иммунного статуса, нарушениями коагуляции крови.

5. Менингит, энцефалит, другое острое инфекционное заболевание (в том числе синдром системной воспалительной реакции, сепсис / септический шок) бактериальной и / или вирусной этиологии, активный вирусный гепатит В и / или С, сифилис, инфицирование вирусом иммунодефицита человека.

6. Отягощенный токсико-наркологический анамнез, злоупотребление алкоголем, энцефалопатия алкогольного генеза.

7. Повреждение аутопсийного материала – аутолиз тканей, недостаточный объем материала, ошибки забора, фиксации и / или хранения материала.

Соответствие исследования этическим правилам и нормам.

Архивный аутопсийный материал для исследования получен в Централизованном патологоанатомическом отделении Института клинической морфологии и цифровой патологии (выражаем благодарность директору – д.м.н., проф. Т.А. Демуре) ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Исследование одобрено на заседании Локального этического комитета ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (протокол № 13-25 от 05.06.2025 г.).

2.2. Методы исследования

В ходе реализации научной работы выполнен анализ медицинской документации пациентов с ишемическим инсультом (группа I) и пациентов с условно интактной корой головного мозга (группа II), распределенных по возрастным подгруппам в соответствии с дизайном исследования. Использован следующий комплекс методов исследования:

- 1) гистологический (окрашивание гематоксилином и эозином, окрашивание крезилвиолетом по Нисслию);
- 2) иммуногистохимический (с антителами к CD31 и VEGF-A);
- 3) мультиплексная иммунофлуоресцентная микроскопия (с антителами к CD3, CD31, CD45, CD56, CD68, CD105, CD163, TGF- β , NeuN, NSE, Caspase 3, Vimentin);
- 4) молекулярно-генетический анализ (экспрессия мРНК цитокинов TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- γ ; участников сигнальных путей TGF- β , NF κ B, PI3K/Akt/mTOR и PI3K/Akt/FOXO3a);
- 5) морфометрический анализ полученных цифровых изображений и гистологических / флуоресцентных сканов;
- 6) статистическая обработка полученных данных.

2.2.1. Гистологическое исследование

Для гистологического исследования с каждого из фрагментов лобной доли коры головного мозга, заключенных в парафиновые блоки, на автоматическом ротационном микротоме (Leica RM 2255, Германия) готовили по 5 серийных срезов толщиной около 3 мкм. Затем проводили депарафинизацию и дегидратацию, а для классической дифференциальной двойной идентификации окрашивали гематоксилином Майера и эозином в соответствии со стандартной методикой. Приготовленные гистологические микропрепараты исследовали под светооптическим микроскопом Leica DM2000 (Leica Microsystems, Германия) с использованием программного пакета Leica Application Suite версии 4.9.0.

Окрашивание по Нисслию проводили для оценки морфологии и распределения нейронов в коре головного мозга. Для этого по одному срезу с каждого парафинового блока депарафинизировали и дегидратировали через нисходящую серию этанола до дистиллированной воды, после чего окрашивали в водном растворе крезилвиолета в течение 5-10 минут при комнатной температуре.

По завершении окрашивания срезы инкубировали в 96% этаноле до достижения оптимального контраста, промывали в дистиллированной воде, дегидратировали через восходящую серию этанола, просветляли в ксилоле и заключали в канадский бальзам. Подсчет нейронов в группе I отдельно для зон ядра инфаркта, пенумбры и интактной коры головного мозга, а также в группе II не менее чем в пяти случайных полях зрения осуществляли при увеличении $\times 400$ светооптического микроскопа Leica DM2000 (Leica Microsystems, Германия) с использованием программного пакета Leica Application Suite версии 4.9.0., с последующим расчетом среднего числа нейронов в одном поле зрения.

2.2.2. Иммуногистохимическое исследование

Для иммуногистохимического анализа ангиогенеза в коре головного мозга в качестве первичных использовали моноклональные антитела к CD31 (клон JC/70A, Thermo Fisher Scientific, США) и поликлональные антитела к VEGF-A (Sigma-Aldrich, Missouri, США). Для определения вторичных антител использовали универсальную двухкомпонентную систему детекции HiDef Detection™ HRP Polymer system, (Cell Marque, США), анти-IGG мыши/кролика, пероксидаза хрена (HRP) и субстрат DAB. Ядра клеток докрашивали гематоксилином Майера. Иммуномечение антителами к CD31 применяли для облегчения детекции и подсчета количества кровеносных сосудов не менее чем в 5 случайно выбранных полях зрения светооптического микроскопа Leica DM2000 (Leica Microsystems, Германия) при увеличении $\times 400$ (в группе I – отдельно для зон ядра инфаркта и пенумбры). Подсчет числа VEGF-иммунопозитивных нейронов и эндотелиальных клеток в зонах ядра инфаркта и пенумбры проводили в 5 случайно отобранных полях зрения при увеличении $\times 400$, полученные количественные данные выражали в % от общего числа клеток в поле зрения светооптического микроскопа Leica DM2000 (Leica Microsystems, Германия).

2.2.3. Мультиплексное иммунофлуоресцентное исследование

Исследование выполняли в Научно-образовательном ресурсном центре инновационных технологий иммунофенотипирования, цифрового пространственного профилирования и ультраструктурного анализа (молекулярной морфологии) (выражаем благодарность директору – д.м.н., проф. Д.А. Атякшину) федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы.

Для проведения мультиплексного иммунофлуоресцентного исследования использовали парафиновые срезы фрагментов коры головного мозга после депарафинизации и регидратации по стандартному протоколу. Демаскировку антигенов проводили в буферном растворе Tris-EDTA (pH 9,0) при микроволновом нагревании в течение 15 минут. При необходимости повторного восстановления эпитопов в рамках последовательного мультиплексного окрашивания, применяли аналогичную буферную систему при температуре 95 °C в течение 30 мин с использованием систем нагрева EZ–Retriever® System MW015-IR (BioGenex, Fremont, Калифорния, США). После демаскировки блокировали эндогенную пероксидазную активность инкубацией с соответствующим блокирующим раствором (Акоya Biosciences Peroxidase Blocking Reagent; Akoya Biosciences, Марльборо, США). Мультиплексное окрашивание выполняли с использованием набора Opal™ 7-Color Fluorescence Immunohistochemistry Kit (Акоya Biosciences, Марльборо, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

Окрашивание на маркеры NeuN, NSE и каспаза 3.

Первый цикл окрашивания включал инкубацию с первичными антителами к NeuN (клон EPR12763, Abcam, США; 1:500) при комнатной температуре в течение 60 минут. После промывки препараты инкубировали с полимером HRP Ms+Rb в течение 10 минут, затем – с флуорохромом Opal 647 на 10 минут. После детекции проводили элиминацию связанных комплексов антител и флуорохрома при

повторной микроволновой обработке в буферном растворе Tris-EDTA (pH 9,0) в рамках подготовки к последующим циклам окрашивания.

Аналогичным образом повторяли последующие циклы окрашивания с использованием первичных антител к NSE (клон EPR12483, Abcam, США; 1:500) и Caspase 3 (клон 9H19L2, Thermo Fisher Scientific, США; 1:500). В качестве флуоресцирующих меток использовали флуорохромы Opal 488 (для NSE) и Opal 540 (для Caspase 3), последовательно нанося каждый из них в течение 10 минут после инкубации с полимером HRP Ms+Rb. На заключительном этапе срезы контрастировали ядерным красителем DAPI в течение 5 минут и заключали в среду ProLong™ Diamond Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific, США).

При морфометрическом анализе количество иммуномеченных нейронов определяли отдельно для каждого из маркеров (NeuN, NSE и caspase 3) в поле зрения конфокального микроскопа при увеличении $\times 400$. На основании полученных средних значений рассчитывали процент клеток Caspase 3⁺ среди NeuN⁺ нейронов по разработанному индексу (соотношению): $\text{Caspase 3} / \text{NeuN} \times 100$ (%), что отражает долю погибающих нейронов (в которых инициирован апоптотический каскад) среди всех зрелых NeuN⁺ нейронов.

Окрашивание на маркеры CD45, CD56 и CD3

Первый цикл окрашивания выполняли после депарафинизации и регидратации срезов, а также демаскировки антигенов в буфере Tris-EDTA (pH 9,0) в микроволновой печи в течение 15 минут. Срезы инкубировали с первичными антителами к CD45 (клон HI30, Thermo Fisher Scientific, США; 1:500) в течение 60 минут. После промывки препараты инкубировали с HRP-полимером Ms+Rb в течение 10 минут, затем – с флуорохромом Opal 647 в течение 10 минут. Для удаления комплексов антител и флуорохрома осуществляли повторное тепловое воздействие в буферной среде Tris-EDTA (pH 9,0) по описанной выше методике в рамках подготовки к последующим циклам окрашивания.

При последующих циклах окрашивания аналогичную процедуру повторяли с использованием антител к CD56 (клон 56C04, Thermo Fisher Scientific, США;

1:500) и CD3 (клон ОКТ3, Thermo Fisher Scientific, США; 1:500). После каждой инкубации с соответствующими первичными антителами препараты последовательно обрабатывали HRP-полимером Ms+Rb (10 минут), а затем соответствующим флуорохромом Opal: Opal 488 (для CD56) и Opal 540 (для CD3) по 10 минут на каждый цикл. После завершения всех стадий мультиплексного окрашивания выполняли контрастное докрасивание ядер DAPI в течение 5 минут, а полученные препараты заключали в среду ProLong™ Diamond Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific, США).

При морфометрическом анализе в каждом микропрепарате определяли количество НК-клеток (фенотип $CD45^+CD56^+CD3^-$), НКТ-клеток ($CD45^+CD56^+CD3^+$) и Т-лимфоцитов ($CD45^+CD56^-CD3^+$). Клетки подсчитывали в пяти произвольно выбранных полях зрения при увеличении $\times 400$. Рассчитывали среднее количество клеток на $1 \text{ мм}^2 \pm$ стандартное отклонение (SD). Дополнительно определяли соотношение $CD45^+CD56^+CD3^+ / CD45^+CD56^+CD3^-$ для оценки доли цитотоксического НКТ-иммунофенотипа в составе общей популяции НК-клеток.

Окрашивание на маркеры CD105, TGF- β и CD31

Первый цикл окрашивания включал инкубацию с первичными антителами к TGF- β (клон EPR21143, Abcam, США; 1:500) при комнатной температуре в течение 60 минут. После промывки препараты инкубировали с полимером HRP Ms+Rb в течение 10 минут, затем – с флуорохромом Opal 647 на 10 минут. После детекции проводили элиминацию связанных комплексов антител и флуорохрома при повторной микроволновой обработке в буферном растворе Tris-EDTA (pH 9,0) в рамках подготовки к последующим циклам окрашивания.

Аналогичным образом повторяли последующие циклы окрашивания с использованием первичных антител к CD105 (клон 3A9, Abcam, США; 1:500) и CD31 (клон JC/70A, Thermo Fisher Scientific, США; 1:500). В качестве флуоресцирующих меток использовали флуорохромы Opal 488 (для CD105) и Opal 540 (для CD31), последовательно нанося каждый из них в течение 10 минут после

инкубации с полимером HRP Ms+Rb. На заключительном этапе срезы контрастировали ядерным красителем DAPI в течение 5 минут и заключали в среду ProLong™ Diamond Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific, США).

При морфометрическом анализе в каждом микропрепарате подсчитывали количество CD105-, TGF-β- и CD31-позитивных эндотелиальных клеток в пяти произвольно выбранных полях зрения при увеличении ×400, рассчитывали среднее количество клеток на 1 мм² ± стандартное отклонение (SD). Дополнительно проводили расчет доли активированных эндотелиоцитов (CD105⁺) среди всех эндотелиальных клеток (CD31⁺) по формуле: $N_{CD105+} / N_{CD31+} \times 100$ (%).

Окрашивание на маркеры CD68, CD163, TGF-β и Vimentin

Первый цикл окрашивания выполняли после депарафинизации и регидратации срезов, а также демаскировки антигенов в буфере Tris-EDTA (pH 9,0) в микроволновой печи в течение 15 минут. Срезы инкубировали с первичными антителами к CD68 (клон KP1, Abcam, США; 1:500) в течение 60 минут. После промывки препараты инкубировали с HRP-полимером Ms+Rb в течение 10 минут, затем – с флуорохромом Opal 647 в течение 10 минут. Для удаления комплексов антител и флуорохрома осуществляли повторное тепловое воздействие в буферной среде Tris-EDTA (pH 9,0) по описанной выше методике в рамках подготовки к последующим циклам окрашивания.

При последующих циклах окрашивания аналогичную процедуру повторяли с использованием антител к Vimentin (клон EPR3776, Abcam, США; 1:500), TGF-β (клон EPR21143, Abcam, США; 1:500) и CD163 (клон EPR19518, Abcam, США; 1:500). После каждой инкубации с соответствующими первичными антителами препараты последовательно обрабатывали HRP-полимером Ms+Rb (10 минут), а затем соответствующим флуорохромом Opal: Opal 488 (для Vimentin), Opal 540 (для TGF-β) и Opal 780 (для CD163) по 10 минут на каждый цикл. После завершения всех стадий мультиплексного окрашивания выполняли контрастное докрасивание ядер DAPI в течение 5 минут, а полученные препараты заключали в среду ProLong™ Diamond Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific, США).

При морфометрическом анализе в каждом микропрепарате подсчитывали количество CD68-, CD163-, TGF- β - и Vimentin-позитивных клеток в пяти произвольно выбранных полях зрения при увеличении $\times 400$, рассчитывали среднее количество клеток на $1 \text{ мм}^2 \pm$ стандартное отклонение (SD). Дополнительно проводили расчет доли M2 макрофагов ($\text{CD68}^+\text{CD163}^+$) среди всех макрофагов (CD68^+) по формуле: $N_{\text{CD163}^+} / N_{\text{CD68}^+} \times 100 (\%)$.

Визуализация и программное обеспечение

Для визуализации всех полученных иммунных меток и проведения количественного анализа использовали автоматизированную систему мультиспектральной визуализации Vectra® Polaris Automated Quantitative Pathology Imaging System (Akoya Biosciences, Марльборо, США) при увеличении $20\times$ с регистрацией изображений в нескольких спектральных диапазонах. Для получения сканов флуоресцентно окрашенных препаратов использовали микроскоп Olympus BX43 (Olympus Corporation, Токио, Япония) и флуоресцентный сканер KF-FL-005 (Ningbo, ZheJiang, Китай), а также программное обеспечение для количественного анализа Mantra 2 Quantitative Pathology Imaging System (Akoya Biosciences, Марльборо, США).

Для высокодетального микроскопического анализа применяли комплекс ZEISS Axio Imager.Z2 (Carl Zeiss Vision, Йена, Германия), оснащенный объективами Zeiss alpha Plan-Apochromat $100\times/1.46 \text{ Oil DIC M27}$ и Zeiss Plan-Apochromat $150\times/1.35 \text{ Glyc DIC Corr M27}$, а также цифровыми камерами ZEISS AxioCam 712 color и ZEISS AxioCam 712 mono (Carl Zeiss Vision, Йена, Германия).

Обработку изображений и последующий количественный анализ выполняли в программной среде inForm® Image Analysis Software (Akoya Biosciences, Марльборо, США), а также в программных пакетах Zen 3.0 Light Microscopy Software Package, ZEN Module Bundle Intellesis & Analysis for Light Microscopy и ZEN Module Z-Stack Hardware (Carl Zeiss Vision, Йена, Германия).

Для морфометрических измерений, детекции клеточных популяций и систематического анализа распределения таргетных белков использовали программное обеспечение QuPath v0.5.1.

2.2.4. Молекулярно-генетический анализ

Для количественной оценки уровни экспрессии мРНК провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-6, TNF- α), противовоспалительного цитокина IL-10, интерферона- γ , а также участников сигнальных путей TGF- β (SMAD2, SMAD3, MMP2, MMP9), NF κ B (RELA/p65), PI3K/Akt/mTOR и PI3K/Akt/FOXO3a (*PIK3CA*, *AKT2*, *MTOR*, *FOXO3A*) проводили полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени (qRT-PCR). Для этого FFPE-образцы ткани коры головного мозга предварительно гомогенизировали в соответствии со стандартным протоколом. Выделение общей РНК осуществляли при помощи набора RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN, Нидерланды). Синтез комплементарной ДНК (кДНК) проводили при помощи коммерческого набора SuperScript™ VILO™ Master Mix (Invitrogen, США) согласно инструкции производителя. Полученные образцы кДНК использовали для проведения qRT-PCR с применением набора ABsolute™ Blue QPCR Mix (Thermo Fisher Scientific, США) с детекцией SYBR Green I. Амплификацию осуществляли на системе StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США) в соответствии с инструкциями производителя. Для анализа данных использовали метод сравнительного порогового цикла (Δ Ct), а относительные уровни экспрессии рассчитывали в соответствии с общепринятым протоколом нормализации. В качестве референсного «гена домашнего контроля» использовали β -актин. Пары праймеров для анализируемых генов подбирали на основании данных в специализированной научной литературе и общедоступных нуклеотидных последовательностей ДНК и мРНК, представленных в базах данных NCBI, с использованием инструмента Primer-BLAST. Последовательности праймеров представлены в Таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Прямые и обратные последовательности праймеров, использованные при проведении qRT-PCR (специфичность – человек)

Ген	Прямой праймер (5'→3')	Обратный праймер (5'→3')
<i>IL-1β</i>	AGCTACGAATCTCCGACCAC	CGTTATCCCATGTGTCTGAAGAA
<i>IL-6</i>	ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG	CCATCTTTGGAAGGTTTCAGGTG
<i>TNFα</i>	CCTCTCTСТААТCAGCCCTCTG	GAGGACCTGGGAGTAGATGAG
<i>IL-10</i>	TCTCCGAGATGCCTTCAGCAGA	TCAGACAAGGCTTGGCAACCCA
<i>IFNG</i>	GAGTGTGGAGACCATCAAGGAAG	TGCTTTGCGTTGGACATTCAAGTC
<i>PIK3CA</i>	GAAGCACCTGAATAGGCAAGTCG	GAGCATCCATGAAATCTGGTTCGC
<i>AKT2</i>	CATCCTCATGGAAGAGATCCGC	GAGGAAGAACCTGTGCTCCATG
<i>MTOR</i>	AGCATCGGATGCTTAGGAGTGG	CAGCCAGTCATCTTTGGAGACC
<i>FOXO3A</i>	TCTACGAGTGGATGGTGC GTTG	CTCTTGCCAGTTCCCTCATTCTG
<i>RELA (p65)</i>	TGAACCGAAACTCTGGCAGCTG	CATCAGCTTGCGAAAAGGAGCC
<i>MMP-2</i>	AGCGAGTGGATGCCGCCTTTAA	CATTCCAGGCATCTGCGATGAG
<i>MMP-9</i>	CTGGTGCCTACCACCTCGAAC	GTGCCGGATGCCATTCACGTCGTC
<i>SMAD2</i>	GGGTTTTGAAGCCGTCTATCAGC	CCAACCACTGTAGAGGTCCATTC
<i>SMAD3</i>	TGAGGCTGTCTACCAGTTGACC	GTGAGGACCTTGTCAAGCCACT
<i>β-актин</i>	CATGTACGTTGCTATCCAGGC	CTCCTTAATGTCACGCACGAT

2.2.5. Статистическая обработка результатов исследования

В исследовании применяли общепринятые методы статистической оценки достоверности различий, широко используемые в медицинских исследованиях. Полученные данные были систематизированы и внесены в электронные таблицы Microsoft Excel, на основе которых сформированы базы данных, включающие клинические характеристики пациентов и результаты проведенного комплекса исследований в соответствии с дизайном работы.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программного пакета TIBCO Statistica версии 14.0.1 (TIBCO Software Inc., USA). Распределение количественных переменных оценивали с использованием критерия Шапиро-Уилка. Гомогенность дисперсий проверяли

критерием Левена. При нормальном распределении и равенстве дисперсий для сравнения двух групп применяли двусторонний t-критерий Стьюдента; для сравнения трех и более независимых групп использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с апостериорным тестом Тьюки. При распределении данных, отличном от нормального, применяли критерий Краскела-Уоллиса с post-hoc критерием Данна с поправкой на множественные сравнения. Для категориальных переменных использовали χ^2 -критерий Пирсона при соблюдении условий применимости; при ожидаемых частотах <5 применяли точный критерий Фишера.

При анализе клинических данных пациентов для всех категориальных факторов риска рассчитывали отношение шансов (OR) с 95% доверительным интервалом (ДИ), что позволяет провести возраст-стратифицированное сравнение (пожилые и молодые; средние и молодые). Для количественных переменных также вычисляли стандартизированные разности средних (SMD), отражающие степень межгрупповых различий. Для визуализации профиля факторов риска построены радиальные диаграммы (z-оценки), характеризующие отклонения показателей каждой возрастной группы от средних значений совокупной выборки. Для выявления независимых предикторов проводили многофакторный анализ с использованием логистической регрессии и модели пропорциональных рисков Кокса.

В исследованиях морфологического блока для парных сравнений использовали U-тест Манна–Уитни с поправкой Бонферрони. Данные с нормальным распределением представляли в виде среднего \pm стандартного отклонения (SD); данные с ненормальным распределением – в виде медианы и межквартильного размаха (IQR). Статистически значимыми считали различия при $p \leq 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящей главе представлен сравнительный анализ коры головного мозга пациентов разных периодов постнатального онтогенеза как в норме, так и при ишемическом повреждении. Клиническая характеристика выборки демонстрирует высокую степень ее однородности в различных возрастных группах, а также показывает неразрывную взаимосвязь процессов старения с накоплением сопутствующей коморбидной патологии.

Помимо этого, особый акцент в проведенном исследовании сделан на определении ключевых возраст-ассоциированных морфологических изменений условно интактного головного мозга: ослаблении взаимодействия между компонентами нейроваскулярной единицы, угнетении механизмов нейрогенеза, ангиогенеза и редукции пластического потенциала нервной ткани при старении.

В этой главе описываются компенсаторно-адаптационные и пластические механизмы, заложенные еще при внутриутробном развитии, которые сохраняют свою роль и в постнатальном онтогенезе, сложная система регуляции этих программ претерпевает значительную модуляцию по мере старения. В представленных ниже результатах приводится комплексная характеристика нейрогенеза и ангиогенеза, а также определение роли иммунных клеток в реализации компенсаторного, репаративного и пластического потенциала нервной ткани как в нормальных условиях, так и при ишемическом повреждении, в зависимости от периода постнатального онтогенеза. Нарушение локальной регуляции взаимодействий между компонентами нейроваскулярной единицы, заложенных на эмбриональном этапе развития нервной системы, предрасполагает к более тяжелому течению ишемического инсульта в старших возрастных группах.

3.1. Клиническая характеристика пациентов

3.1.1. Группа I: пациенты с верифицированным ишемическим инсультом

В группу пациентов с ишемическим инсультом были включены 154 пациента с верифицированным инфарктом головного мозга молодого ($n = 38$; средний возраст составил $34,8 \pm 4,2$ года), среднего ($n = 51$; средний возраст составил $51,1 \pm 4,8$ года) и пожилого ($n = 65$; средний возраст составил $69,3 \pm 5,4$ года) возрастов ($p < 0,0001$). Во всех возрастных группах преобладала доля пациентов мужского пола (78,9 %, 66,7 % и 72,3 %; $p = 0,315$) (Таблица 3.1).

Среди пациентов с ишемическим инсультом в разных возрастных группах обнаружили неравномерное распределение некоторых факторов риска и данных анамнеза жизни. Так, частота встречаемости курения была сопоставимой во всех группах (55,3 % – 58,5 %; $p = 0,952$). Артериальной гипертензией страдали чаще пожилые (98,5 %) и средневозрастные (94,1 %) пациенты по сравнению с молодыми (89,5 %), однако статистически значимыми эти наблюдения не являлись ($p = 0,135$). Напротив, частота гиподинамии, предшествующей заболеванию, значимо возрастала по мере старения: 11,6 % у молодых, 33,3 % у средних, 84,6 % у пожилых ($p < 0,0001$). Также значительно увеличивалась доля пациентов с гиперлипидемией – от 57,9 % среди молодых до 95,4 % у пожилых ($p < 0,0001$) (Таблица 3.1).

Среди сопутствующих / предрасполагающих заболеваний частота кардиомиопатий, пороков сердца и фибрилляции предсердий была выше у молодых (76,3 %), чем у пациентов среднего (45,1 %) и пожилого возраста (41,5 %) при высокой степени статистической значимости ($p = 0,0017$). Напротив, частота тромботических осложнений в анамнезе (ТЭЛА / ТГВНК) увеличивалась с возрастом: 2,6 % → 9,8 % → 29,2 % ($p = 0,0006$). ИБС чаще выявляли у пациентов среднего (54,9 %) и пожилого (53,8 %) возрастов по сравнению с молодыми (21,1 %; $p = 0,0017$). Распространенность ХОБЛ (отсутствовала у молодых пациентов, в

среднем возрасте – 33,3 %, в пожилом – 61,5 %; $p < 0,0001$) и хронических анемических состояний (23,7 % → 39,2 % → 49,2 %; $p = 0,038$) также возрастала с возрастом. IgG к SARS-CoV-2 чаще обнаруживали у молодых (86,8 %), чем у пожилых пациентов (67,7 %; $p = 0,047$). Признаки нейродегенерации и дементных состояний отсутствовали в молодом возрасте, но их выявили в 25,5 % случаев среди пациентов средней возрастной группы и в 38,5 % у пожилых ($p < 0,0001$). Постоянный прием лекарственных препаратов по данным анамнеза также различался в зависимости от возрастной группы: терапию антикоагулянтами чаще получали пациенты молодого возраста (55,3 %), антиагрегантами – пациенты среднего (49,0 %) и пожилого (47,7 %) возрастов, а антифибринолитиками пользовались единичные молодые женщины (7,9 %) при полном отсутствии их приема у пожилых ($p < 0,05$) (Таблица 3.1).

В рамках оценки характеристики ишемического инсульта были проанализированы данные анамнеза заболевания. Так, тяжелая физическая работа чаще предшествовала началу симптомов ишемического инсульта в когортах молодого и среднего возрастов (31,6 % и 29,4 %, соответственно) по сравнению с пожилыми пациентами (10,8 %; $p = 0,0148$), тогда как длительную иммобилизацию отмечали преимущественно у пациентов старше 60 лет (81,5 %; $p < 0,0001$).

Всем пациентам группы I был выставлен диагноз МКБ-10: I63.3 (Инфаркт мозга, вызванный тромбозом мозговых артерий) или МКБ-10: I63.4 (Инфаркт мозга, вызванный эмболией мозговых артерий), подтвержденный результатами патологоанатомического исследования в соответствии с критериями включения. Также по данным протоколов патологоанатомического исследования всем пациентам был выставлен диагноз МКБ-10: G93.6 (Отек мозга) как непосредственная причина смерти. Значимые различия выявили только для диагноза МКБ-10: I67.8 (Другие уточненные поражения сосудов мозга), выставляемого при диагностике хронической ишемии головного мозга, частота встречаемости которой существенно увеличивалась с возрастом (2,6 % → 25,5 % → 87,7 %; $p < 0,0001$). Кроме того, доля впервые установленного диагноза

ишемического инсульта была высокой во всех возрастных группах без существенной статистической значимости обнаруженных различий (97,4 %, 94,1 %, 90,8 %; $p = 0,413$) (Таблица 3.1).

Клиническая симптоматика у пациентов с ишемическим инсультом значительно различалась в зависимости от возраста: контралатеральный гемипарез отмечали чаще в средних и пожилых группах (74,5 % и 80,0 %, соответственно) по сравнению с молодыми (26,3 %; $p < 0,0001$). Аналогичные различия наблюдали для гемигипестезии ($p < 0,0001$) и афазии ($p < 0,0001$). Напротив, головокружение и головная боль в дебюте клинической симптоматики чаще манифестировали в группе молодых пациентов (71,0 % и 50,0 %; $p < 0,05$) (Таблица 3.1).

Кроме того, в группе пациентов пожилого возраста отмечали более тяжелое клиническое течение инсульта, что подтверждается достоверно более высокими баллами, набранными по шкале NIHSS при поступлении ($20,8 \pm 2,9$ против $10,9 \pm 2,2$ у молодых) при относительно низких показателях по шкале комы Глазго. Время от начала симптомов до госпитализации увеличивалось с возрастом, достигая максимальных значений у пожилых ($88,1 \pm 6,6$ мин), что сопровождалось наибольшей частотой летальных исходов в первые сутки (40,0 % против 15,8 % у молодых). Напротив, наибольшую летальность среди молодых пациентов отмечали лишь на 2 – 3 сутки от начала заболевания (34,2 %), что может быть связано с компенсаторным потенциалом и нейрогенезом, подтверждающимися дальнейшими исследованиями (Таблица 3.1, Рисунок 3.1).

Таблица 3.1 – Клиническая характеристика пациентов с ишемическим инсультом

Параметр	n (%), M \pm SD (95% ДИ) / Me [Q1 – Q3]			P
	Молодые (n = 38)	Средние (n = 51)	Пожилые (n = 65)	
Возраст, лет	34,8 \pm 4,2 (33,42 – 36,18)	51,1 \pm 4,8 (49,75 – 52,45)	69,3 \pm 5,4 (67,96 – 70,64)	< 0,0001 ¹

Продолжение Таблицы 3.1

Мужчины	30 (78,9 %)	34 (66,7 %)	47 (72,3 %)	0,315 ²
Женщины	8 (21,1 %)	17 (33,3 %)	18 (27,7 %)	
<i>Анамнестические данные</i>				
Курение	21 (55,3 %)	29 (56,9 %)	38 (58,5 %)	0,95 ²
Артериальная гипертензия	34 (89,5 %)	48 (94,1 %)	64 (98,5 %)	0,135 ²
Гиподинамия	9 (11,6 %)	17 (33,3 %)	55 (84,6 %)	< 0,0001²
Ожирение	18 (47,3 %)	29 (56,9 %)	28 (43,1 %)	0,140 ²
ИМТ, кг/м ²	21,7 [19,1 – 24,3]	25,6 [22,7 – 28,5]	22,3 [19,8 – 24,8]	0,352 ³
Гиперлипидемия	22 (57,9 %)	41 (80,4 %)	63 (95,4 %)	< 0,0001²
Кардиомиопатии, пороки сердца, ФП	29 (76,3 %)	23 (45,1 %)	27 (41,5 %)	0,0017²
Тромбозы в анамнезе (ТЭЛА, ТГВНК)	1 (2,6 %)	5 (9,8 %)	19 (29,2 %)	0,0006²
ИБС	8 (21,1 %)	28 (54,9 %)	35 (53,8 %)	0,0017²
ХСН	14 (36,8 %)	25 (49,0 %)	37 (56,9 %)	0,144 ²
Сахарный диабет	10 (26,3 %)	19 (37,3 %)	25 (38,5 %)	0,424 ²
ХОБЛ	0	17 (33,3 %)	40 (61,5 %)	< 0,0001²
ХБП	5 (13,2 %)	9 (17,6 %)	19 (29,2 %)	0,115 ²
Язвенная болезнь желудка/ДПК	12 (31,6 %)	21 (41,2 %)	28 (43,1 %)	0,496 ²
Хроническая анемия	9 (23,7 %)	20 (39,2 %)	32 (49,2 %)	0,038²
SARS-CoV-2 IgG	33 (86,8 %)	42 (82,4 %)	44 (67,7 %)	0,047²
Деменция	0	13 (25,5 %)	25 (38,5 %)	< 0,0001²
Прием препаратов:				
антикоагулянты	21 (55,3 %)	22 (43,1 %)	20 (30,8 %)	0,047²
антиагреганты	7 (18,4 %)	25 (49,0 %)	31 (47,7 %)	0,005²
антифибринолитики	3 (7,9 %)	1 (2,0 %)	0	0,049²

Продолжение Таблицы 3.1

<i>Клиническая характеристика ИИ</i>				
Предшествующие условия:				
физическая работа	12 (31,6 %)	15 (29,4 %)	7 (10,8 %)	0,0148²
длительная иммобилизация	2 (5,3 %)	22 (43,1 %)	53 (81,5 %)	< 0,0001²
Диагноз МКБ-10:				
I63.3	15 (39,5 %)	28 (54,9 %)	36 (55,4 %)	0,164 ²
I63.4	23 (60,5 %)	23 (45,1 %)	29 (44,6 %)	0,173 ²
I67.8	1 (2,6 %)	13 (25,5 %)	57 (87,7 %)	< 0,0001²
G93.6	38 (100 %)	51 (100 %)	65 (100 %)	
Впервые установленный	37 (97,4 %)	48 (94,1 %)	59 (90,8 %)	0,413 ²
Повторный	1 (2,6 %)	3 (5,9 %)	6 (9,2 %)	0,413 ²
Период: острейший	38 (100 %)	51 (100 %)	65 (100 %)	
SSS-TOAST:				
атеротромботический подтип	15 (39,5 %)	28 (54,9 %)	36 (55,4 %)	0,164 ²
кардиоэмболический подтип	23 (60,5 %)	23 (45,1 %)	29 (44,6 %)	0,173 ²
Клиническая симптоматика:				
Контралатеральный гемипарез	10 (26,3 %)	38 (74,5 %)	52 (80,0 %)	< 0,0001²
Гемигипестезия	11 (28,9 %)	38 (74,5 %)	49 (75,4 %)	< 0,0001²
Гемианопсия	17 (44,7 %)	26 (50,1 %)	23 (35,4 %)	0,233 ²
Моторная/сенсорная афазия	9 (23,7 %)	39 (76,5 %)	55 (84,6 %)	< 0,0001²
Головокружение	27 (71,0 %)	24 (47,1 %)	16 (24,6 %)	< 0,0001²
Головная боль	19 (50,0 %)	11 (21,6 %)	12 (18,5 %)	0,0013²

Продолжение Таблицы 3.1

Балл NIHSS при поступлении	10,9 ± 2,2 (10,18 – 11,62)	17,3 ± 2,7 (16,54 – 18,06)	20,8 ± 2,9 (20,08 – 21,52)	< 0,0001 ¹
Балл ШКГ при поступлении	11,6 ± 2,5 (10,78 – 12,42)	12,8 ± 2,7 (12,04 – 13,56)	9,3 ± 2,6 (8,66 – 9,94)	< 0,0001 ¹
Время от предполагаемого начала симптомов до госпитализации, мин	63,7 ± 5,9 (62,24 – 65,16)	68,3 ± 5,9 (66,64 – 69,96)	88,1 ± 6,6 (86,46 – 89,74)	< 0,0001 ¹
Проведение ТЛГ на догоспитальном этапе	4 (10,5 %)	12 (23,5 %)	17 (26,2 %)	0,159 ²
Проведение механической реканализации/эндоваскулярного вмешательства	26 (68,4 %)	32 (62,7 %)	36 (55,4 %)	0,405 ²
Причина смерти:				
Отек/дислокация ГМ	32 (84,2 %)	41 (80,4 %)	49 (75,4 %)	0,549 ²
ОССН	4 (10,5 %)	7 (13,7 %)	9 (13,8 %)	0,873 ²
ЖКК	2 (5,3 %)	1 (2,0 %)	4 (6,2 %)	0,418 ⁴
ТЭЛА	0	2 (3,9 %)	3 (4,6 %)	0,191 ⁴
Количество умерших на:				
1 сутки	6 (15,8 %)	24 (47,0 %)	26 (40,0 %)	0,0073²
2 сутки	9 (23,7 %)	12 (23,5 %)	13 (20,0 %)	0,8682 ²
3 сутки	13 (34,2 %)	6 (11,8 %)	13 (20,0 %)	0,035²
4 сутки	5 (13,2 %)	2 (3,9 %)	3 (4,6 %)	0,1562 ²
5 сутки	2 (5,3 %)	3 (5,9 %)	6 (9,3 %)	0,6867 ²
6 сутки	2 (5,3 %)	1 (2,0 %)	3 (4,6 %)	0,6738 ²
7 сутки	1 (2,5 %)	3 (5,9 %)	1 (1,5 %)	0,4112 ²
Примечание: ¹ – однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с апостериорным тестом Тьюки; ² – χ^2 -критерий Пирсона; ³ – критерий Краскела-Уоллиса; ⁴ – точный критерий Фишера; полужирным выделены значения $p \leq 0,05$.				

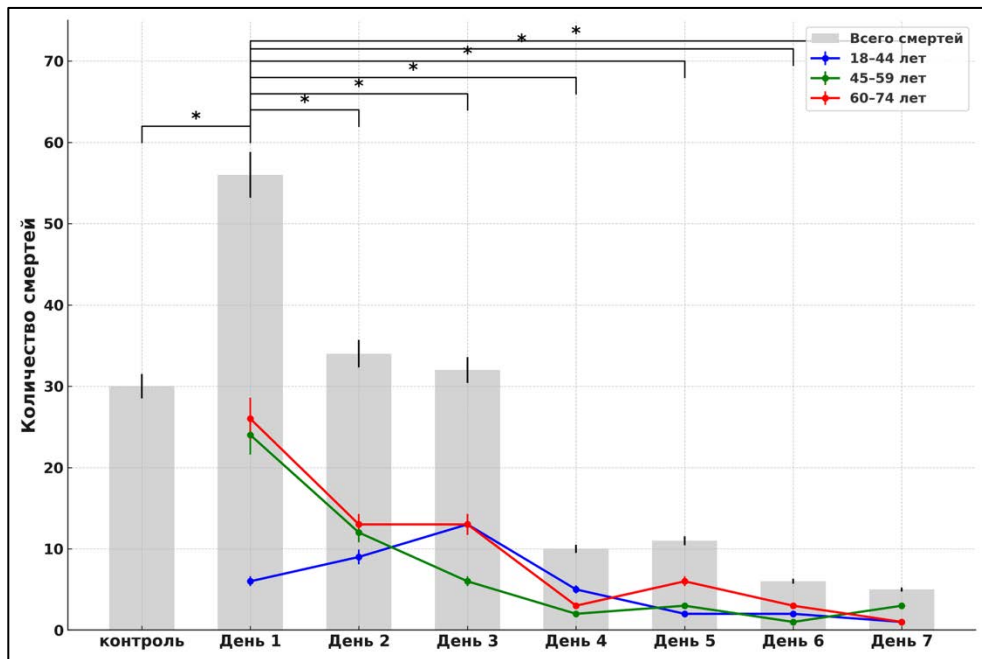


Рисунок 3.1 – Распределение пациентов группы I (синяя кривая – молодой возраст, зеленая кривая – средний возраст, красная кривая – пожилой возраст; серые столбцы отражают общее число смертей в группе) и группы II в соответствии со сроками смерти, знаком «*» обозначены статистически достоверные различия, $p \leq 0,05$

В связи с этим, представленный ниже корреляционный анализ сфокусирован на тех факторах, которые показали наибольший вклад в межгрупповые различия при первичном анализе агрегированных данных: балл NIHSS при поступлении, время от начала симптомов до госпитализации, частота гиперлипидемии, хронической обструктивной болезни легких, хронической анемии, деменции, а также наличие кардиомиопатий/фибрилляции предсердий в анамнезе.

Так, при проведении сравнительной оценки возраст-стратифицированных факторов риска неблагоприятного исхода у пациентов с ишемическим инсультом обнаружили значимые различия между группами по ряду категориальных признаков (Таблица 3.2). В частности, у пожилых пациентов по сравнению с молодыми наиболее высокие отношения шансов выявили для таких факторов, как: хроническая обструктивная болезнь легких (OR = 122,29; 95 % ДИ: 7,2 – 2079,5), деменция (OR = 48,48; 95 % ДИ: 2,9 – 824,4), гиподинамия (OR = 46,75; 95 % ДИ: 13,6 – 160,9), длительная иммобилизация (OR = 79,50; 95 % ДИ: 16,8 – 376,7).

Существенный вклад также вносили гиперлипидемия (OR = 15,03; 95 % ДИ: 4,0 – 56,6) и тромбозы в анамнезе (OR = 15,28; 95 % ДИ: 2,0 – 119,5). Среди факторов, более характерных для молодых пациентов, отмечено преимущественное наличие кардиомиопатий и фибрилляции предсердий (OR = 0,22; 95 % ДИ: 0,1 – 0,5), а также более частое выполнение физической работы перед развитием инсульта (OR = 0,26; 95 % ДИ: 0,1 – 0,7), что подтверждает данные первичного анализа агрегированных данных. Кроме того, при сравнении группы среднего возраста с молодыми значимые различия сохранялись для ряда показателей, включая физическую гиподинамию, длительную иммобилизацию, гиперлипидемию и ишемическую болезнь сердца.

При оценке непрерывных переменных с использованием стандартизированных разностей средних выявили выраженное нарастание тяжести инсульта по шкале NIHSS с возрастом: средние значения составили $10,9 \pm 2,2$ у молодых, $17,3 \pm 2,7$ у пациентов среднего возраста и $20,8 \pm 2,9$ у пожилых, при этом SMD при сравнении пожилых с молодыми достигал 3,69. Время от появления симптомов до госпитализации также увеличивалось с возрастом – от $63,7 \pm 5,9$ мин в группе молодых до $88,1 \pm 6,6$ мин у пожилых (SMD = 3,81). Показатели по шкале комы Глазго существенно не различались при сравнении молодого и среднего возрастов, в то время как у пожилых фиксировали снижение значений до $9,3 \pm 2,6$ балла (Таблица 3.3).

Корреляционный анализ на уровне групп выявил положительную связь между ранней летальностью (в первые сутки) и некоторыми клиническими показателями, включая балл по шкале NIHSS, частоту деменции, гиперлипидемии и ХОБЛ, а также временем до госпитализации. Напротив, отрицательную корреляционную связь наблюдали для кардиомиопатий/фибрилляции предсердий, которые преимущественно встречались у молодых пациентов, что сопровождалось снижением показателей ранней летальности (Рисунок 3.2).

Таблица 3.2 – Возраст-стратифицированные отношения шансов (OR) для категориальных факторов риска (Пожилые / Молодые; Средние / Молодые)

Фактор	OR (95 % ДИ)	
	Пожилые / Молодые	Средние / Молодые
Прием антикоагулянтов	0,36 (0,2 – 0,8)	0,61 (0,3 – 1,4)
Прием антифибринолитиков	0,08 (0,0 – 1,5)	0,23 (0,0 – 2,3)
Прием антиагрегантов	4,04 (1,6 – 10,5)	4,26 (1,6 – 11,4)
Хроническая болезнь почек	2,73 (0,9 – 8,0)	1,41 (0,4 – 4,6)
Хроническая обструктивная болезнь легких	122,29 (7,2 – 2079,5)	39,06 (2,3 – 674,2)
Кардиомиопатии / фибрилляция предсердий	0,22 (0,1 – 0,5)	0,25 (0,1 – 0,6)
Хроническая сердечная недостаточность	2,27 (1,0 – 5,2)	1,65 (0,7 – 3,9)
Хроническая анемия	3,12 (1,3 – 7,6)	2,08 (0,8 – 5,3)
Летальность в 1-е сутки	3,56 (1,3 – 9,7)	4,74 (1,7 – 13,3)
Деменция	48,48 (2,9 – 824,4)	27,00 (1,5 – 470,5)
Сахарный диабет	1,75 (0,7 – 4,2)	1,66 (0,7 – 4,2)
Гиперлипидемия	15,03 (4,0 – 56,6)	2,98 (1,2 – 7,7)
Артериальная гипертензия	7,53 (0,8 – 70,1)	1,88 (0,4 – 9,0)
Ишемическая болезнь сердца	4,38 (1,7 – 11,0)	4,57 (1,8 – 11,9)
Ожирение	0,84 (0,4 – 1,9)	1,46 (0,6 – 3,4)
Гиподинамия	46,75 (13,6 – 160,9)	4,25 (1,3 – 13,9)
Предшествующая физическая работа	0,26 (0,1 – 0,7)	0,90 (0,4 – 2,2)
Длительная иммобилизация	79,50 (16,8 – 376,7)	13,66 (3,0 – 62,9)
SARS-CoV-2 IgG+	0,32 (0,1 – 0,9)	0,71 (0,2 – 2,3)
Курение	1,14 (0,5 – 2,6)	1,07 (0,5 – 2,5)
Тромбозы в анамнезе (ТЭЛА/ТГВНК)	15,28 (2,0 – 119,5)	4,02 (0,4 – 35,9)
Язвенная болезнь желудка / 12- перстной кишки	1,64 (0,7 – 3,8)	1,52 (0,6 – 3,7)

Таблица 3.3 – Стандартизованные разности средних (SMD) для непрерывных переменных по возрастным группам

Переменная	SMD	SMD	Молодые, М ± SD	Средние, М ± SD	Пожилые, М ± SD
	Средние / Молодые	Пожилые / Молодые			
NIHSS при поступлении	2,54	3,69	10,9 ± 2,2	17,3 ± 2,7	20,8 ± 2,9
ШКГ при поступлении	0,45	-0,89	11,6 ± 2,5	12,8 ± 2,7	9,3 ± 2,6
Время от начала симптомов до госпитализации, мин	0,77	3,81	63,7 ± 5,9	68,3 ± 5,9	88,1 ± 6,6

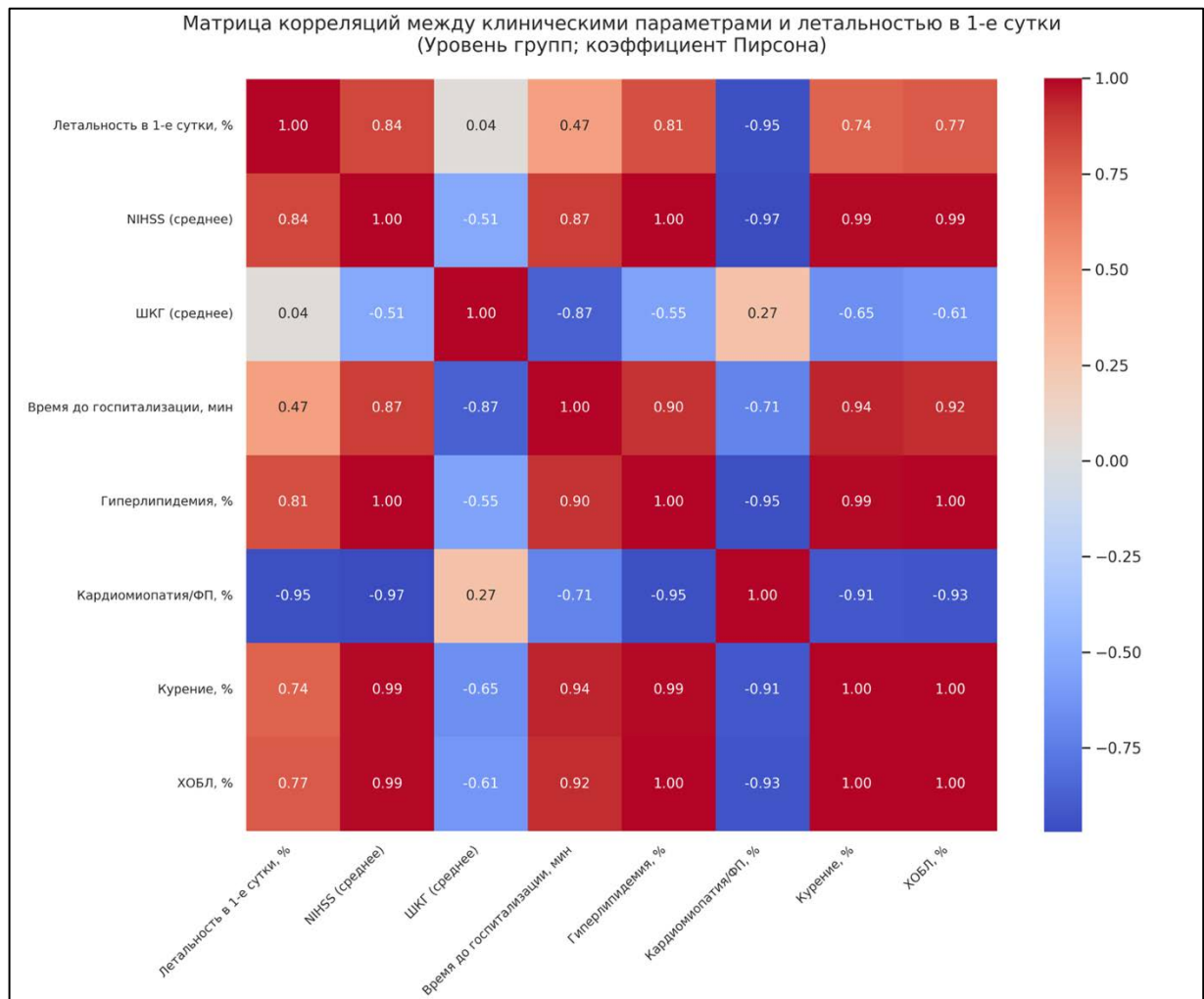


Рисунок 3.2 – Матрица корреляций между wybranными клиническими параметрами и летальностью в 1-е сутки на групповом уровне (при сравнении молодой, средней и пожилой возрастных групп), построенная с использованием коэффициента Пирсона

Анализ стандартизированных профилей риска в формате радиальных диаграмм продемонстрировал, что у молодых пациентов доминирующими характеристиками являлись высокая частота кардиомиопатий / ФП, относительно низкое время до госпитализации и меньшая тяжесть инсульта по NIHSS (Рисунок 3.3). В группе среднего возраста наибольшие z-оценки соответствовали показателям тяжести инсульта, ранней летальности и наличию гиперлипидемии. В то же время, среди пожилых пациентов отмечали достоверно высокую частоту хронических коморбидных состояний, включая гиперлипидемию, анемию, деменцию и ХОБЛ, а также увеличение времени до госпитализации и высокие показатели NIHSS. Эти данные также подтверждают существенные различия в структуре факторов риска между возрастными группами, что особенно подчеркивает необходимость их учета при разработке персонализированных стратегий ведения пациентов с ишемическим инсультом в зависимости от возраста.

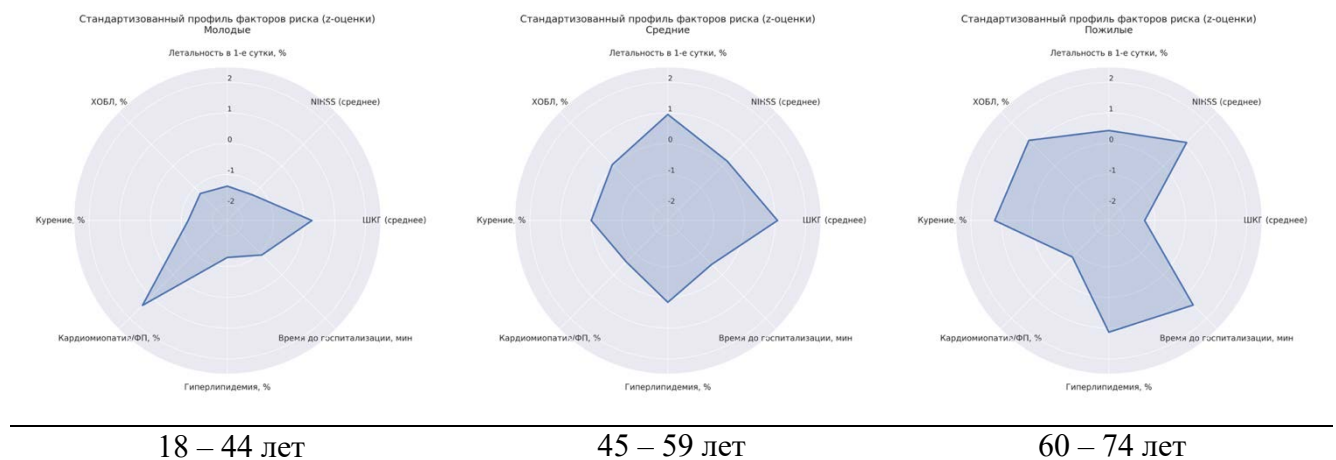


Рисунок 3.3 – Стандартизованные профили факторов риска (z-оценки) у пациентов с ишемическим инсультом: молодых (18 – 44 лет), среднего возраста (45 – 59 лет) и пожилых (60 – 74 лет). Положительные значения отражают превышение средних показателей выборки, отрицательные – их снижение

3.1.2. Группа II: пациенты с условно интактным головным мозгом

Группа II включала 30 пациентов с условно интактным головным мозгом, равномерно распределенных по возрасту в соответствии с дизайном исследования. Средний возраст составил: $31,4 \pm 3,9$ года у молодых, $53,6 \pm 4,9$ года у пациентов среднего возраста и $67,7 \pm 5,8$ года у пожилых ($p < 0,0001$). Гендерное распределение достоверно не различалось во всех группах. При сравнении между возрастными группами наблюдали четкие различия по анамнестическим данным: частота артериальной гипертензии увеличивалась от 30 % у молодых до 80 – 90 % в старших когортах; гиподинамия – от 10 % до 50 % ($p < 0,0001$); гиперлипидемия – от 40 % до 70 % и 90 % ($p < 0,0001$). Встречаемость заболеваний сердца и нарушений ритма также учащалась с возрастом: кардиомиопатии – 20 %, 40 % и 60 %; ИБС – 10 %, 30 % и 60 %; эпизоды тромбозов – отсутствовали среди молодых, 20 % случаев обнаружили в средней и 50 % в пожилой возрастных группах ($p = 0,0006$). У пожилых также значительно чаще диагностировали ХОБЛ (60 %, $p < 0,0001$), хроническую анемию (80 %) и деменцию (80 %, $p < 0,0001$). Прием антикоагулянтов возрастал от 10 % (у молодых) до 40 – 50 % (у средних и пожилых), аналогичную тенденцию наблюдали в отношении приема антиагрегантных лекарственных препаратов (Таблица 3.4).

Таблица 3.4 – Клиническая характеристика пациентов интактной группы

Параметр	n (%), M \pm SD (95 % ДИ) / Me [Q1 – Q3]			P
	Молодые (n = 10)	Средние (n = 10)	Пожилые (n = 10)	
Возраст, лет	$31,4 \pm 3,9$ (27,57 – 35,13)	$53,6 \pm 4,9$ (49,98 – 55,73)	$67,7 \pm 5,8$ (63,1 – 72,39)	$< 0,0001^1$
Мужчины	6 (60 %)	5 (50 %)	5 (50 %)	0,315 ²
Женщины	4 (40 %)	5 (50 %)	5 (50 %)	

Продолжение Таблицы 3.4

<i>Анамнестические данные</i>				
Курение	5 (50 %)	6 (60 %)	6 (60 %)	0,95 ²
Артериальная гипертензия	3 (30 %)	8 (80 %)	9 (90 %)	0,135 ²
Гиподинамия	1 (10 %)	2 (20 %)	5 (50 %)	< 0,0001²
Ожирение	3 (30 %)	5 (50 %)	5 (50 %)	0,140 ²
ИМТ, кг/м ²	20,6 [18,3 – 25,6]	27,4 [21,3 – 30,7]	26,6 [20,4 – 31,3]	0,352 ³
Гиперлипидемия	4 (40 %)	7 (70 %)	9 (90 %)	< 0,0001²
Кардиомиопатии, пороки сердца, ФП	2 (20 %)	4 (40 %)	6 (60 %)	0,0017²
Тромбозы в анамнезе (ТЭЛА, ТГВНК)	0	2 (20 %)	5 (50 %)	0,0006²
ИБС	1 (10 %)	3 (30 %)	6 (60 %)	0,0017²
ХСН	1 (10 %)	3 (30 %)	6 (60 %)	0,144 ²
Сахарный диабет	1 (10 %)	2 (20 %)	4 (40 %)	0,424 ²
ХОБЛ	0	3 (30 %)	6 (60 %)	< 0,0001²
ХБП	1 (10 %)	2 (20 %)	5 (50 %)	0,115 ²
Язвенная болезнь желудка/ДПК	2 (20 %)	4 (40 %)	3 (30 %)	0,496 ²
Хроническая анемия	1 (10 %)	2 (20 %)	8 (80 %)	0,038²
SARS-CoV-2 IgG	6 (60 %)	7 (70 %)	7 (70 %)	0,047²
Деменция	0	2 (20 %)	8 (80 %)	< 0,0001²
Прием препаратов:				
антикоагулянты	1 (10 %)	4 (40 %)	5 (50 %)	0,047²
антиагреганты	0	2 (20 %)	4 (40 %)	0,005²
антифибринолитики	1 (10 %)	0	0	0,049²
Причины смерти				
Травма, несовместимая с жизнью, массивное кровотечение	6 (60 %)	1 (10 %)	0	
Травма ствола головного мозга	3 (30 %)	0	0	

Продолжение Таблицы 3.4

Разрыв аневризмы сердца / аорты	0	3 (30 %)	4 (40 %)	
Разрыв варикозно расширенных вен пищевода	0	4 (40 %)	5 (50 %)	
Летальные нарушения ритма сердца	2 (20 %)	2 (20 %)	1 (10 %)	
Электротравма	1 (10 %)	0	0	
Примечание: ¹ – однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с апостериорным тестом Тьюки; ² – χ^2 -критерий Пирсона; ³ – критерий Краскела-Уоллиса; ⁴ – точный критерий Фишера; полужирным выделены значения $p \leq 0,05$.				

В качестве причин смерти у молодых преобладали травмы, несовместимые с жизнью (60 %), и травматические повреждения ствола мозга (30 %). В среднем возрасте основными причинами становились разрывы аневризмы сердца / аорты (30 %) и массивные кровотечения из варикозно расширенных вен пищевода (40 %). В пожилой группе доминировали хронические сосудистые события – разрывы аневризмы сердца / аорты (40 %) и варикозно расширенных вен пищевода (50 %) (Таблица 3.4).

Резюме

Клиническая характеристика пациентов, отобранных для настоящего исследования, позволяет говорить о высокой степени однородности выборки. Следует особенно подчеркнуть, что старение неразрывно связано с накоплением сопутствующей коморбидной патологии, включая различные системные заболевания, вносящие вклад в нарушение морфологии и функций головного мозга даже при отсутствии острого ишемического повреждения.

В совокупности клинические данные пациентов с ишемическим инсультом (группа I) демонстрируют четкую возрастную стратификацию как факторов риска, так и тяжести заболевания: по мере увеличения возраста существенно возрастали

частота встречаемости гиподинамии, гиперлипидемии, тромботических осложнений, ИБС, ХОБЛ, анемии и деменции, что сопровождалось более тяжелой клинической манифестацией, повышенными значениями по шкале NIHSS, увеличением времени до госпитализации и высокой ранней летальностью. На этом фоне в когорте молодых пациентов отмечали относительно более легкий дебют заболевания и низкую раннюю летальность, что может быть связано с высокими компенсаторными возможностями и пластичностью головного мозга на данном этапе постнатального онтогенеза. У пациентов, включенных в группу II (условно интактный головной мозг), подобные возрастные различия также проявлялись в структуре коморбидности: от минимальной частоты сердечно-сосудистых и других хронических заболеваний в молодом возрасте – до значительного их нарастания в пожилой возрастной группе. В качестве причин смерти у молодых выступали травматические повреждения, тогда как в средней и пожилой группах – преимущественно осложнения хронических сосудистых заболеваний. Полученные данные в обеих группах демонстрируют стабильную возрастную тенденцию – от более благоприятных исходных условий у молодых к выраженной соматической отягощенности и высокой смертности у пожилых, что создает объективный клинический контекст для выявляемых далее различий в нейропластичности, нейрогенезе и ангиогенном ответе в зависимости от периода постнатального онтогенеза.

3.2. Гистологическое исследование

При гистологическом исследовании образцов коры пациентов с ишемическим инсультом выявили типичные морфологические признаки инфаркта головного мозга: формирование ядра инфаркта (зона паннекроза) и зоны ишемической полутени (пенумбры). В пределах зоны паннекроза обнаружили единичные сохранившиеся нейроны с эозинофильной цитоплазмой и пикнотическими изменениями ядер, а также признаки выраженных нарушений

локальной микроциркуляции: венозную гиперемию, периваскулярный отек с расширением пространств Вирхова–Робина, агрегацию эритроцитов и стаз в просвете кровеносных сосудов (склерозированных на более поздних сроках) (Рисунок 3.4).

Кнаружи от этой зоны расположена обширная область ишемически поврежденных клеток (пенумбра), в которой структурное нарушение нейронов менее выражено, однако их последовательная гибель в течение первой недели сопровождалась умеренной инфильтрацией лимфоцитами и полиморфноядерными клетками, преимущественно периваскулярно, а в ряде случаев наблюдали реактивную глиальную гиперплазию (глиоз), преимущественно у лиц пожилого возраста. В той же подгруппе практически во всех случаях наблюдали признаки отсроченной (начиная с 24 часов от манифестации заболевания) некротической трансформации пенумбры и расширение ядра инфаркта (Рисунок 3.4).

При сравнении фрагментов коры головного мозга пациентов с ишемическим инсультом во всех возрастных группах отмечали последовательную смену морфологических стадий: острая (ишемически-некротическая), подострая (воспалительно-деструктивная) и репаративная (восстановительная) стадии. Тем не менее, сроки смены перечисленных стадий и степень выраженности соответствующих морфологических изменений значительно варьировали как при сравнении между возрастными группами, так и внутри каждой группы между отдельными случаями. Тем не менее, наблюдали следующие тенденции: на ранних сроках (в большинстве случаев до 2 – 3 суток) отмечали массивную гибель нейронов и признаки некротической трансформации пенумбры (ишемически-некротическая стадия); начиная с 1 – 2 суток в область ишемического повреждения постепенно мигрировали лейкоциты и клетки моноцитарного ряда, постепенно увеличивалось количество полиморфноядерных клеток, что в ряде случаев сочеталось с формированием обширной зоны некротической трансформации пенумбры, особенно в старших возрастных группах (воспалительно-деструктивная). Сроки перехода к репаративной стадии значительно различались в

зависимости от возрастной группы. Так, у лиц молодого возраста уже начиная с 3-х суток после манифестации заболевания наблюдали уменьшение клеточного воспалительного инфильтрата, преобладание в ядре инфаркта и зоне пенумбры клеток макрофагального происхождения (в т.ч. многочисленных элементов микроглии), а также минимальной зоной некротической трансформации пенумбры, что сопровождалось в ряде случаев реактивной глиальной гиперплазией и ограничением зоны некроза глиальным рубцом (преимущественно к 5 – 7 суткам). В старших возрастных группах практически не наблюдали признаков перехода к репаративной стадии; в зоне пенумбры даже на 7-е сутки после ишемического инсульта отмечали элементы клеточного воспалительного инфильтрата, а зона некротической трансформации пенумбры была наибольшей у лиц пожилого возраста. Таким образом, обнаруженные изменения гистоархитектоники коры головного мозга демонстрируют наиболее тяжелое течение ишемического инсульта у лиц пожилого возраста. В противоположность этому, в коре головного мозга молодых пациентов на более поздних сроках наблюдали частичное сохранение нейронов в зоне пенумбры, отсутствие четкой зоны некротической трансформации к концу первой недели, а также, в ряде случаев, ограничение ядра инфаркта в результате формирования глиального рубца.

Кроме того, в зависимости от возраста и типа ишемического инсульта по классификации SSS-TOAST, при анализе состояния кровеносных сосудов (преимущественно артерий среднего калибра) отмечали соответствующие структурные изменения сосудистой стенки. Так, в большинстве наблюдений отмечали склероз, гиалиноз и / или атрофию гладкомышечных клеток преимущественно у пациентов с кардиоэмболическим подтипом ишемического инсульта. Напротив, при анализе микропрепаратов коры головного мозга пациентов с атеротромботическим подтипом ишемического инсульта в стенке кровеносных сосудов преобладали вторичные изменения по типу липоидоза и фиброза, а в некоторых случаях визуализировали атеросклеротические бляшки, гиалиноз и истончение мышечной оболочки. При сравнении между возрастными

группами описанные изменения были наиболее выраженными в когорте пожилых пациентов.

За пределами зоны пенумбры наблюдали условно интактные нейроны коры головного мозга, в которой сохранялась типичная слоевая организация: молекулярный, наружный зернистый, пирамидный, внутренний зернистый, ганглионарный и полиморфноклеточный слой с элементами макро- и микроглии. При сравнении этой зоны в разных возрастных группах на основании гистологического анализа можно предполагать лишь возраст-ассоциированное снижение объемной плотности и распределения нейронов по мере старения, однако требует дальнейшего подтверждения результатами морфометрического подсчета.

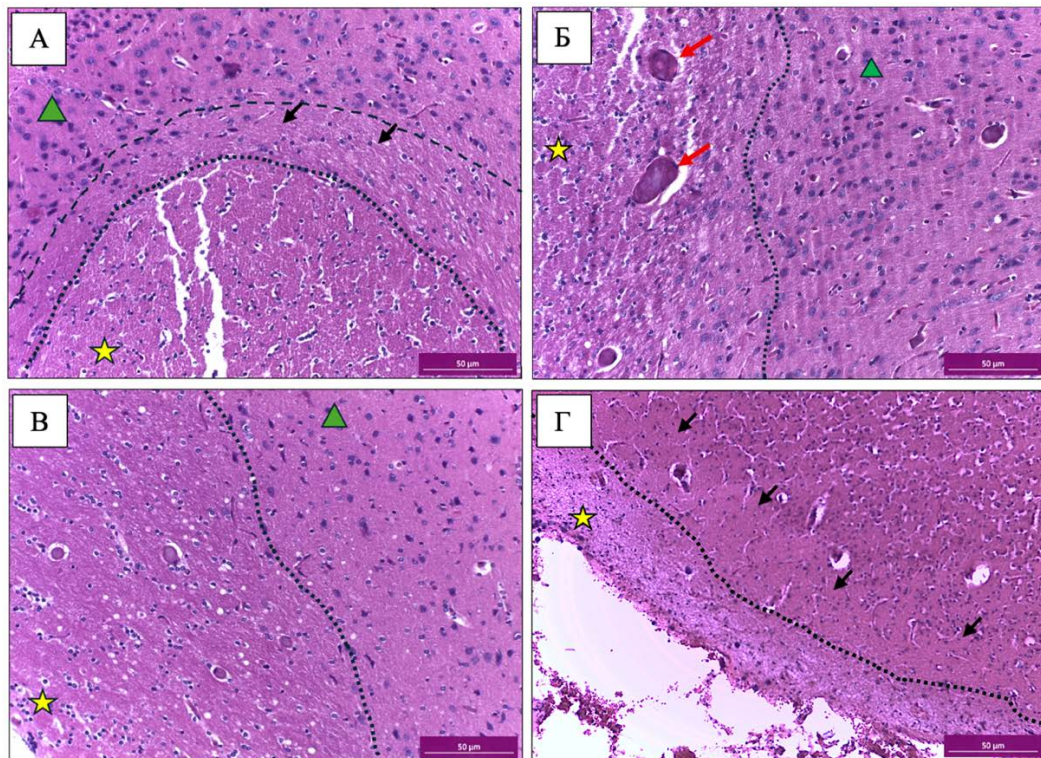


Рисунок 3.4 – Кора головного мозга. Ишемический инсульт. А – Пациент М., 40 лет; Б – Пациент Т., 53 лет; В – Пациент П., 67 лет. Г – Пациент С., 69 лет. Окрашивание – гематоксилином и эозином, увелич. $\times 200$. Звезда – ядро инфаркта ограничено точечным пунктиром, треугольник – зона пенумбры. Черные стрелки – область некротической трансформации части пенумбры за пределами первичной зоны паннекроста; красные стрелки – склерозированные кровеносные сосуды в зоне паннекроста

При гистологическом исследовании образцов условно интактной коры головного мозга наблюдали типичную для неокортекса шестислойную организацию. В молекулярном слое (I) определяли небольшое количество мелких тормозных нейронов и тангенциально ориентированные нервные волокна. Во II и IV зернистых слоях отмечали мелкие пирамидные, звездчатые и тормозные нейроны, при этом границы этих слоев местами были нечеткими вследствие незначительной толщины. Пирамидный (III) и ганглионарный (V) слои определяли по наличию в них средних и крупных пирамидных нейронов (включая гигантские клетки Беца), между которыми располагались многочисленные тормозные клетки (Рисунок 3.5). В полиморфноклеточном слое (VI) определяли нейроны различной морфологии с ориентацией их аксонов в направлении белого вещества. Во всех слоях также отмечали элементы макроглии и единичные микроглиальные клетки.

Несмотря на сохранность слоевой гистоархитектоники во всех возрастных группах, у пожилых пациентов также отмечали умеренные возраст-ассоциированные морфологические изменения, которые можно считать физиологическими (Рисунок 3.5). При световой микроскопии, по сравнению с образцами молодой группы, у пожилых пациентов в коре головного мозга отмечали резкое уменьшение плотности нейронов, уменьшение размеров пирамидных клеток, а также единичные нейроны с вакуолизацией цитоплазмы. В ряде случаев у пожилых пациентов границы между слоями были нечеткими, а в стенке некоторых артериол и мелких артерий отмечали признаки гиалиноза, склероза, утолщения базальной мембраны и / или частичной атрофии мышечной оболочки, то есть признаков физиологической инволюции, нейродегенерации и хронической ишемии, особенно выраженных у лиц с отягощенным сердечно-сосудистым анамнезом.

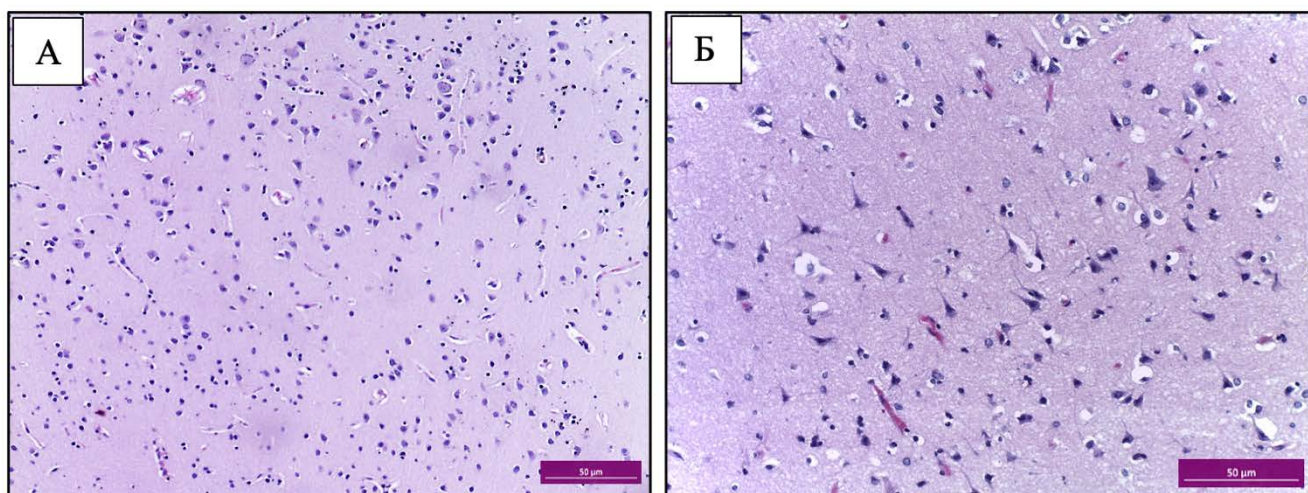


Рисунок 3.5 – Условно интактная кора головного мозга. А – Пациент П., 38 лет, увелич. $\times 200$; Б – Пациент З., 70 лет, увелич. $\times 400$. Окрашивание – гематоксилином и эозином. На микрофотографиях представлен слой пирамидных нейронов, со сниженной численностью клеточных элементов в пожилом возрасте

Резюме

При гистологическом анализе коры головного мозга пациентов с ишемическим инсультом выявили типичные признаки инфаркта: зону паннекроза (ядро инфаркта) с практически полным отсутствием нейронов, локальные нарушения микроциркуляции и менее выраженные изменения в области пенумбры, сопровождающиеся преимущественно периваскулярной воспалительной инфильтрацией и реактивным глиозом. Наиболее яркие изменения гистоархитектоники наблюдали в коре головного мозга пожилых пациентов, в которой ядро инфаркта расширялось вплоть до 7 суток, вероятно за счет продолжающейся гибели нейронов пенумбры. В противоположность этому, у молодых пациентов на поздних сроках отмечали частичное ограничение зоны инфаркта, в том числе благодаря формированию глиального рубца, что отражает высокую степень компенсаторного клеточно-тканевого ответа и пластичности коры головного мозга в этой возрастной группе. Структурные изменения стенки кровеносных сосудов обычно соответствовали подтипу инсульта по классификации SSS-TOAST и были наиболее выражены в пожилом возрасте.

В условно интактной коре головного мозга сохранялось типичное послойное строение, однако в пожилой группе отмечали появление возраст-ассоциированных изменений: снижение плотности нейронов, уменьшение размеров пирамидных клеток, вакуолизацию цитоплазмы отдельных нейронов, сглаживание границ между слоями и признаки гиалиноза и склероза стенки кровеносных сосудов. Эти особенности отражают снижение структурной целостности и пластичности коры по мере старения, а также ограниченность ее компенсаторного потенциала в старших возрастных группах.

При окрашивании микропрепаратов коры головного мозга крезилвиолетом по Нисслю также обнаружили возраст-ассоциированные различия в степени сохранности нейронов и выраженности структурных изменений. Так, у пациентов с ишемическим инсультом во всех возрастных группах в ядре инфаркта наблюдали выраженную гибель большинства нейронов, а в единичных сохранившихся клетках – частичный / тотальный хроматолиз, указывающий на резкое уменьшение объемов хроматофильной субстанции в сочетании с гиперхромазией цитоплазмы. Эти нейроны были морфологически деформированы, резко уменьшены в размерах, в некоторых из них наблюдали пикнотические изменения ядер и неравномерное распределение базофильных гранул.

В большинстве нейронов зоны пенумбры интенсивность перечисленных изменений была ниже, однако сохранялись признаки неполного хроматолиза, периферического смещения и фрагментации хроматофильной субстанции, а также умеренная гипохромия цитоплазмы (Рисунок 3.6, Рисунок 3.7, Рисунок 3.8). В ряде случаев обнаружили нейроны с вакуолизацией перикариона, отражающей развитие дистрофических изменений. При сравнительной оценке отмечали, что у молодых пациентов в пенумбре сохраняется большая доля нейронов с относительной сохраненной структурой хроматофильной субстанции, тогда как в пожилом возрасте все чаще наблюдали клетки с выраженным хроматолизом и редукцией гранулярности (Рисунок 3.9, Рисунок 3.10).

Морфометрический анализ подтвердил различия, выявленные при сравнении рутинного окрашивания гематоксилином и эозином и окрашивания нервной ткани по Ниссля, демонстрируя четкую зависимость численного состава нейронов от времени смерти и возраста. Уже в первые сутки после ишемического инсульта в зоне условно интактной коры количество нейронов у молодых пациентов составило $19,3 \pm 0,9$ клеток в поле зрения светового микроскопа при увеличении $\times 400$, тогда как у лиц пожилого возраста данный показатель был достоверно ниже ($15,6 \pm 0,7$; $p < 0,05$) (Рисунок 3.11). В зоне пенумбры число нейронов у молодых пациентов сохранялось на более высоком уровне ($15,3 \pm 0,7$) по сравнению с пожилыми ($8,9 \pm 0,4$; $p < 0,05$), что подтверждает результаты визуальной оценки, проведенной при гистологическом исследовании. Следует отметить, что плотность распределения нейронов в коре головного мозга пациентов мужского и женского пола различалась не более чем на 20% внутри одной возрастной группы, в связи с чем полученные средние значения можно считать достоверными ($p \leq 0,05$).

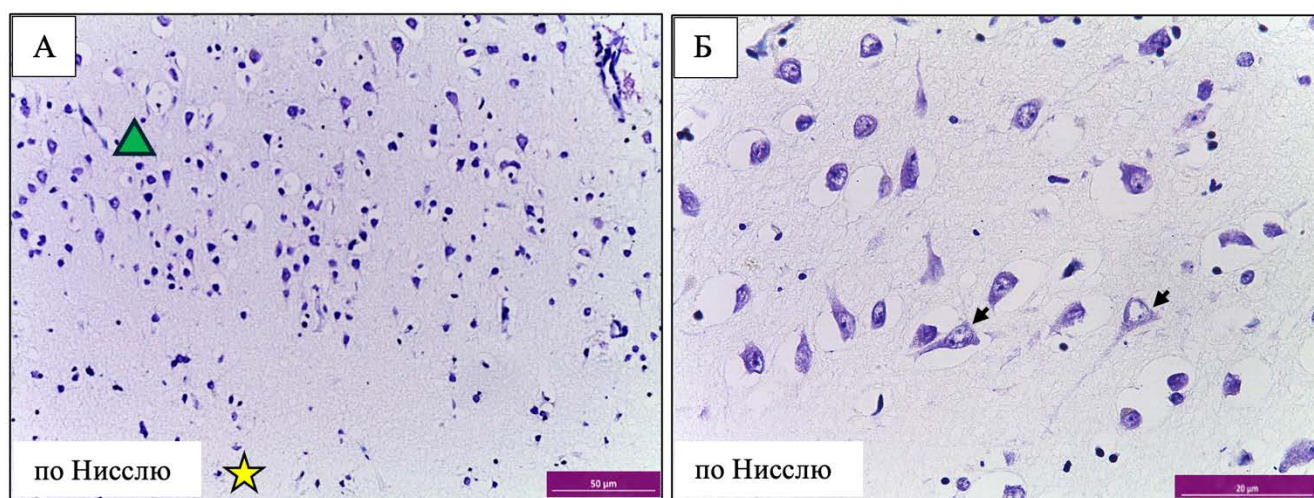


Рисунок 3.6 – Кора головного мозга пациента Т., 41 лет, с ишемическим инсультом, умершего на 1-е сутки от начала заболевания, окрашивание крезилвиолетом по Ниссля, А – увелич. $\times 200$, Б – увелич. $\times 400$. На микрофотографии визуализируется ядро инфаркта (желтая звезда), окруженное зоной пенумбры (зеленый треугольник), стрелки – пирамидные нейроны с признаками неполного хроматолиза, периферического смещения и фрагментации хроматофильной субстанции, гипохромией цитоплазмы

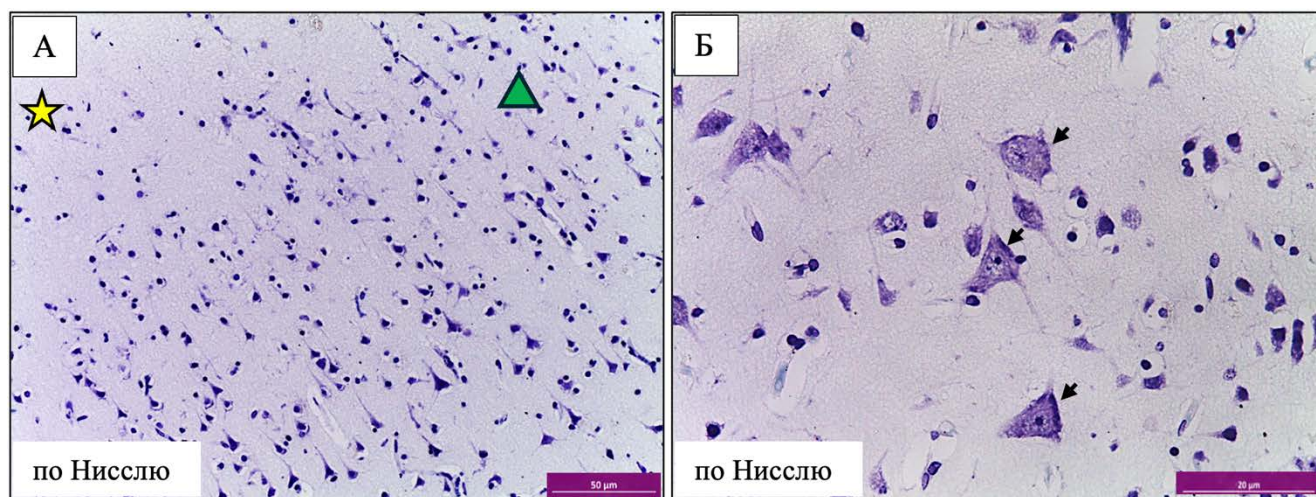


Рисунок 3.7 – Кора головного мозга пациента С., 53 лет, с ишемическим инсультом, умершего на 1-е сутки от начала заболевания, окрашивание крезилвиолетом по Нисслю, А – увелич. $\times 200$, Б – увелич. $\times 400$. На микрофотографии визуализируется ядро инфаркта (желтая звезда), окруженное зоной пенумбры (зеленый треугольник), стрелки – крупные нейроны с признаками неполного хроматолиза, периферического смещения и фрагментации хроматофильной субстанции, гипохромией цитоплазмы

Кроме того, при анализе выявленных изменений в разные сроки от манифестации ишемического инсульта отмечали последовательное снижение числа нейронов в зоне инфаркта в течение первой недели, наиболее выраженное в когорте пожилых пациентов: от $2,7 \pm 0,1$ клеток у умерших в 1-е сутки до практически полного отсутствия в отдаленные сроки (спустя 7 суток). Следует отметить, что у молодых пациентов даже спустя 7 суток от начала заболевания некоторые нейроны в ядре инфаркта морфологически сохранными (Рисунок 3.11).

В зоне пенумбры, где повреждение носило сублетальный характер, также отмечали возраст-зависимое истощение пула нейронов: у молодых пациентов значения снижались незначительно, тогда как у пожилых уменьшение было существенным (более чем в 1,9 раза при сравнении умерших в 1-й день с умершими на 7-е сутки).

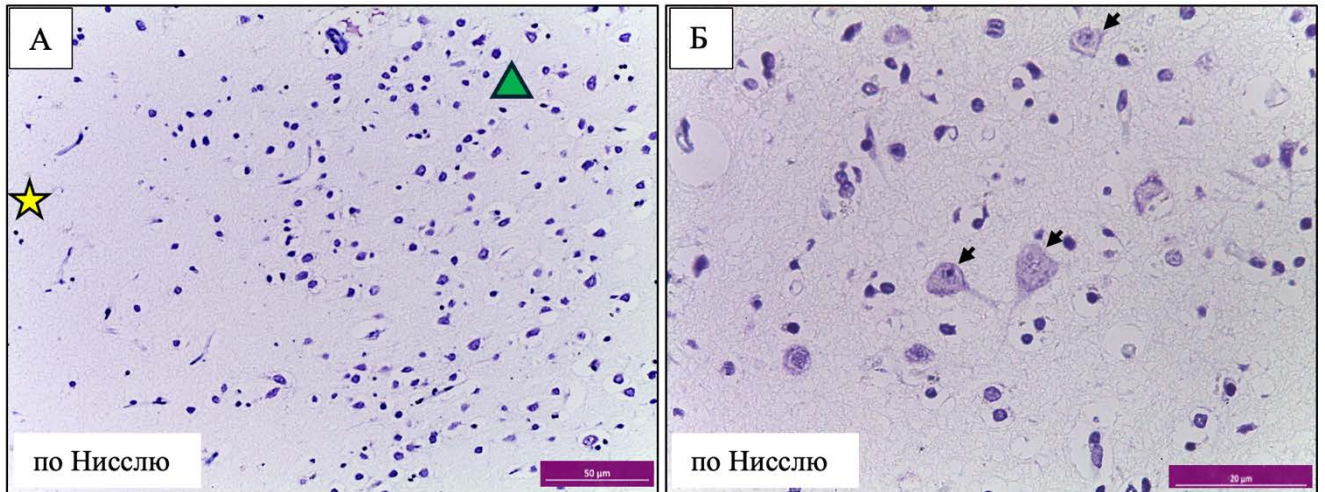


Рисунок 3.8 – Кора головного мозга пациента Е., 70 лет, с ишемическим инсультом, умершего на 1-е сутки от начала заболевания, окрашивание крезилвиолетом по Нислю, А – увелич. $\times 200$, Б – увелич. $\times 400$. На микрофотографии визуализируется ядро инфаркта (желтая звезда), окруженное зоной пенумбры (зеленый треугольник), стрелки – «бледные» нейроны с признаками тотального хроматолиза, периферическим смещением ядра, фрагментацией хроматофильной субстанции

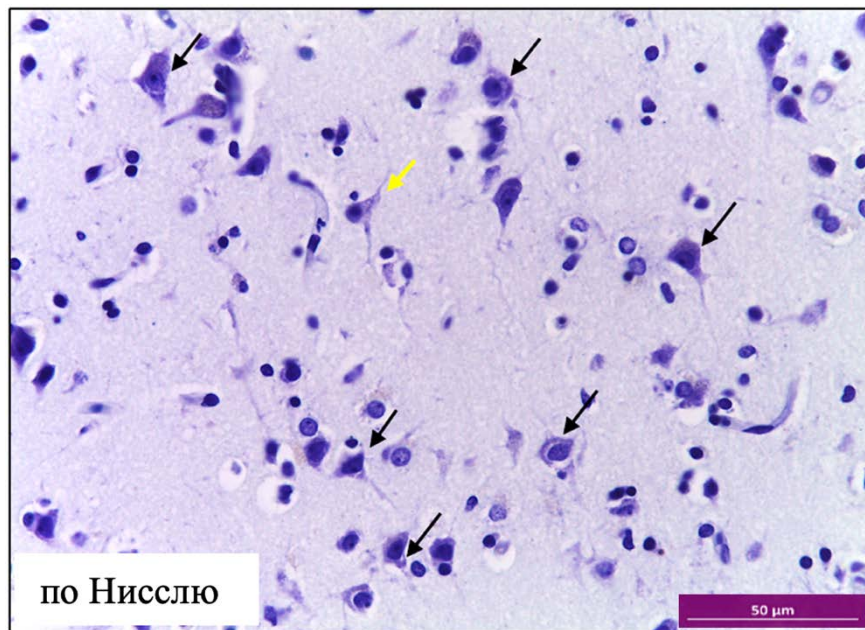


Рисунок 3.9 – Кора головного мозга пациента В., 61 лет, с ишемическим инсультом, умершего на 3-и сутки от начала заболевания, окрашивание крезилвиолетом по Нислю, увелич. $\times 400$. На микрофотографии представлена зона пенумбры с большим числом поврежденных пирамидных нейронов (черные стрелки) и биполярный нейрон (желтая стрелка) с признаками хроматолиза, периферического смещения и фрагментации хроматофильной субстанции, гипохромией цитоплазмы

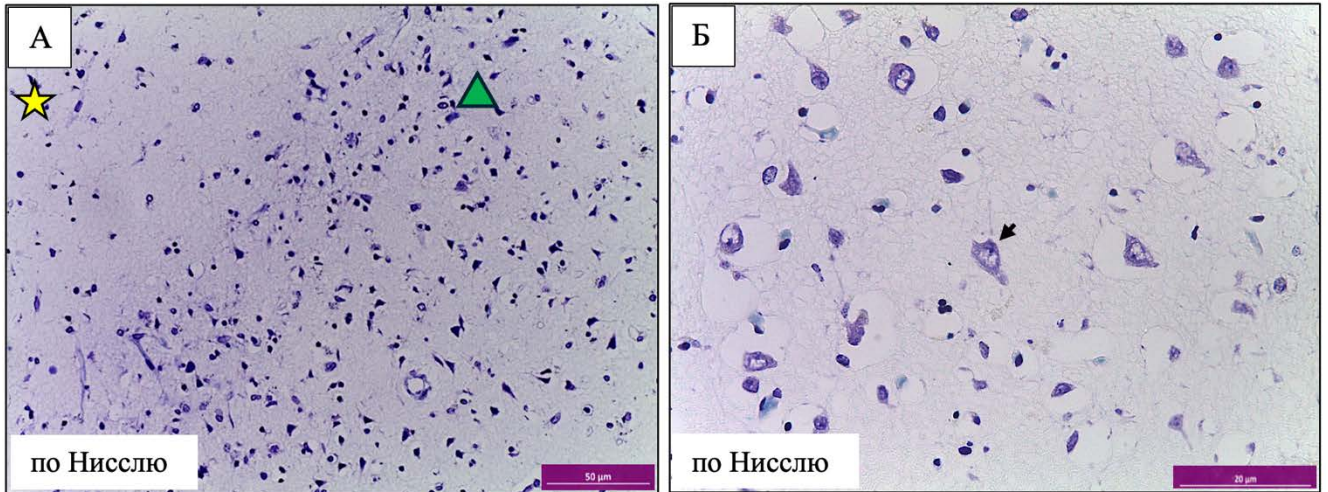


Рисунок 3.10 – Кора головного мозга пациента Е., 68 лет, с ишемическим инсультом, умершего на 7-е сутки от начала заболевания, окрашивание кризильвиолетом по Нисслю, А – увелич. $\times 200$, Б – увелич. $\times 400$. На микрофотографии визуализируется ядро инфаркта (желтая звезда), ограниченное переходной зоной (зеленый треугольник), за которой расположены единичные нейроны (стрелка) с признаками тотального хроматолиза, периферическим смещением ядра и частичной фрагментацией хроматофильной субстанции

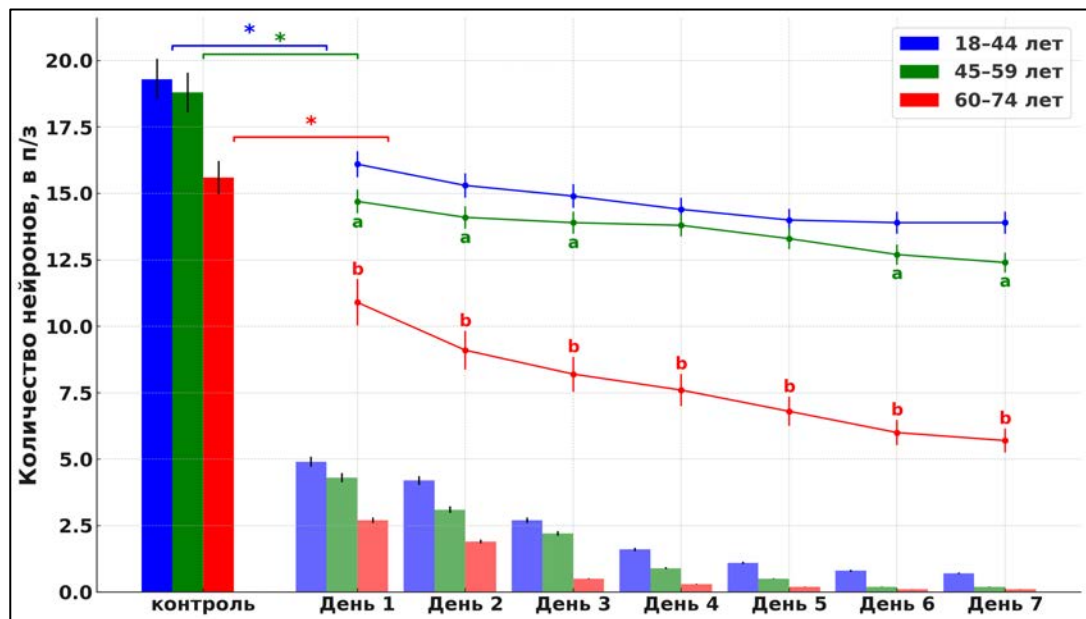


Рисунок 3.11 – Результаты морфометрического анализа. Подсчет количества нейронов (в поле зрения) в условно интактной коре (контроль) и в группе пациентов с ишемическим инсультом молодого (синий), среднего (зеленый) и пожилого (красный) возраста, умерших на первой неделе от начала заболевания график. Столбцы – количество нейронов в ядре инфаркта, цветные кривые – количество нейронов в пенумбре. Статистически значимые различия: * – «контроль» против «День 1», а – «45 – 59» против «18 – 44», b – «60 – 74» против «18 – 44»; $p \leq 0,05$

Таким образом, по мере увеличения срока от дебюта ишемического инсульта наблюдается прогрессирующее сокращение численности нейронов как в ядре инфаркта, так и в зоне пенумбры, причем темпы гибели нейронов пенумбры увеличивались с возрастом, что может быть связано с значительным истощением механизмов нейрогенеза (поддерживающего пул морфологически сохраненных нейронов в группе молодых пациентов в течение длительного времени) и отражает существенное снижение компенсаторно-адаптационного потенциала и пластичности коры головного мозга пациентов пожилой возрастной группы.

При окрашивании по Ниссию образцов условно интактной коры головного мозга лиц молодого возраста наблюдали типичную для неокортекса шестислойная организация с четким разделением на молекулярный, наружный зернистый, пирамидный, внутренний зернистый, ганглионарный и полиморфноклеточный слои. В нейронах отмечали ярко окрашенную хроматофильную субстанцию, представленную базофильными гранулами, ее равномерное распределение без признаков дисперсии (Рисунок 3.12А). В пирамидных нейронах III и V слоев наблюдали равномерно окрашенную хроматофильную субстанцию в перикарионе и четкие контуры ядра с сохраненным ядрышком (Рисунок 3.12Б). В II и IV зернистых слоях отмечали мелкие звездчатые и пирамидные нейроны с умеренно выраженной базофилией цитоплазмы. Отмечали плотное распределение нейронов (подтвержденное морфометрически), активно синтезирующих белок, определенных по высокой интенсивности окрашивания хроматофильной субстанции (Рисунок 3.11). При этом окрашивании также детектировали нейроглиальные элементы: астроциты с бледной цитоплазмой и мелкие микроглиальные клетки.

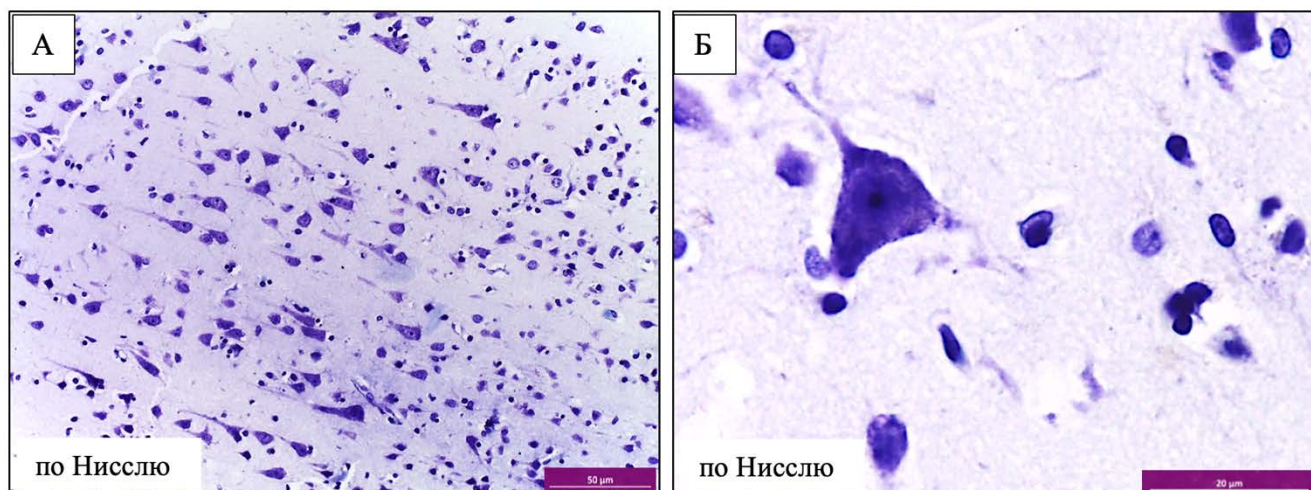


Рисунок 3.12 – Условно интактная кора головного мозга пациента С., 39 лет, окрашивание крезилвиолетом по Ниссля. А – увелич. $\times 200$; на микрофотографии визуализируется слой пирамидных нейронов с ярким окрашиванием хроматофильной субстанции, четкими очертаниями ядра и сохранным ядрышком. Б – увелич. $\times 1000$; на микрофотографии представлен крупный пирамидный нейрон с ярким равномерным окрашиванием перикариона, четко очерченным круглым ядром с ядрышком

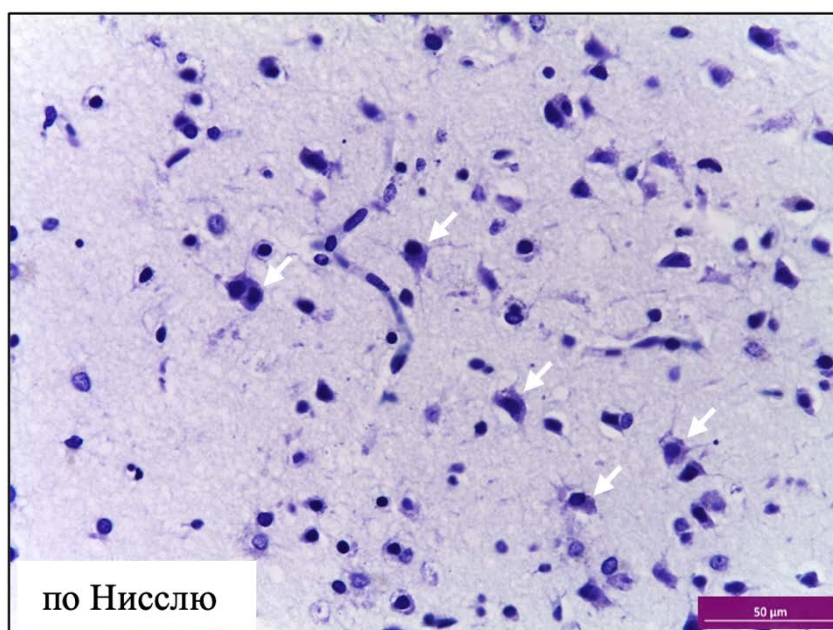


Рисунок 3.13 – Условно интактная кора головного мозга пациента М., 63 лет, окрашивание крезилвиолетом по Ниссля, увелич. $\times 400$. На микрофотографии визуализируются крупные нейроны (белые стрелки) со слабым неравномерным окрашиванием перикариона и бледной цитоплазмой

В условно интактной коре головного мозга лиц пожилого возраста отмечали снижение плотности распределения нейронов по сравнению с молодыми (Рисунок 3.11). В некоторых нейронах обнаружили фрагментацию и частичную дисперсию хроматофильной субстанции, неоднородность цитоплазматического окрашивания и участки умеренной периферической хроматолизной перестройки. В ряде случаев отмечали нейроны с небольшим перикарионом, слабой базофильностью и бледностью цитоплазмы – признаками, характерными для возрастной редукции метаболической активности (Рисунок 3.13).

Резюме

Перечисленные изменения цитологии нейронов при окрашивании крезилвиолетом по Ниссию сочетаются с описанной ранее тенденцией к снижению нейрогенетического и пластического потенциала коры головного мозга по мере старения (см. результаты гистологического анализа), что обуславливает физиологическую инволюцию нервной ткани и уменьшение пула метаболически-активных нейронов. Это указывает на закономерное усиление структурной дезорганизации нейронов, особенно усугубляющееся при инфаркте головного мозга, что проявляется резким снижением количества нейронов, деформацией и дисперсией их хроматофильной субстанции, преобладанием выраженного хроматолиза в зоне пенумбры, в совокупности подтверждающих снижение способности к компенсации и адаптации с возрастом. Следует отметить, что перечисленные изменения морфологической картины у лиц пожилого возраста неуклонно прогрессировали, а наиболее тяжелое повреждение нейронов коры головного мозга в этой группе отмечали на 7-е сутки, что связано с отсутствием компенсаторной активации факторов нейрогенеза и продолжающейся гибелью нейронов пенумбры (некротическая трансформация), что соответствует результатам гистологического исследования.

3.3. Иммуногистохимическая характеристика ангиогенеза

3.3.1. Иммуногистохимическая характеристика распределения CD31- позитивных эндотелиальных клеток

При проведении иммуногистохимического исследования с антителами к CD31 выявили выраженные различия в плотности сосудистой сети коры головного мозга в зависимости от срока смерти и возраста пациентов (Таблица 3.5). В образцах условно интактной коры головного мозга плотность CD31-позитивных кровеносных сосудов практически не различалась при сравнении возрастных групп ($4,8 \pm 0,2$ мелких и средних кровеносных сосудов в поле зрения светового микроскопа у лиц молодого возраста против $4,5 \pm 0,2$ у пожилых), что отражает сохранную микрососудистую организацию (Рисунок 3.14).

Таблица 3.5 – Среднее количество кровеносных сосудов в условно интактной коре головного мозга и в зонах ядра и пенумбры при ишемическом инсульте

количество кровеносных сосудов, в п/з при увелич. $\times 200$						
возраст	молодой (18 – 44 лет)		средний (45 – 59 лет)		пожилой (60 – 74 лет)	
Интактная кора	$4,8 \pm 0,2$		$4,6 \pm 0,2$		$4,5 \pm 0,1$	
Ишемический инсульт	ядро	пенумбра	ядро	пенумбра	ядро	пенумбра
День 1	$1,2 \pm 0,06^*$	$5,4 \pm 0,2^{*#}$	$0,8 \pm 0,04^*$	$4,3 \pm 0,2^{#!}$	$0,4 \pm 0,02^{*!}$	$2,2 \pm 0,1^{*#!}$
День 2	$1,1 \pm 0,05^*$	$8,7 \pm 0,4^{*#}$	$0,7 \pm 0,03^*$	$4,5 \pm 0,2^{#!}$	$0,3 \pm 0,01^{*!}$	$2,1 \pm 0,1^{*#!}$
День 3	$0,9 \pm 0,04^*$	$12,6 \pm 0,6^{*#}$	$0,5 \pm 0,02^*$	$6,4 \pm 0,3^{*#!}$	$0,2 \pm 0,01^{*!}$	$1,8 \pm 0,1^{*#!}$
День 4	$0,7 \pm 0,03^*$	$13,3 \pm 0,6^{*#}$	$0,3 \pm 0,01^*$	$9,2 \pm 0,4^{*#!}$	$0,2 \pm 0,01^{*!}$	$1,9 \pm 0,1^{*#!}$
День 5	$0,4 \pm 0,02^*$	$13,8 \pm 0,6^{*#}$	$0,3 \pm 0,01^*$	$9,7 \pm 0,4^{*#!}$	$0,2 \pm 0,01^{*!}$	$2,0 \pm 0,1^{*#!}$
День 6	$0,3 \pm 0,01^*$	$14,5 \pm 0,6^{*#}$	$0,3 \pm 0,01^*$	$10,1 \pm 0,5^{*#!}$	$0,1 \pm 0,01^{*!}$	$2,1 \pm 0,1^{*#!}$
День 7	$0,4 \pm 0,02^*$	$14,9 \pm 0,7^{*#}$	$0,2 \pm 0,01^*$	$10,8 \pm 0,5^{*#!}$	$0,1 \pm 0,01^{*!}$	$2,2 \pm 0,1^{*#!}$

Примечание: Статистически достоверные различия: * – по сравнению с интактной корой, # – по сравнению с ядром инфаркта, ! – по сравнению с «18 – 44 года» в той же локализации, $p < 0,05$.

В группе пациентов с ишемическим инсультом во всех случаях обнаружили резкое уменьшение количества кровеносных сосудов в ядре инфаркта в первые сутки от начала заболевания: у молодых пациентов данный показатель снижался

до $1,2 \pm 0,06$ в п/з; у лиц среднего возраста – до $0,8 \pm 0,04$ в п/з; а у пожилых – до $0,4 \pm 0,02$ в п/з кровеносных сосудов мелкого и среднего калибра в поле зрения. Таким образом, редукция или полное отсутствие кровеносных сосудов в зоне паннекроза является универсальным и закономерным признаком инфаркта мозга, с некоторым усилением сосудистой деструкции по мере старения.

В контексте изучения компенсаторных механизмов и пластичности нервной ткани в рамках клеточно-тканевого ответа наиболее важным является оценка ангиогенеза в зоне обратимого ишемического повреждения нейронов – пенумбры. Так, у лиц молодого возраста в этой зоне уже на 2 – 3 сутки после развития инфаркта мозга фиксировали отчетливую активацию неоангиогенеза, проявляющуюся увеличением количества CD31-позитивных эндотелиальных клеток и формированием многочисленных мелкокалиберных артериол и гемокапилляров (Рисунок 3.15). Среднее количество кровеносных сосудов в пенумбре у лиц молодого возраста уже к первым суткам достигало $5,4 \pm 0,2$ в п/з, что статистически превышало соответствующие значения как зоны ядра инфаркта, так и условно здоровой коры головного мозга ($p < 0,05$). Это проявлялось формированием мелких, интенсивно окрашенных CD31⁺ кровеносных сосудов с выраженной мембранной реакцией в эндотелиальных клетках, что указывает на гиперактивный ангиогенез. В группе среднего возраста также отмечали перечисленные признаки проангиогенной активности, однако их выраженность была промежуточной (Рисунок 3.16).

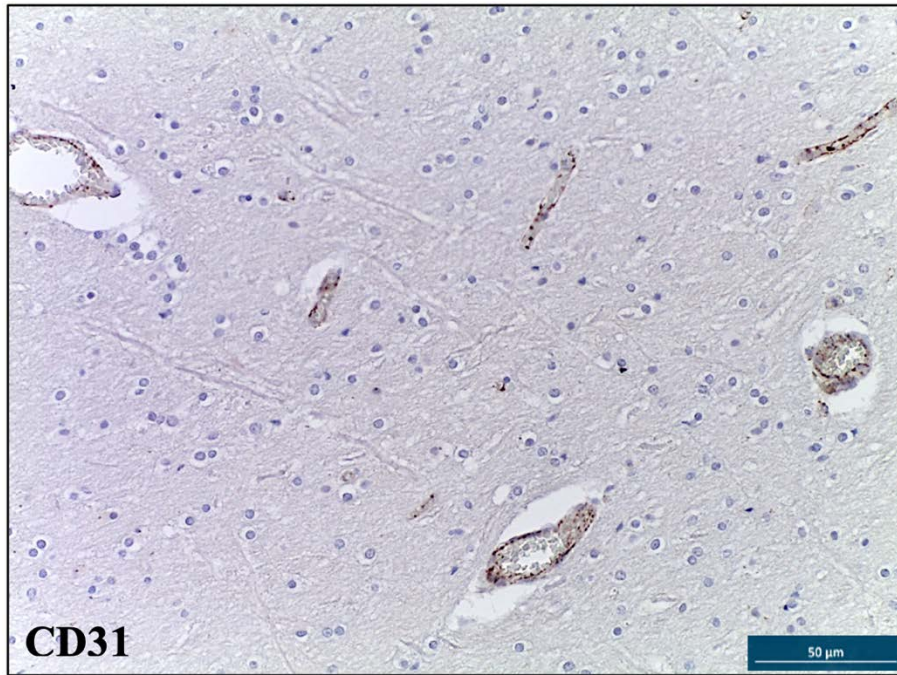


Рисунок 3.14 – Условно интактная кора головного мозга пациента К., 48 лет, иммуногистохимическая реакция с антителами к CD31, увелич. $\times 200$. На микрофотографии представлены окрашенные кровеносные сосуды мелкого и среднего калибров

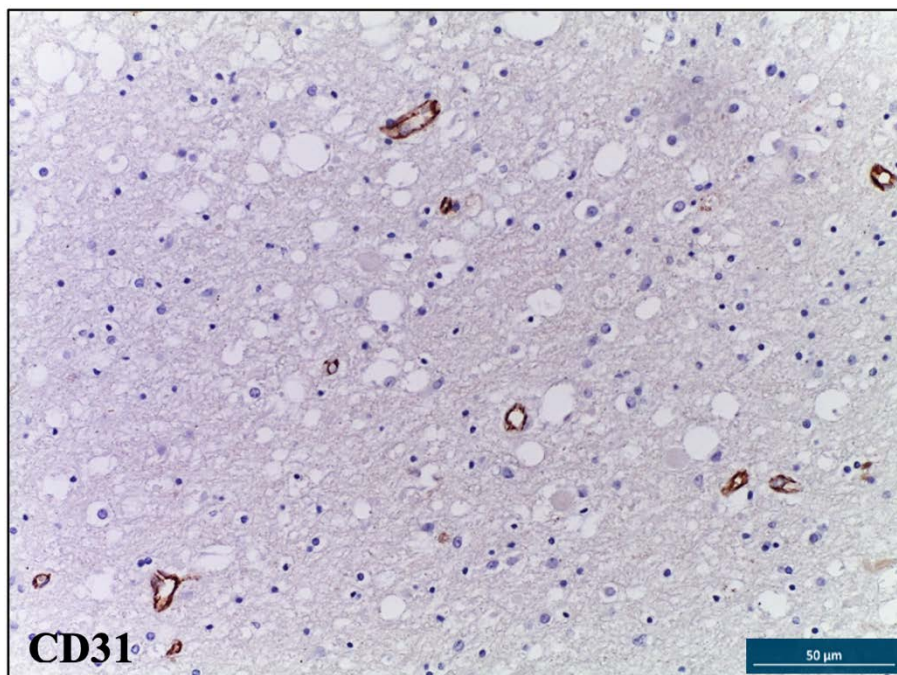


Рисунок 3.15 – Кора головного мозга пациента Ш., 42 лет, с ишемическим инсультом, умершего на 2-е сутки от начала заболевания, иммуногистохимическая реакция с антителами к CD31, увелич. $\times 200$. На микрофотографии визуализируется большое количество интенсивно окрашенных формирующихся мелкокалиберных артериол в зоне пенумбры

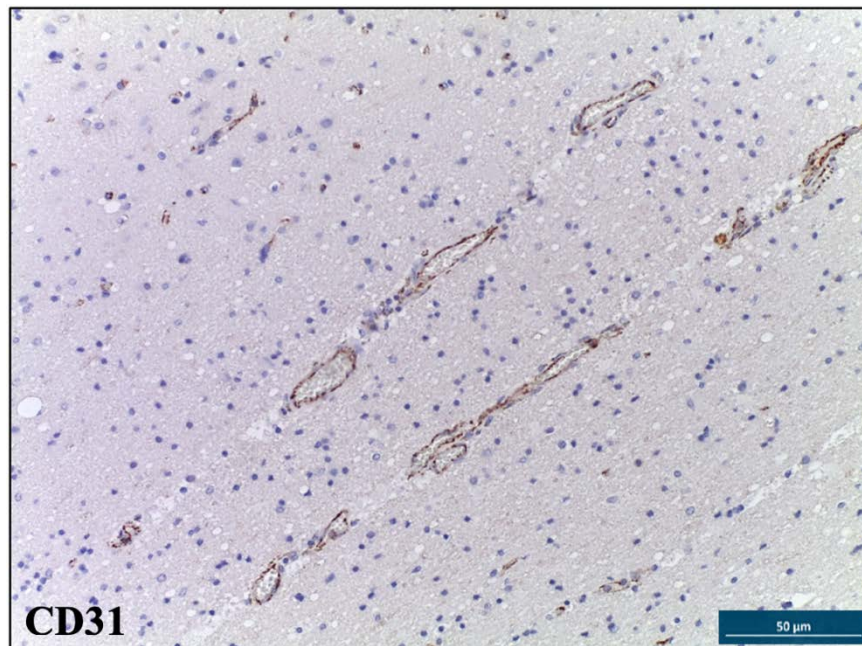


Рисунок 3.16 – Кора головного мозга пациента С., 58 лет, с ишемическим инсультом, умершего на 2-е сутки от начала заболевания, иммуногистохимическая реакция с антителами к CD31, увелич. $\times 200$. На микрофотографии в зоне пенумбры визуализируются интенсивно окрашенные кровеносные сосуды среднего калибра и единичные формирующиеся мелкокалиберные артериолы

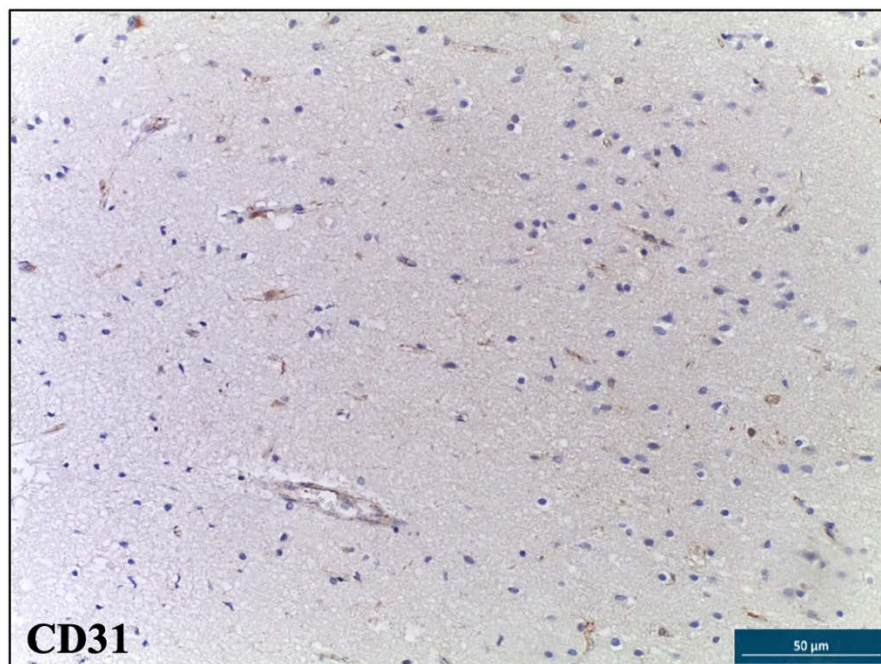


Рисунок 3.17 – Кора головного мозга пациента Я., 71 лет, с ишемическим инсультом, умершего на 3-и сутки от начала заболевания, иммуногистохимическая реакция с антителами к CD31, увелич. $\times 200$. На микрофотографии в зоне пенумбры визуализируются единичные слабо окрашенные кровеносные сосуды среднего калибра

В то же время, у лиц пожилого возраста практически не отмечали признаков активного неоангиогенеза ни на одном из сроков (Рисунок 3.17). Плотность сосудов в пенумбре оставалась минимальной ($2,2 \pm 0,1$ в поле зрения), отмечали появление лишь единичных мелкокалиберных кровеносных сосудов. В отличие от молодых, в когорте пожилых пациентов в течение всей первой недели отсутствовали морфологические признаки компенсаторно-направленной активации ангиогенеза и увеличения коллатерального кровотока.

3.3.2. Иммуногистохимическая характеристика распределения VEGF-A- позитивных клеток

При проведении иммуногистохимического исследования с антителами к VEGF-A обнаружили различия в локализации и интенсивности проангиогенного ответа в зависимости от возраста, зоны поражения и сроков смерти (Таблица 3.6). В образцах условно интактной коры головного мозга экспрессию VEGF-A отмечали в $27,9 \pm 1,3$ % эндотелиальных клеток у молодых, этот показатель постепенно снижался по мере старения. Кроме того, регистрировали единичные VEGF-позитивные нейроны. В совокупности эти характеристики отражают базовый уровень экспрессии VEGF в нормальных условиях (Рисунок 3.18).

При ишемическом инсульте интенсивность VEGF-A-сигналинга существенно различалась в зависимости от локализации и возраста. Так, в ядре инфаркта эндотелиальные клетки немногочисленных сохранившихся сосудов демонстрировали слабое VEGF-A-иммуномечение. Кроме того, в единичных морфологически измененных нейронах этой зоны также регистрировали слабую экспрессию VEGF-A, однако их количество было статистически незначимым. Тем не менее, эти данные подтверждают, что даже в условиях тяжелого ишемического повреждения некоторые нейроны принимают участие в активации эмбрионально заложенных проангиогенных программ.

Таблица 3.6 – Доля VEGF-позитивных эндотелиальных клеток в условно интактной коре головного мозга и в зоне пенумбры при ишемическом инсульте, %

доля VEGF-позитивных эндотелиальных клеток, %			
возраст	молодой (18 – 44 лет)	средний (45 – 59 лет)	пожилой (60 – 74 лет)
Интактная кора	27,9 ± 1,3 [!]	14,2 ± 0,7 [#]	6,6 ± 0,3 ^{#!}
Ишемический инсульт: зона пенумбры			
День 1	54,3 ± 2,5 ^{*!}	41,8 ± 2,0 ^{*#}	13,5 ± 0,6 ^{*#!}
День 2	69,1 ± 3,4 ^{*!}	49,7 ± 2,4 ^{*#}	15,9 ± 0,7 ^{*#!}
День 3	76,0 ± 3,7 ^{*!}	55,2 ± 2,6 ^{*#}	19,4 ± 0,9 ^{*#!}
День 4	71,5 ± 3,5 ^{*!}	61,4 ± 2,9 ^{*#}	18,1 ± 0,8 ^{*#!}
День 5	62,8 ± 3,1 [*]	57,3 ± 2,7 [*]	18,3 ± 0,7 ^{*#!}
День 6	59,5 ± 2,8 [*]	56,5 ± 2,7 [*]	16,7 ± 0,8 ^{*#!}
День 7	53,7 ± 2,6 [*]	49,2 ± 1,9 [*]	15,2 ± 0,6 ^{*#!}
Примечание: Статистически достоверные различия: * – по сравнению с интактной корой, # – по сравнению с «18 – 44 года» на том же сроке, ! – по сравнению с «45 – 59 года» на том же сроке, p < 0,05.			

Не менее важным является распределение иммуномечения антителами к VEGF-A в стенке кровеносных сосудов зоны пенумбры. Здесь наблюдали максимально выраженный проангиогенный ответ у лиц молодого возраста по сравнению с пожилыми. Так, количество VEGF-A-позитивных эндотелиальных клеток достигало пиковых значений преимущественно на 2 – 3 сутки заболевания у молодых пациентов (54,3 ± 2,5 %), что более чем в 2,0 раза превышало показатели условно интактной группы (Рисунок 3.19). Наиболее выраженную экспрессию VEGF-A в эндотелиальных клетках и нейронах наблюдали в зонах с активным формированием новых мелкокалиберных артериол (по данным иммуногистохимического окрашивания антителами к CD31). У пациентов среднего и пожилого возрастов выраженность проангиогенного сигналинга была значительно ниже по сравнению с молодыми (Рисунок 3.20).

Особенно интересными представляются данные о детекции выраженной VEGF-A-экспрессии в нейронах зоны пенумбры, особенно в молодой возрастной группе. Так, практически во всех сохранившихся нейронах обнаружили цитоплазматическое окрашивание VEGF-A, тогда как у пожилых пациентов экспрессия была менее выраженной (Рисунок 3.20). Тем не менее, выявление VEGF-позитивных нейронов в зоне ишемической полутени подтверждает

крупную роль нейронального проангиогенного сигналинга в инициации и поддержании неоангиогенеза, подчеркивая тесное нейроваскулярное взаимодействие как компонент раннего компенсаторного ответа на ишемическое повреждение.

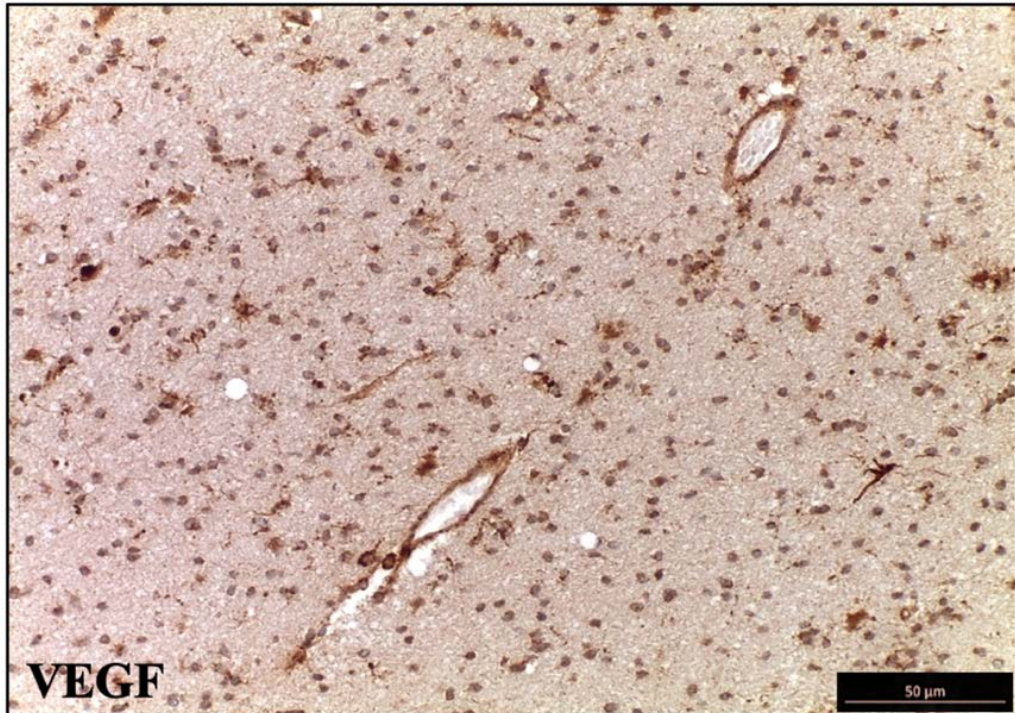


Рисунок 3.18 – Условно интактная кора головного мозга пациента Д., 40 лет, иммуногистохимическая реакция с антителами к VEGF-A, увелич. $\times 200$. На микрофотографии представлены окрашенные кровеносные сосуды среднего калибра

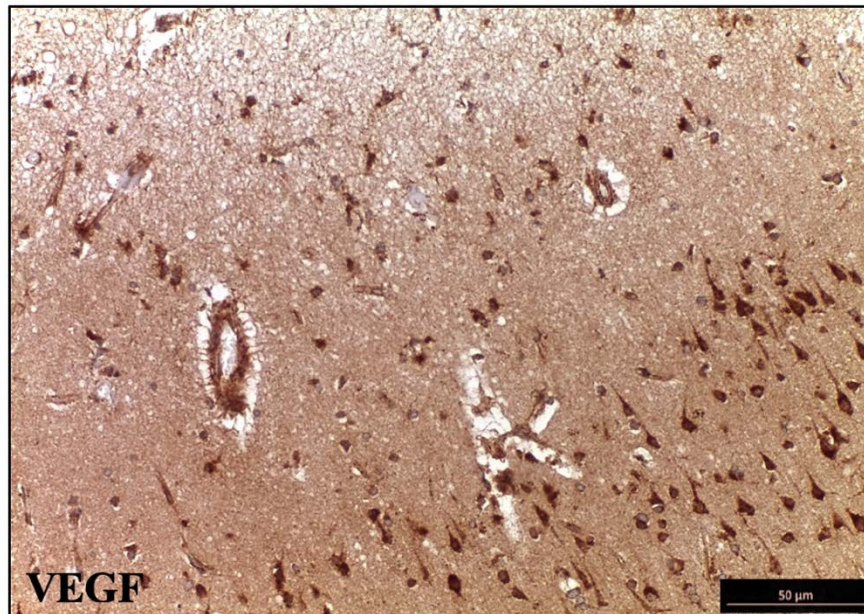


Рисунок 3.19 – Кора головного мозга пациента Ш., 43 лет, с ишемическим инсультом, умершего на 2-е сутки от начала заболевания, иммуногистохимическая реакция с антителами к VEGF-A, увелич. $\times 200$. На микрофотографии визуализируется переходная зона между ядром инфаркта (сверху) и пенумброй (снизу) с ярко окрашенными кровеносными сосудами среднего и мелкого калибров, а также крупными VEGF+ нейронами в зоне пенумбры

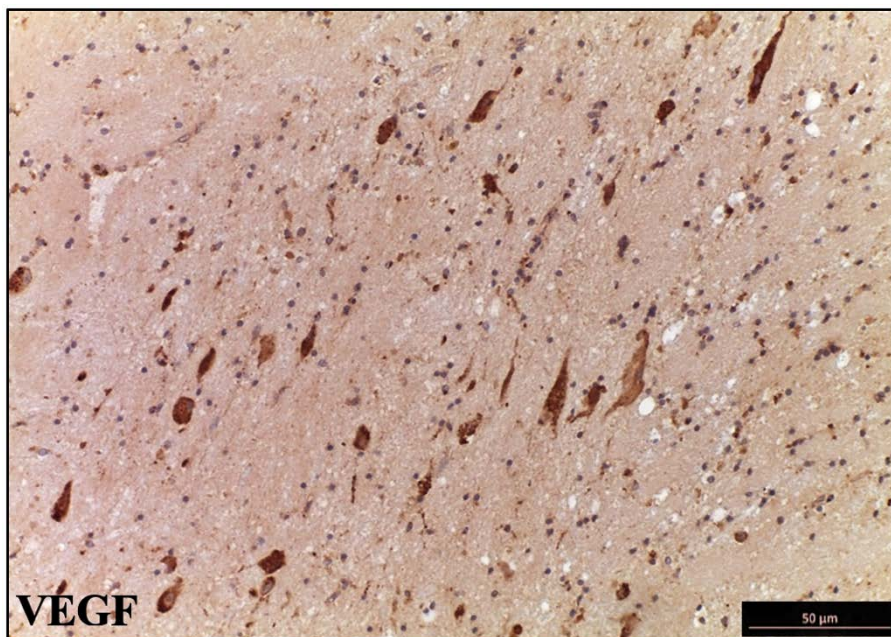


Рисунок 3.20 – Кора головного мозга пациента Ж., 66 лет, с ишемическим инсультом, умершего на 3-е сутки от начала заболевания, иммуногистохимическая реакция с антителами к VEGF-A, увелич. $\times 200$. На микрофотографии визуализируются слабо окрашенные кровеносные сосуды и единичные умеренно окрашенные VEGF+ нейроны в зоне пенумбры

Резюме

Сопоставление данных между возрастными группами демонстрирует четкую тенденцию: у лиц молодого возраста в зоне пенумбры происходит компенсаторная активация ангиогенеза как одного из ведущих механизмов реализации пластичности головного мозга и адаптации к ишемическим условиям с целью протекции обратимо поврежденных нейронов и обеспечения их трофической поддержки, тогда как в среднем и, особенно, пожилом возрастах реактивность микроциркуляторного русла была значительно ограничена, что указывает на глубокую возрастную утрату проангиогенного резерва. Кроме того, обнаружение экспрессии VEGF-A в нейронах, вероятно, является одним из ключевых механизмов контроля проангиогенного ответа и формирования новых кровеносных сосудов, что наглядно демонстрирует нейроваскулярное сопряжение (особенно выраженное у лиц молодого возраста) между механизмами нейро- и ангиогенеза в ответ на ишемическое повреждение. Следует отметить, что наиболее выраженный проангиогенный ответ у лиц молодого возраста наблюдали уже на 2 – 3 сутках (что сочетается с началом репаративной стадии в большинстве случаев по данным морфологического исследования), в то время как в пожилом возрасте на 3-и сутки отмечали лишь незначительное увеличение доли CD31- и VEGF-окрашенных клеток с последующим снижением, что подтверждает предположение об отсутствии адекватной активации проангиогенных механизмов и дисрегуляции нейроваскулярных взаимодействий в рамках концепции возраст-ассоциированного угнетения репаративного и пластического потенциала коры головного мозга при ишемическом повреждении.

3.4. Мультиплексное иммунофлуоресцентное исследование

3.4.1. Мультиплексный анализ ко-локализации NeuN⁺NSE⁺Caspase 3

При анализе данных мультиплексного иммунофлуоресцентного исследования фрагментов головного мозга выявили выраженные возраст-зависимые различия в метаболической активности и степени клеточной гибели нейронов. В условно интактной коре отмечали выраженную экспрессию NeuN в ядрах и перикарионе нейронов, причем дендритные отростки в большинстве случаев практически не окрашивались антителами к этому фактору. Аналогичный паттерн отмечали и при окрашивании на NSE, что свидетельствует о преимущественно центральном распределении этих маркеров (в телах нейронов) в норме (Рисунок 3.21). В то же время, даже в условно интактном головном мозге обнаружили единичные каспаза-позитивные нейроны, что отражает «базальные» уровни апоптотической гибели при обновлении клеточного пула, причем наибольшую долю погибающих нейронов отмечали у пожилых (Рисунок 3.22).

Таблица 3.7 – Среднее количество нейронов NeuN⁺, NSE⁺ и Caspase 3⁺ в пенумбре на первой неделе после ишемического инсульта, в п/з при увелич. ×400

возраст	NeuN ⁺	NSE ⁺	Caspase 3 ⁺	Caspase ⁺ среди NeuN ⁺ (%)
День 1				
18 – 44 лет	11,3 ± 0,5	11,9 ± 0,5	4,8 ± 0,2	42,5 %
45 – 59 лет	7,9 ± 0,3*	8,2 ± 0,4*	6,5 ± 0,3*	82,3 %
60 – 74 лет	4,4 ± 0,2 ^{#!}	4,6 ± 0,1 ^{#!}	3,9 ± 0,1 ^{#!}	88,6 %
День 4				
18 – 44 лет	12,6 ± 0,6	12,9 ± 0,6	5,1 ± 0,2	40,5 %
45 – 59 лет	8,8 ± 0,4*	9,0 ± 0,4*	6,9 ± 0,3*	78,4 %
60 – 74 лет	3,5 ± 0,1 ^{#!}	4,4 ± 0,2 ^{#!}	3,2 ± 0,1 ^{#!}	91,4 %
День 7				
18 – 44 лет	14,1 ± 0,6	14,4 ± 0,7	3,3 ± 0,1	23,4 %
45 – 59 лет	8,3 ± 0,3*	8,9 ± 0,4*	5,6 ± 0,2*	67,5 %
60 – 74 лет	2,7 ± 0,1 ^{#!}	4,0 ± 0,1 ^{#!}	2,6 ± 0,1 ^{#!}	96,3 %
Примечание: Статистически значимые различия: * – «45–59» против «18–44»; # – «60–74» против «18–44»; ! – «60–74» против «45–59»; p < 0,05.				

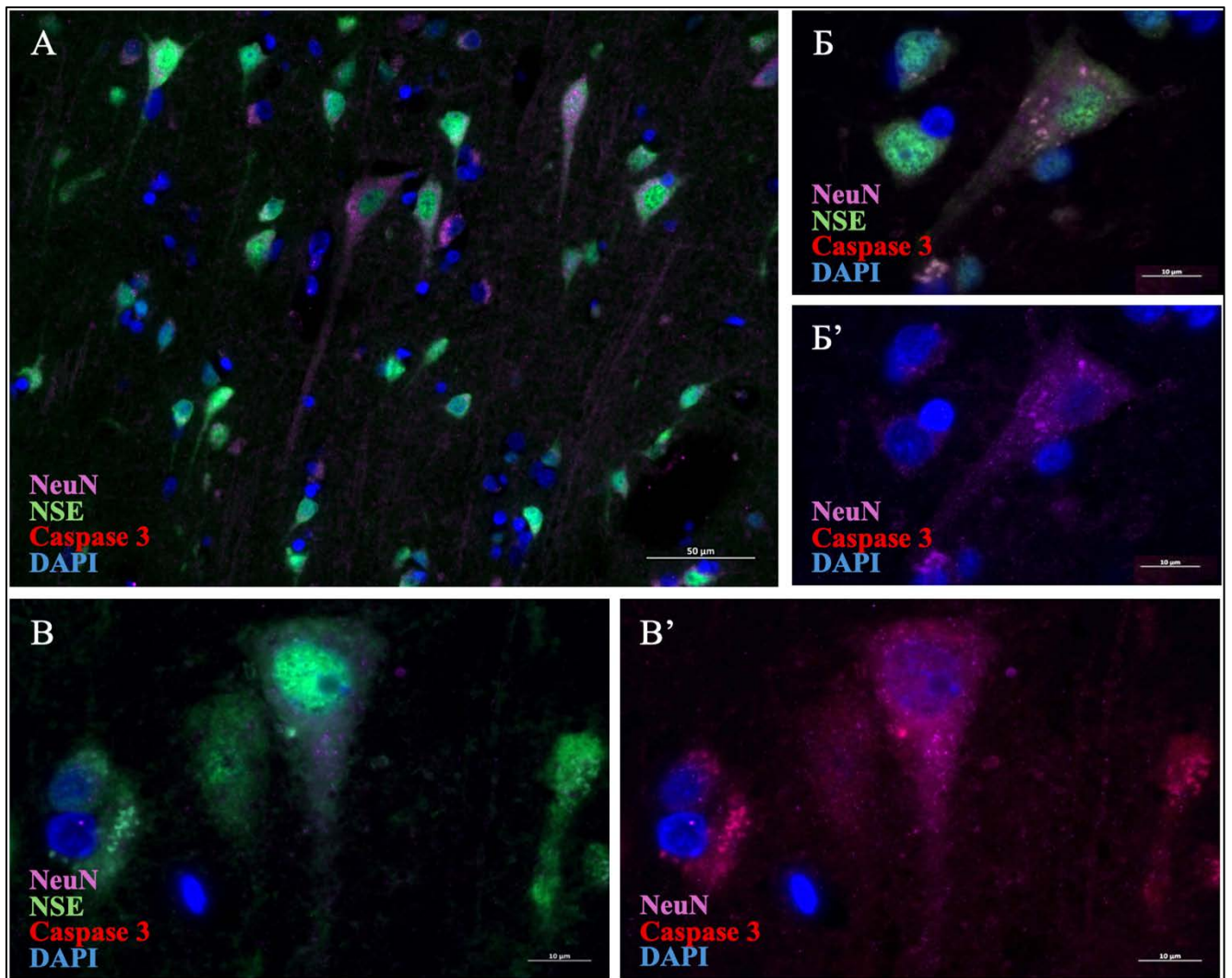


Рисунок 3.21 – Условно интактная кора головного мозга. Мультиплексный иммунофлуоресцентный анализ с антителами к NeuN (фиолетовый сигналинг; Opal 647), NSE (зеленый сигналинг; Opal 488) и Caspase 3 (красный сигналинг; Opal 540), докрасивание ядер – DAPI (синий сигналинг). **А** – Пациент М., 44 лет, в поле зрения – положительно окрашенные зрелые нейроны, идентифицированные на основании характерной цитологии и специфического сигналинга, увелич. $\times 400$; **Б** (**Б'**) – Пациент Ф., 48 лет, в поле зрения – Caspase 3⁻ зрелый нейрон, увелич. $\times 1000$; **В** (**В'**) – Пациент С., 57 лет, в поле зрения – Caspase 3⁻ зрелый нейрон, увелич. $\times 1000$

У пациентов с ишемическим инсультом в ядре инфаркта нейроны, экспрессирующие NeuN или NSE, практически отсутствовали вне зависимости от возраста, что соответствует полной утрате клеточной организации в зоне паннекроза в течение всего срока наблюдения. Полученные результаты подтверждают аналогичные данные, описанные ранее при изучении ядра инфаркта рутинными морфологическими методами.

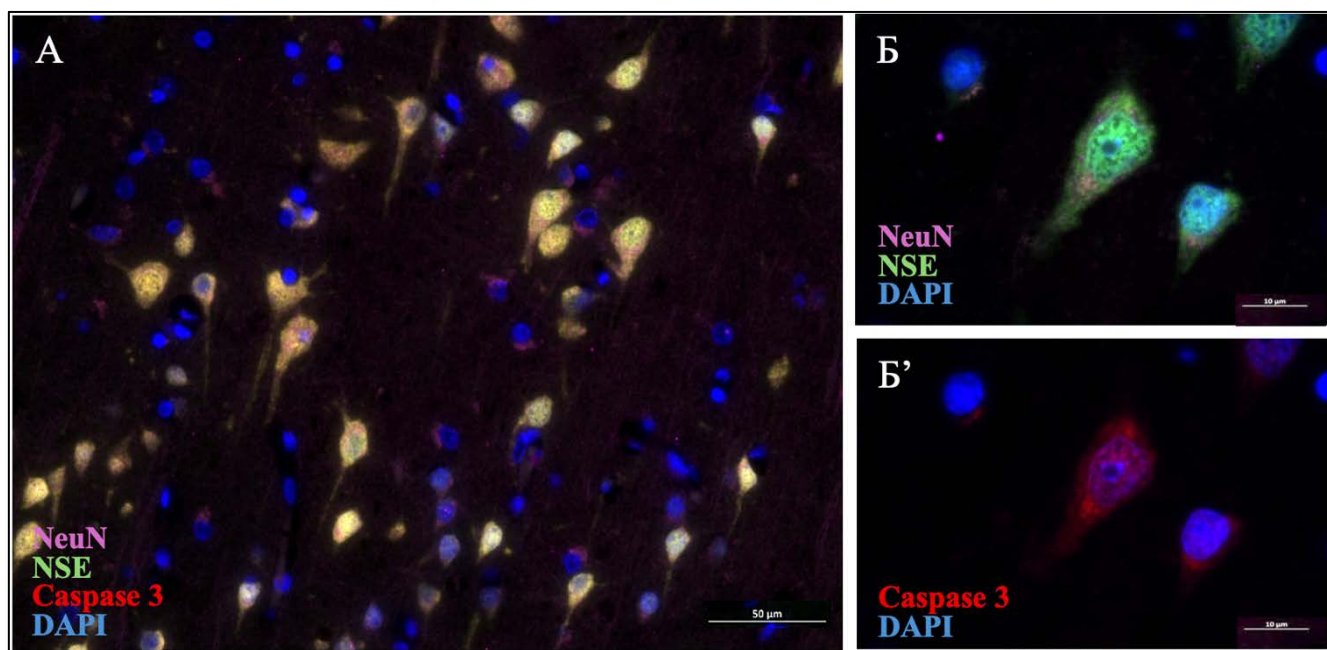


Рисунок 3.22 – Условно интактная кора головного мозга. Мультиплексный иммунофлуоресцентный анализ с антителами к NeuN (фиолетовый сигналинг; Opal 647), NSE (зеленый сигналинг; Opal 488) и Caspase 3 (красный сигналинг; Opal 540), докрасивание ядер – DAPI (синий сигналинг). А – Пациент Ш., 73 лет, в поле зрения – слабое диффузное окрашивание нейронов, в некоторых нейронах – транслокация сигналинга NeuN и NSE в дендритные отростки, увелич. $\times 400$; Б (Б') – Пациент М., 70 лет, в поле зрения – Caspase 3⁺ нейрон, диффузно окрашенный на NeuN и NSE, увелич. $\times 1000$

Наиболее интересное распределение исследуемых маркеров наблюдали в зоне пенумбры, где уже в первые сутки после ишемического повреждения количество метаболически активных нейронов, одновременно экспрессирующих NeuN и NSE, значительно снижалось. Следует отметить, что результаты мультиплексного анализа демонстрировали большее количество поврежденных нейронов (подсчитанных по экспрессии в них каспазы 3) по сравнению с рутинными методами морфологического анализа (см. результаты подсчета количества нейронов при окрашивании крезилвиолетом по Нисслю), что указывает на больший объем ишемического поражения за счет «скрытого» повреждения цитологически целостных нейронов, в которых уже произошла активация апоптотического каскада (Рисунок 3.23). Особого внимания заслуживают результаты подсчета отношения Caspase 3⁺ клеток среди NeuN⁺ нейронов,

отражающего процент поврежденных нейронов, в которых уже произошла активация апоптотического каскада несмотря на сохраненную морфологию. Так, наибольшее количество Caspase3⁺NeuN⁺ нейронов обнаружили в старших возрастных группах, а у лиц пожилого возраста данный показатель достигал 88,6 % уже на первых сутках после клинической манифестации ишемического инсульта (Таблица 3.7). На основании полученной информации можно говорить о высокой диагностической ценности (высоких уровнях чувствительности и специфичности) мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа, позволяющего уточнить границы между ядром инфаркта, пенумброй и интактной корой головного мозга при патоморфологическом исследовании аутопсийного материала пациентов с ишемическим инсультом.

В подтверждение вышесказанного были получены данные о том, что в коре головного мозга пациентов с ишемическим инсультом практически во всех нейронах зоны пенумбры отмечали аномальное распределение NeuN с трансформацией ядерного сигнала в диффузное цитоплазматическое распределение вплоть до его обнаружения в дендритных отростках, что может быть связано с нарушением ядерной проницаемости и специфического связывания NeuN (Рисунок 3.23). Другой особенностью стала регистрация клеток глиального происхождения с фенотипом NeuN⁻NSE⁺, которые обнаружили преимущественно у лиц пожилого возраста, что согласуется с данными о реактивной трансформации элементов нервной ткани и перераспределении метаболических функций при утрате нейронных связей в рамках реализации пластического потенциала коры головного мозга. Не исключено, что детекция NSE-сигналинга за пределами нейронов может быть также связана с частичной дислокацией NSE⁺ фрагментов разрушенных нейронов в цитоплазму соседних глиальных клеток (Рисунок 3.24).

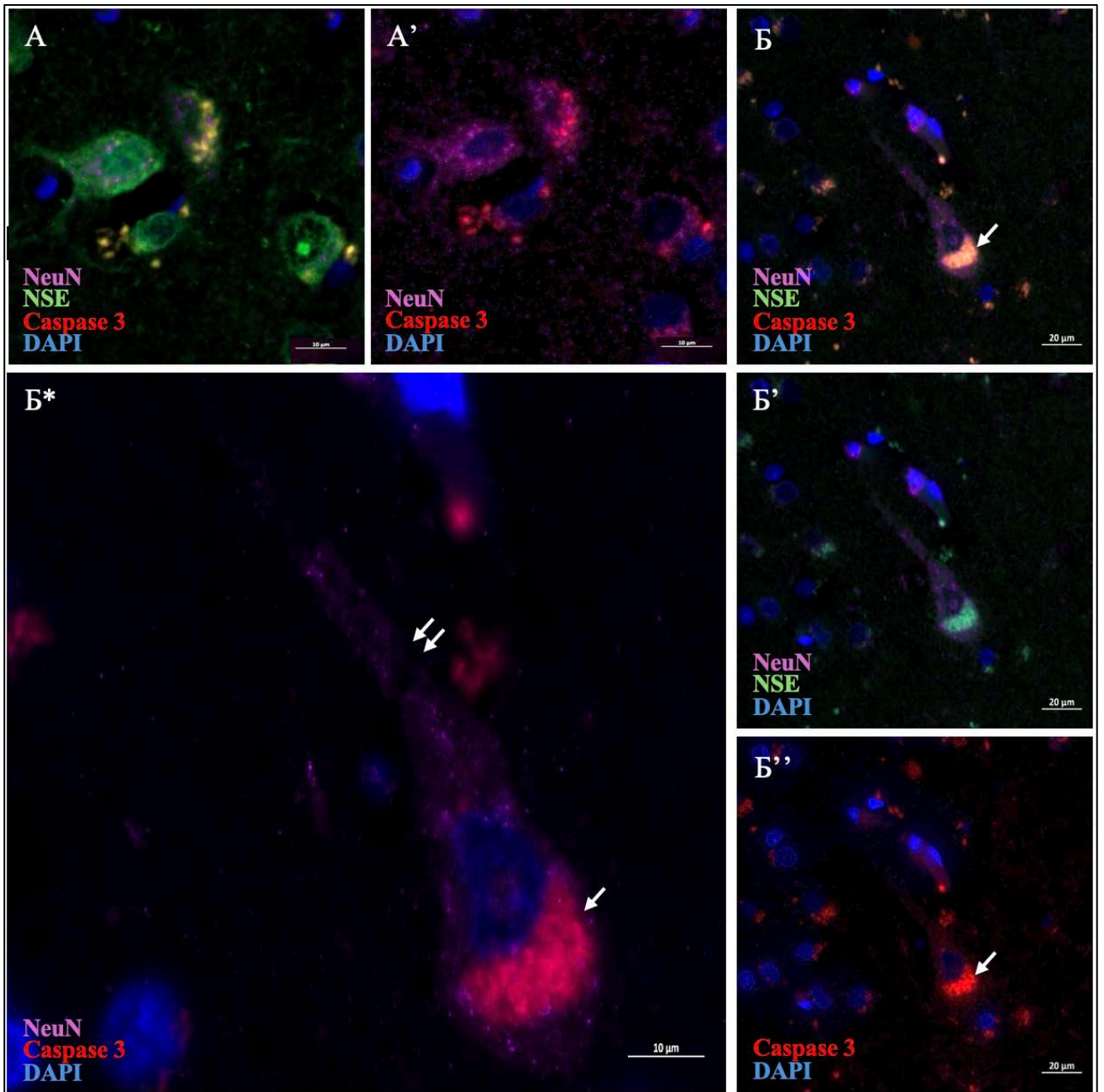


Рисунок 3.23 – Кора головного мозга пациентов через сутки после клинической манифестации ишемического инсульта. Мультиплексный иммунофлуоресцентный анализ с антителами к NeuN (фиолетовый сигналинг; Opal 647), NSE (зеленый сигналинг; Opal 488) и Caspase 3 (красный сигналинг; Opal 540), докрасивание ядер – DAPI (синий сигналинг). А – Пациент С., 42 лет, в поле зрения – ярко окрашенные на NeuN и NSE нейроны, в части из которых обнаружен яркий пестрый сигналинг Caspase 3 (А'), увелич. $\times 1000$; Б – Пациент Ж., 69 лет, в поле зрения – крупный пирамидный нейрон, слабо окрашенный антителами к NeuN и NSE (Б'), в перикарионе которого обнаружен выраженный сигналинг Caspase 3 (Б'', Б*; белая стрелка), а дендритный отросток деформирован (двойная стрелка), увелич. $\times 1000$

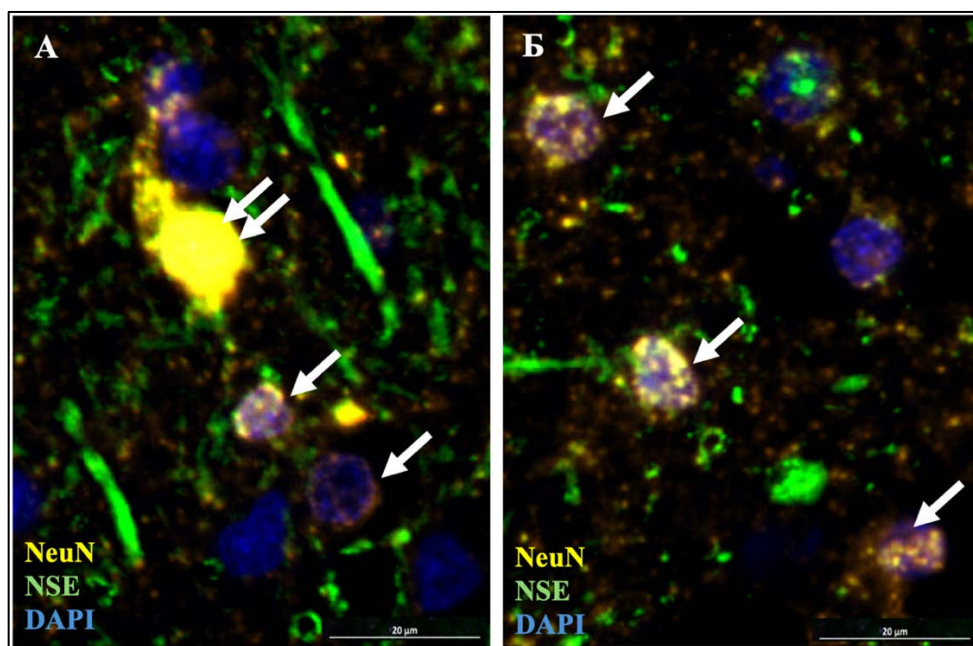


Рисунок 3.24 – Кора головного мозга пациента Т., 54 лет, с ишемическим инсультом, умершего на 3-и сутки от начала заболевания. Мультиплексный иммунофлуоресцентный анализ с антителами к NeuN (желтый сигналинг; Opal 647) и NSE (зеленый сигналинг; Opal 488), докрасивание ядер – DAPI (синий сигналинг); увелич. $\times 800$. На изображениях А и Б представлены мелкие диффузно окрашенные клетки (стрелка), активно накапливающие в цитоплазме NeuN⁺ и NSE⁺ фрагменты соседних поврежденных нейронов (двойная стрелка)

При сравнительной мультиплексной иммунофлуоресцентной оценке ко-локализации NeuN⁺NSE⁺Caspase3 между возрастными группами было обнаружено, что среди молодых пациентов с ишемическим инсультом в зоне пенумбры коры головного мозга преобладали нейроны с сохраненной цитологией, в которых наблюдали интенсивную экспрессию NeuN и NSE уже на ранних сроках после клинической манифестации заболевания (Рисунок 3.23, Рисунок 3.25). Менее выраженный сигналинг NeuN и NSE в этой группе отмечали даже при поздней гибели пациента (до 7 суток), что отражает гиперактивацию в нейронах метаболических (гликолитических и белок-синтетических) и пластических механизмов, направленных на адаптацию (на ранних сроках) и репарацию. Описанную ранее активацию фактора терминации апоптотического каскада (Caspase 3) в перикарионе некоторых нейронов зоны пенумбры отмечали уже на первых сутках, однако доля таких клеток была существенно ниже, чем в группах

более старшего возраста (Таблица 3.7, Рисунок 3.23). В ряде случаев при максимальном увеличении конфокального микроскопа по характеру распределения сигналинга NeuN и NSE определяли деструкцию дендритных отростков единичных нейронов (Рисунок 3.25).

В средней возрастной группе распределение исследуемых маркеров демонстрировало схожие тенденции, однако количество клеток, окрашенных антителами к NeuN и NSE, было достоверно ниже (более чем в 1,5 раза) уже в первый день от клинической манифестации, в то время как число Caspase 3⁺ нейронов превышало аналогичные показатели группы молодого возраста в течение всей первой недели с незначительным увеличением к 7-м суткам (Рисунок 3.25).

У лиц пожилого возраста наблюдали наименьшее количество функционально сохраненных метаболически-активных нейронов. Так, в течение всей первой недели после клинической манифестации ишемического инсульта в данной возрастной группе отмечали возрастание доли Caspase 3⁺ нейронов, в то время как общее количество нейронов (NeuN⁺NSE⁺) в зоне пенумбры неуклонно уменьшалось: уже в первые сутки в пенумбре у пожилых пациентов практически отсутствовали NeuN-позитивные нейроны, а по мере увеличения срока от начала заболевания наблюдали тенденцию к дальнейшему угнетению экспрессии NeuN и NSE в единичных оставшихся клетках (Рисунок 3.26). При этом доля дегенерирующих нейронов, позитивных на Caspase 3, была максимальной у пожилых при сравнении между возрастными группами, достигая практически 100% всех сохранившихся нейронов зоны пенумбры к 7-му дню после клинической манифестации, что подтверждает полученные ранее данные о некротической трансформации зоны пенумбры в отсроченном периоде, наиболее выраженной в старших возрастных группах (Таблица 3.7). Компенсаторная реакция, характерная для лиц молодого возраста, в пожилой группе практически полностью нивелировалась, что указывает на резкое снижение пластичности и метаболического потенциала нервной ткани.

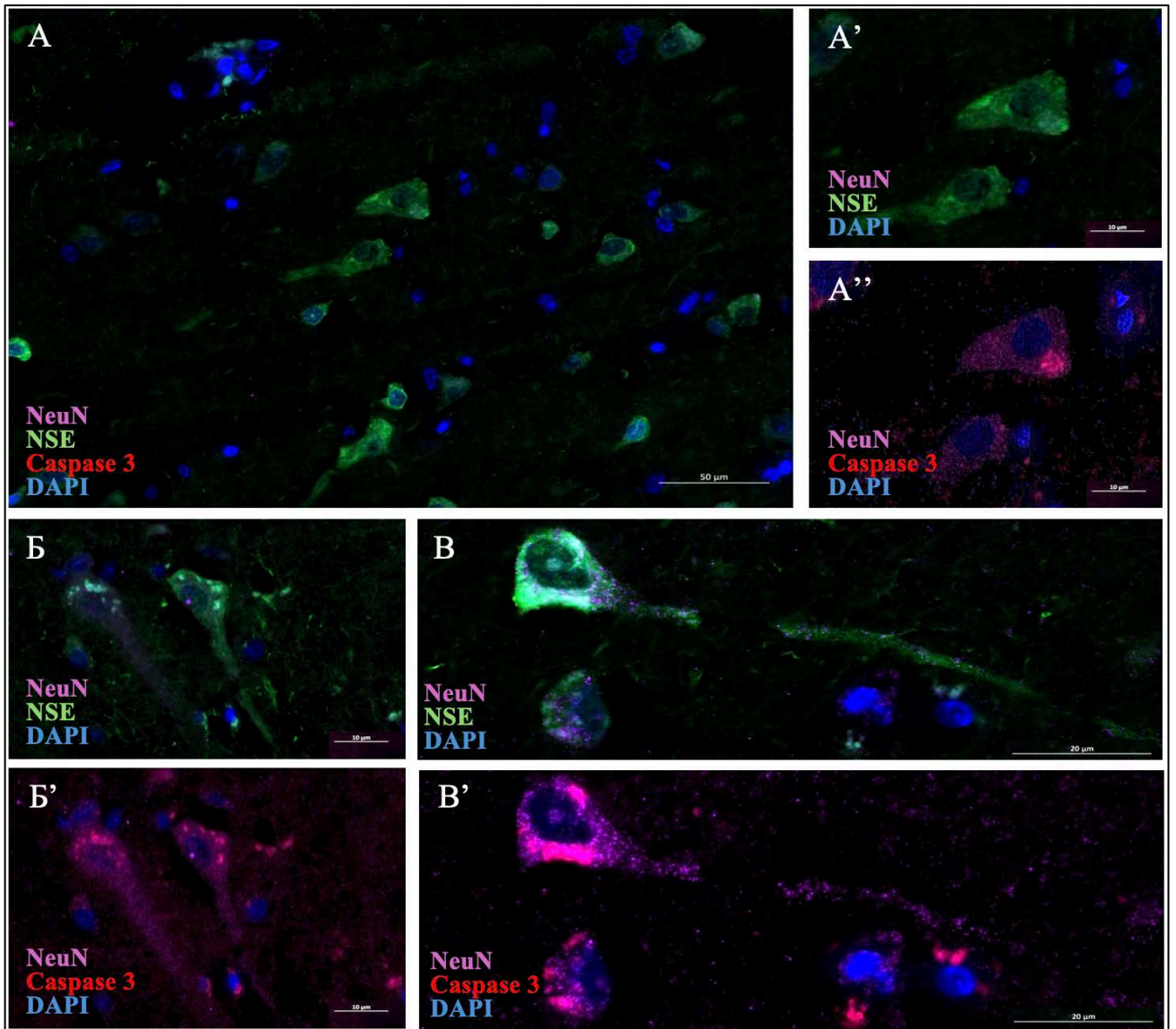


Рисунок 3.25 – Кора головного мозга пациентов с ишемическим инсультом через 4 дня после манифестации заболевания, зона пенумбры. Мультиплексный иммунофлуоресцентный анализ с антителами к NeuN (фиолетовый сигналинг; Opal 647), NSE (зеленый сигналинг; Opal 488) и Caspase 3 (красный сигналинг; Opal 540), докрасивание ядер – DAPI (синий сигналинг). А – Пациент М., 44 лет, в поле зрения – яркое равномерное распределение сигналинга NeuN и NSE в телах пирамидных нейронов (А'), слабая точечная реакция с антителами к Caspase 3 (А''), увелич. $\times 400$; Б – Пациент С., 68 лет, в поле зрения – два крупных нейрона, диффузно окрашенных антителами к NeuN и NSE, окрашенные дендритные отростки фрагментированы, в перикарионе – точечный сигналинг Caspase 3 (Б'), увелич. $\times 1000$; В (В') – Пациент Т., 53 лет, в поле зрения – ярко окрашенный NeuN⁺NSE⁺ нейрон с длинным фрагментированным дендритным отростком, в перикарионе – яркий сигналинг Caspase 3, увелич. $\times 1000$

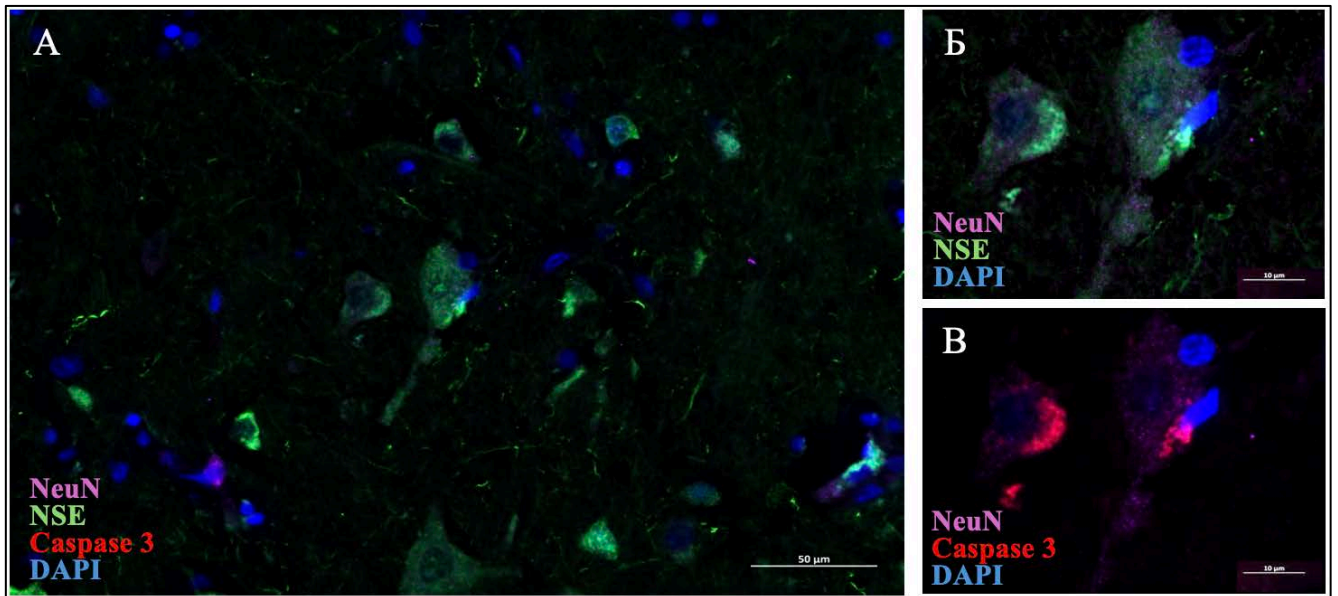


Рисунок 3.26 – Кора головного мозга пациентов с ишемическим инсультом через 4 дня после манифестации заболевания, зона пенумбры. Мультиплексный иммунофлуоресцентный анализ с антителами к NeuN (фиолетовый сигналинг; Opal 647), NSE (зеленый сигналинг; Opal 488) и Caspase 3 (красный сигналинг; Opal 540), докрасивание ядер – DAPI (синий сигналинг). А – Пациент 3., 74 лет, в поле зрения – слабое неравномерное NeuN- и NSE-окрашивание единичных нейронов с измененной морфологией, транслокация сигналинга NeuN и NSE в деформированные дендритные отростки (Б), яркое свечение Caspase 3 в телах нейронов (В), увелич. $\times 400$ и $\times 1000$

Резюме

Результаты мультиплексного анализа демонстрируют четкую возраст-ассоциированную динамику: у молодых пациентов отмечается выраженная компенсаторная активация NeuN и NSE при относительно низкой степени апоптотической деградации; в среднем возрасте компенсаторный ответ ослаблен, а активация каспазы-3 более выраженная. У пожилых пациентов не происходит значимого восстановления метаболической активности единичных сохранившихся нейронов зоны пенумбры, в которых тем не менее уже инициирована программированная клеточная гибель путем апоптоза. Выявленный молекулярный паттерн отражает утрату метаболической активности нейронов, снижение нейрогенетического и пластического потенциала, а также неспособность коры головного мозга к адекватной компенсации и репарации индуцированных ишемией

изменений, особенно выраженных в старших возрастных группах. Следует отметить, что полученные при мультиплексном иммунофлуоресцентном исследовании данные сочетаются с результатами гистологического анализа: наиболее резкое снижение численности нейронов у молодых и средних пациентов происходит в первые дни после манифестации заболевания преимущественно в острой (ишемически-некротической) и подострой (воспалительно-деструктивной) морфологических стадиях. В отсроченном периоде у лиц молодого возраста происходит активация механизмов репарации, а именно – усиление нейрогенетического сигналинга и метаболической активности нейронов в зоне пенумбры, в то время как у пожилых эти процессы остаются угнетенными.

3.4.2. Мультиплексный анализ ко-локализации CD31⁺CD105⁺TGF-β

При мультиплексном иммунофлуоресцентном исследовании с антителами к CD105, TGF-β1 и CD31 в коре головного мозга пациентов с ишемическим инсультом выявили возраст-ассоциированные различия проангиогенного ответа в эндотелии кровеносных сосудов. Во всех случаях в условно интактной коре отмечали сопоставимые уровни TGF-β1-позитивных эндотелиальных клеток, при этом количество кровеносных сосудов (окрашенных на CD31) уменьшалось с возрастом (от максимально выраженного у молодых до минимального у пожилых), а число CD105⁺CD31⁺ эндотелиальных клеток было несколько ниже в пожилой группе по сравнению с лицами молодого и среднего возрастов (Таблица 3.8, Рисунок 3.27).

У лиц молодого возраста уже на 1-е сутки после клинической манифестации ишемического инсульта регистрировали выраженный ангиогенный ответ, направленный на компенсацию и адаптацию зоны гипоперфузии: число CD105⁺CD31⁺ эндотелиальных клеток неуклонно возрастало до 5-го дня, когда более чем вдвое превышало исходные значения, что свидетельствует о стойкой активации большинства эндотелиальных клеток. В то же время, количество CD31-

окрашенных кровеносных сосудов в первые дни несколько уменьшалось по сравнению с показателями условно интактной коры, однако к 5 – 7 суткам не только восстанавливалось, но и превышало исходный уровень, что указывает на выраженную проангиогенную реакцию, интенсивный неоангиогенез, ремоделирование и относительное увеличение количества кровеносных сосудов мелкого и среднего калибра к концу первой недели после клинической манифестации ишемического инсульта. Количество TGF- β 1⁺CD31⁺ эндотелиальных клеток превышало значения интактной коры более чем в два раза, достигая максимума уже на 2-е сутки, после чего постепенно снижалось, оставаясь, тем не менее, на уровне выше исходного (Таблица 3.8, Рисунок 3.28).

Таблица 3.8 – Доля CD105⁺ эндотелиальных клеток в сосудистой стенке, %

соотношение CD105 ⁺ / CD31 ⁺ × 100%			
возраст	молодой (18 – 44 лет)	средний (45 – 59 лет)	пожилой (60 – 74 лет)
Интактная кора	12,4 ± 0,6 [!]	8,4 ± 0,4 [#]	5,3 ± 0,2 ^{#!}
Ишемический инсульт			
День 1	27,4 ± 1,3 ^{*!}	15,9 ± 0,7 ^{*#}	7,6 ± 0,3 ^{*#!}
День 2	37,5 ± 1,6 ^{*!}	22,3 ± 1,0 ^{*#}	8,9 ± 0,4 ^{*#!}
День 3	45,4 ± 2,1 ^{*!}	25,7 ± 1,1 ^{*#}	9,4 ± 0,4 ^{*#!}
День 4	38,6 ± 1,8 ^{*!}	31,4 ± 1,5 ^{*#}	9,8 ± 0,3 ^{*#!}
День 5	43 ± 2,0 ^{*!}	28,9 ± 1,3 ^{*#}	9,9 ± 0,4 ^{*#!}
День 6	39,1 ± 1,8 ^{*!}	25,1 ± 1,2 ^{*#}	8,7 ± 0,3 ^{*#!}
День 7	32,5 ± 1,5 ^{*!}	21,8 ± 1,0 ^{*#}	7,2 ± 0,3 ^{*#!}

Примечание: Статистически достоверные различия: * – по сравнению с интактной корой, # – по сравнению с «18 – 44 года» на том же сроке, ! – по сравнению с «45 – 59 года» на том же сроке, p < 0,05.

У лиц среднего возраста ответ эндотелиальных клеток на ишемическое повреждение был менее выраженным и более продолжительным по сравнению с молодыми. Так, при мультиплексном иммунофлуоресцентном анализе отмечали постепенное увеличение количества CD105⁺CD31⁺ эндотелиальных клеток до значений, превышающих таковые в условно интактной группе более чем в 1,4 раза к 5-м суткам, однако амплитуда этих изменений была заметно меньше, чем у молодых. Кроме того, количество CD31⁺ кровеносных сосудов на протяжении всей первой недели от начала заболевания не достигало значений интактной коры: после

снижения этого показателя на 1 – 2 сутках отмечали лишь частичное усиление ангиогенеза и восстановление числа CD31⁺ кровеносных сосудов, плотность распределения которых оставалась значительно снижена по сравнению с условным контролем.

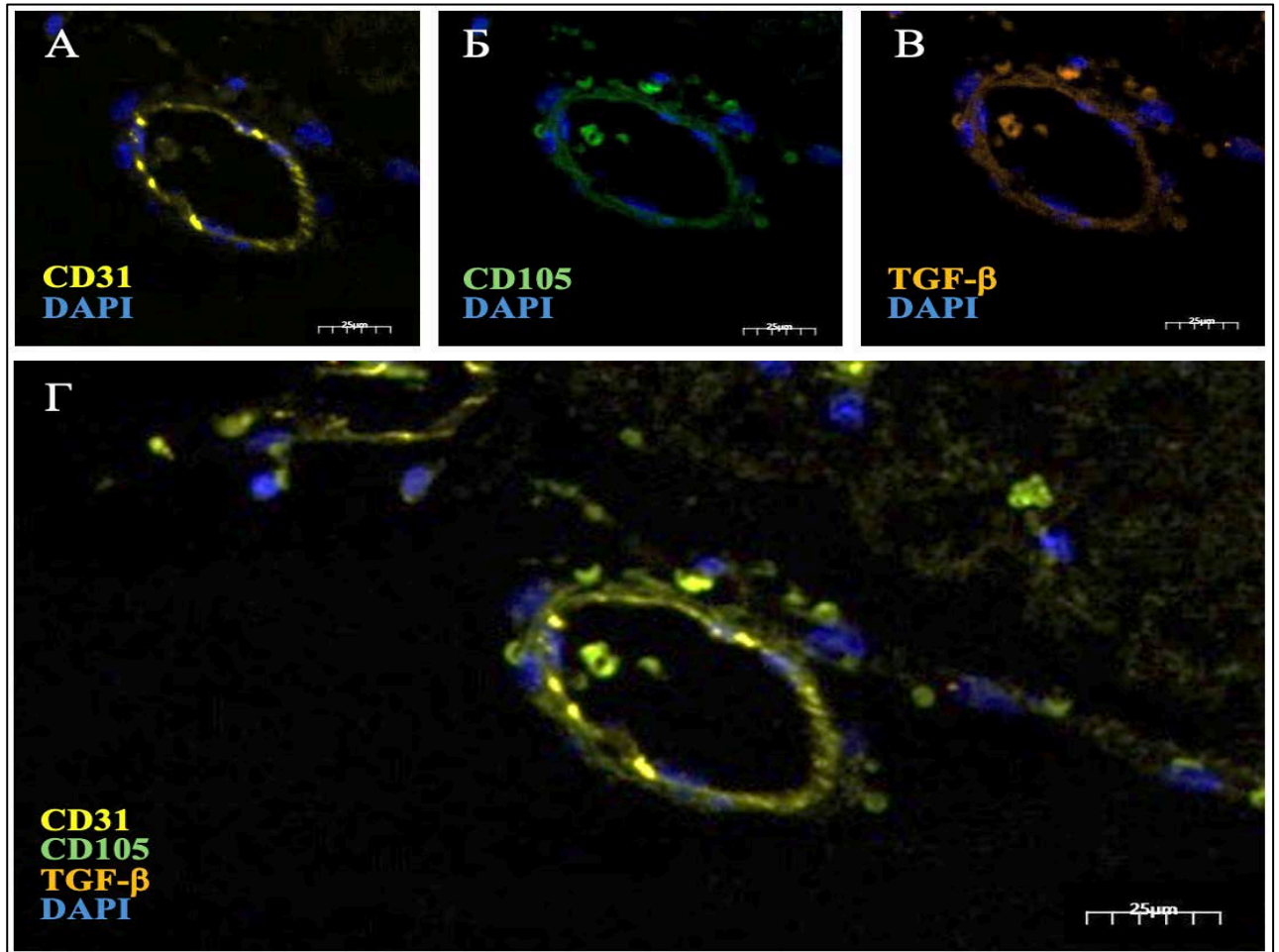


Рисунок 3.27 – Условно интактная кора головного мозга пациента Д., 52 лет. Мультиплексный иммунофлуоресцентный анализ с антителами к CD31 (А; желтый сигналинг; Opal 540), CD105 (Б; зеленый сигналинг; Opal 488) и TGF-β (В; оранжевый сигналинг; Opal 647), докрасивание ядер – DAPI (синий сигналинг); Г – совмещенный; увелич. ×400

При сравнении сигналинга TGF-β1 в зависимости от срока от начала заболевания наблюдали его двухфазное усиление. Так, число TGF-β1⁺CD31⁺ эндотелиальных клеток резко увеличивалось на ранних сроках после клинической манифестации, достигая максимума уже на 1 – 2 сутках. Затем происходило

некоторое снижение доли TGF-β1⁺ клеток, а на более поздних сроках (к 5 – 6 суткам) наблюдали повторное увеличение числа TGF-β1⁺CD31⁺ клеток (Таблица 3.8, Рисунок 3.29).

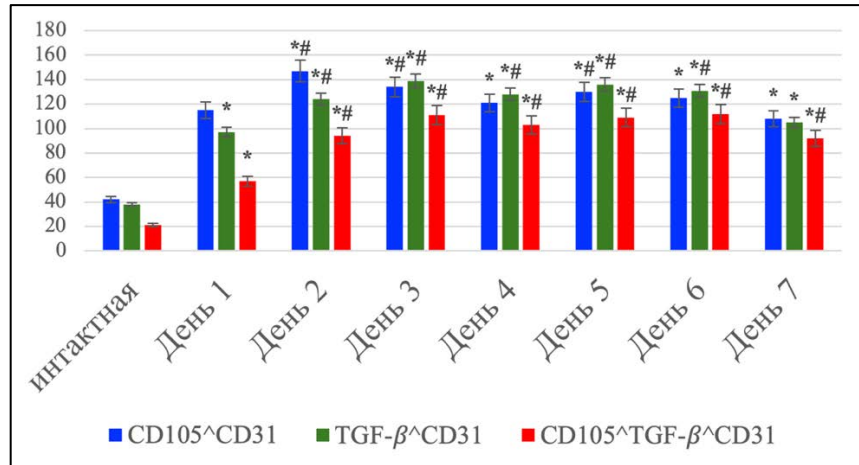


Рисунок 3.28 – Количество эндотелиальных клеток, окрашенных при мультиплексном флуоресцентном исследовании с антителами к CD105, TGF-β и CD31 в фрагментах коры головного мозга в условно интактной группе и у пациентов с ишемическим инсультом молодого возраста в течение первой недели от начала заболевания, график. Статистически значимые различия: * – «интактная» против «День 1», # – по сравнению с «День 1»; $p \leq 0,05$

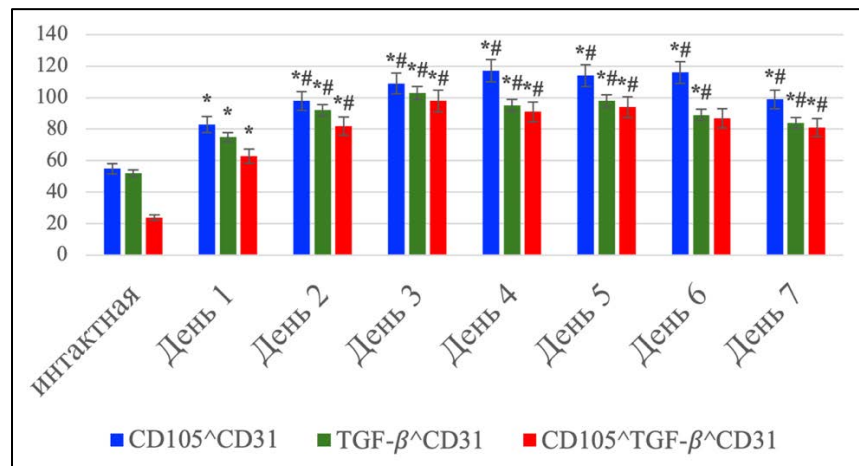


Рисунок 3.29 – Количество эндотелиальных клеток, окрашенных при мультиплексном флуоресцентном исследовании с антителами к CD105, TGF-β и CD31 в фрагментах коры головного мозга в условно интактной группе и у пациентов с ишемическим инсультом среднего возраста в течение первой недели от начала заболевания, график. Статистически значимые различия: * – «интактная» против «День 1», # – по сравнению с «День 1»; $p \leq 0,05$

В группе пожилого возраста наблюдали наибольшую редукцию микроциркуляторного русла и выраженную депрессию механизмов проангиогенного ответа: уже на 1-е сутки отмечали резкое снижение числа $CD105^+CD31^+$ эндотелиальных клеток по сравнению с показателями в условно интактной коре. В течение всей первой недели после клинической манифестации ишемического инсульта доля этих клеток неуклонно сокращалась, достигая к 7-м суткам уровня вдвое ниже исходного. При подсчете $TGF-\beta^+CD31^+$ эндотелиальных клеток в этой группе отмечали кратковременный монофазный подъем на 1-е сутки с последующим снижением: начиная с 3-х суток количество этих клеток неуклонно сокращалось и к концу первой недели было практически вдвое ниже исходных значений (Таблица 3.8, Рисунок 3.30, Рисунок 3.31).

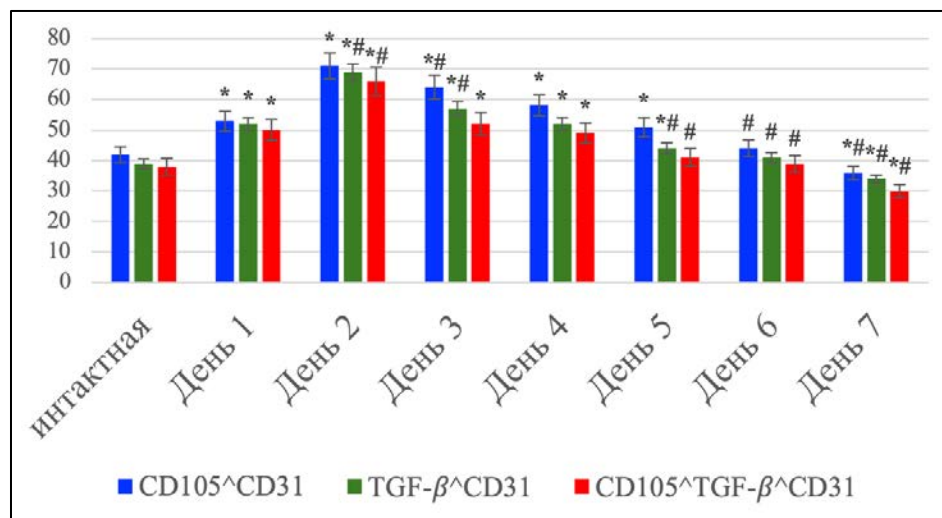


Рисунок 3.30 – Количество эндотелиальных клеток, окрашенных при мультиплексном флуоресцентном исследовании с антителами к CD105, TGF-β и CD31 в фрагментах коры головного мозга в условно интактной группе и у пациентов с ишемическим инсультом пожилого возраста в течение первой недели от начала заболевания, график. Статистически значимые различия: * – «интактная» против «День 1», # – по сравнению с «День 1»; $p \leq 0,05$

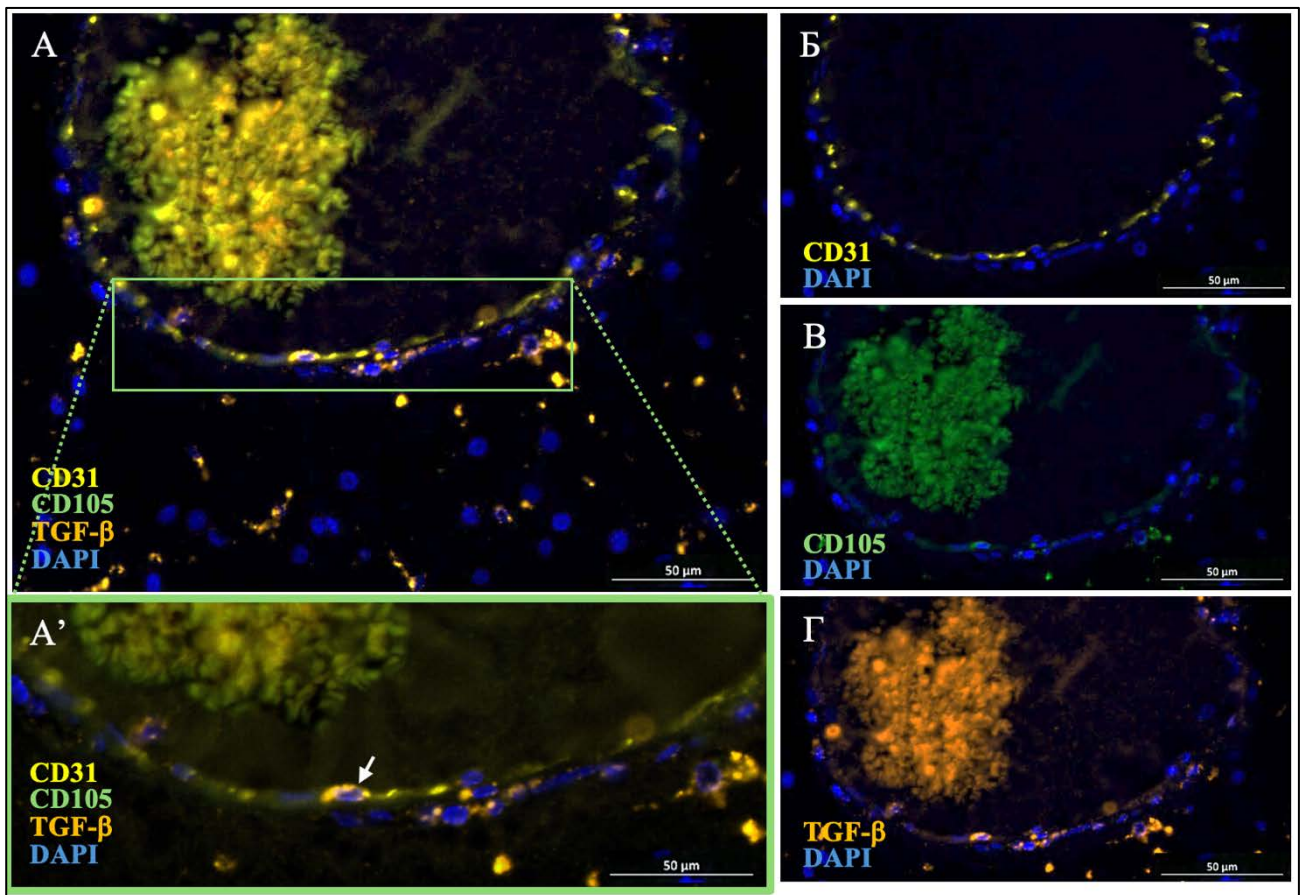


Рисунок 3.31 – Кора головного мозга пациента С., 67 лет, с ишемическим инсультом, умершего на 3-и сутки от начала заболевания, увелич. $\times 400$ (А) и $\times 800$ (А'). Мультиплексный иммунофлуоресцентный анализ с антителами к CD31 (Б; желтый сигналинг; Opal 540), CD105 (В; зеленый сигналинг; Opal 488), TGF- β (Г; оранжевый сигналинг; Opal 647), докрасивание ядер – DAPI (синий сигналинг). В поле зрения CD105⁺TGF- β ⁺CD31⁺ эндотелиальная клетка (стрелка)

В совокупности, обнаруженный молекулярный паттерн отражает сочетание редукции количества кровеносных сосудов, дисрегуляции компенсаторного проангиогенного сигналинга в единичных сохранившихся гемокapиллярах, а также провоспалительного монофазного сигналинга TGF- β в эндотелиальных клетках (на воспалительно-деструктивной стадии) без последующего усиления его активности как индуктора ремоделирования и перехода к репаративной стадии ишемического повреждения.

Резюме

В совокупности с результатами, полученными при иммуногистохимическом исследовании с антителами к CD31 и VEGF-A, мультиплексное иммунофлуоресцентное исследование дополняет данные о значимой редукции сети кровеносных сосудов и угнетении проангиогенного потенциала эндотелиальных клеток и нейронов по мере старения, особенно выраженные при сопутствующем ишемическом повреждении.

Так, перечисленные изменения усугубляются при цереброваскулярной патологии. При сопоставлении трех возрастных групп обнаружили, что у лиц молодого возраста ишемическое повреждение сопровождается развернутым, многоэтапным проангиогенным ответом, характеризующимся ранним и выраженным увеличением числа CD31⁺ кровеносных сосудов, последовательной активацией CD105 и двухфазным усилением сигналинга TGF- β в эндотелиальных клетках: 1 фаза (2 – 3 сутки) – провоспалительная (сочетается с воспалительно-деструктивной стадией ишемического повреждения); 2 фаза (5 – 6 сутки) – ремоделирующая (сочетается с переходом к репаративной стадии ишемического повреждения). У лиц пожилого возраста, напротив, наблюдали прогрессирующее снижение количества CD31⁺ и CD105⁺ эндотелиальных клеток на фоне кратковременного монофазного увеличения в них экспрессии TGF- β (2 – 4 сутки; провоспалительная фаза), что в совокупности указывает на возраст-ассоциированное сокращение проангиогенного сигналинга, приводящее к дисрегуляции сосудистого компонента нейроваскулярных взаимодействий. Это способствует значительному уменьшению трофической поддержки и метаболической активности нервных клеток, угнетению нейрогенеза и пластического потенциала коры головного мозга при ишемическом инсульте.

3.4.3. Мультиплексный анализ ко-локализации CD68⁺CD163⁻TGF-β⁺Vimentin

При мультиплексном иммунофлуоресцентном исследовании с антителами к CD68, CD163, TGF-β и Vimentin выявили выраженные возраст-ассоциированные различия количества и распределения макрофагов, а также изменения их функционально-фенотипических характеристик в рамках реализации клеточно-тканевого ответа на ишемическое повреждение коры головного мозга.

При сравнительном анализе в условно интактной коре наблюдали увеличение количества CD68⁺CD163⁻ M1-макрофагов с возрастом: у лиц молодого возраста эти клетки располагались преимущественно периваскулярно, в то время как у пожилых CD68-сигналинг детектировали в единичных элементах микроглии значительно чаще, что отражает базовый уровень хронического нейровоспаления, свойственного стареющему головному мозгу. Напротив, единичные CD68⁺CD163⁺ клетки наиболее часто обнаруживали в корковом веществе у лиц молодого возраста, а по мере старения их доля среди CD68⁺ макрофагов снижалась, что свидетельствует о возраст-зависимом угнетении противовоспалительного и репаративного потенциала, за реализацию которых ответственны M2-макрофаги (Таблица 3.9). Кроме того, в пожилой возрастной группе отмечали ослабление сигналинга в элементах микроглии при окрашивании антителами к виментину – маркеру цитоскелетной перестройки и сохранности citoархитектоники. Следует отметить, что количество Vimentin⁺ клеток увеличивалось, но внутриклеточное распределение Vimentin⁺ филаментов было неоднородным, что демонстрирует частичную дегенерацию цитоскелета этих клеток на фоне увеличения их общего количества (в рамках концепции инфламмаджинга) в коре головного мозга лиц старших возрастных групп (Рисунок 3.32, Рисунок 3.33, Рисунок 3.34, Рисунок 3.35).

Клеточно-тканевой ответ на ишемическое повреждение коры головного мозга во всех возрастных группах проявлялся быстрым нарастанием числа CD68⁺ макрофагов, преимущественно в пограничной зоне инфаркта (пенумбре), достигая

максимальных значений к 2 – 3 суткам. Однако амплитуда и сроки принципиально различалась при сравнении периодов постнатального онтогенеза. Так, в коре головного мозга лиц молодого возраста количество CD68⁺ клеток увеличивалось более чем в 3,0 раза относительно показателей условно интактной коры уже ко 2-м суткам, отражая быструю мобилизацию и интенсивную миграцию макрофагов в область ишемического повреждения (Рисунок 3.32). В среднем возрасте прирост числа CD68⁺ макрофагов был несколько ниже по сравнению с молодыми, а в пожилой подгруппе абсолютное количество CD68⁺ макрофагов было максимальным (Рисунок 3.33, Рисунок 3.34). При этом в данной группе на первой неделе после клинической манифестации заболевания число этих клеток увеличивалось менее резко в относительных величинах, но оставалось максимальным (при сравнении между возрастными группами) в абсолютных значениях, что может указывать на их чрезмерную активацию и срыв регуляторных механизмов нейровоспаления.

Динамическое наблюдение за распределением CD68⁺CD163 фенотипов показывает принципиально разные паттерны макрофагальной реакции на ишемическое повреждение. Так, среди лиц молодого возраста на ранних сроках (1 – 3 сутки) наблюдали преобладание M1-фенотипа макрофагов (CD68⁺CD163⁻) при умеренном увеличении пула M2-фенотипа, что соответствует срокам ишемически-некротической и началу воспалительно-деструктивной стадий и связано с накоплением большого количества субстрата для фагоцитоза (Рисунок 3.36, Рисунок 3.37). Напротив, начиная с 3 – 4 суток и до конца первой недели, наблюдали смену преобладающего фенотипа и увеличение количества CD68⁺CD163⁺ клеток, достигающей максимума к 6 – 7 суткам с более чем полуторакратным превышением значений первого дня в той же группе, а доля M2-макрофагов среди всех CD68⁺ клеток возрастала почти в два раза. Это указывает на формирование репаративного M2-доминирующего клеточного ответа на 5 – 7 сутки после клинической манифестации ишемического инсульта, что отражает высокую степень пластичности и способность элементов нервной ткани к

автономному «переключению» с воспалительной фазы на репаративную (Рисунок 3.40).

В группе среднего возраста также отмечали постепенное увеличение количества M2-макрофагов, однако их доля среди CD68⁺ клеток не достигала значений, обнаруженных у лиц молодого возраста. Максимальное количество CD68⁺CD163⁻ макрофагов приходилось на 2-е сутки, а число CD68⁺CD163⁺ клеток было наибольшим на 3 – 5 сутки, однако соотношение фенотипов M2 / M1 оставалось существенно ниже показателей молодой группы. Так, в среднем возрасте не обнаружили четкого перехода от воспалительной фазы к репаративной, а увеличение числа CD68⁺ макрофагов демонстрировало монофазный пик на 2-е сутки с последующим снижением, а также при сохранении высокой доли M1-фенотипа клеток макрофагального ряда. Это свидетельствует о сохранении реактивности элементов микроглии и частично регулируемой миграции этих клеток, однако переход нейровоспаления к противовоспалительной фазе был более продолжительным и менее сбалансированным по сравнению с группой молодого возраста.

В группе лиц пожилого возраста наблюдали противоположный паттерн клеточно-тканевого ответа. На фоне перманентного состояния хронического нейровоспаления в головном мозге пожилых пациентов острое ишемическое повреждение коркового вещества способствует резкому увеличению количества CD68⁺ макрофагов, превышающего значения условно интактной группы более чем в 2,5 раза уже на 2-е сутки после клинической манифестации, а снижение доли M1-макрофагов в течение первой недели было наименее значимым среди выбранных возрастных групп (Рисунок 3.34). Так, в этой возрастной группе на протяжении всей первой недели преобладал M1-фенотип, составляя более 2 / 3 части всех CD68⁺ клеток (Рисунок 3.38, Рисунок 3.39). Кроме того, количество CD68⁺CD163⁺ клеток лишь незначительно увеличивалось к 4 – 5 суткам от начала заболевания с последующим снижением. Тем не менее, на 7-е сутки отмечали некоторое увеличение доли M2-фенотипа, однако это связано не с приростом абсолютного

числа CD68⁺CD163⁺ макрофагов, а со снижением общего количества CD68⁺ клеток. Перечисленные изменения указывают на стойкую фиксацию провоспалительного статуса и практически полное отсутствие перехода к репаративной фазе в коре головного мозга пожилых пациентов после ишемического инсульта.

Анализ экспрессии TGF-β в CD68⁺ макрофагах уточняет данные о соотношении провоспалительного и репаративного сигналинга в течение первой недели после клинической манифестации ишемического инсульта. У лиц молодого возраста количество CD68⁺CD163⁻TGF-β⁺ резко увеличивалось уже в первые сутки и достигало максимума на 2-е сутки (коррелируя с резким увеличением количества CD68⁺ макрофагов), после чего плавно снижалось к концу недели до значений, превышающих таковые в интактной группе более чем в 3,5 раза, преимущественно в CD68⁺CD163⁺TGF-β⁺ клетках (Таблица 3.9, Рисунок 3.32, Рисунок 3.36, Рисунок 3.37, Рисунок 3.40). Так, можно предполагать, что ранний интенсивный сигналинг сопряжен с активацией в макрофагах провоспалительных эффектов сигнальных каскадов TGF-β, а повышенные значения экспрессии TGF-β на фоне смены фенотипа M1 на M2 могут быть связаны со сменой роли этого фактора и преобладанию осей TGF-β-сигналинга, ответственных за ремоделирование в рамках реализации пластичности нервной ткани.

Таблица 3.9 – Доля M2-фенотипа (CD163⁺) среди всех CD68⁺ макрофагов, %

соотношение CD163 ⁺ / CD68 ⁺ × 100%			
возраст	молодой (18 – 44 лет)	средний (45 – 59 лет)	пожилой (60 – 74 лет)
Интактная кора	57,2 ± 2,8 [!]	48,9 ± 2,3 [#]	31,3 ± 1,5 ^{#!}
Ишемический инсульт			
День 1	39,8 ± 1,9 ^{*!}	29,9 ± 1,4 ^{*#}	36,4 ± 1,7 ^{*!}
День 2	46,9 ± 2,3 ^{*!}	32,9 ± 1,5 ^{*#}	32,8 ± 1,6 [#]
День 3	61,4 ± 3,0 [!]	46,3 ± 2,2 [#]	32,7 ± 1,5 ^{#!}
День 4	73,7 ± 3,6 ^{*!}	59,4 ± 2,8 ^{*#}	37,2 ± 1,7 ^{*#!}
День 5	80,2 ± 3,9 ^{*!}	57,9 ± 2,7 ^{*#}	36,6 ± 1,6 ^{*#!}
День 6	87,1 ± 4,1 ^{*!}	62,6 ± 2,9 ^{*#}	31,7 ± 1,5 ^{#!}
День 7	91,4 ± 4,4 ^{*!}	59,8 ± 2,9 ^{*#}	38,9 ± 1,8 ^{#!}
Примечание. Статистически достоверные различия: * – по сравнению с интактной корой, # – по сравнению с «18 – 44 года» на том же сроке, ! – по сравнению с «45 – 59 года» на том же сроке, p < 0,05.			

В группе среднего возраста наибольшее количество макрофагов, экспрессирующих TGF- β , наблюдали на 2 – 3 сутки, а на последующих сроках число CD68⁺CD163⁻TGF- β ⁺ клеток превышало значения, полученные в молодой группе (Таблица 3.9, Рисунок 3.33).

В группе пожилого возраста в течение всей первой недели после клинической манифестации ишемического инсульта в коре головного мозга CD68⁺CD163⁻ макрофаги значительно преобладали над фенотипом CD68⁺CD163⁺, причем в них наблюдали яркий сигналинг TGF- β (Таблица 3.9, Рисунок 3.34, Рисунок 3.38, Рисунок 3.39). Так, наличие большого количества TGF- β ⁺ клеток, достигающего на 2-е сутки значений почти втрое выше таковых в интактном головном мозге, при сохранении M1-доминирования позволяет предположить, что переключение макрофагов на M2-фенотип практически отсутствует, а TGF- β в пожилом возрасте преимущественно участвует в поддержании нейровоспаления.

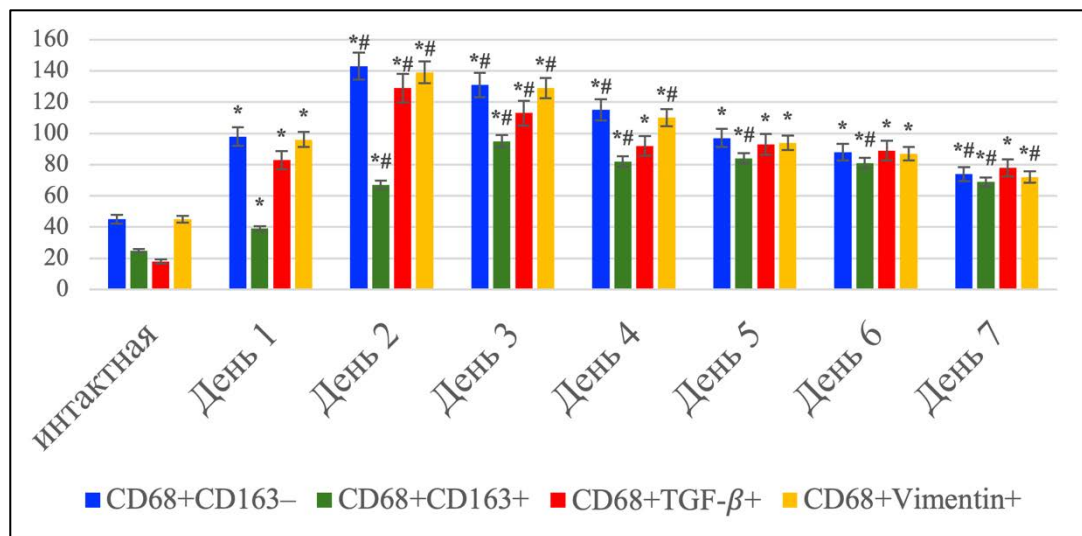


Рисунок 3.32 – Количество иммунных клеток, окрашенных при мультиплексном флуоресцентном исследовании с антителами к CD68⁺CD163⁺TGF- β ⁺Vimentin в фрагментах коры головного мозга в условно интактной группе и у лиц молодого возраста с ишемическим инсультом в течение первой недели от начала заболевания, график. Статистически значимые различия: * – «интактная» против «День 1», # – по сравнению с «День 1»; $p \leq 0,05$

Изменения цитоскелета макрофагов, оцененные по характеру распределения в их цитоплазме виментина, также продемонстрировали возрастные отличия. Количество $CD68^+Vimentin^+$ клеток в нервной ткани лиц молодого возраста удваивалось к 1 – 2 суткам и затем снижалось к концу первой недели, при этом наиболее яркое окрашивание клеток антителами к виментину наблюдали к концу первой недели, что отражает переход от активной миграции и ремоделирования тканевого матрикса к репарации и восстановлению цитоархитектоники (Таблица 3.9, Рисунок 3.32, Рисунок 3.36, Рисунок 3.37, Рисунок 3.40). В среднем возрасте изменения были более сглаженными, однако сохранялась тенденция к умеренному увеличению количества $Vimentin^+$ клеток на ранних сроках и последующему постепенному снижению (Таблица 3.9, Рисунок 3.33). В пожилой группе число $CD68^+Vimentin^+$ клеток также резко увеличивалось к 2-м суткам, однако их число превышало аналогичные показатели других возрастных групп (Таблица 3.9, Рисунок 3.34). Следует отметить, что в пожилой возрастной группе на всех сроках наблюдения окрашивание этих клеток антителами к виментину было тусклым, особенно в популяции $CD68^+CD163^+$ макрофагов, что может быть связано с сохраняющимся нарушением цитоархитектоники и стойкой активацией макрофагов с деформированным цитоскелетом в коре головного мозга после ишемического повреждения (Рисунок 3.38, Рисунок 3.39).

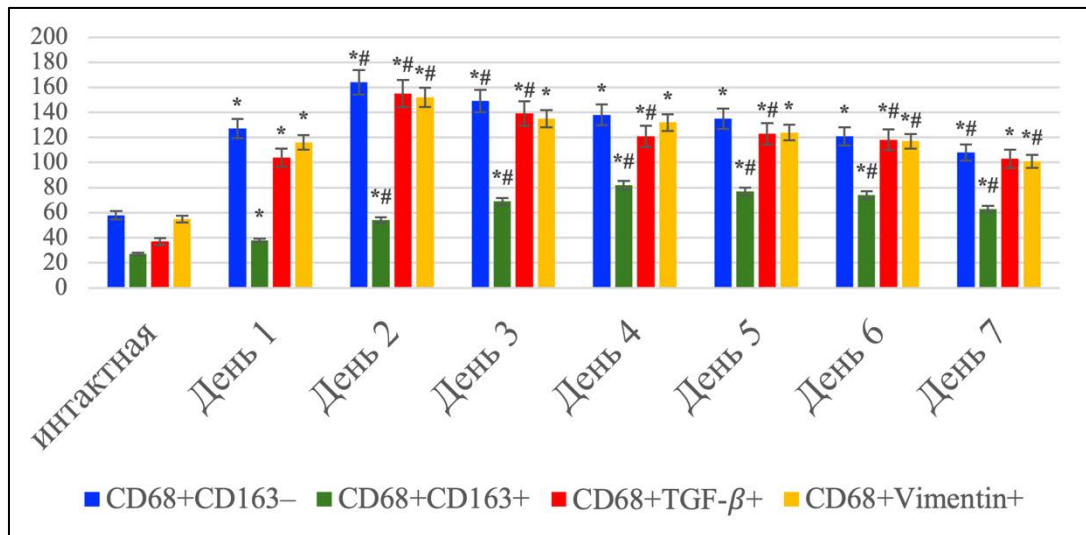


Рисунок 3.33 – Количество иммунных клеток, окрашенных при мультиплексном флуоресцентном исследовании с антителами к CD68⁺CD163⁺TGF-β⁺Vimentin в фрагментах коры головного мозга в условно интактной группе и у лиц среднего возраста с ишемическим инсультом в течение первой недели от начала заболевания, график. Статистически значимые различия: * – «интактная» против «День 1», # – по сравнению с «День 1»; $p \leq 0,05$

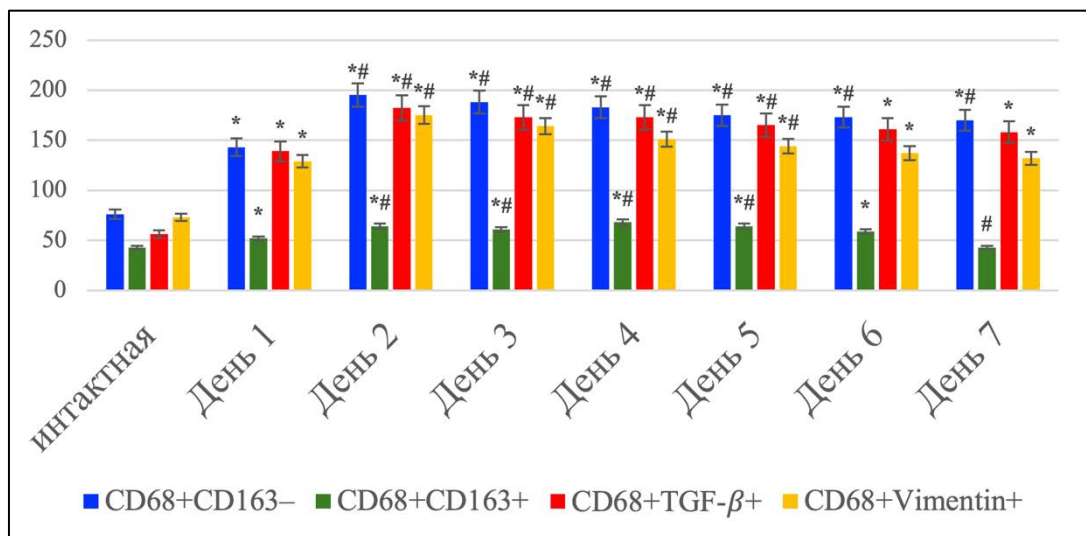


Рисунок 3.34 – Количество иммунных клеток, окрашенных при мультиплексном флуоресцентном исследовании с антителами к CD68⁺CD163⁺TGF-β⁺Vimentin в фрагментах коры головного мозга в условно интактной группе и у лиц пожилого возраста с ишемическим инсультом в течение первой недели от начала заболевания, график. Статистически значимые различия: * – «интактная» против «День 1», # – по сравнению с «День 1»; $p \leq 0,05$

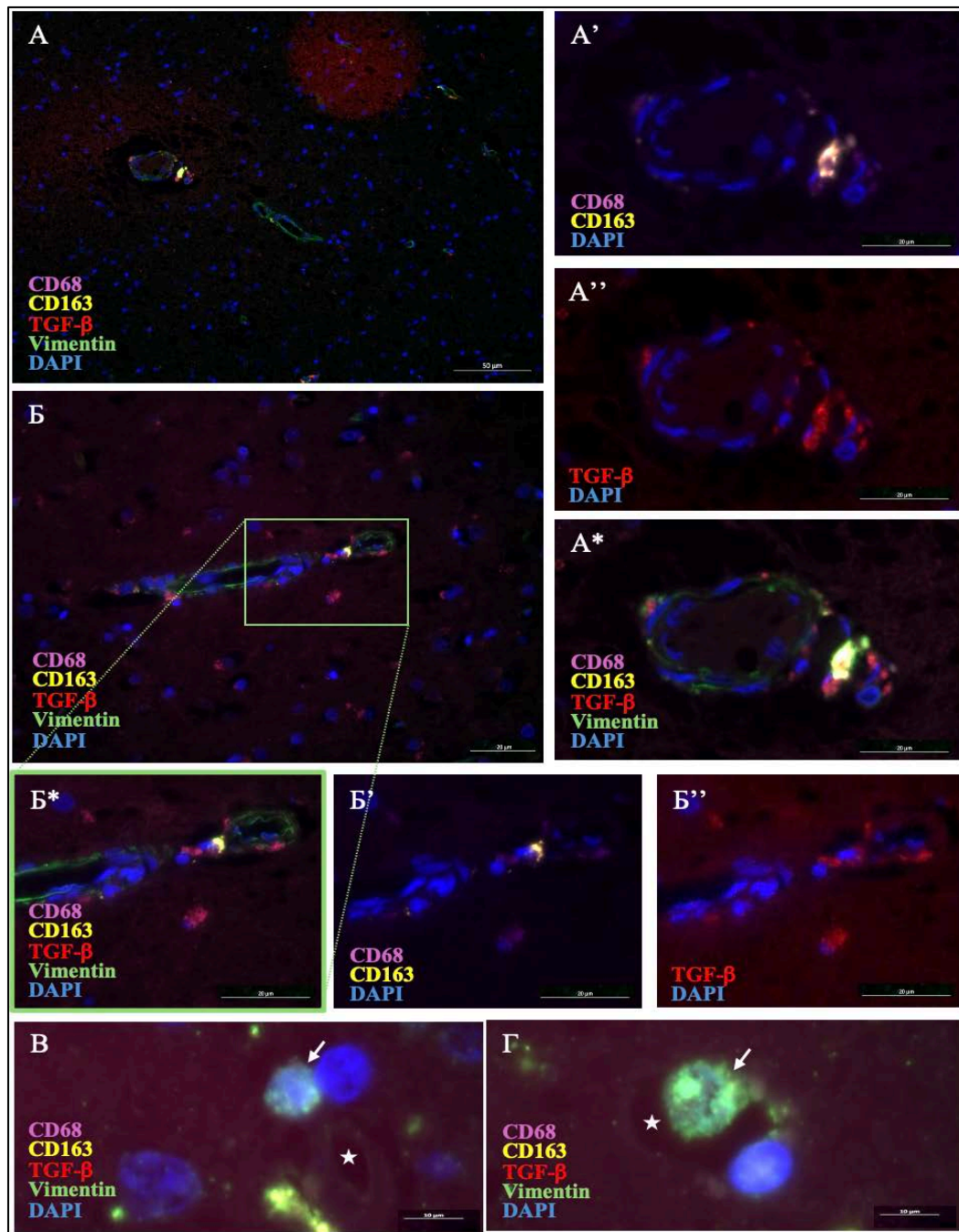


Рисунок 3.35 – Условно интактная кора головного мозга. Мультиплексный иммунофлуоресцентный анализ с антителами к CD68 (фиолетовый сигналинг, Opal 647), CD163 (желтый сигналинг, Opal 780), TGF- β (красный сигналинг, Opal 540) и Vimentin (зеленый сигналинг, Opal 488), докрасивание ядер – DAPI (синий сигналинг). А – Пациент С., 43 лет, увелич. $\times 200$; А* – в п/з единственный M2-макрофаг (А'), позитивный на TGF- β (А''), увелич. $\times 400$. Б – Пациент Д., 57 лет, увелич. $\times 200$; Б* – в п/з единственный M2-макрофаг (Б'), слабо позитивный на TGF- β (Б''), увелич. $\times 400$. В, Г – Пациент Ж., 71 лет, увелич. $\times 800$; единичные M1-макрофаги (белая стрелка), расположенные периваскулярно или в просвете кровеносного сосуда (белая звезда)

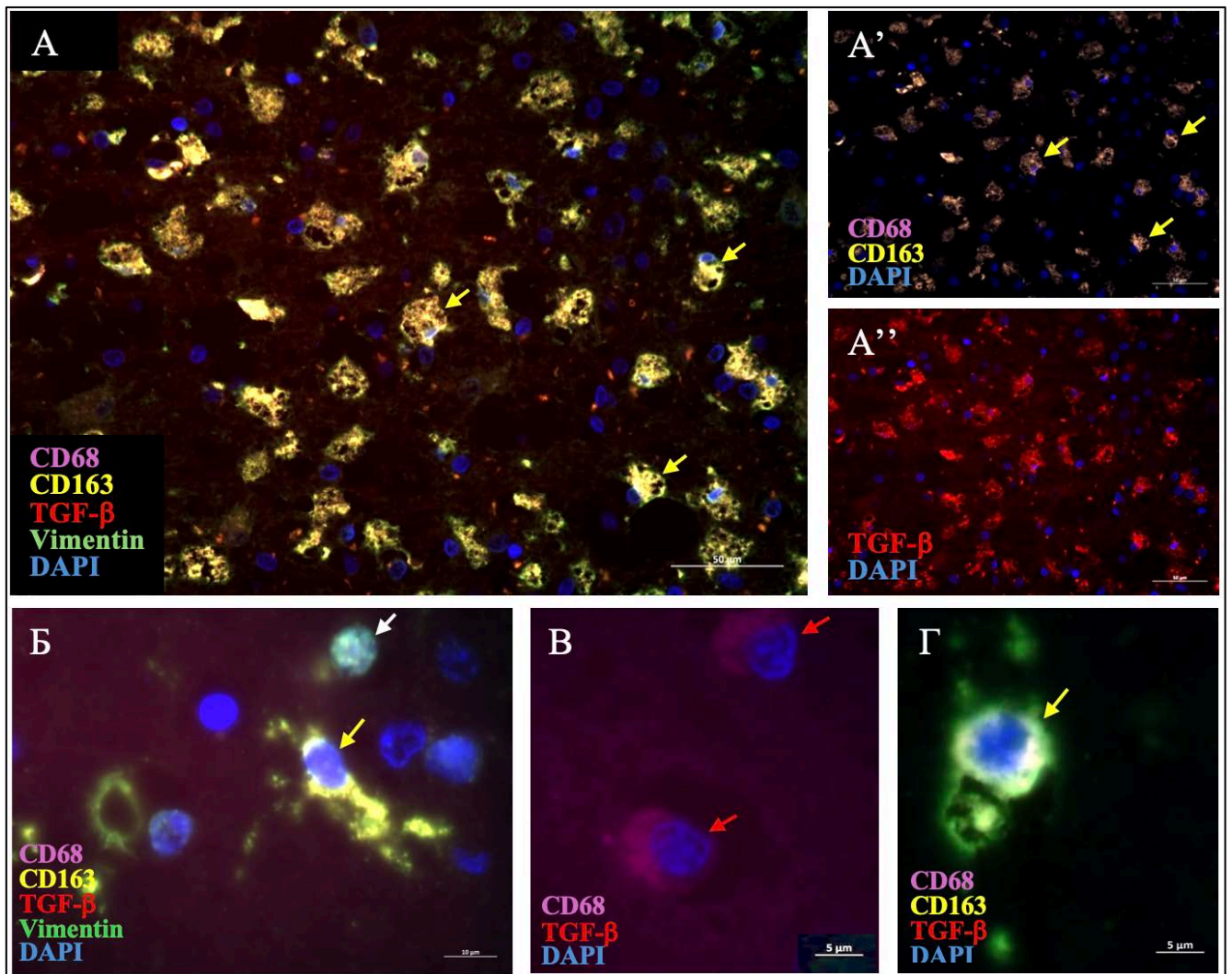


Рисунок 3.36 – Кора головного мозга лиц молодого возраста через трое суток после клинической манифестации ишемического инсульта. Мультиплексный иммунофлуоресцентный анализ с антителами к CD68 (фиолетовый сигналинг, Opal 647), CD163 (желтый сигналинг, Opal 780), TGF-β (красный сигналинг, Opal 540) и Vimentin (зеленый сигналинг, Opal 488), докрасивание ядер – DAPI (синий сигналинг). **А** – Пациент К., 45 лет; зона пенумбры, скопление M2-макрофагов (**А'**) с ярким сигналингом TGF-β и многочисленными фагосомами в цитоплазме (желтые стрелки), увелич. ×400. **Б** – Пациент К., 45 лет; активированный макрофаг неправильной формы с многочисленными псевдоподиями (желтая стрелка), увелич. ×800. **В** – Пациент Ч., 42 лет; в п/з M1-макрофаги, позитивные на TGF-β (красная стрелка), увелич. ×800. **Г** – Пациент Р., 44 лет; в п/з M2-макрофаг (желтая стрелка), увелич. ×800

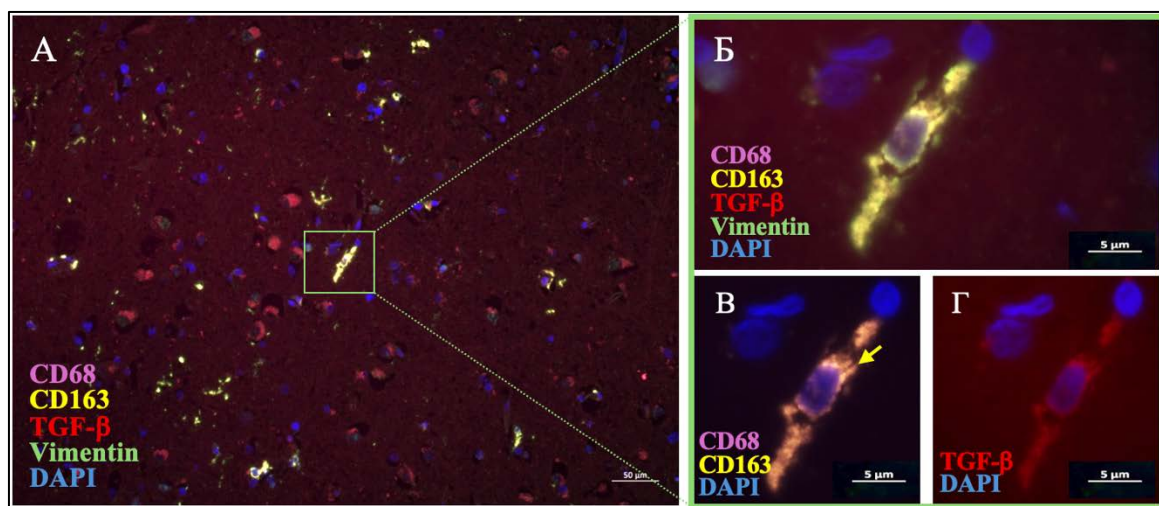


Рисунок 3.37 – Кора головного мозга лиц молодого возраста через трое суток после клинической манифестации ишемического инсульта. Мультиплексный иммунофлуоресцентный анализ с антителами к CD68 (фиолетовый сигналинг, Opal 647), CD163 (желтый сигналинг, Opal 780), TGF- β (красный сигналинг, Opal 540) и Vimentin (зеленый сигналинг, Opal 488), докрасивание ядер – DAPI (синий сигналинг). **А** – Пациент А., 42 лет, зона пенумбры, увелич. $\times 200$; **Б** – в п/з M2-макрофаг (**В**) распластанной формы (желтая стрелка), позитивный на TGF- β (**Г**), увелич. $\times 800$

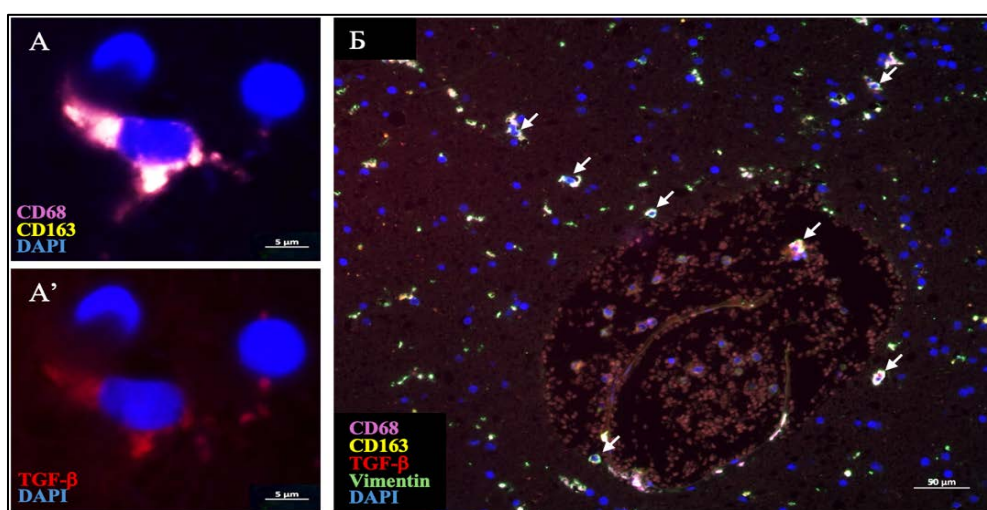


Рисунок 3.38 – Кора головного мозга лиц пожилого возраста на четвертые сутки после клинической манифестации ишемического инсульта. Мультиплексный иммунофлуоресцентный анализ с антителами к CD68 (фиолетовый сигналинг, Opal 647), CD163 (желтый сигналинг, Opal 780), TGF- β (красный сигналинг, Opal 540) и Vimentin (зеленый сигналинг, Opal 488), докрасивание ядер – DAPI (синий сигналинг). **А** – единственный активированный M2-макрофаг с фенотипом CD68⁺CD163⁺ и протяженными TGF- β ⁺ псевдоподиями (**А'**), увелич. $\times 800$. **Б** – Пациент К., 73 лет, в поле зрения деструкция стенки кровеносного сосуда среднего калибра, скопление макрофагов (белые стрелки) вокруг геморрагии, увелич. $\times 200$

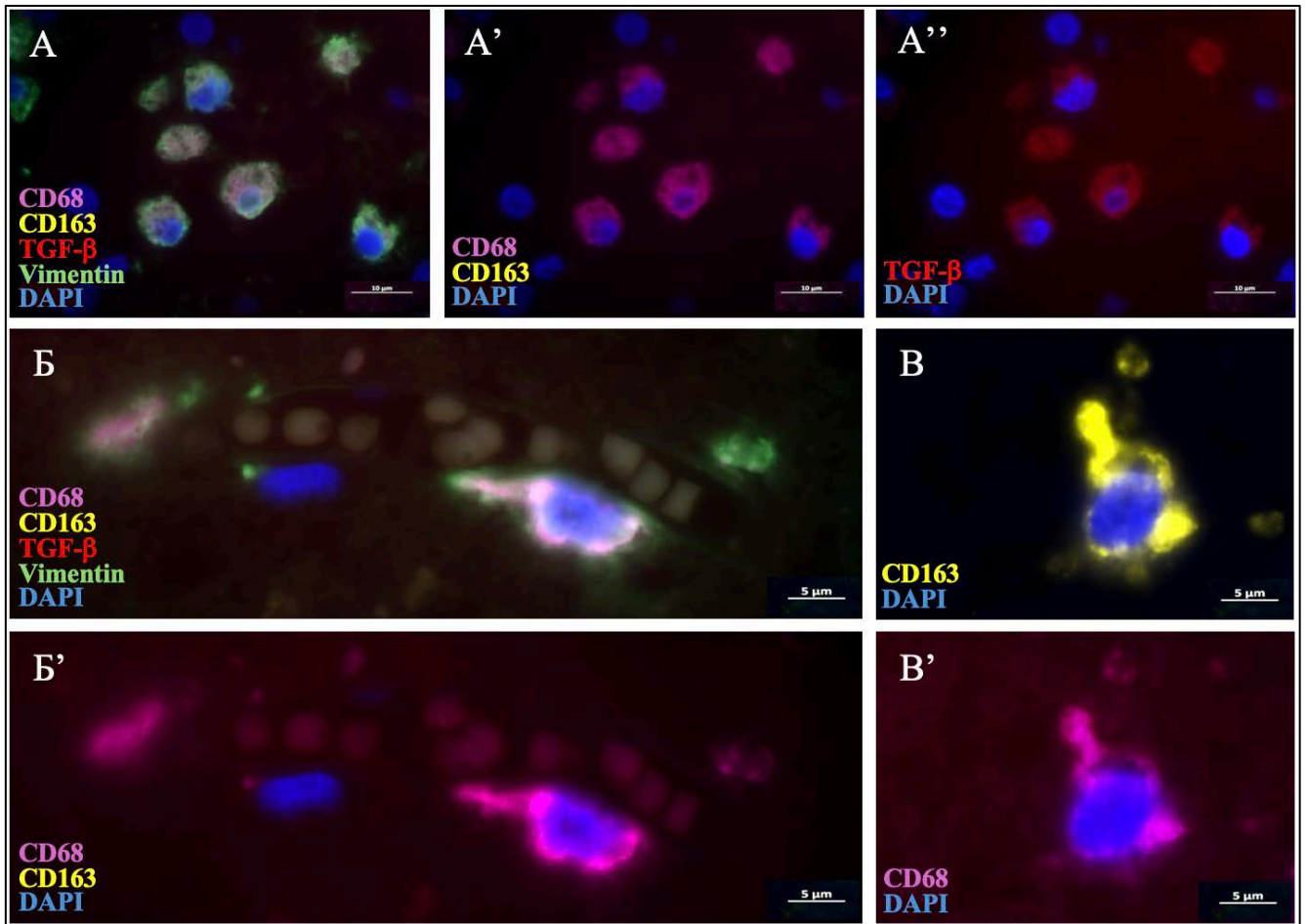


Рисунок 3.39 – Кора головного мозга лиц пожилого возраста на четвертые сутки после клинической манифестации ишемического инсульта. Мультиплексный иммунофлуоресцентный анализ с антителами к CD68 (фиолетовый сигналинг, Opal 647), CD163 (желтый сигналинг, Opal 780), TGF-β (красный сигналинг, Opal 540) и Vimentin (зеленый сигналинг, Opal 488), докрасивание ядер – DAPI (синий сигналинг). А – Пациент М., 62 лет, в поле зрения скопление CD68⁺CD163⁻ макрофагов (А') с ярким сигналингом TGF-β (А''), увелич. ×400. Б – Пациент Т., 69 лет, активированный макрофаг с фенотипом CD68⁺CD163⁻ (Б'), взаимодействующий со стенкой кровеносного сосуда, увелич. ×800. В – активированный M2-макрофаг с фенотипом CD68⁺CD163⁺ (В'), увелич. ×800

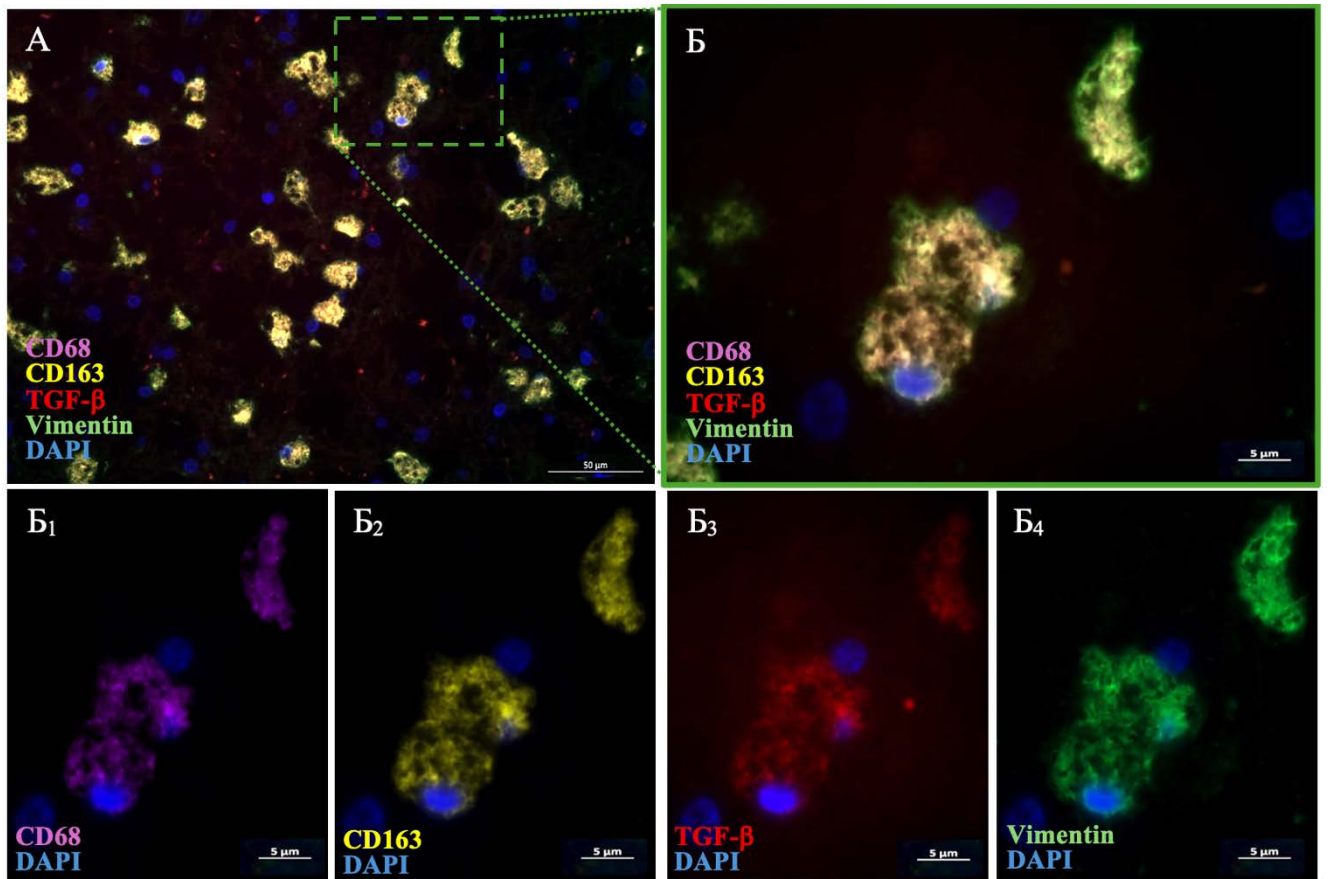


Рисунок 3.40 – Кора головного мозга пациента С., 43 лет, через 5 суток после клинической манифестации ишемического инсульта. Мультиплексный иммунофлуоресцентный анализ с антителами к CD68 (фиолетовый сигналинг, Opal 647), CD163 (желтый сигналинг, Opal 780), TGF- β (красный сигналинг, Opal 540) и Vimentin (зеленый сигналинг, Opal 488), докрасивание ядер – DAPI (синий сигналинг). **А** – в поле зрения многочисленны M2-макрофаги, увелич. $\times 200$; **Б** – взаимодействие двух M2-макрофагов, позитивных на CD68 (**Б₁**), CD163 (**Б₂**) и TGF- β (**Б₃**). Обращает на себя внимание большое количество внутриклеточных везикул (фагосом, лизосом) и диффузное окрашивание филаментов цитоскелета антителами к виментину (**Б₄**), увелич. $\times 800$

Резюме

В настоящем исследовании продемонстрирована функционально-фенотипическая характеристика и особенности распределения макрофагов, являющихся одними из ключевых регуляторов ремоделирования нервной ткани в рамках реализации ее пластического потенциала. По мере старения происходит его угнетение, а макрофаги (преимущественно M1-фенотипа) становятся одними из ключевых элементов инфламмаджинга.

В совокупности полученные данные демонстрируют принципиально различные паттерны распределения макрофагов как crucialного регулятора клеточно-тканевого ответа на ишемическое повреждение в зависимости от возраста. В головном мозге лиц молодого возраста отмечали интенсивную раннюю фазу с доминированием M1-фенотипа, с последующим автономно контролируемым «переключением» на M2-репаративную программу, заложенную еще в процессе иммуногенеза, с постепенным снижением в них провоспалительного TGF- β -сигналинга, потенцированием ремоделирования нервной ткани. Следует отметить, что перечисленные фазы соответствовали таковым при гистологическом и иммунофлуоресцентном исследованиях, а экспрессия TGF- β была обнаружена в эндотелиальных клетках (см. выше), на основании чего можно полагать, что TGF- β является одним из наиболее важных факторов межклеточной коммуникации между различными компонентами нейроваскулярной единицы, особенно в условиях ишемического повреждения. Перечисленные изменения отражают высокую чувствительность этого взаимодействия в зависимости от состояния локального гомеостаза и микроокружения, а также достаточности репаративного потенциала.

В среднем возрасте сохраняются аналогичные тенденции клеточно-тканевого ответа, однако активация M2-фенотипа макрофагов при переходе к репаративной фазе была менее выраженной. У лиц пожилого возраста, напротив, отмечали устойчивое преобладание M1-макрофагов с деформированной цитоархитектоникой в течение всей первой недели после ишемического повреждения, а также длительно сохраняющийся сигналинг TGF- β в этих клетках на фоне низкого количества M2-репаративных макрофагов. Особенно интересным представляется сопоставление полученных данных с результатами иммунофлуоресцентного исследования эндотелиальных клеток, в которых экспрессия TGF- β значительно снижалась, начиная уже с 4-го дня после ишемического повреждения, что может свидетельствовать о разобщении регуляторного взаимодействия между клетками кровеносных сосудов и

микроглией / рекрутированными макрофагами. В совокупности, обнаруженные данные подтверждают усугубление и длительную потенциацию нейровоспаления в коре головного мозга пожилых пациентов после ишемического повреждения. Эти особенности указывают на утрату адекватной иммунной пластичности и преобладание провоспалительного статуса в нервной ткани, что способствует прогрессирующему повреждению нейронов пенумбры и частично объясняет более тяжелое течение ишемического инсульта у пациентов старших возрастных групп.

3.4.4. Мультиплексный анализ ко-локализации CD45⁺CD56⁺CD3⁻

В фрагментах условно интактной коры головного мозга при мультиплексном иммунофлуоресцентном анализе ко-локализации маркеров CD45⁺CD56⁺CD3⁻ обнаружили единичные CD45⁺CD56⁺CD3⁻-NK-клетки и CD45⁺CD56⁻CD3⁺-Т-лимфоциты, детектируемые преимущественно интраваскулярно (Рисунок 3.37). За пределами кровеносного русла также наблюдали сигналинг CD45 в немногочисленных клетках, что соответствует нормальной локализации микроглии – резидентного компонента нервной ткани.

В средней и пожилой возрастных группах отмечали появление единичных CD45⁺CD56⁻CD3⁺-Т-лимфоцитов, что соответствует концепции об инфламмаджинге – хроническом воспалении в нервной ткани головного мозга у лиц старшего возраста (Рисунок 3.41).

Возраст-ассоциированные различия в составе воспалительного инфильтрата при развитии клеточно-тканевого ответа на ишемическое повреждение проявлялись уже в первые сутки от начала заболевания. Так, среди лиц молодого возраста в зоне пенумбры детектировали CD45⁺CD56⁺CD3⁻-NK-клетки и CD45⁺CD56⁻CD3⁺-Т-лимфоциты, тогда как доля цитотоксических CD45⁺CD56⁺CD3⁺-NKT-клеток была относительно небольшой (Рисунок 3.42, Рисунок 3.43, Рисунок 3.46). В первые трое суток количество инфильтрирующих NK- и NKT-клеток более чем в 2,0 раза, а число Т-лимфоцитов – многократно

превышало значения условно интактной группы, что отражает активную, но условно контролируемую воспалительную реакцию.

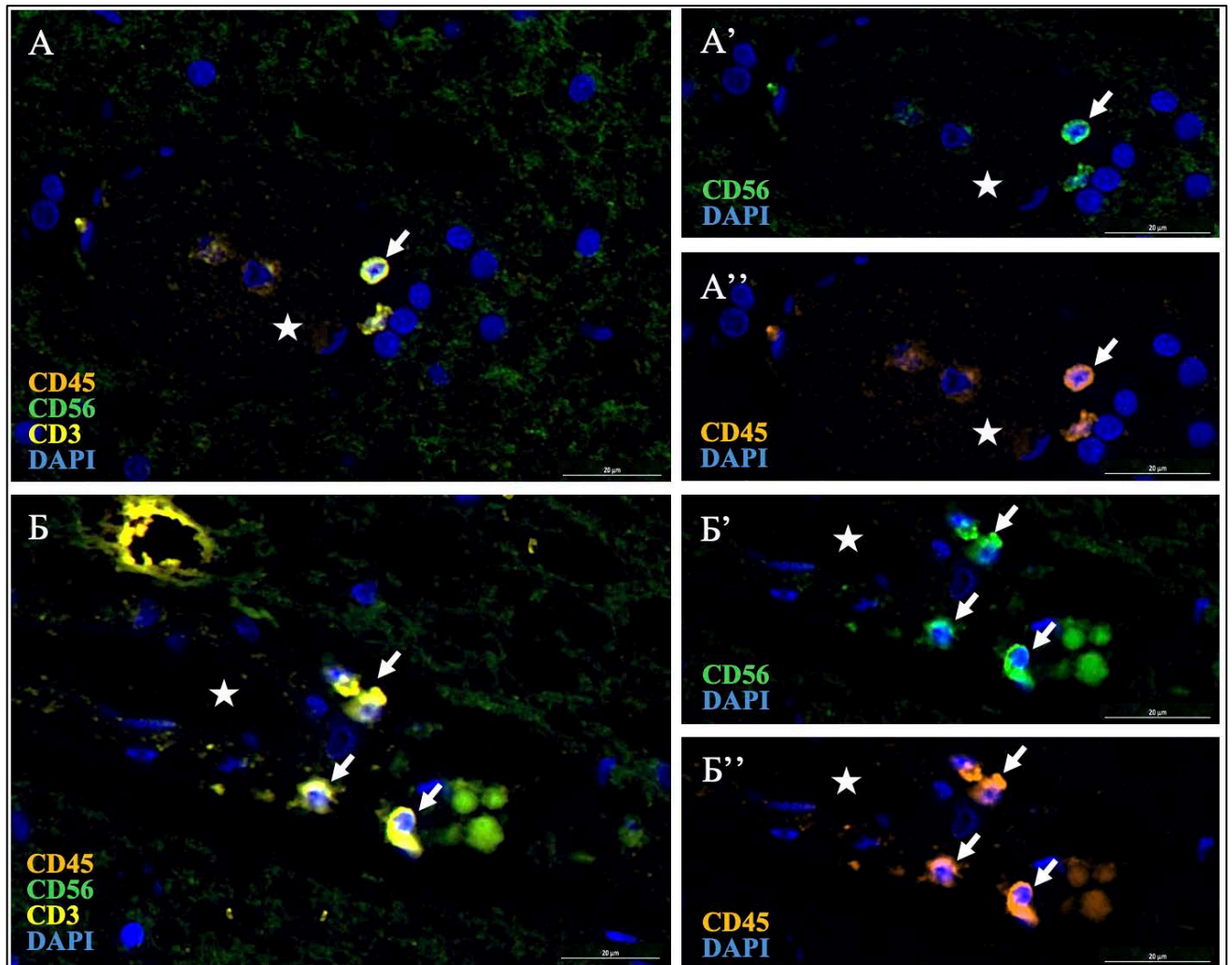


Рисунок 3.41 – Условно интактная кора головного мозга. Мультиплексный иммунофлуоресцентный анализ с антителами к маркерам иммунных клеток CD45 (оранжевый сигналинг, Opal 647), CD56 (зеленый сигналинг, Opal 488) и CD3 (желтый сигналинг, Opal 540), докрасивание ядер – DAPI (синий сигналинг). А – Пациент Ж., 41 лет; Б – Пациент С., 62 лет, в просвете кровеносных сосудов (белая звезда) визуализируются единичные НК-клетки (белые стрелки), ярко окрашенные антителами к CD56 (А', Б') и CD45 (А'', Б''), увелич. $\times 400$

Кроме того, соотношение НКТ / НК демонстрировало динамику, схожую с таковой при анализе макрофагального ответа: отмечали двухфазное нарастание доли НКТ – к 2-м суткам (первая фаза) и на 4-е сутки (вторая фаза) от клинической манифестации заболевания с последующим снижением к концу первой недели, что

свидетельствует о сохранении автономии клеточно-тканевого ответа на ишемическое повреждение (Рисунок 3.42).

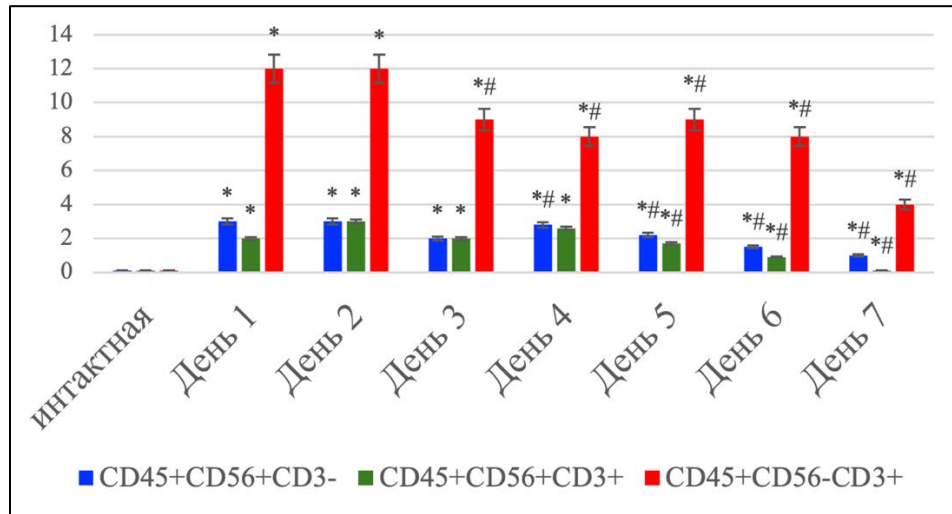


Рисунок 3.42 – Распределение НК-клеток (фенотип $CD45^+CD56^+CD3^-$), НКТ-клеток (фенотип $CD45^+CD56^+CD3^+$) и Т-лимфоцитов (фенотип $CD45^+CD56^-CD3^+$) в фрагментах коры головного мозга в условно интактной группе и у пациентов с ишемическим инсультом молодого возраста в течение 1-й недели от начала заболевания, график. Статистически значимые различия: * – «интактная» против «День 1», # – по сравнению с «День 1»; $p \leq 0,05$

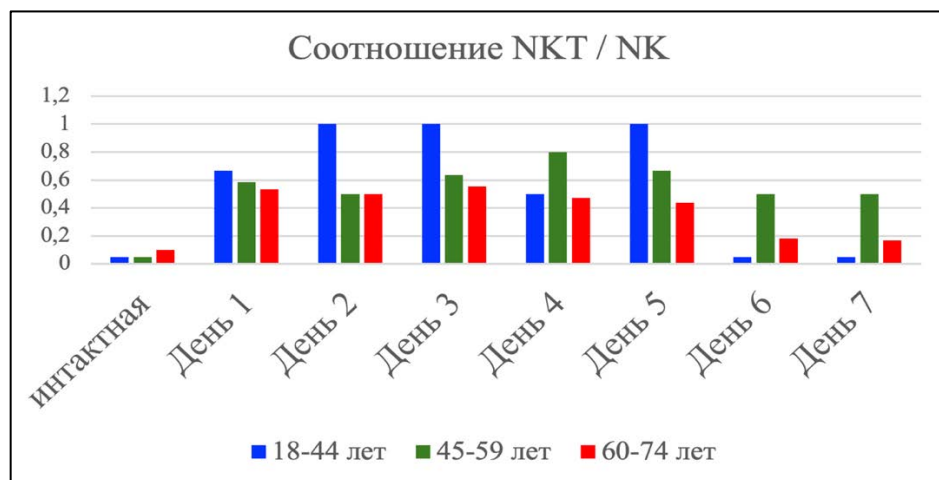


Рисунок 3.43 – Доля клеток НКТ-субпопуляции среди всех НК-клеток в коре головного мозга условно интактной группы и у пациентов с ишемическим инсультом молодого (18 – 44 лет), среднего (45 – 59 лет) и пожилого (60 – 74 лет) возрастов в течение 1-й недели от начала заболевания, график

В группе пациентов среднего возраста общее количество NK-, NKT- и T-клеток в зоне пенумбры было значительно выше по сравнению с показателями молодой возрастной группы: отмечали увеличение количества CD45⁺CD56⁺CD3⁻-NK-клеток более чем в 4 раза, а количество CD45⁺CD56⁻CD3⁺-T-лимфоцитов – в 2,0 раза (Рисунок 3.44). В первые четверо суток от начала заболевания доля CD45⁺CD56⁺CD3⁺-NKT-клеток в данной возрастной группе возрастала, превышая аналогичный уровень у лиц молодого возраста, однако на более поздних сроках соотношение NKT / NK постепенно снижалось практически в 2,0 раза по сравнению с максимальным уровнем, что сопровождалось увеличением количества CD45⁺CD56⁻CD3⁺-T-лимфоцитов (Рисунок 3.43).

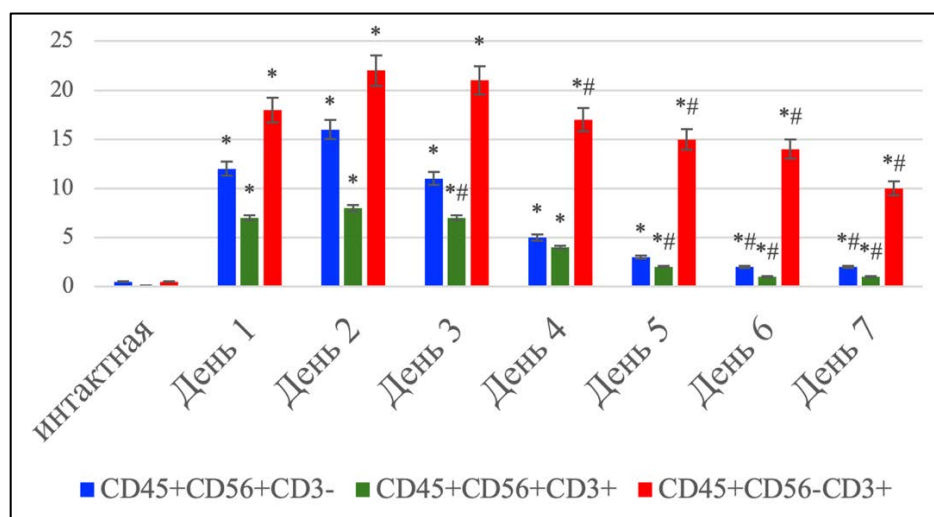


Рисунок 3.44 – Распределение NK-клеток (фенотип CD45⁺CD56⁺CD3⁻), NKT-клеток (фенотип CD45⁺CD56⁺CD3⁺) и T-лимфоцитов (фенотип CD45⁺CD56⁻CD3⁺) в фрагментах коры головного мозга в условно интактной группе и у пациентов с ишемическим инсультом среднего возраста в течение 1-й недели от начала заболевания, график. Статистически значимые различия: * – «интактная» против «День 1», # – по сравнению с «День 1»; $p \leq 0,05$

У лиц пожилого возраста в зоне пенумбры уже в первые сутки от начала заболевания наблюдали выраженную миграцию и доминирование в клеточном воспалительном инфильтрате CD45⁺CD56⁻CD3⁺-T-лимфоцитов, количество которых превышало таковое у молодых практически в 3,0 раза, а к четвертым суткам – в 4,0 раза (Рисунок 3.45, Рисунок 3.47). В то же время миграция

CD45⁺CD56⁺CD3⁻-NK-клетками была наименьшей относительно других возрастов, а количество этих клеток неуклонно снижалось в течение первой недели после клинической манифестации. Кроме того, в образцах коры головного мозга этой возрастной группы обнаружили лишь единичные CD45⁺CD56⁺CD3⁺-NKT-клетки (Рисунок 3.43).

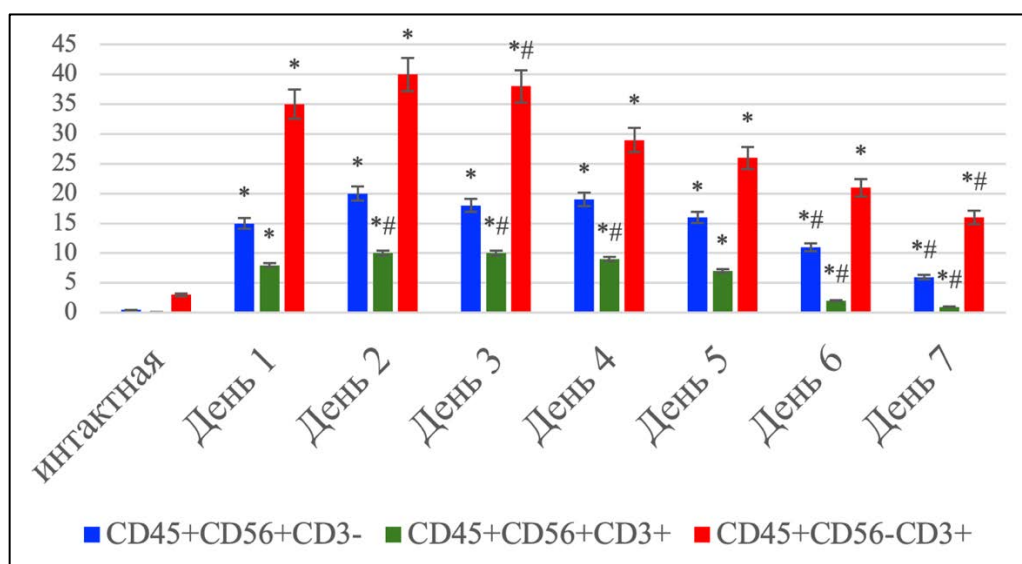


Рисунок 3.45 – Распределение NK-клеток (фенотип CD45⁺CD56⁺CD3⁻), NKT-клеток (фенотип CD45⁺CD56⁺CD3⁺) и T-лимфоцитов (фенотип CD45⁺CD56⁻CD3⁺) в фрагментах коры головного мозга в условно интактной группе и у пациентов с ишемическим инсультом пожилого возраста в течение 1-й недели от начала заболевания, график. Статистически значимые различия: * – «интактная» против «День 1», # – по сравнению с «День 1»; $p \leq 0,05$

Так, при иммунофенотипировании клеточного воспалительного инфильтрата в зоне пенумбры можно выделить два принципиально различающихся паттерна клеточно-тканевого ответа. У молодых пациентов NK, NKT и T-клетки формируют относительно сбалансированную систему регуляции нейровоспаления: уровень NK остается высоким в течение первых трех суток и повторно незначительно увеличивается на 4 – 5 сутки, что соответствует описанным ранее двум фазам (провоспалительной и прорепаративной). Кроме того, в первые сутки после клинической манифестации ишемического инсульта резко увеличивается количество T-лимфоцитов, однако уже на 3 – 4 сутки происходит значимое

снижение этого показателя примерно в 2 – 3 раза относительно первого дня. Это отражает регулируемую воспалительную реакцию, способствующую ауторегулируемому переходу от воспалительно-деструктивной стадии к репарации нервной ткани, направленной на сохранение жизнеспособных нейронов и ограничение вторичного (иммунного) повреждения сохранившихся нейронов пенумбры.

Напротив, у лиц пожилого возраста формируется устойчивый провоспалительный статус: количество Т-лимфоцитов резко увеличивается относительно значений интактной группы и остается стабильно высоким в течение всей первой недели от клинической манифестации заболевания (Рисунок 3.44). В то же время, увеличение количества НК- и НКТ-клеток не соответствовало темпам миграции Т-клеток, а с 4-го дня неуклонно уменьшалось, что исключает возможность эффективной регуляции воспалительной реакции этими клетками. Таким образом, у пожилых пациентов формируется устойчивая цитотоксическая среда, способствующая прогрессирующей гибели нейронов повреждающими факторами иммунных клеток и некротической трансформации зоны пенумбры. Более того, разрушение нервных клеток, в свою очередь, приводит к накоплению высоких концентраций провоспалительных цитокинов и цитотоксических факторов, что потенцирует миграцию новых популяций Т-лимфоцитов, замыкая порочный круг иммунного повреждения зоны пенумбры.

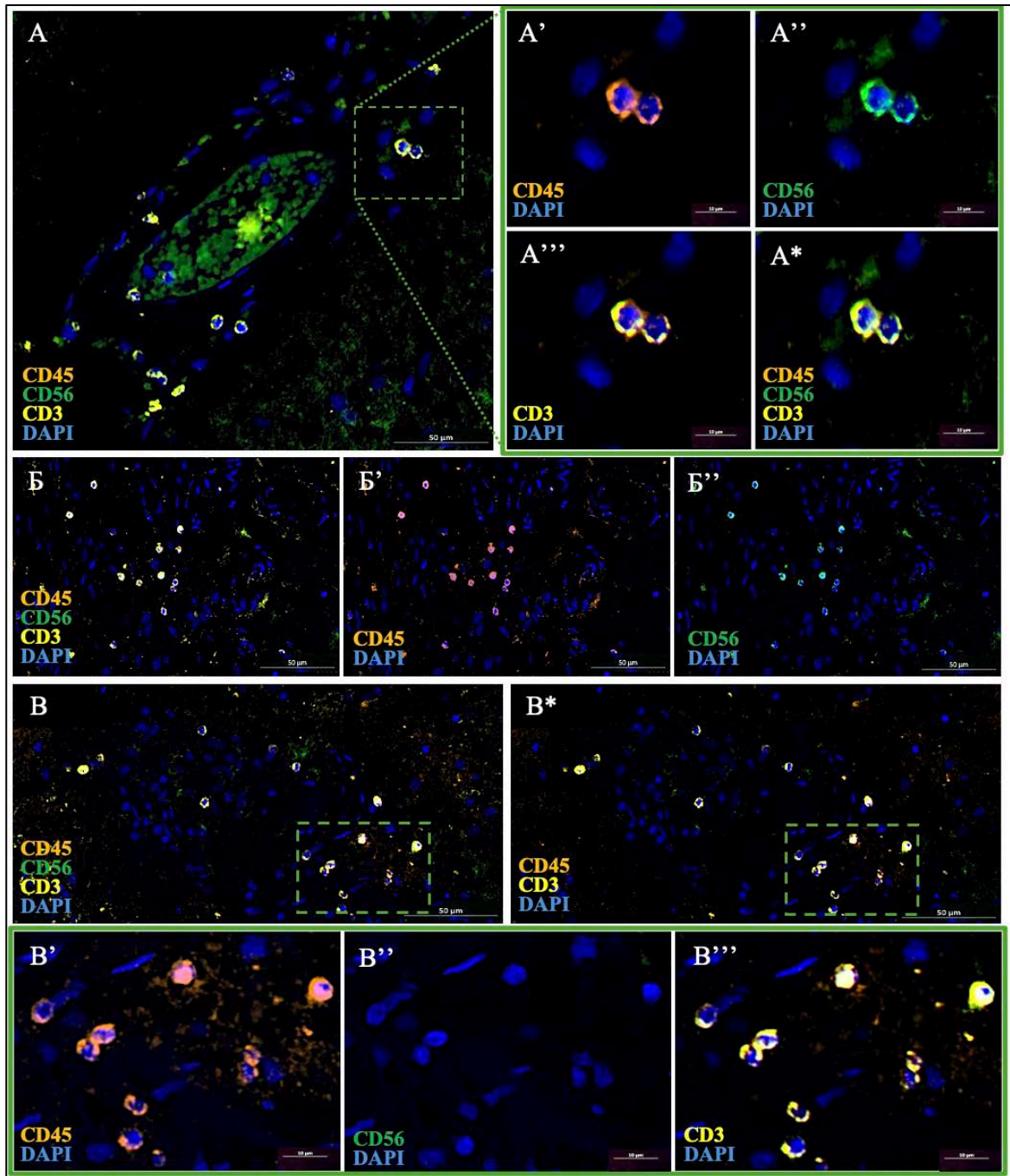


Рисунок 3.46 – Кора головного мозга лиц молодого возраста через двое суток после клинической манифестации ишемического инсульта. Мультиплексный иммунофлуоресцентный анализ с антителами к маркерам иммунных клеток CD45 (оранжевый сигналинг, Opal 647), CD56 (зеленый сигналинг, Opal 488) и CD3 (желтый сигналинг, Opal 540), докрашивание ядер – DAPI (синий сигналинг). **А** – Пациент С., 43 лет, периваскулярно расположенные НК и НКТ клетки, увелич. $\times 400$; **А*** – взаимодействие двух НКТ клеток, позитивных на CD45 (**А'**), CD56 (**А''**) и CD3 (**А'''**), увелич. $\times 800$. **Б** – Пациент С., 45 лет, в п/з инфильтрация НК-клетками, позитивными на CD45 (**Б'**) и CD56 (**Б''**), увелич. $\times 200$. **В** – Пациент З., 44 лет, в п/з периваскулярная инфильтрация Т-лимфоцитами (**В***) с фенотипом CD45⁺CD56⁻CD3⁺ (**В'** – **В'''**), увелич. $\times 800$

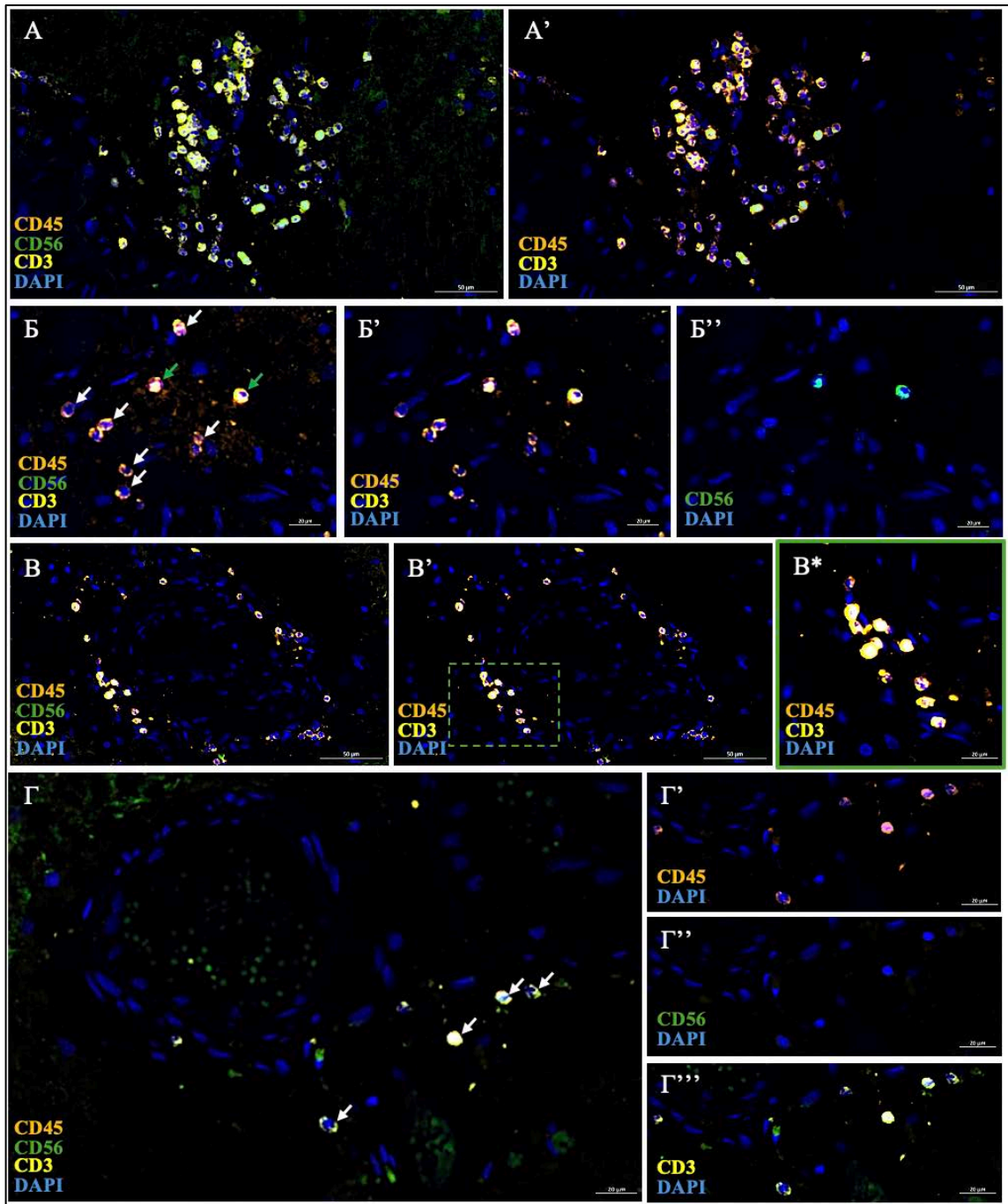


Рисунок 3.47 – Кора головного мозга лиц пожилого возраста через четверо суток после клинической манифестации ишемического инсульта. Мультиплексный иммунофлуоресцентный анализ с антителами к маркерам иммунных клеток CD45 (оранжевый сигналинг, Opal 647), CD56 (зеленый сигналинг, Opal 488) и CD3 (желтый сигналинг, Opal 540), докрасивание ядер – DAPI (синий сигналинг). **А** – Пациент К., 65 лет, массивная инфильтрация зоны пенумбры Т-лимфоцитами (**А'**), увелич. $\times 200$. **Б** – Пациент Ж., 61 лет, в п/з НК (зеленая стрелка) и НКТ (белая стрелка) клетки, позитивные на CD45, CD3 (**Б'**) и CD56 (**Б''**), увелич. $\times 400$. **В** – Пациент З., 68 лет, периваскулярная инфильтрация Т-лимфоцитами; **В'** – увелич. $\times 200$, **В''** – увелич. $\times 400$. **Г** – Пациент М., 74 лет, периваскулярная инфильтрация Т-лимфоцитами с фенотипом CD45⁺CD56⁻CD3⁺ (**Г'** – **Г'''**)

Резюме

Так, можно говорить о возраст-ассоциированного угнетения NK / NKT-опосредованной регуляции клеточно-тканевого ответа на ишемическое повреждение. Доминирование цитотоксических Т-лимфоцитов в составе воспалительного инфильтрата, вероятно, является crucialным механизмом, определяющим выраженность вторичного повреждения нейронов и степень редукции пластического потенциала нервной ткани в течение первой недели после ишемического инсульта. Кроме того, на основании сопоставления полученных функционально-фенотипических характеристик воспалительного инфильтрата с данными о гибели нейронов пенумбры на тех же сроках, можно говорить о меньшей цитотоксичности NK-субпопуляций иммунных клеток по сравнению с Т-лимфоцитами, равно как и о более высокой пластичности нервной ткани в молодом возрасте. Помимо этого, двухфазное увеличение количества NK / NKT-клеток соответствует аналогичной тенденции, описанной в той же возрастной группе при анализе распределения сигналинга в эндотелиальных клетках и макрофагов, что в совокупности дополняет высказанные ранее концепции и свидетельствует о сохранении автономной регуляции и тождественности функций этих клеток в рамках обеспечения контролируемого клеточно-тканевого ответа на ишемию.

У лиц пожилого возраста, напротив, наблюдали возраст-ассоциированную трансформацию фенотипического состава воспалительного инфильтрата в сторону доминирования цитотоксических эффектов Т-клеточного звена иммунитета при низком уровне регуляции со стороны NK- и NKT-клеток. Это создает предпосылки для формирования неспецифической цитотоксической микросреды в зоне пенумбры, что приводит к вторичной (иммунной) гибели компонентов нервной ткани и замыкает порочный круг неконтролируемого нейровоспаления. Этот механизм частично объясняет продолжающуюся некротическую трансформацию пенумбры в течение первой недели после ишемического повреждения, обнаруженную ранее методами гистологии и иммунофлуоресценции.

3.5. Молекулярно-генетический анализ

3.5.1. Экспрессия участников сигнальных путей PI3K/Akt/mTOR и PI3K/Akt/FOXO3a

При оценке PI3K/Akt-сигналинга методами молекулярно-генетического анализа (полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, ПЦР-РВ) в фрагментах коры головного мозга исследовали уровни транскрипционной активности компонентов осей PI3K/Akt/mTOR и PI3K/Akt/FOXO3a: выявлены выраженные возрастные различия их регуляции как в условиях старения в норме, так и при ишемическом инсульте.

У лиц молодого возраста регистрировали согласованное усиление экспрессии *PIK3CA* и *AKT2* уже в первые сутки после клинической манифестации заболевания, что сопровождалось увеличением уровней транскрипции обоих генов нижележащих эффекторов – *MTOR* и *FOXO3A* (Рисунок 3.48, Рисунок 3.49, Рисунок 3.50, Рисунок 3.51). При этом значения транскрипции всех исследуемых генов в последующие дни постепенно снижались от максимальных (в первые дни) до умеренных, что указывает на сохранность механизмов адаптивного контроля и на способность нервной ткани к обратимой активации заложенных на эмбриональном этапе развития PI3K/Akt-зависимых программ, направленных на выживание, подавление избыточной клеточной гибели, адекватную аутофагию.

У пациентов среднего возраста также наблюдали усиление транскрипционной активности всех исследуемых генов, однако по мере увеличения срока от начала заболевания отмечали некоторое доминирование оси PI3K/Akt/FOXO3a, при этом транскрипция *FOXO3A* возрастала относительно *MTOR*, оставаясь повышенной вплоть до 7-х суток наблюдения (Рисунок 3.50, Рисунок 3.51). Такой характер изменений свидетельствует о некотором возраст-ассоциированном смещении баланса внутри PI3K/Akt-сигналинга в сторону преобладания FOXO3a-зависимых механизмов аутофагии и проапоптоза.

В группе лиц пожилого возраста выявляли принципиально иной молекулярный паттерн: транскрипционная активность *PIK3CA*, *AKT2* и *MTOR* была незначительной, не достигая уровней, характерных для молодых, тогда как активация *FOXO3A* напротив резко доминировала над экспрессией *MTOR* на всех исследуемых сроках (Рисунок 3.50, Рисунок 3.51). Такая диспропорция указывает на выраженный возрастной дисбаланс между анализируемыми осями PI3K/Akt сигнального пути и на смещение регуляции в пользу доминирования проапоптотических эффектов PI3K/Akt/FOXO3a. Это сопровождается угнетением механизмов выживаемости нейронов (что коррелирует с результатами морфологического комплекса исследований) и чрезмерной активацией программ, направленных на избыточную аутофагию и симуляцию проапоптотических и провоспалительных механизмов, лежащих в основе выраженной инфильтрации иммунными клетками (см. результаты иммунофлуоресцентного исследования), вторичного повреждения ими нейронов пенумбры, а также редукции компенсаторно-адаптационного, репаративного и пластического потенциала нервной ткани пожилых пациентов при ишемическом повреждении.

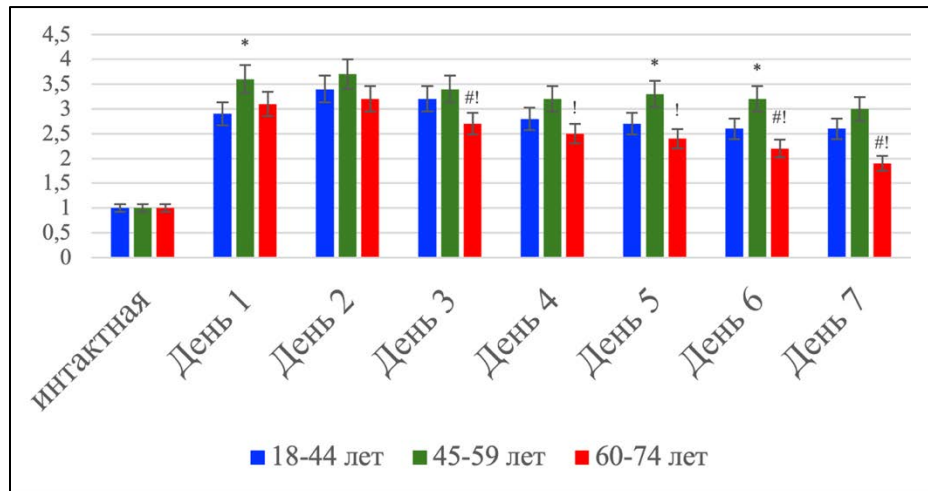


Рисунок 3.48 – Относительная экспрессия мРНК гена *PIK3CA* в головном мозге пациентов с ишемическим инсультом молодого (18–44 лет), среднего (45–59 лет) и пожилого (60–74 лет) возрастов, график. Слева представлены уровни экспрессии мРНК *PIK3CA* в условно интактной коре. Статистически значимые различия: * – «45–59» против «18–44»; # – «60–74 против «18–44»; ! – «60–74» против «45–59»; $p < 0,05$

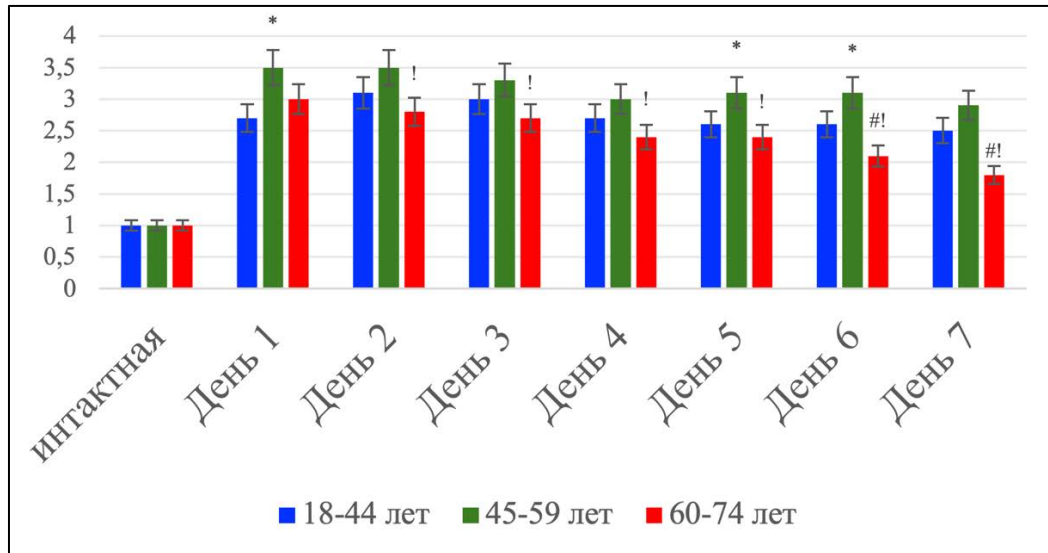


Рисунок 3.49 – Относительная экспрессия мРНК гена *AKT2* в головном мозге пациентов с ишемическим инсультом молодого (18–44 лет), среднего (45–59 лет) и пожилого (60–74 лет) возрастов, график. Слева представлены уровни экспрессии мРНК *AKT2* в условно интактной коре. Статистически значимые различия: * – «45–59» против «18–44»; # – «60–74» против «18–44»; ! – «60–74» против «45–59»; $p < 0,05$

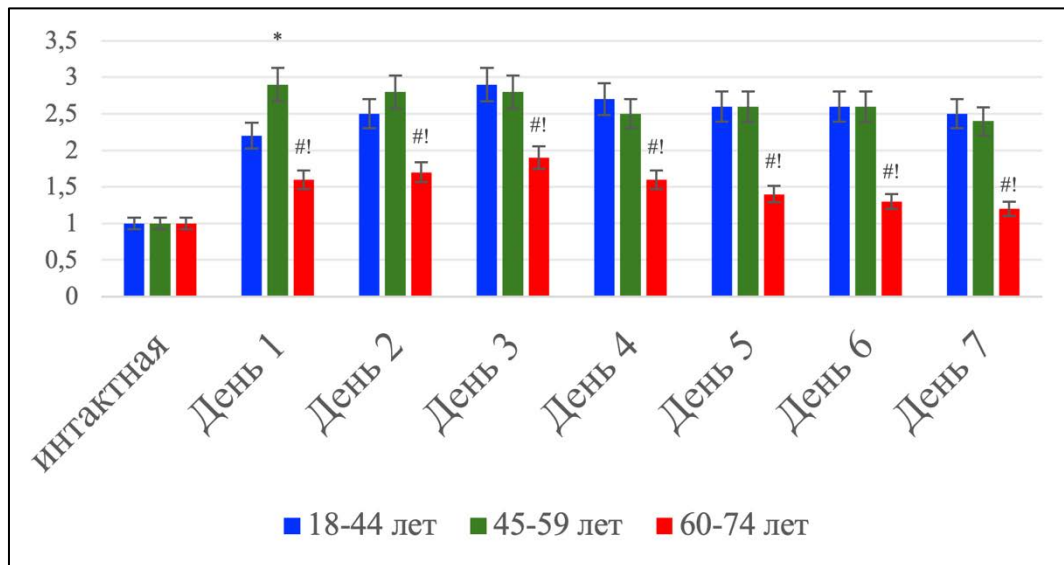


Рисунок 3.50 – Относительная экспрессия мРНК гена *MTOR* в головном мозге пациентов с ишемическим инсультом молодого (18–44 лет), среднего (45–59 лет) и пожилого (60–74 лет) возрастов, график. Слева представлены уровни экспрессии мРНК *MTOR* в условно интактной коре. Статистически значимые различия: * – «45–59» против «18–44»; # – «60–74» против «18–44»; ! – «60–74» против «45–59»; $p < 0,05$

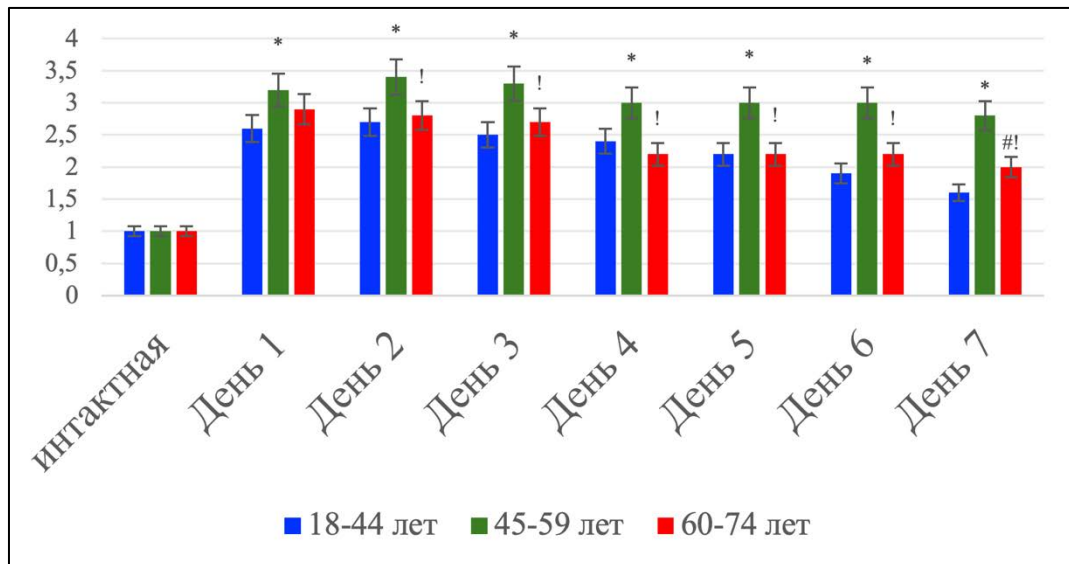


Рисунок 3.51 – Относительная экспрессия мРНК гена *FOXO3A* в головном мозге пациентов с ишемическим инсультом молодого (18–44 лет), среднего (45–59 лет) и пожилого (60–74 лет) возрастов, график. Слева представлены уровни экспрессии мРНК *FOXO3A* в условно интактной коре. Статистически значимые различия: * – «45–59» против «18–44»; # – «60–74» против «18–44»; ! – «60–74» против «45–59»; $p < 0,05$

Резюме

Данные молекулярно-генетического анализа транскрипционной активности генов участников сигнального пути PI3K/Akt дополняют результаты, полученные при гистологическом и иммунофлуоресцентном исследованиях. В совокупности полученные значения свидетельствует о высокой степени модуляции PI3K/Akt-сигналинга в зависимости от возраста и состояния локального гомеостаза. В молодом возрасте после ишемического повреждения сохраняется регуляция осей PI3K/Akt/mTOR и PI3K/Akt/FOXO3a, а сроки соответствуют морфологической стадии заболевания: FOXO3a преобладает на ранней (воспалительно-деструктивной) стадии, а позднее (в начале репаративной стадии) доминирует с mTOR, ответственный за инициацию эмбрионально-заложенной программы адаптивного нейропротекторного ответа в рамках реализации пластической функции нервной ткани. В среднем возрасте обнаружен некоторый дисбаланс между ветвями PI3K/Akt/mTOR и PI3K/Akt/FOXO3a, преимущественно за счет увеличения транскрипции *FOXO3A*. В пожилой группе этот дисбаланс становится

наиболее очевидным и проявляется снижением транскрипции *PIK3CA/AKT2/MTOR* при гиперактивации гена *FOXO3A*, что отражает дисрегуляцию и нарушение координации функций PI3K/Akt-сигналинга, ответственного за модуляцию клеточной выживаемости и репаративных программ в нервной ткани в норме и при ишемическом повреждении.

3.5.2. Экспрессия про- и противовоспалительных цитокинов

При проведении анализа транскрипционной активности генов про- и противовоспалительных цитокинов в условно интактной коре головного мозга уровни транскриптов *TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-10* и *IFNG* во всех возрастных группах были сопоставимы, их принимали за «базальный» уровень.

Уже к первым суткам после ишемического повреждения во всех возрастных группах регистрировали резкое увеличение транскрипции мРНК основных провоспалительных медиаторов (*TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-6*), однако амплитуда и продолжительность этого подъема существенно различались в зависимости от возраста. В группе лиц молодого возраста наблюдали увеличение транскрипции мРНК *TNF- α* , *IL-1 β* и *IL-6* в 2,5–3 раза по сравнению с интактной корой уже на 1–2 сутки, после чего отмечали устойчивую тенденцию к снижению этих показателей, а к концу первой недели исследуемые показатели приближались к значениям условно интактной группы (Рисунок 3.52, Рисунок 3.53, Рисунок 3.54). В группе среднего возраста максимальные значения экспрессии тех же цитокинов были несколько более высокими и сохранялись дольше, однако к концу первой недели также снижались до умеренно повышенных значений (Рисунок 3.52, Рисунок 3.53, Рисунок 3.54). В пожилой возрастной группе относительные уровни экспрессии мРНК *TNF- α* , *IL-1 β* и *IL-6* были наивысшими среди всех возрастов и оставались высокими на протяжении всего периода наблюдения: даже к 7-м суткам транскрипционная активность этих генов в 1,5 – 2 раза превышала показатели интактной группы (Рисунок 3.52, Рисунок 3.53, Рисунок 3.54). Таким образом, у

молодых и средних пациентов воспалительная реакция характеризовалась транзиторным, фазовым увеличением экспрессии провоспалительных цитокинов с последующим автономно регулируемым снижением, в то время как у лиц пожилого возраста наблюдали пролонгированную гиперактивацию генов провоспалительных цитокинов, ответственных за поддержание нейровоспаления.

Особый интерес представляют возрастные различия уровней относительной экспрессии мРНК противовоспалительного цитокина *IL-10*, играющего ключевую роль в лимитировании воспалительной реакции и активации механизмов репарации / ремоделирования – переходе от воспалительно-деструктивной к репаративной стадии ишемического повреждения. Так, в молодой группе экспрессия *IL-10* возрастала в 2,5 – 3 раза уже на 1 – 3 сутки от начала заболевания, достигая максимума к 3-м суткам, а затем незначительно снижалась, превышая, однако, показатели интактной группы на более поздних сроках. У пациентов среднего возраста транскрипционная активность *IL-10* была менее выраженной и более кратковременной. В пожилом возрасте уровень транскрипции *IL-10* в первые сутки после ишемического повреждения был ниже по сравнению с молодыми, а с 2 – 3 суток наблюдали постепенное снижение экспрессии этого медиатора практически до значений условно интактной группы (Рисунок 3.55).

В результате, в течение первой недели после ишемического повреждения в группе пожилого возраста отмечали сочетание устойчиво повышенной экспрессии провоспалительных цитокинов при относительно слабом и быстро угасающем противовоспалительном ответе. Следует подчеркнуть, что это происходит на фоне выраженной инфильтрации нервной ткани иммунными клетками, описанной в других разделах настоящей работы.

При анализе транскрипционной активности гена *IFNG*, кодирующего интерферон- γ (один из ключевых факторов неспецифической цитотоксичности NK / NKT и некоторых других иммунных клеток), обнаружили аналогичные возраст-ассоциированные тенденции (Рисунок 3.56). Так, в коре головного мозга лиц молодого возраста отмечали увеличение относительной экспрессии мРНК *IFNG* в

2,3 – 2,5 раза в первые 2 суток с последующим постепенным снижением, а к концу первой недели транскрипция гена этого медиатора превышала показатели интактной группы лишь в 1,4 раза. В группе среднего возраста динамика была сходной, с несколько более длительным сохранением повышенных значений. В то же время в пожилом возрасте после ишемического повреждения обнаружили высокие стартовые значения транскрипции *IFNG*, при отсутствии четкой тенденции к снижению: даже к 7-м суткам относительный уровень транскриптов интерферона- γ превышал показатели интактной группы практически в 2 раза. С учетом известной роли интерферона- γ в активации микроглии и макрофагов, усилении продукции провоспалительных цитокинов и поддержании неспецифической цитотоксической микросреды такой паттерн экспрессии указывает на формирование устойчивого, дисрегулированного нейровоспаления в коре головного мозга лиц пожилого возраста.

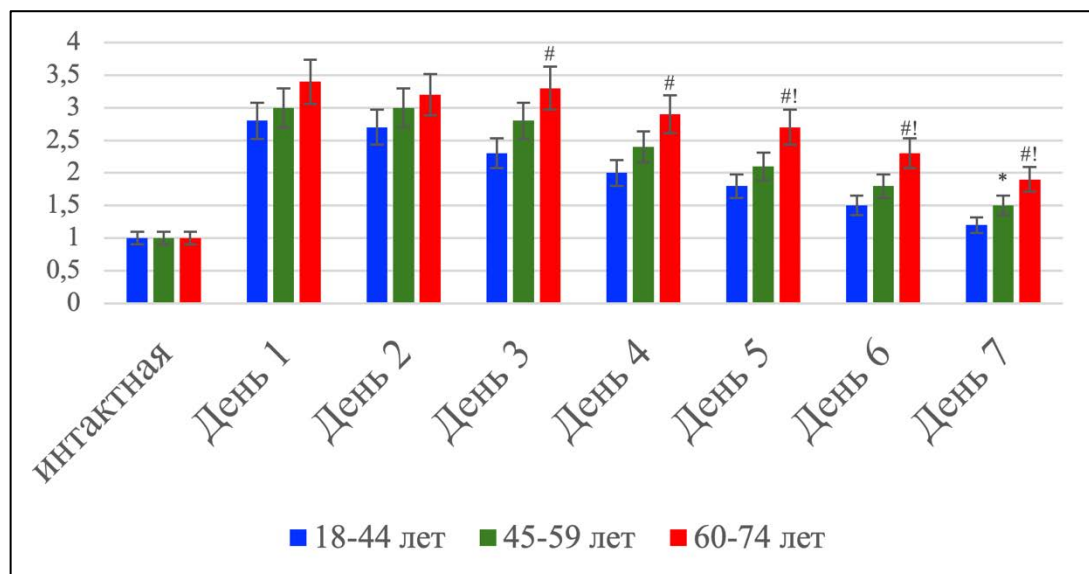


Рисунок 3.52 – Относительная экспрессия мРНК гена *TNF α* в головном мозге пациентов с ишемическим инсультом молодого (18 – 44 лет), среднего (45 – 59 лет) и пожилого (60 – 74 лет) возрастов, график. Слева представлены уровни экспрессии мРНК *TNF α* в условно интактной коре. Статистически значимые различия: * – «45 – 59» против «18 – 44»; # – «60 – 74 против «18 – 44»; ! – «60 – 74» против «45 – 59»; $p < 0,05$

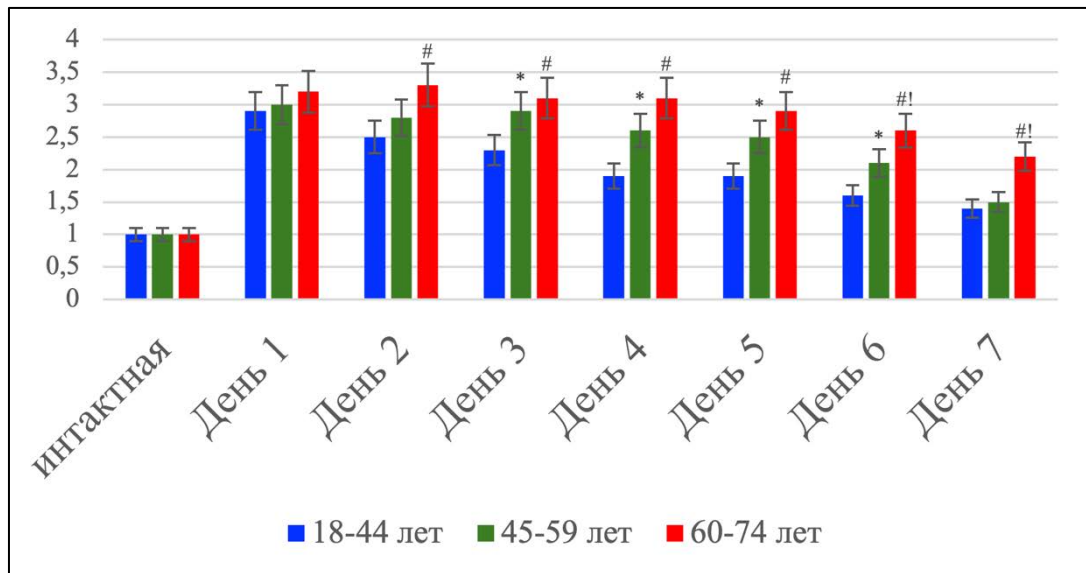


Рисунок 3.53 – Относительная экспрессия мРНК гена *IL-1β* в головном мозге пациентов с ишемическим инсультом молодого (18 – 44 лет), среднего (45 – 59 лет) и пожилого (60 – 74 лет) возрастов, график. Слева представлены уровни экспрессии мРНК *IL-1β* в условно интактной коре. Статистически значимые различия: * – «45 – 59» против «18 – 44»; # – «60 – 74 против «18 – 44»; ! – «60 – 74» против «45 – 59»; $p < 0,05$

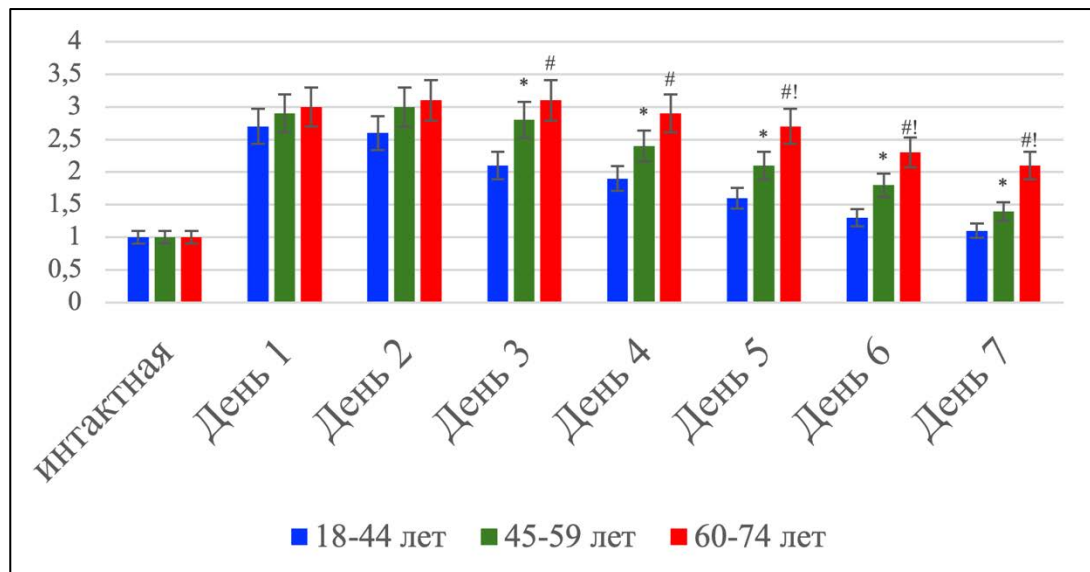


Рисунок 3.54 – Относительная экспрессия мРНК гена *IL-6* в головном мозге пациентов с ишемическим инсультом молодого (18 – 44 лет), среднего (45 – 59 лет) и пожилого (60 – 74 лет) возрастов, график. Слева представлены уровни экспрессии мРНК *IL-6* в условно интактной коре. Статистически значимые различия: * – «45 – 59» против «18 – 44»; # – «60 – 74 против «18 – 44»; ! – «60 – 74» против «45 – 59»; $p < 0,05$

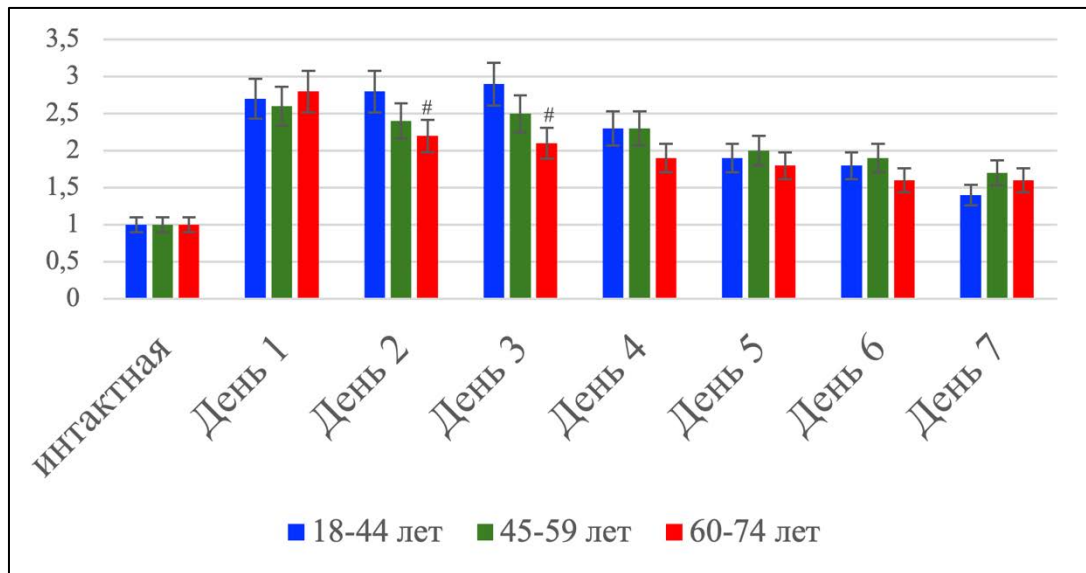


Рисунок 3.55 – Относительная экспрессия мРНК гена *IL-10* в головном мозге пациентов с ишемическим инсультом молодого (18 – 44 лет), среднего (45 – 59 лет) и пожилого (60 – 74 лет) возрастов, график. Слева представлены уровни экспрессии мРНК *IL-10* в условно интактной коре. Статистически значимые различия: * – «45 – 59» против «18 – 44»; # – «60 – 74 против «18 – 44»; ! – «60 – 74» против «45 – 59»; $p < 0,05$

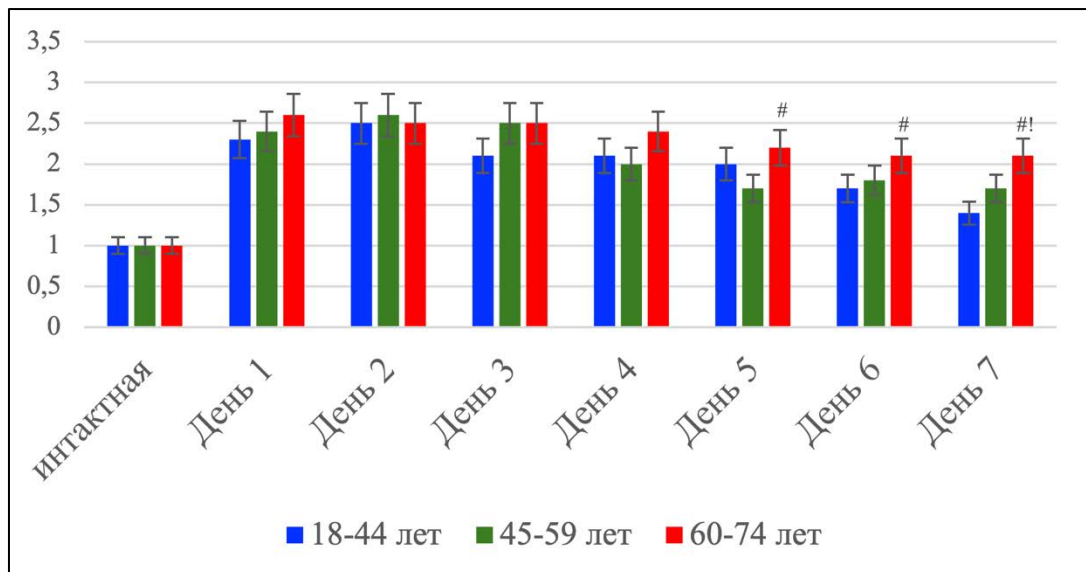


Рисунок 3.56 – Относительная экспрессия мРНК гена *IFNG* в головном мозге пациентов с ишемическим инсультом молодого (18 – 44 лет), среднего (45 – 59 лет) и пожилого (60 – 74 лет) возрастов, график. Слева представлены уровни экспрессии мРНК *IFNG* в условно интактной коре. Статистически значимые различия: * – «45 – 59» против «18 – 44»; # – «60 – 74 против «18 – 44»; ! – «60 – 74» против «45 – 59»; $p < 0,05$

Резюме

В совокупности с данными морфологического исследования, полученные результаты молекулярно-генетического анализа относительной экспрессии мРНК генов про- и противовоспалительных цитокинов свидетельствуют о принципиальных различиях в характере регуляции локальной воспалительной реакции в рамках клеточно-тканевого ответа в коре головного мозга на ишемическое повреждение при сравнении разных возрастных групп.

У лиц молодого возраста наблюдали координированную, фазово протекающую воспалительную реакцию с быстрым контролируемым увеличением экспрессии провоспалительных цитокинов $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$ и $IFNG$ и последующим снижением на фоне сохраняющегося устойчивого доминирования $IL-10$ во второй половине первой недели, что отражает сохранение механизмов локальной регуляции нейровоспаления и сочетается с данными, полученными при иммунофлуоресцентном исследовании. Так, сроки смены провоспалительного сигналинга в коре головного мозга на противовоспалительный паттерн соответствуют 3 – 4 суткам после ишемического повреждения, когда, по представленным ранее данным, реализуется переход от воспалительно-деструктивной к репаративной стадии.

В коре головного мозга лиц пожилого возраста, напротив, в течение всей первой недели после ишемического повреждения доминирует гиперэкспрессия провоспалительных медиаторов и $IFNG$ при относительно слабом противовоспалительном ответе, что создает предпосылки к формированию длительно сохраняющейся цитотоксической микросреды, препятствующей адекватной репарации нервной ткани и продолжающейся гибели нейронов зоны пенумбры (см. результаты гистологического и иммунофлуоресцентного исследований).

Кроме того, такая дисрегуляция локального цитокинового профиля формирует устойчивый провоспалительный паттерн, способствующий миграции и активации новых иммунных клеток. Это приводит к инициации длительно

персистирующего нейровоспаления и дисрегуляции клеточно-тканевого ответа в коре головного мозга, подтвержденных ранее при мультиплексном иммунофлуоресцентном анализе в этой возрастной группе.

3.5.3. Экспрессия участников сигнальных путей NFκB и TGF-β

При анализе относительной экспрессии мРНК генов участников сигнального пути NFκB (*RELA* / p65), сигнального каскада TGF-β (*SMAD2*, *SMAD3*), а также матриксных металлопротеиназ *MMP-2* и *MMP-9* также выявили возраст-ассоциированные различия молекулярных паттернов в рамках клеточно-тканевого ответа на ишемическое повреждение в нервной ткани. В молодой возрастной группе уже на первые сутки после клинической манифестации ишемического инсульта отмечали умеренное повышение транскрипционной активности *RELA* в 2,0 раза, в сочетании с частичным увеличением относительной экспрессии мРНК *SMAD2* и *SMAD3*. Последующее снижение *RELA* до значений, превышающих таковые в интактной группе лишь в 1,1 раза, указывает на постепенную автономно регулируемую редукцию NFκB-зависимого воспалительного ответа. Кроме того, начиная с 1-х суток регистрировали умеренное увеличение уровней экспрессии *MMP-2* (преобладает на ранних сроках) и *MMP-9* (преобладает на поздних сроках) с дальнейшим постепенным снижением их транскрипции, что соответствует контролируемой, кратковременной ремоделирующей реакции и сохраненной способности нервной ткани молодых пациентов к ограничению деструктивных механизмов воспаления и переходу к репаративной стадии ишемического повреждения (Рисунок 3.57).

В группе среднего возраста выявили более высокую амплитуду уровней относительной экспрессии мРНК *RELA*, которая превышала значения молодой группы в 1,2 – 1,3 раза в течение первых 4-х суток, однако впоследствии демонстрировала тенденцию к сокращению провоспалительного сигналинга. Кроме того, в этой группе отмечали более выраженное увеличение транскрипции

SMAD2 и *SMAD3*, что указывает на возрастающую вовлеченность TGF- β -сигналинга в клеточно-тканевой ответ на ишемическое повреждение. Транскрипционная активность *MMP-2* и *MMP-9* оставалась повышенной более длительное время по сравнению с молодой группой, что может отражать менее сбалансированный характер постишемической перестройки матрикса вследствие частичной дисрегуляции механизмов пластичности нервной ткани (Рисунок 3.58).

У лиц пожилого возраста отмечали наиболее выраженную и стойкую транскрипцию всех исследуемых генов: *RELA / p65*, *SMAD2*, *MMP-2* и *MMP-9* преимущественно на ранних сроках, в то время как относительная экспрессия мРНК *SMAD3* достигала максимальных значений к концу первой недели (Рисунок 3.59). Так, относительная экспрессия мРНК *RELA* резко увеличивалась уже на 1 – 2 сутки и лишь незначительно снижалась к концу первой недели, тем не менее превышая исходный уровень в 1,8 раза. Транскрипция *SMAD2* возрастала в 2,0 и более раз, оставаясь повышенной в течение всех сроков наблюдения, в то время как активация *SMAD3* была отсроченной и уровни относительной экспрессии его мРНК превышали значения условно интактной коры более чем в 2,0 раза к концу первой недели, что свидетельствует о дисрегуляции TGF- β -зависимых путей, способствующей персистирующему нейровоспалению, ремоделированию матрикса и патологическому глиозу в этой возрастной группе, обнаруженных ранее при морфологическом исследовании. Кроме того, уже в первые дни после клинической манифестации заболевания регистрировали наиболее высокую и длительную активацию *MMP-2* и *MMP-9* по сравнению с другими возрастными группами, что согласуется с гиперактивацией механизмов деструкции внеклеточного матрикса и повышенной проницаемостью гематоэнцефалического барьера у пациентов старшего возраста. Описанный механизм создает предпосылки к повреждению сосудистого компонента нейроваскулярной единицы, что приводит к повышению миграцию иммунных клеток в кору головного мозга и вторичному повреждению нейронов с некротической трансформацией пенумбры, показанной морфологическом блоке исследования.

В совокупности распределение транскрипционной активности изученных генов по срокам от клинической манифестации ишемического повреждения демонстрирует, что в коре головного мозга молодых пациентов на ранних сроках происходит кратковременная гиперактивация генов, ответственных за провоспалительный сигналинг, которая впоследствии сменяется на индукцию пластического потенциала и ремоделирование нервной ткани. У пожилых, напротив, формируется устойчивый дисбаланс и гиперэкспрессия индукторов воспалительной реакции и деструкции экстрацеллюлярного матрикса: выраженная транскрипция *RELA* сочетается с массивным SMAD-опосредованным TGF- β -сигналингом и пролонгированной гиперактивацией *MMP-2* и *MMP-9*. Такая конфигурация транскриптомного ответа отражает срыв механизмов регуляции локального воспаления, переход к персистирующему нейровоспалению и продолжающемуся повреждению компонентов нервной ткани.

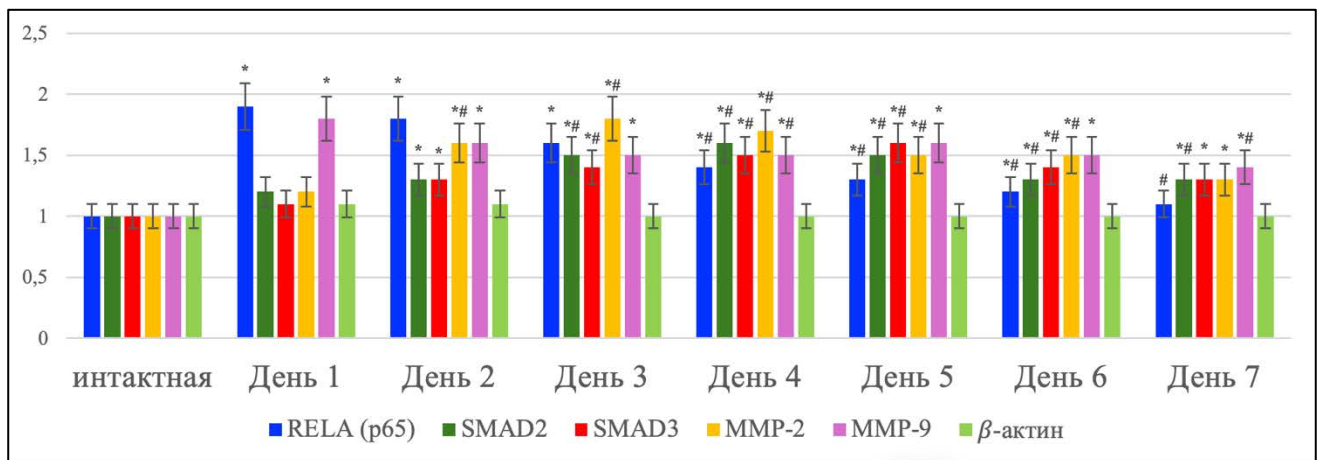


Рисунок 3.57 – Относительная экспрессия мРНК *RELA* / *p65*, *SMAD2*, *SMAD3*, *MMP-2* и *MMP-9* в фрагментах коры головного мозга в условно интактной группе и у пациентов с ишемическим инсультом молодого возраста в течение 1-й недели от начала заболевания, график. Статистически значимые различия: * – «интактная» против «День 1», # – по сравнению с «День 1»; $p \leq 0,05$

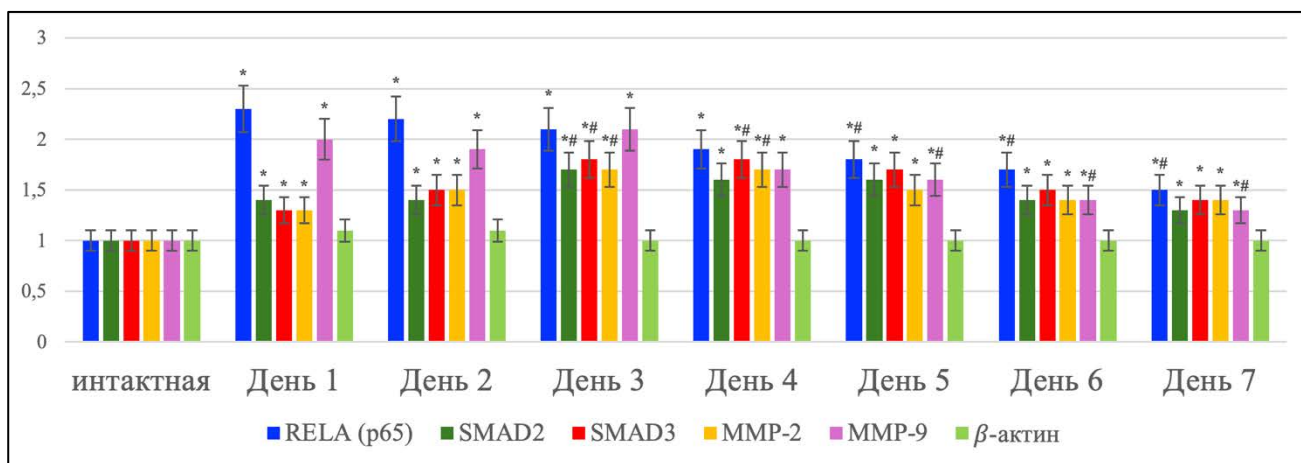


Рисунок 3.58 – Относительная экспрессия мРНК *RELA / p65*, *SMAD2*, *SMAD3*, *MMP-2* и *MMP-9* в фрагментах коры головного мозга в условно интактной группе и у пациентов с ишемическим инсультом среднего возраста в течение 1-й недели от начала заболевания, график. Статистически значимые различия: * – «интактная» против «День 1», # – по сравнению с «День 1»; $p \leq 0,05$

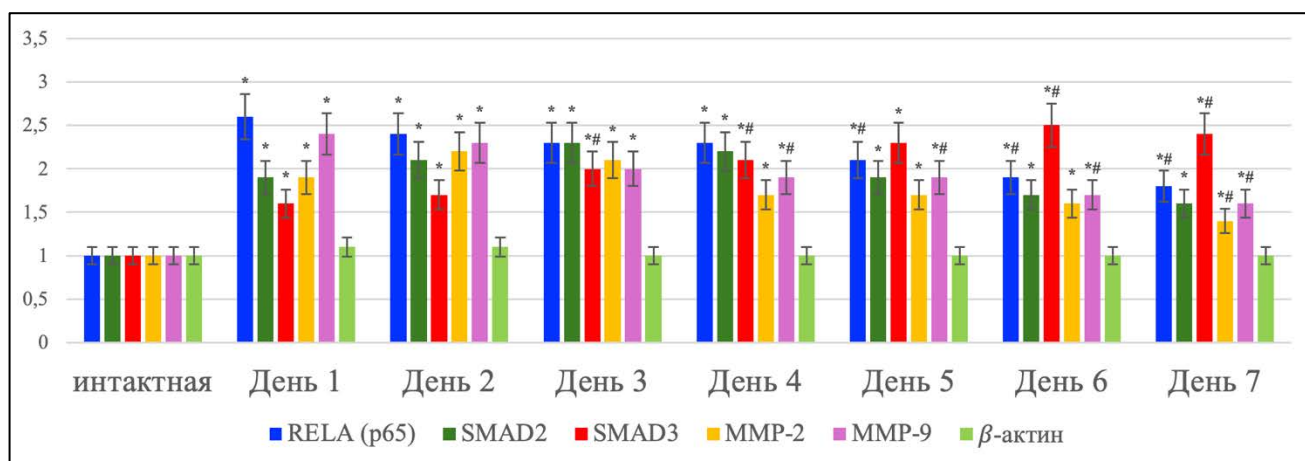


Рисунок 3.59 – Относительная экспрессия мРНК *RELA / p65*, *SMAD2*, *SMAD3*, *MMP-2* и *MMP-9* в фрагментах коры головного мозга в условно интактной группе и у пациентов с ишемическим инсультом пожилого возраста в течение 1-й недели от начала заболевания, график. Статистически значимые различия: * – «интактная» против «День 1», # – по сравнению с «День 1»; $p \leq 0,05$

Резюме

Программы, заложенные еще в эмбриональном периоде развития, определяют функции и эффекты ключевых участников сигнальных путей NFκB и TGF-β, а также их роль в реализации механизмов воспаления, деструкции и ремоделирования нервной ткани. Так, сигналинг NFκB контролирует клеточно-тканевую ответ, в то время как нижележащие эффекторы каскада TGF-β контролируют локальный гомеостаз, клеточную дифференцировку и морфогенез (TGF-β/BMP/Smad), ремоделирование и пластичность нервной ткани. В то время как некоторые из них регулируют локальный гомеостаз (SMAD2) и проницаемость ГЭБ (MMP-2) в нормальных условиях, другие способствуют регуляции провоспалительного сигналинга, механизмов деструкции / ремоделирования, а также реакции глиального (SMAD3) и сосудистого (MMP-9) компонентов нервной ткани на острое повреждение.

Учитывая вышесказанное, следует отметить, что наиболее выраженную транскрипционную активность *RELA/p65*, *SMAD2*, *MMP-2* и *MMP-9* наблюдали на ранних сроках, что согласуется с их ролью в определении провоспалительного сигналинга и деструктивным влиянием на экстрацеллюлярный матрикс, а также сочетается с фазами наиболее выраженной миграции иммунных клеток, описанными в морфологическом блоке настоящего исследования. Это подтверждает предположения об участии этих белков в инициации и поддержании ранней воспалительной реакции (в рамках воспалительно-деструктивной стадии ишемического повреждения), а индуцированное ими разрушение компонентов экстрацеллюлярного матрикса и увеличение проницаемости ГЭБ для иммунных клеток лишь способствуют усугублению нейровоспаления и вторичному повреждению нейронов пенумбры, преимущественно у лиц пожилого возраста.

На более поздних сроках, напротив, отмечали увеличение экспрессии SMAD3, ответственного за активацию микроглии (в то же время отмечали переход к репаративной стадии и преобладание в нервной ткани M2-макрофагов), а также, вероятно, за патологический глиоз, обнаруженный при гистологическом

исследовании у некоторых пожилых пациентов. В совокупности полученные результаты демонстрируют прямую корреляцию между молекулярными и морфологическими данными: у пожилых пациентов усиленная экспрессия участников NF κ B- и TGF- β -сигналинга согласуется с выраженной инфильтрацией нервной ткани Т-лимфоцитами, доминированием М1-макрофагов и снижением доли регуляторных NK и NKT клеток, тогда как у молодых умеренная активация RELA, SMAD2 / 3 и MMP ассоциируется с кратковременной клеточной реакцией и последующим переходом к репаративному иммунному профилю.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

4.1. Нервная ткань как динамическая развивающаяся система: от эмбриогенеза к постнатальному онтогенезу

Нервная ткань представляет собой сложную, иерархически организованную и функционально интегрированную систему, формирование которой начинается в эмбриогенезе и продолжается в течение всего постнатального онтогенеза [239]. Эмбриональное развитие коры головного мозга характеризуется строгой пространственно-временной координацией пролиферации нейральных предшественников, их направленной миграции, дифференцировки и последующей интеграции в зрелую систему межнейронной коммуникации [279]. Уже на этом этапе закладываются принципы нейроваскулярных взаимодействий, определяющие способность нервной ткани к структурному ремоделированию и адаптации в последующие периоды жизни. Так, микрососуды не только обеспечивают трофическую поддержку нейрогенеза, но и выступают источником сигнальных молекул, регулирующих рост и направленную миграцию нейронов [289].

Существенной особенностью нейроонтогенеза является синхронное формирование компонентов нейроваскулярной единицы (НВЕ) как структурно-функционального комплекса, ответственного за сопряжение нейрогенеза и ангиогенеза [66]. Эндотелиальные клетки, перициты, астроциты и нейроны образуют устойчивую систему межклеточных взаимодействий, регулирующую микроциркуляцию, ионный баланс, барьерные свойства и локальные адаптационные реакции. Сигнальные пути, координирующие развитие НВЕ в эмбриогенезе (VEGF, Wnt/ β -catenin, Notch, TGF- β , FGF, PI3K/Akt/mTOR и др.), продолжают функционировать и после рождения [143, 264, 296]. Так, в зрелом головном мозге эти механизмы принимают непосредственное участие в поддержании локального гомеостаза, синаптической пластичности и адаптивном

ремоделировании межнейронной коммуникации. Было показано, что их активность постепенно снижается по мере старения, что проявляется уменьшением сосудистой реактивности, изменением глиальной регуляции и ограничением пластического потенциала нервной ткани [96, 174].

Ангиогенез на эмбриональном этапе развития головного мозга регулируется многочисленными сигнальными молекулами, среди которых ведущую роль играют HIF, VEGF, ангиопоэтины и др. Их активность обеспечивает формирование разветвленной сети микрососудов, адаптирующейся к возрастающим метаболическим потребностям нервной ткани [185, 232]. По мере завершения эмбриогенеза процессы интенсивного роста сменяются стабилизацией структур, однако механизмы сигнальной координации между клетками сохраняются и продолжают участвовать в поддержании структурной и функциональной целостности мозга. Кроме того, в некоторых исследованиях показана их способность к реактивации на фоне повреждения структур головного мозга, особенно в условиях гипоксии, как одного из наиболее сильных проангиогенных стимулов [17].

В постнатальном онтогенезе трансформация нервной ткани проявляется постепенным снижением интенсивности нейрогенеза, редукцией плотности микрососудов и модуляцией функционального состояния глиальных клеток [144]. Эти изменения не означают полного выключения заложенных на эмбриональном этапе развития программ, а лишь свидетельствуют о постепенном ограничении их регуляторных возможностей и ослаблении нейроваскулярных взаимодействий по мере старения. Результатом становится частичное угнетение способности нервной ткани к реактивной трансформации и адаптации к внешним и внутренним стрессовым воздействиям в рамках реализации пластического потенциала [216].

В связи с этим, головной мозг в постнатальном онтогенезе следует рассматривать не как статичную структуру, а как динамическую систему, сохраняющую способность к частичной реактивации эмбрионально-заложенных морфогенетических программ, особенно в условиях ишемического повреждения. В

последние годы накоплено большое количество данных о наличии нейрогенных ниш в субвентрикулярной зоне боковых желудочков и зубчатой извилине гиппокампа, что подтверждает сохранение потенциала к обновлению пула нейронов в зрелом головном мозге [29, 48, 107]. Однако активность этих зон и их чувствительность к регуляторным сигналам также существенно изменяется с возрастом, что отражает постепенную трансформацию пластического и регенераторного потенциала нервной ткани в постнатальном онтогенезе [71].

В условиях ишемического повреждения указанные механизмы межклеточной координации проявляются наиболее отчетливо. Так, в условиях гипоксии происходит активация тех сигнальных и клеточных механизмов, которые в эмбриогенезе обеспечивали рост и формирование структур головного мозга [70]. В настоящем исследовании комплексно продемонстрировано, что дефицит трофической поддержки способствует компенсаторно-направленному усилению процессов ангиогенеза, изменению функционально-фенотипического состояния глиальных клеток, активации механизмов, ответственных за выживание клеток нервной ткани. Такая сопряженная реакция со стороны всех компонентов НВЕ на тканевом, клеточном и молекулярном уровнях отражает реализацию компенсаторно-адаптационного и пластического потенциала нервной ткани. Однако, полученные данные свидетельствуют, что степень активации и эффективность этих механизмов существенно зависят от возраста, что определяет различия в устойчивости структур головного мозга к ишемическому повреждению. У молодых пациентов сохраняется согласованное взаимодействие нейронального, сосудистого и глиального компонентов, обеспечивающее более высокий компенсаторно-адаптационный потенциал. В пожилом возрасте отмечается снижение сосудистой реактивности, преобладание провоспалительных изменений и ослабление сигнальных путей клеточного выживания, что ограничивает репаративные возможности нервной ткани.

4.2. Влияние возраста на морфологическую организацию коры головного мозга в норме и при ишемическом повреждении

Морфогенез коры головного мозга представляет собой результат координированных процессов радиальной миграции, послойной дифференцировки нейронов и формирования функциональных синаптических сетей, заложенных еще на этапе эмбрионального развития и определяющих стратификацию и метаболическую специализацию неокортекса [285]. Эти закономерности сохраняются в зрелом головном мозге на протяжении всей жизни, а нейроны, астроциты, эндотелиальные клетки и перициты образуют сложную морфофункциональную систему – НВЕ, поддерживающую гомеостаз, адаптивные и пластические возможности нервной ткани. Вместе с тем многочисленные исследования показывают, что с возрастом происходят угнетение сигнального взаимодействия между компонентами НВЕ, что способствует прогрессирующему снижению объемной плотности нейронов, состояния микроциркуляторного русла, дисрегуляции глиального компонента [203, 231, 244].

Так, возраст является одним из ключевых факторов, определяющих морфологическую организацию коры головного мозга в постнатальном онтогенезе. Даже при отсутствии острого повреждения нервная ткань претерпевает структурные и молекулярные изменения, отражающие постепенное угнетение нейроваскулярных взаимодействий, метаболической активности и клеточной регуляции. В настоящем исследовании результаты морфологического анализа демонстрируют, что эти изменения формируют исходный морфологический фон, который, в дальнейшем, значимо влияет на реализацию клеточно-тканевого ответа и пластического потенциала нервной ткани при ишемическом повреждении.

Так, в нормальных условиях (без ишемического повреждения) в коре головного мозга лиц старших возрастных групп формируется четкий морфологический паттерн: уменьшение плотности нейронов, редукция размеров перикариона пирамидных клеток, вакуолизация цитоплазмы, гиалиноз стенки

кровеносных сосудов. Эти особенности согласуются с данными других исследователей о прогрессирующем снижении количественно-качественных характеристик нейронального пула с возрастом [40]. Кроме того, в единичных работах описаны механизмы истончения слоев коркового вещества, редукции дендритных отростков и синаптических контактов, а также снижения числа астроцитарных отростков, обеспечивающих нейроваскулярное сопряжение [144]. На основании полученных в настоящем исследовании результатов и данных других авторов можно говорить о возраст-ассоциированном нарушении взаимодействия компонентов НВЕ и дисрегуляции микроциркуляторного русла, что предрасполагает к развитию хронического гипоксического фона и сокращению компенсаторно-адаптационного потенциала нервной ткани при остром ишемическом повреждении.

В проведенном исследовании, вне зависимости от возраста, ишемическое повреждение во всех случаях привело к формированию зоны инфаркта головного мозга (паннекроза) с практически полной утратой в ней жизнеспособных нейронов, причем в единичных сохранившихся клетках наблюдали эозинофилию цитоплазмы, пикнотические изменения ядер, что сопровождалось стазом форменных элементов крови в просвете кровеносных сосудов. Эти изменения полностью соответствуют классическому морфологическому паттерну инфаркта мозга, описанному в многочисленных исследованиях в области нейропатологии [130]. В окружающей ядро инфаркта зоне пенумбры отмечали характерные признаки сублетального повреждения: частичный хроматолиз, изменение распределения хроматофильной субстанции, периферическое смещение ядра и др. Подобные изменения принято считать потенциально обратимыми при быстрой компенсации и восстановлении адекватного кровотока [302].

Количественные и качественные результаты, полученные в настоящем исследовании, подтверждают, что возраст напрямую влияет на выраженность перечисленных процессов при остром ишемическом повреждении. Так, в коре головного мозга лиц молодого возраста в зоне пенумбры сохраняется

значительный пул нейронов с нормальной цитоархитектоникой, а степень хроматолиза и вакуолизации цитоплазмы была наименьшей. Эти данные согласуются с другими экспериментальными и клиническими наблюдениями, демонстрирующими, что головной мозг в этом возрасте обладает высоким компенсаторно-адаптационным потенциалом за счет эффективной работы эндогенных антиоксидантных систем, митохондриальной активности и PI3K/Akt-зависимых нейропротекторных каскадов [108]. В пожилой возрастной группе в ответ на ишемическое повреждение, напротив, отмечали резкое сокращение пула нейронов, с частичной некротической трансформацией зоны пенумбры и расширением ядра инфаркта на более поздних сроках, что согласуется с данными других исследований о снижении энергетического резерва и ослаблении антиоксидантной защиты по мере старения [46]. Это также частично объясняет большой объем инфаркта мозга и более тяжелое течение ишемического инсульта у пациентов старших возрастных групп [14].

Проведенный морфометрический анализ подтвердил возрастную зависимость темпов сокращения количества нейронов: в течение первой недели после клинической манифестации ишемического инсульта в зоне пенумбры у лиц молодого возраста количество нейронов оставалось существенно выше по сравнению с пожилыми. Более того, при проведении мультиплексного иммунофлуоресцентного исследования обнаружили фазовое увеличение сигналинга NeuN и NSE в нейронах коры головного мозга в молодой возрастной группе, что свидетельствует не только об их структурной сохранности, но и о способности к частичной компенсации повреждения посредством увеличения метаболической активности. В пожилом возрасте уже к концу первой недели после ишемического повреждения в зоне пенумбры отмечали лишь единичные нейроны с патологическим распределением слабого NeuN[^]NSE сигналинга и активацией апоптотического каскада, что указывает на резкое ограничение компенсаторного потенциала в этих клетках. Эти результаты дополняют сведения, опубликованные другими авторами, о том, что по мере старения происходит дисрегуляция

сигнальных путей, ответственных за аутофагию, метаболическую активность и репарацию нейронов [5, 8, 120].

Возрастные различия обнаружены и при анализе реактивных изменений стенки кровеносных сосудов после ишемического повреждения. Так, в зоне пенумбры у лиц молодого возраста отмечали раннее резкое увеличение числа CD31⁺ микрососудов, что соответствует морфологической картине выраженного ангиогенеза [3]. Некоторые авторы уточняют, что ишемическое повреждение может сопровождаться активацией сигнальных каскадов, ответственных за реализацию проангиогенных программ, а именно – факторов VEGF, TGF- β , HIF и Ang-1/2, обеспечивающих не только дифференцировку эндотелиальных клеток, но и повышение устойчивости нейронов к гипоксии [12, 229, 252]. Это объясняет выраженное иммуномечение эндотелиальных клеток и нейронов при иммуногистохимическом окрашивании фрагментов коры головного мозга молодой возрастной группы с антителами к VEGF-A. Кроме того, это еще раз подчеркивает сохранение тесного нейроваскулярного взаимодействия в рамках реализации сочетанного компенсаторного ответа нейронов и кровеносных сосудов на ишемическое повреждение. Выявленные изменения тождественны таковым при эмбриональном развитии головного мозга и могут свидетельствовать о реактивации проангиогенных программ в рамках реализации пластического потенциала нервной ткани при инфаркте головного мозга [64, 286].

В пожилой возрастной группе, напротив, отмечали резкое снижение числа CD31⁺ эндотелиальных клеток на фоне слабой экспрессии VEGF-A в стенке кровеносных сосудов и нейронах, что подтверждает предположение о возраст-ассоциированном угнетении ангиогенеза и дисрегуляции сосудистого ремоделирования [6, 97]. Аналогичные данные о возрастном снижении проангиогенного сигналинга VEGF при старении ранее были описаны в экспериментальных работах в качестве одного из ключевых механизмов нарушения нейроваскулярной интеграции [100].

Результаты окрашивания фрагментов коры головного мозга по Нисслию дополняют описанные выше данные. Так, в пенумбре в коре головного мозга лиц молодого возраста сохранялось значительное количество нейронов с нормальной citoархитектоникой, тогда как в пожилом возрасте ишемическое повреждение привело не только к массивной гибели нейронов, но и развитию морфологических признаков дегенерации цитоплазмы с тотальным хроматолизом в немногочисленных клетках. Эти данные так же подтверждают высказанные ранее предположения о возраст-ассоциированном снижении компенсаторной способности нейронов к восстановлению белок-синтетической функции и метаболического гомеостаза, что согласуется с представлениями о нарушении регуляции синтетических и транспортных процессов в головном мозге при старении, высказанным другими авторами [96].

Как уже было сказано ранее, crucialную роль не только при формировании, но и в сохранении морфологической целостности коры головного мозга играет взаимодействие нейрональных и сосудистых компонентов НВЕ. В молодом возрасте нейроваскулярное сопряжение функционирует согласованно, обеспечивая адекватную доставку кислорода и метаболитов, а также автономную регуляцию микроциркуляторного русла при участии астроцитов и перицитов. Даже в отсутствие острого ишемического повреждения в головном мозге в пожилом возрасте отмечали признаки нарушения этой координации, проявляющиеся формированием участков периваскулярного отека с расширенным пространством Вирхова-Робина, разрыхлением матрикса, нарушением целостности сосудистой стенки [4]. По данным литературных источников, это также сопровождается нарушением астроцитарно-васкулярного взаимодействия, увеличением проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), угнетением экспрессии аквапоринов и ионных каналов, что в совокупности приводит к дерегуляции водно-электролитного обмена и усугублению отека [74].

Возрастная трансформация гистоархитектоники коркового вещества головного мозга связана с прогрессирующей дисрегуляцией межклеточных

взаимодействий: совокупное снижение плотности кровеносных сосудов и трофической поддержки, редукция нейронов и нарушение глиальной регуляции создают предпосылки для структурной дезинтеграции НВЕ и снижения ее функциональной стабильности в нормальных условиях [54, 75, 237, 244]. При ишемическом повреждении этот дисбаланс проявляется особенно выражено, когда нарушение нейроваскулярного сопряжения в сочетании с дисрегуляцией молекулярных каскадов, обеспечивающих нейрогенез и ангиогенез, способствует разобщению сигнализации между эндотелием, нейронами и астроцитами. В этих условиях у лиц пожилого возраста в ответ на гипоперфузию происходит не только угнетение компенсаторного и пластического потенциала нервной ткани, но и прогрессирующая гибель нейронов, комплексно оцененная при гистологическом и мультиплексном иммунофлуоресцентном исследованиях.

Полученные результаты дополняют данные о том, что выраженность клеточно-тканевого ответа на ишемическое повреждение в коре головного мозга определяется не только степенью локальной гипоксии, но и возрастом, влиянием которого на эффективность ремоделирования нервной ткани и чувствительность к нейротропной терапии не следует пренебрегать [49]. В молодой возрастной группе сохраняется более высокий уровень морфологической и функциональной целостности коркового вещества, что обеспечивает возможность для реализации репаративных и пластических механизмов. Напротив, признаки структурной дезорганизации, утрата межклеточной коммуникации и недостаточность автономной регуляции компонентов НВЕ в пожилом возрасте связаны с расширением объема инфаркта и ухудшением клинического течения ишемического инсульта [90]. Обнаруженные в настоящем исследовании различия отражают фундаментальную зависимость морфогенеза и пластического потенциала нервной ткани от возрастной модуляции нейроваскулярных взаимодействий.

4.3. Изменение взаимодействия компонентов нейроваскулярной единицы в динамике постнатального онтогенеза в норме и при ишемическом повреждении

Нейроваскулярная единица представляет собой структурно-функциональный комплекс, обеспечивающий взаимосвязь между нейронами, макро- и микроглией, элементами сосудистой стенки и внеклеточного матрикса. Формирование НВЕ начинается в эмбриогенезе в условиях тесного сопряжения нейрогенеза и ангиогенеза, однако ключевые регуляторные механизмы сохраняются на протяжении всей жизни организма [225]. В норме интеграция компонентов НВЕ обеспечивается балансом между ангиогенными, нейрогенными и противовоспалительными факторами.

По данным многочисленных исследований, координация между компонентами НВЕ обеспечивается сигнальной системой Notch, регулирующей артериовенозную спецификацию и ветвление кровеносных сосудов, а также каскадом Wnt/ β -catenin, участвующим в формировании ГЭБ и поддержании его стабильности [73, 85]. Существенную роль в регуляции выживания и метаболической адаптации нейронов также играет каскад PI3K/Akt, нижележащие участники которого обеспечивают устойчивость нейронов и эндотелиальных клеток при повреждении: баланс достигается за счет сочетанной модуляции экспрессии mTOR (ответственной за выживание) или FOXO3A (ответственной за клеточную гибель) [212, 269]. Ремоделирование внеклеточного матрикса и регуляция ангиогенеза также связаны с активностью TGF- β -сигналинга, реализуемого через рецепторы ALK1 и ALK5 с последующей активацией SMAD2 и SMAD3 [229]. Регуляция ангиогенеза обеспечивается синтезом в эндотелиальных клетках VEGF-A и ангиопоэтинов, которые, взаимодействуя с рецепторами VEGFR2 и Tie2, стимулируют рост гемокapилляров и способствуют выживанию нейронов как напрямую (через активацию PI3K/Akt-каскада), так и косвенно – увеличивая трофическую поддержку [176].

В то же время астроциты формируют периваскулярные контакты с эндотелиальными клетками, регулируя транспорт метаболитов, ионный баланс и локальный гомеостаз посредством модуляции экспрессии аквапоринов и ионных каналов Kir4.1 [78]. Перициты стабилизируют стенку кровеносных сосудов, а также регулируют ангиогенез через PDGFR β - и TGF- β -зависимые эффекторы, контролируя проницаемость ГЭБ [228]. Клетки микроглии, обладая высокой функционально-фенотипической пластичностью, ответственны не только за иммунный надзор и контроль ангиогенеза, но также участвуют в ремоделировании синапсов и контактов между макроглией и сосудистой стенкой [151].

В нормальных условиях совокупность перечисленных каскадов обеспечивает не только регуляцию проницаемости ГЭБ, энергетического метаболизма и трофической поддержки, но и синхронизацию нейро- и ангиогенеза, а принципы этих взаимодействий сохраняются и в зрелом головном мозге, обеспечивая структурную и функциональную целостность НВЕ. Однако с возрастом происходит постепенное изменение регуляции этих механизмов, что приводит к снижению пластичности нервной ткани и нарушению межклеточной координации.

Результаты настоящего исследования демонстрируют, что в постнатальном онтогенезе морфофункциональное состояние НВЕ подвержено значимой возрастной модуляции. У лиц молодого возраста в нормальных условиях наблюдали высокую плотность микрососудов (CD31⁺) и выраженная экспрессия CD105 и VEGF-A в эндотелиальных клетках (вероятно, в сочетании с экспрессией HIF1 α), что указывает на сохранность ангиогенного потенциала и адекватность трофической поддержки. В таких условиях ГЭБ функционирует как селективный регулятор межклеточного обмена [26].

У пожилых пациентов, напротив, регистрировали признаки деструкции ГЭБ: истончение эндотелия, периваскулярный отек, расширение пространств Вирхова-Робина и снижение количества CD31⁺ и CD105⁺ эндотелиальных клеток. Это сопровождается данными о возраст-ассоциированной утрате VEGF-A-сигналинга и согласуется с ранее опубликованными работами, в которых авторы связывают

угнетение регулируемого VEGF ангиогенеза с возрастным ослаблением активности PI3K/Akt и eNOS, а также гиперэкспрессией оксида азота и эндотелина-1, приводящим к постепенной редукции микроциркуляторного русла [92, 131]. Кроме того, в ряде публикаций сообщается о сопутствующем возраст-ассоциированном снижении активности TGF- β /ALK1-сигнального пути, что приводит к нарушению взаимодействия между эндотелием и астроцитами, сокращению экспрессии белков плотных контактов (claudin-5, occludin, ZO-1), повышению проницаемости ГЭБ и связанным с этими изменениями увеличением клеточной гибели в зоне пенумбры (Рисунок 4.1) [229, 248].

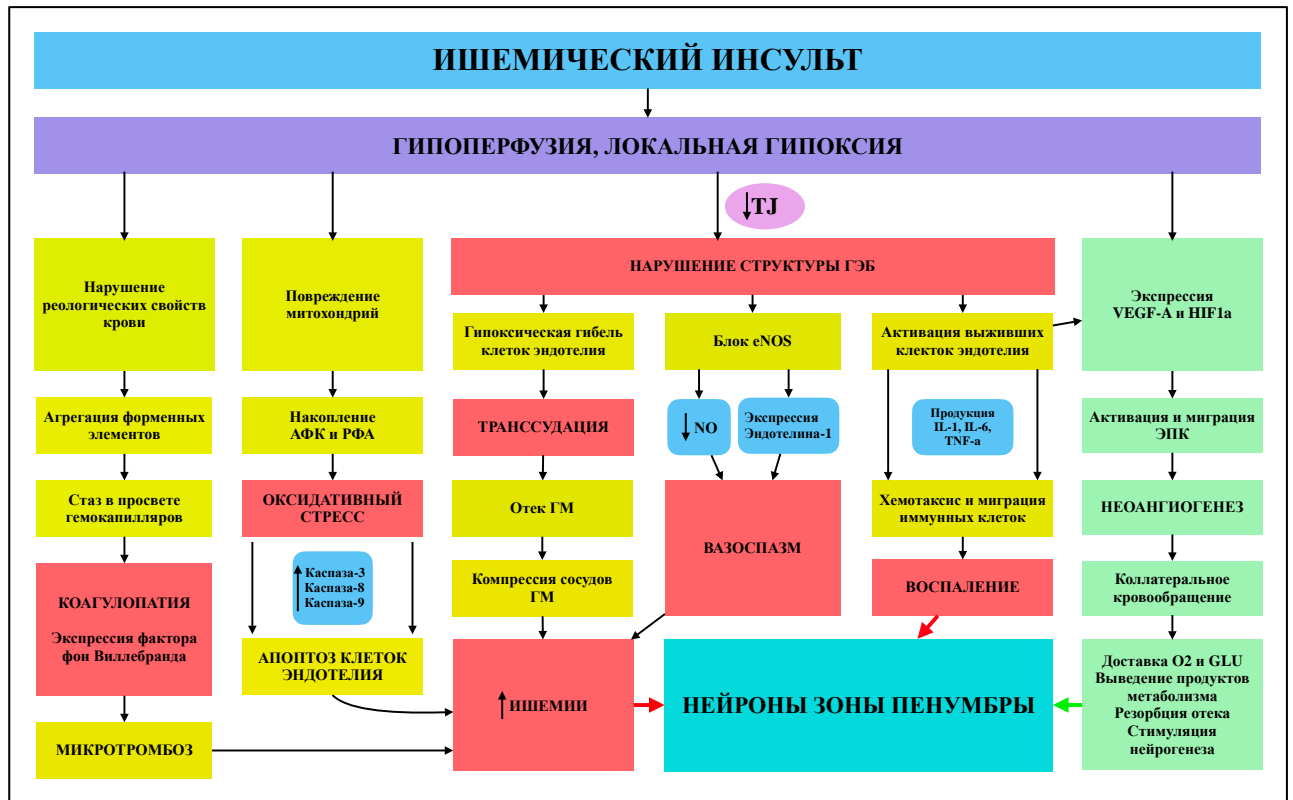


Рисунок 4.1 – Вклад эндотелиальных клеток в патогенез повреждения нейронов зоны пенумбры при ишемическом инсульте, схема. ТТJ – плотные контакты, АФК – активные формы кислорода, РФА – реактивные формы азота, ГМ – головной мозг, ГЭБ – гематоэнцефалический барьер, eNOS – эндотелиальная фракция синтазы оксида азота, NO – оксид азота, IL – интерлейкин, TNF- α – фактор некроза опухоли- α , VEGF – васкулярный эндотелиальный фактор роста, HIF – фактор, индуцируемый гипоксией, ЭПК – эндотелиальные прогениторные клетки, GLU – глюкоза

При инфаркте мозга дисрегуляция взаимодействия компонентов НВЕ резко изменяется, приобретая фазовую динамику в зависимости от стадии (ишемически-некротическая, воспалительно-деструктивная или репаративная) и ведущих механизмов (ишемия, клеточная гибель, воспаление, ремоделирование). В зоне ишемического повреждения преимущественно в первые сутки после клинической манифестации (ишемически-некротическая стадия) отмечали деструкцию сосудистой стенки и прогрессирующую гибель нейронов пенумбры. Впоследствии это привело к активации микроглии, а также гиперэкспрессии провоспалительных цитокинов – IL-1 β , TNF- α , IL-6, усиливающих проницаемость ГЭБ через NF κ B-зависимые пути. Сочетание этих факторов способствует миграции ко 2–3 суткам различных популяций иммунных клеток и переходу к воспалительно-деструктивной стадии [191].

В это время в зоне пенумбры у лиц молодого возраста выявляли компенсаторную реактивацию проангиогенных и нейропротекторных каскадов, заложенных на этапе эмбрионального развития головного мозга. Так, отмечали увеличение доли CD105⁺CD31⁺ эндотелиальных клеток, увеличение в них сигналинга VEGF-A и TGF- β /SMAD2, а также доминирование оси PI3K/Akt/mTOR в нервной ткани. Этот комплексный ответ со стороны регуляторных систем способствует выживанию эндотелиальных клеток, росту новых кровеносных сосудов, увеличению локальной трофической поддержки, что создает предпосылки для реактивации нейрогенеза в рамках реализации пластической функции. Сбалансированное увеличение экспрессии mTOR и FOXO3a в нервной ткани согласуется с современными представлениями о роли этих белков в регуляции клеточной пластичности, метаболизма и репарации [41, 179].

В аналогичных зонах в пожилой возрастной группе отмечали снижение количества CD31⁺ кровеносных сосудов в течение всего срока наблюдения, экспрессия VEGF-A и CD105 в них была снижена, а уровень TGF- β и SMAD2/3 превышал значения интактной группы и показатели группы молодого возраста, что указывает на преобладание провоспалительного и профибротического сигналинга.

Это сопровождалось изолированным увеличением транскрипционной активности FOXO3A, ответственного за клеточную гибель, в сочетании с активацией провоспалительного гена *RELA/p65*, объясняя активацию апоптотических (\uparrow каспазы-3) и воспалительных программ при угнетении экспрессии mTOR и противовоспалительного IL-10 [116, 274]. В таких условиях происходит многократное усиление клеточной воспалительной инфильтрации, хронизация воспаления, формирование цитотоксической микросреды, ремоделирование сосудистой стенки и прогрессирующее разобщение сигналинга между компонентами НВЕ.

Микроглия и астроциты принимают непосредственное участие в интеграции сигналинга между нейрональным и сосудистым компонентами НВЕ. У лиц молодого возраста клетки микроглии демонстрировали фазовую пластичность – раннее преобладание M1-фенотипа макрофагов с последующим автономным переключением и доминированием CD163⁺ M2-макрофагов, ассоциированными с повышением экспрессии в них TGF- β , ответственного за ремоделирование, на фоне гиперэкспрессии противовоспалительного IL-10 [139]. Эта динамика отражает переход к репаративной стадии ишемического повреждения, активации TGF- β /SMAD2/3 и PI3K/Akt-сигналинга, регулирующих реполяризацию микроглии, а также матриксных металлопротеиназ-2 и -9, направленных на ремоделирование экстрацеллюлярного матрикса [218]. В пожилом возрасте наблюдали длительную фиксацию M1-фенотипа микроглии, сопровождающуюся гиперактивацией NF κ B и низкой экспрессией IL-10, что подтверждает развитие по мере старения феномена «праймированной» микроглии, описанного в ряде нейробиологических исследований [292].

По некоторым данным, эндотелиальные клетки в условиях ишемического повреждения становятся не только источником, но и мишенью провоспалительного сигналинга [92]. Так, активация каскада NF κ B запускает в стенке кровеносных сосудов синтез молекул адгезии ICAM-1, VCAM-1 и селектинов, а также факторов, повышающих проницаемость ГЭБ для иммунных клеток. В сочетании с высоким

уровнем ММР-2/9, разрушающих базальную мембрану, эти механизмы приводят к потенцированию клеточной воспалительной инфильтрации. При сравнении между возрастными группами было обнаружено, что у молодых перечисленные процессы носили транзиторный характер и завершались переходом к репаративной фазе, сменой провоспалительного на противовоспалительный фенотип, восстановлением целостности микроциркуляторного русла, тогда как в пожилом возрасте наблюдали хроническое течение нейровоспаления в течение всего срока наблюдения, что сопровождалось увеличением проницаемости ГЭБ, накоплением М1-макрофагов и Т-лимфоцитов, доминированием сигналинга FOXO3A, высокой экспрессией NFκB, TGF-β/SMAD3 и матриксных металлопротеиназ.

Сравнительный анализ полученных данных подтверждает, что эффективность взаимодействия компонентов НВЕ определяется возрастной модуляцией многочисленных механизмов регуляции нейроваскулярного сопряжения при участии ангиогенных, метаболических и иммунных факторов. Совокупность обнаруженных возраст-ассоциированных изменений отражает характер клеточно-тканевого ответа в рамках реализации пластического потенциала: с возрастом механизмы компенсаторно-направленного ремоделирования значительно редуцируются на фоне дестабилизации НВЕ, что объясняет ограничение репаративных возможностей нервной ткани по мере старения.

4.4. Возрастная трансформация воспалительной регуляции и иммунной пластичности в нервной ткани при ишемическом повреждении

Нейровоспаление представляет собой ключевое звено патогенеза ишемического инсульта и одновременно фундаментальный элемент постнатальной трансформации нервной ткани. В зрелом головном мозге контролируемая активация микроглии и инфильтрация иммунными клетками обеспечивают не только удаление продуктов клеточного распада, но и регуляцию нейрогенеза,

ангиогенеза и ремоделирования взаимодействий внутри НВЕ [141]. При этом возраст является одним из решающих факторов, определяющих направленность и интенсивность воспалительной реакции. Так, некоторыми авторами было показано, что по мере старения происходит постепенное изменение функционального состояния микроглиальных и эндотелиальных клеток, формирующее фон хронического низкоинтенсивного воспаления – так называемый феномен «инфламмаджинга», развитие которого снижает адаптативный потенциал нервной ткани и способствует дисрегуляции клеточно-тканевого ответа на повреждающие стимулы [140].

Развитие нейровоспаления в коре головного мозга при ишемическом повреждении представляет собой многоуровневый, строго стадийный (фазовый) процесс, включающий активацию врожденного и адаптивного иммунитета, перестройку нейроваскулярных взаимодействий и запуск программ ремоделирования нервной ткани [145]. Полученные в настоящем исследовании данные позволяют рассматривать нейровоспаление как динамическую систему регуляции клеточно-тканевого ответа, выраженность и направленность которого принципиально различаются в зависимости от возраста и состояния локального гомеостаза. Фазовая смена ишемически-некротической, воспалительно-деструктивной и репаративной стадий ишемического повреждения отражает последовательную активацию многочисленных сигнальных каскадов и клеточных популяций, координация которых определяет реализацию компенсаторно-адаптационного и пластического потенциала нервной ткани.

На ишемически-некротической стадии ведущими механизмами ишемического повреждения являются энергетический дефицит, глутаматная эксайтотоксичность и оксидативный стресс, которые в совокупности приводят к гибели части нейронов и высвобождению молекул, ассоциированных с повреждением (от англ. *damage-associated molecular patterns*, DAMPs), активирующих Toll-подобные рецепторы микроглии и эндотелиальных клеток [220]. По данным ряда исследований, это инициирует канонический NFκB-

сигналинг через активацию ИКК-комплекса (ИКК α , ИКК β и регуляторной субъединицы NEMO), фосфорилирование ингибиторного белка I κ B α , его протеасомную деградацию и транслокацию RELA/p65 в ядро [200, 274]. Обнаруженная в настоящем исследовании ранняя высокая транскрипционная активность *RELA/p65* согласуется с его ролью в индукции экспрессии провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-1 β , IL-6 и IFNG, а также молекул адгезии ICAM-1 и VCAM-1, обеспечивающих таксис и рекрутинг иммунных клеток в зону ишемии. По данным некоторых исследований, NF κ B-сигналинг также находится в перекрестной регуляции с MAPK-зависимыми каскадами (ERK1/2, JNK и p38) при участии инфламмосомы NLRP: активация p38 и JNK потенцирует экспрессию провоспалительных генов, тогда как ERK1/2 в определенных условиях участвует в поддержании клеточного выживания [101]. Не исключено, что выявленная гиперактивация *RELA/p65* в сочетании с повышенной экспрессией матриксных металлопротеиназ у пожилых пациентов отражает именно такую перекрестную активацию NF κ B- и MAPK-звеньев, способствующую пролонгации воспалительно-деструктивной стадии и торможению перехода к программам репарации.

В связи с этим, в контексте врожденного иммунитета следует учитывать и возможную роль NLRP3-инфламмосомы. По данным некоторых исследований, ишемическое повреждение способствует активации NLRP3-комплекса в микроглии, что приводит к активации каспазы-1 и протеолитическому созреванию IL-1 β и IL-18 [275]. Кроме того, активация каспазы-1 также может усиливать воспалительный ответ и индуцировать пироптоическую гибель клеток. В связи с этим, ранняя гиперэкспрессия IL-1 β у пожилых пациентов позволяет предполагать участие инфламмосомного механизма в поддержании воспалительно-деструктивной фазы и формировании пролонгированного нейровоспаления в отдаленные сроки после ишемического повреждения.

Существенную роль в ранней фазе нейровоспаления играют матриксные металлопротеиназы MMP-2 и MMP-9, однако их функциональная направленность

различается [81]. Так, MMP-2 в нормальных условиях участвует в регуляции базальной проницаемости ГЭБ и контролируемом ремоделировании внеклеточного матрикса, тогда как ее гиперактивация при ишемическом повреждении способствует избыточной деградации ламинина и коллагена IV базальной мембраны, повышая проницаемость ГЭБ, облегчая миграцию иммунных клеток. В то же время MMP-9, по данным ряда авторов, более тесно ассоциирована с воспалительной инфильтрацией, разрушением плотных контактов (claudin-5, occludin, ZO-1) и развитием вазогенного отека, а накопление избыточной жидкости в межклеточном пространстве приводит к сдавлению мелких гемокapилляров и усилению локальной ишемии, потенцируя ишемическое повреждение нейронов пенумбры. Следует отметить, что наиболее выраженная экспрессия MMP-9 у пожилых пациентов совпадала по срокам с фазой максимальной миграции иммунных клеток, что позволяет предположить ее вклад в поддержание воспалительно-деструктивной стадии и усиление вторичного (иммунного) повреждения нейронов пенумбры.

Дополнительным уровнем регуляции выступает JAK/STAT-сигналинг. В некоторых исследованиях показано, что накопление IL-6 и IFNG способствует активации JAK1/2 с последующей фосфорилицией STAT1 и STAT3. STAT1 преимущественно поддерживает провоспалительный ответ и стабилизацию M1-фенотипа макрофагов, тогда как STAT3 является не только регулятором воспалительной реакции, но и индуктором репаративных программ [270]. Обнаруженная в настоящем исследовании гиперэкспрессия IFNG и провоспалительных цитокинов в пожилой группе может быть сопряжена с преобладанием STAT1-опосредованных эффектов, что способствует персистенции провоспалительного фенотипа микроглии / мигрирующих макрофагов и ограничению их реполяризации [217].

Другим существенным компонентом возрастной трансформации воспалительной регуляции является изменение соотношения регуляторных и цитотоксических субпопуляций лимфоцитов [42, 258]. Так, на основании

полученных в настоящем исследовании результатов, можно говорить, что в коре головного мозга лиц молодого возраста происходит двухфазное увеличение количества NK- и NKT-клеток, совпадающее по срокам с фазовой динамикой TGF- β -сигналинга и макрофагальной реполяризации. По данным ряда исследований, NK-клетки активируются в просвете кровеносных сосудов посредством связывания их рецепторов со специфическими лигандами MICА/В и ULBP1-6, ключевыми источниками которых являются поврежденные нейроны, что еще раз подчеркивает взаимосвязь между нейродегенерацией и нейровоспалением [42]. Было показано, что мигрировавшие NK/NKT-клетки обладают не только цитотоксической, но и иммунорегуляторной функцией, модулируя активность макрофагов и Т-лимфоцитов через продукцию IFN- γ , IL-10 и взаимодействие с антигенпрезентирующими клетками [182]. Кроме того, NKT-клетки, обладая чертами врожденного и адаптивного иммунитета, способны быстро реагировать на изменение локального микроокружения и способствовать ограничению чрезмерного провоспалительного сигналинга [83, 190]. Тем не менее, синтез этими клетками неспецифических цитотоксических факторов (интерферон, перфорин, гранзимы), а также провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-1 β , IL-6 также способствует увеличению клеточной гибели в зоне пенумбры, подтверждая выводы, сделанные другими авторами о двойственной роли (регуляция воспаления и цитотоксичность) NK- и NKT-клеток в рамках нейровоспаления (Рисунок 4.2).

Не исключено, что сопряженная модуляция PI3K/Akt- и MAPK-зависимых путей в молодом возрасте также обеспечивает баланс между ранней цитотоксической активностью и последующим ограничением воспалительной реакции, способствуя переходу к репаративной стадии ишемического повреждения [210].

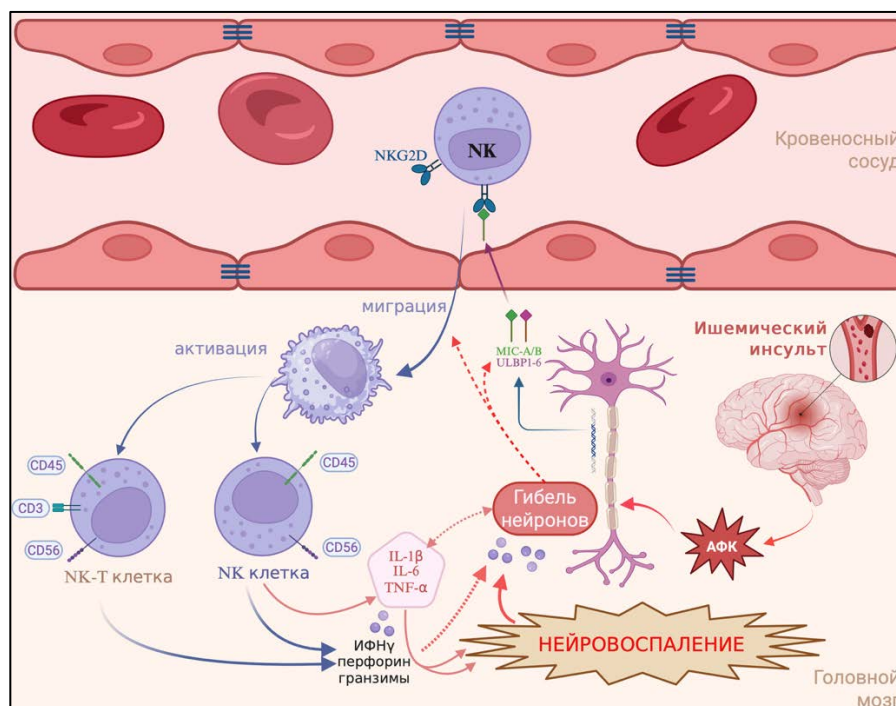


Рисунок 4.2 – Механизмы активации и миграции NK-клеток в рамках воспалительной инфильтрации нервной ткани при ишемическом инсульте. ROS – активные формы кислорода; NK – естественные клетки-киллеры; NKG2D – интегральный мембранный рецептор NKG2-D типа II; MICA – последовательность А, связанная с полипептидами МНС класса I; ULBP3 – белок 3, связывающий UL16; IFN- γ – интерферон гамма. Создано в BioRender.com

В пожилой возрастной группе, напротив, обнаружили доминирование цитотоксических эффектов CD3⁺ Т-лимфоцитов на фоне относительно небольшого количества регуляторных NK/NKT-клеток. Данные некоторых литературных источников подтверждают, что с возрастом увеличивается доля эффекторных Т-клеток при относительном снижении регуляторных субпопуляций, с формированием цитотоксического профиля [203, 258]. Кроме того, некоторые популяции Т-лимфоцитов регулируются NF κ B- и STAT1-зависимыми механизмами, а их эффекты заключаются в инициации апоптотической гибели нейронов посредством многочисленных неспецифических цитотоксических факторов (таких как перфорин и гранзимы) [190]. Такое смещение иммунного баланса создает устойчивую цитотоксическую микросреду, препятствующую адекватной репарации и способствующую вторичной (иммунной) гибели нейронов пенумбры.

Кроме того, возрастная трансформация нейровоспаления тесно связана с изменением фенотипической пластичности макрофагов. В первые дни после клинической манифестации ишемического повреждения у лиц молодого возраста доминировали провоспалительные M1-макрофаги, вероятно ассоциированные с активацией NFκB, STAT1 и MAPK/p38 и продукцией TNF-α, IL-1β и IL-6 [152]. Этот этап соответствует воспалительно-деструктивной стадии и обеспечивает элиминацию поврежденных клеток и их фрагментов. Однако уже к 3–4 суткам отмечали переключение на CD163⁺ M2-репаративный фенотип, ответственный за продукцию IL-10 и TGF-β и подавление провоспалительного сигналинга NFκB. По данным некоторых исследований, реполяризация в M2-состояние может быть связана с активацией PI3K/Akt/mTOR и ERK1/2-зависимых путей, а угнетение p38 и JNK способствует ограничению провоспалительного транскрипционного профиля [153, 218]. Такая координированная динамика отражает сохранение иммунной пластичности и соответствует регулируемому переходу к репаративной стадии ишемического повреждения [224].

Напротив, в старших возрастных группах наблюдали устойчивое преобладание M1-фенотипа с пролонгированной экспрессией провоспалительных медиаторов в течение всего срока наблюдения. Это не противоречит единичным исследованиям других авторов [145]. Вероятно, именно повышенная активность RELA/p65 и IFNG способствует NFκB- и STAT1-зависимой стабилизации макрофагов в M1-состоянии. Кроме того, обнаруженный дисбаланс PI3K/Akt-сигналинга и доминирование оси FOXO3A способствуют смещению внутриклеточной регуляции в сторону стресс-ответа и катаболических программ, ограничивая возможность реполяризации макрофагов и реализацию репаративных и пластических программ.

Особое значение имеет TGF-β/SMAD-сигналинг: по данным большинства авторов SMAD2 преимущественно участвует в поддержании локального гомеостаза и регуляции барьерной функции, тогда как SMAD3 ассоциирован с активацией микроглии, патологическим глиозом и фибротическим

ремоделированием [115, 276]. В связи с этим, ранняя активация SMAD2 в настоящем исследовании может отражать попытку ограничения воспаления, тогда как увеличение SMAD3 на более поздних сроках, особенно в пожилой возрастной группе, коррелирует с признаками патологического глиоза и снижением структурной пластичности нервной ткани при ишемическом повреждении.

Следует особенно подчеркнуть, что на репаративной стадии в когорте лиц молодого возраста отмечали координированную активацию PI3K/Akt/mTOR и PI3K/Akt/FOXO3A: в ранний период преобладание FOXO3A отражает стресс-ответ, тогда как последующее доминирование mTOR может быть связано с потенциацией белкового синтеза и метаболической активности в рамках реализации эндогенных программ нейропротекции [68]. Это согласуется с результатами мультиплексного иммунофлуоресцентного исследования, а именно – с усилением метаболической активности нейронов пенумбры по данным анализа сигналинга NeuN и NSE. Напротив, в пожилой группе гиперактивация FOXO3A при снижении транскрипции PIK3CA, AKT2 и MTOR свидетельствует о нарушении координации PI3K/Akt-сигналинга и ограничении перехода к полноценной репарации.

В совокупности, полученные результаты и их сопоставление с современными данными о молекулярной регуляции нейровоспаления позволяют заключить, что возраст является одним из ключевых факторов координации клеточно-тканевого ответа при ишемическом повреждении. В молодом возрасте нейровоспаление носит фазовый, регулируемый характер и интегрируется с механизмами нейропротекции, ангиогенеза и пластического ремоделирования, что обеспечивает переход от воспалительно-деструктивной к репаративной стадии. На поздних этапах постнатального онтогенеза, напротив, происходит утрата иммунной пластичности, дисбаланс между провоспалительными и противовоспалительными сигналами, нарушение взаимодействия клеточных популяций и дисрегуляция сопряжения между ключевыми сигнальными путями (NF κ B, MAPK, JAK/STAT, PI3K/Akt, TGF- β /SMAD), что препятствует своевременной смене стадий

ишемического повреждения. В результате воспалительная реакция приобретает устойчивый провоспалительный профиль, утрачивая адаптивную направленность и становясь независимым фактором прогрессирующего разобщения компонентов нейроваскулярной единицы, ограничивая компенсаторно-адаптационный и пластический потенциал нервной ткани.

4.5. Возраст-ассоциированные ограничения нейропластичности и регенераторного потенциала нервной ткани

Пластичность нервной ткани представляет собой фундаментальное свойство центральной нервной системы, обеспечивающее адаптацию, восстановление и перестройку межнейронных связей в ответ на внутренние и внешние стимулы [24]. Эта способность формируется еще на этапах эмбрионального развития головного мозга, но частично сохраняется и в постнатальном онтогенезе, обеспечивая регуляцию активности специализированных нейрогенных ниш и функциональной интеграции нейронов в рамках реализации контролируемого нейрогенеза в сочетании с адаптивной модуляцией ангиогенеза [28, 29].

Нейропластичность в постнатальном головном мозге следует рассматривать как результат сопряженного взаимодействия компонентов НВЕ, объединяющего механизмы структурной, метаболической и сигнальной адаптации к изменяющимся условиям локального гомеостаза [219]. Она включает способность нейронов к ремоделированию синаптических контактов, изменению дендритной архитектоники, изменению экспрессии белков синаптического аппарата, а также согласованную реакцию васкулярного и глиального компонентов, обеспечивающих адекватную трофическую и метаболическую поддержку [159]. В отличие от эмбрионального периода, когда нейрогенез и ангиогенез определяют формирование новых структур, в зрелом мозге пластичность реализуется преимущественно через ремоделирование уже существующих связей. Полученные в настоящем исследовании данные позволяют предполагать, что с возрастом

снижается способность к такому согласованному ремоделированию, что проявляется ограничением компенсаторно-адаптационного потенциала нервной ткани.

В нормальных условиях возрастная редукция пластического потенциала формируется постепенно и носит системный характер. Морфологически это проявляется снижением плотности нейронов, уменьшением размеров перикариона и редукцией дендритных отростков, что, по данным ряда исследований, сопровождается уменьшением числа синаптических контактов и снижением экспрессии белков постсинаптической плотности (PSD-95), синаптофизина и нейротрофических факторов, включая BDNF [33, 183]. Некоторые авторы также связывают возрастное снижение синаптической пластичности с угнетением CREB-зависимой транскрипции и ослаблением ERK1/2-сигналинга, регулирующего экспрессию генов, ответственных за долговременную потенцию [108]. Не исключено, что выявленное в настоящем исследовании снижение метаболической активности нейронов в старших возрастных группах отражает дисрегуляцию этих сигнальных осей, предрасполагая к функциональной недостаточности межнейронных связей.

По данным некоторых исследований, старение сопровождается дисфункцией митохондрий, снижением активности отдельных компонентов дыхательной цепи, накоплением реактивных форм кислорода и дисрегуляцией процессов аутофагии в результате подавления сигналинга AMPK–mTOR [8, 30, 54]. В условиях энергетического дефицита происходит кратное увеличение транскрипции *FOXO3A*, ответственного за стресс-ответ и экспрессию проапоптотических факторов, тогда как активность mTOR, контролирующего белковый синтез и анаболические процессы, постепенно снижается. Полученные в настоящем исследовании данные о дисбалансе PI3K/Akt/mTOR и PI3K/Akt/FOXO3A в пожилом возрасте согласуются с представлениями о смещении регуляции в сторону катаболических программ, ограничивающих ремоделирование и структурную репарацию нейронов после ишемического повреждения.

Важным фактором, определяющим пластический потенциал нервной ткани, является активность нейрогенных ниш. Несмотря на фактическое сохранение в зрелом головном мозге субвентрикулярной зоны боковых желудочков и зубчатой извилины гиппокампа как источников нейральных предшественников, многочисленные исследования подтверждают возраст-ассоциированное снижение их пролиферативной активности на фоне снижения экспрессии факторов роста (FGF-2, EGF) и чувствительности к сигналам VEGF- и Wnt [262]. Даже при реактивации проангиогенных механизмов в зоне ишемического повреждения нервная ткань, вероятно, не воспроизводит полноценный сценарий нейрогенеза, аналогичный таковому в эмбриональном периоде развития [64]. Это позволяет предполагать, что возраст ограничивает не только интенсивность нейрогенеза, но и качественную направленность регенераторных процессов, смещая их в сторону компенсаторного ремоделирования уже имеющихся компонентов нервной ткани.

После ишемического повреждения различие между репарацией, компенсацией и регенерацией становится особенно очевидным. В молодой возрастной группе сохранение координации PI3K/Akt-сигналинга, временная активация FOXO3A в ранний период и последующее усиление mTOR-опосредованного белкового синтеза создают условия для частичного восстановления метаболической активности нейронов пенумбры, что подтверждено усилением сигналинга NeuN и NSE. Однако даже в этом случае речь идет преимущественно о сохранении и функциональной адаптации существующих нейронов, а не о формировании новых [41]. В пожилом возрасте гиперактивация FOXO3A при снижении транскрипции *PIK3CA*, *AKT2* и *MTOR* отражает ограничение перехода к анаболическим программам и резкое сокращение компенсаторно-адаптивного и пластического потенциала в те сроки, когда повреждение пенумбры остается еще потенциально обратимым (Рисунок 4.3).

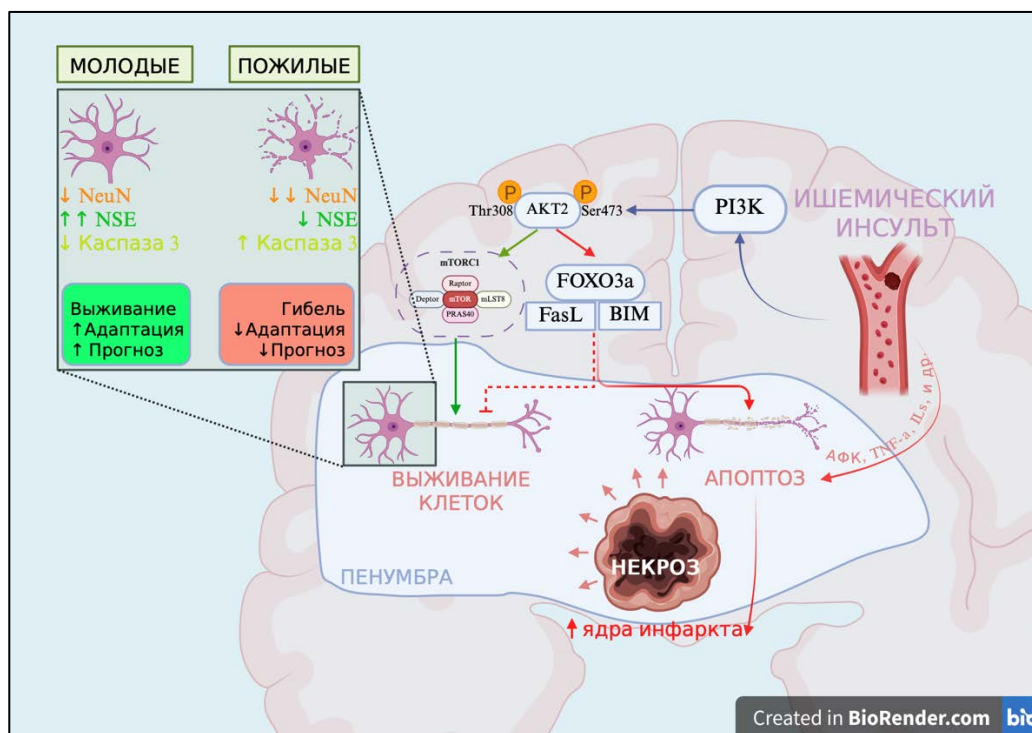


Рисунок 4.3 – Механизм регуляции клеточно-тканевого ответа и гибели нейронов после ишемического инсульта, схема. PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа, Akt2 – изоформа 2 протеинкиназы B, Thr – треонин, Ser – серин, FOXO3a – белок Forkhead box O3a, mTORC1 – механистическая мишень комплекса рапамицина 1, FasL – лиганд Fas (CD95L), BIM – медиатор клеточной смерти, взаимодействующий с Bcl-2. Создано в BioRender.com

Помимо вышперечисленного, ограничение адаптации и пластичности нервной ткани в старших возрастных группах усугубляется дисрегуляцией ремоделирования внеклеточного матрикса и глиального окружения. По данным ряда исследований, избыточная активация TGF- β /SMAD3-зависимых механизмов способствует формированию плотного глиального рубца и накоплению компонентов экстрацеллюлярного матрикса (фибронектина, коллагена), ограничивающих аксональный рост [123]. Кроме того, модуляция синтеза молекул, ответственных за торможение нейритогенеза (а именно – Nogo-A и компонентов миелина) являются дополнительным фактором, препятствующим восстановлению проводящих путей [214]. Подобные результаты позволяют предполагать, что в старших возрастных группах формируется неблагоприятное микроокружение, что делает невозможным полноценную регенерацию нервной ткани даже в условиях

частичного восстановления трофической поддержки на фоне активации ангиогенеза и снижения воспаления.

Полученные в настоящем исследовании результаты позволяют говорить о фазовом характере и частичной синхронизации проангиогенных и противовоспалительных программ на фоне доминирования сигнальных путей, ответственных за клеточную выживаемость нейронов в коре головного мозга лиц молодого возраста, что создает предпосылки для последовательной смены стадий ишемического повреждения [65]. Напротив, в пожилом возрасте наблюдали признаки дисрегуляции клеточно-тканевого ответа: провоспалительные и катаболические программы преобладали в течение всей первой недели, тогда как механизмы репарации оставались угнетенными. Такое нарушение сопряжения между нейрональным, сосудистым и глиальным компонентами НВЕ ограничивает возможность адаптации и комплексной репарации нервной ткани в условиях низкого пластического потенциала.

В совокупности представленные данные демонстрируют, что возраст-ассоциированное ограничение нейропластичности определяется не изолированным нарушением какого-либо сигнального пути, а системной редукцией способности нервной ткани к координированной модуляции компенсаторных программ. Сокращение метаболического резерва, дисбаланс эффектов PI3K/Akt/mTOR и FOXO3A, ограничение нейрогенеза, структурные изменения внеклеточного матрикса и утрата синхронности нейроваскулярных взаимодействий формируют условия, при которых репарация остается неполной, а регенерация практически невозможной. В связи с этим можно говорить о том, что на поздних этапах постнатального онтогенеза пластический потенциал нервной ткани реализуется преимущественно в форме частичной компенсации, тогда как способность к полноценному восстановлению структуры и функции существенно ограничена, что во многом определяет низкую эффективность нейропротекторной терапии в рамках реабилитации пожилых пациентов с ишемическим инсультом [146].

4.6. Возрастные ограничения терапевтической чувствительности коры головного мозга при ишемическом инсульте

Современные подходы к ведению пациентов с ишемическим инсультом основаны на универсальных патогенетических принципах: восстановлении перфузии, ограничении зоны вторичного повреждения, поддержании метаболической активности нейронов и ранней реабилитации [238]. При этом принципиально важно учитывать, что сформировавшееся ядро инфаркта, представленное зоной паннекроза, практически не подлежит обратному развитию; в связи с этим терапевтические стратегии преимущественно направлены на сохранение жизнеспособности обратимо-поврежденных нейронов зоны пенумбры. Именно поддержание метаболической активности и структурной репарации этих клеток рассматривается как ключевой фактор, способный ограничить некротическую трансформацию этой зоны, предотвратить расширение ядра инфаркта и тем самым снизить объем поражения и неблагоприятный функциональный прогноз [302]. Вместе с тем результаты настоящего исследования дополняют существующие клинические и экспериментальные данные о причинах низкой эффективности терапевтических стратегий, подчеркивая crucialную роль возраста в модуляции компенсаторно-адаптационного и пластического потенциала коры головного мозга.

Полученные в настоящем исследовании данные о фазовой активации PI3K/Akt/mTOR-сигналинга, транзиторном усилении экспрессии PIK3CA, AKT2 и MTOR, реактивации VEGF-A- и CD105-опосредованного ангиогенеза, контролируемой активности NF κ B и TGF- β /SMAD2 у лиц молодого возраста позволяют предполагать частичное сохранение регуляции нейроваскулярных взаимодействий и пластического потенциала нервной ткани. Вероятно, это способствует повышению ее чувствительности к воздействиям, направленным на индукцию эндогенных нейропротекторных механизмов, что не противоречит мнению других авторов [157]. В частности, в единичных работах показано, что

модуляция сигналинга PI3K/Akt с использованием IGF-1, BDNF, эритропоэтина или мелатонина ассоциирована с повышением выживаемости нейронов пенумбры и усилением ангиогенеза [89, 133, 163, 193]. Результаты проведенного исследования также позволяют рассматривать ось PI3K/Akt/mTOR и VEGF-зависимые механизмы как потенциальные мишени для контролируемой стимуляции у пациентов молодого возраста.

Следует подчеркнуть, что нейротропные субстраты не должны замещать эндогенные регуляторные механизмы, а лишь поддерживать их физиологическую динамику. Например, контролируемая модуляция аутофагии посредством воздействия на AMPK–mTOR может способствовать элиминации поврежденных органелл и ограничению некротической гибели нейронов на ранних сроках после ишемического повреждения, однако чрезмерное подавление mTOR также способно нарушить белковый синтез и синаптическую перестройку. Аналогичным образом, стимуляция VEGF-A-зависимого ангиогенеза может быть эффективной лишь при сохранности эндотелиальной чувствительности и адекватной регуляции TGF- β /ALK1-сигналинга, предотвращающей патологическое ремоделирование стенки кровеносных сосудов.

В пожилом возрасте обнаружена иная конфигурация клеточно-тканевого ответа на ишемическое повреждение: угнетение оси PI3K/Akt/mTOR, гиперактивация FOXO3A, усиление транскрипции RELA/p65, персистирующая активация TGF- β /SMAD3 и повышенная экспрессия MMP-2/9 на фоне хронического провоспалительного цитокинового профиля (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IFNG). Такая совокупность сигналов в сочетании с выраженной клеточной воспалительной инфильтрацией способствует формированию цитотоксического микроокружения и нарушению локального гомеостаза. Не исключено, что подобные изменения значительно снижают эффективность стандартных нейропротекторных стратегий, ориентированных преимущественно на стимуляцию метаболизма [155, 160]. Кроме того, в ряде публикаций высказывается предположение, что без предварительной стабилизации сигналинга NF κ B и STAT1

потенциация анаболических каскадов, напротив, может сопровождаться усугублением оксидативного стресса и вторичным повреждением компонентов нервной ткани [265].

В этой связи в пожилой возрастной группе представляется обоснованным рассмотрение механизмов, ограничивающих хроническое воспаление и избыточное ремоделирование, в качестве перспективных терапевтических стратегий. По данным единичных исследований, ингибирование NFκB или модуляция взаимодействия ИКК/ИκB способствуют снижению продукции провоспалительных цитокинов и молекул адгезии, стабилизации ГЭБ и уменьшению инфильтрации Т-лимфоцитов [200, 202]. Кроме того, селективная регуляция TGF-β/SMAD-сигналинга также может быть рассмотрена как потенциальный способ ограничения апоптотической гибели нейронов, фибротического ремоделирования ЭЦМ и патологического глиоза [197]. Не исключено, что таргетное влияние на экспрессию MMP-2 и MMP-9, ответственных за деградацию базальной мембраны и повышение проницаемости ГЭБ, тоже может быть потенциально эффективным средством противоотечной и / или противовоспалительной терапии, однако это нуждается в проведении новых исследований с учетом возрастной модуляции соответствующих сигнальных путей [297].

Особое внимание следует уделить модуляции FOXO3A-зависимых механизмов аутофагии, а также катаболических и проапоптотических эффектов чрезмерной активации этой оси в отсутствие компенсирующего mTOR-сигналинга. Немногочисленные экспериментальные данные свидетельствуют, что снижение транскрипционной активности FOXO3A и / или восстановление баланса FOXO3A–mTOR посредством модуляции PI3K/Akt или SIRT1 способствует повышению устойчивости нейронов к ишемическому повреждению [47, 198]. Эти наблюдения позволяют рассматривать FOXO3A не только как маркер стресс-ответа, но и как потенциальную мишень для возраст-специфической коррекции катаболических

программ, при условии сохранения физиологической регуляции аутофагии и клеточной гибели.

Возрастная модуляция терапевтической чувствительности коры головного мозга, вероятно, влияет и на эффективность реабилитационных стратегий в отдаленные сроки после ишемического инсульта. В молодом возрасте частичное сохранение синаптической пластичности, BDNF- и VEGF-зависимой регуляции механизмов нейро- и ангиогенеза, а также относительная интеграция компонентов НВЕ создают условия для эффективного ремоделирования нервной ткани и функциональной компенсации утраченных межнейронных связей в отдаленные сроки [109]. В пожилом возрасте сочетание редукции нейронального пула и микроциркуляторного русла на фоне хронического дисрегулированного нейровоспаления, вероятно, может значительно ограничивать эффективность стандартных программ моторной и когнитивной реабилитации [112]. В этой связи представляется перспективным изучение комплексных подходов, сочетающих физические методы с фармакологической поддержкой нейрогенетических и проангиогенных механизмов (в т.ч. VEGF, BDNF, mTOR и др.) на фоне адекватной противовоспалительной и / или метаболической терапии.

Следует отметить, что изученные в настоящей работе молекулярные участники клеточно-тканевого ответа, в частности PI3K, Akt, mTOR, FOXO3A, NFκB, TGF-β, SMAD2/3, VEGF-A, MMP-2/9 и др., могут рассматриваться как потенциальные мишени для разработки таргетных терапевтических препаратов, обладающих нейрогенными, проангиогенными, противовоспалительными, метаболическими, антиапоптотическими, антифибротическими, репаративными, прорегенераторными свойствами. Интеграция полученных в настоящем исследовании данных с информацией в других литературных источниках позволяет предположить, что изученные молекулярные механизмы реализации нейрогенеза, ангиогенеза, клеточно-тканевого ответа и пластического потенциала нервной ткани, а также их возрастная модуляция являются сходными как при ишемическом повреждении, так и при других нейровоспалительных и

нейродегенеративных состояниях, что особенно подчеркивает актуальность проведенного комплексного анализа, дополняющего современные данные в области биологии развития и нейробиологии.

В перспективе возможно создание селективных модификаторов активности, включая моноклональные антитела к отдельным цитокинам или факторам роста, ингибиторы киназных доменов, регуляторы транскрипционной активности или молекулы, влияющие на белок-белковые взаимодействия внутри сигнальных каскадов. При этом принципиально важным представляется не универсальная стимуляция / подавление участников данных путей, а их избирательная модуляция с учетом возраста, стадии ишемического повреждения и состояния нейроваскулярной единицы, вклад которых в течение ишемического инсульта продемонстрирован результатами настоящего исследования.

Таким образом, данные, полученные при комплексном анализе коры головного мозга при ишемическом повреждении, позволяют рассматривать возраст как crucialный фактор изменчивости терапевтической чувствительности нервной ткани. В рамках лечения и реабилитации пациентов с ишемическим инсультом молодого возраста целесообразной представляется поддержка эндогенных репаративных программ, в то время как для лиц пожилого возраста эффективной стратегией может быть предварительное ограничение хронического провоспалительного и профибротического сигналинга, направленное на стабилизацию нейроваскулярной интеграции и создание условий для последующей активации пластических механизмов.

ГЛАВА 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в настоящем исследовании результаты дополняют современные фундаментальные данные в области биологии развития головного мозга. Описанные закономерности нейроваскулярных и иммунных взаимодействий подтверждают, что нервная ткань человека сохраняет черты развивающейся системы на протяжении всего постнатального онтогенеза. Основные программы, заложенные еще на эмбриональном этапе развития организма – нейрогенез, ангиогенез, клеточная миграция и межклеточная сигнализация – продолжают функционировать в зрелом мозге, обеспечивая его пластичность и способность к репарации. Эти процессы реализуются через активность сигнальных путей PI3K/Akt/mTOR, TGF- β /SMAD, VEGF и Notch, которые остаются ключевыми регуляторами гомеостаза НВЕ в постнатальном периоде.

Установлено, что структура и функции НВЕ зависят от возраста и отражают степень сохранности эмбриональных регуляторных программ. В молодом мозге сохраняется высокая активность PI3K/Akt/mTOR- и VEGF-звеньев, обеспечивающих эффективный ангиогенез, нейропротекцию и метаболическую адаптацию. В многочисленных исследованиях было показано, что астроциты, перициты и эндотелий формируют межклеточные контакты, обеспечивая стабильность ГЭБ, в то время как микроглия обладает фазовой пластичностью, переходя из провоспалительного в репаративное состояние. Эти особенности определяют высокий компенсаторно-регенеративный потенциал нервной ткани после ишемического повреждения.

В пожилом возрасте выявлено смещение молекулярного и клеточного равновесия в сторону катаболизма и хронического воспаления. Снижается активность PI3K/Akt/mTOR и VEGF-каскадов, возрастает экспрессия FOXO3A, NF κ B и SMAD2/3, что сопровождается апоптозом нейронов, нарушением ангиогенеза и дестабилизацией гематоэнцефалического барьера. Хроническая активация микроглии и дискоординация TGF- β /SMAD-сигналинга приводят к

потере репаративных свойств нейровоспаления и формированию структурных дефектов НВЕ. Возраст-ассоциированные различия в экспрессии маркеров NeuN, NSE, Caspase-3, CD31, CD105, CD68, CD163 и TGF- β отражают снижение нейрогенетического и ангиогенного потенциала, особенно выраженное в старших возрастных группах. Сохранность VEGF-зависимых механизмов у молодых пациентов и угнетение PI3K/Akt/MTOR-оси у пожилых подтверждают ключевую роль возрастной регуляции в исходах ишемического повреждения.

Результаты исследования показывают, что эффективность клеточно-тканевого ответа при инфаркте мозга определяется не только степенью ишемии, но и биологическим возрастом ткани. Головной мозг у лиц молодого возраста способен реактивировать эмбриональные программы нейро- и ангиогенеза, тогда как стареющий теряет способность к синхронной активации этих процессов. Нарушение межклеточной координации между нейронами, глией и эндотелием, ослабление ангиогенной реакции и фиксация микроглии в провоспалительном состоянии формируют основу возрастной уязвимости мозга к ишемическому повреждению. Ишемический инсульт в настоящем исследовании является лишь моделью частичной реактивации эмбриональных морфогенетических программ в постнатальном мозге. С возрастом способность к их координированному запуску прогрессивно утрачивается, что ведет к снижению нейро- и ангиогенного потенциала, нарушению межклеточных взаимодействий, истощению компенсаторно-адаптационных механизмов, редукции пластического потенциала нервной ткани.

Совокупность полученных данных позволяет заключить, что возрастная модуляция взаимодействия нейроваскулярных и иммунных компонентов отражает закономерности биологии развития и представляет собой континуум от эмбриональной пластичности к постнатальной инволюции. Изучение этих закономерностей открывает возможности для разработки таргетных стратегий нейропротекции, направленных на восстановление межклеточной интеграции и регенераторного потенциала мозга с учетом периода постнатального онтогенеза.

ВЫВОДЫ

1. В динамике постнатального онтогенеза отмечается снижение количества нейронов при сохранной структурной организации коры головного мозга. У лиц молодого возраста с ишемическим инсультом обнаружено, что уменьшение количества нейронов в пенумбре продолжается до 3 суток, а затем замедляется. В то же время, у пожилых людей гибель нейронов сохраняется вплоть до 7 суток.

2. Репаративный и пластический потенциал нейронов у лиц молодого возраста сохраняется даже при ишемическом инсульте, что подтверждается преобладанием в пенумбре пула NeuN⁺NSE⁺-нейронов при относительно меньшей доле caspase-3⁺ клеток. В то же время, в пожилом возрасте обнаружено истощение механизмов нейрогенеза и пластичности, что подтверждается низкими уровнями экспрессии NeuN и NSE на фоне резкого увеличения доли caspase-3⁺ нейронов.

3. Гибель нейронов зависит от равновесия PI3K/Akt/mTOR и PI3K/Akt/FOXO3a осей. Ишемия приводит к дисбалансу PI3K/Akt-сигналинга и доминированию оси FOXO3A и ее проапоптотических и провоспалительных эффектов. Это способствует возрастной инволюции пластического потенциала и нейрогенеза в пенумбре.

4. Нервная ткань реагирует на ишемическое повреждение усилением синтеза в нейронах и сосудистой стенке VEGF-A, регулирующего компенсаторную активацию эндотелиальных клеток и образование новых кровеносных сосудов, в совокупности направленных на индукцию коллатерального кровообращения, наиболее выраженную у лиц молодого возраста. С возрастом происходит уменьшение интенсивности ангиогенеза: в головном мозге снижается количество кровеносных сосудов и экспрессия проангиогенных факторов.

5. В динамике постнатального онтогенеза меняется характер клеточно-тканевого ответа на ишемическое повреждение, что связано с дисрегуляцией сигнальных путей TGF- β и NF κ B в эндотелиальных клетках, синтезом

провоспалительных цитокинов и миграцией иммунных клеток, развитием выраженной клеточной инфильтрации, ключевыми участниками которой являются макрофаги. Нейровоспаление и дисрегуляция провоспалительных каскадов связана с преобладанием фенотипа $CD68^+CD163^-$ макрофагов у лиц старших возрастных групп. Напротив, доминирование противовоспалительного $CD68^+CD163^+$ фенотипа макрофагов в молодом возрасте связано с индукцией механизмов репарации и пластичности нервной ткани.

6. Важными участниками клеточной воспалительной реакции при ишемическом повреждении нервной ткани у лиц молодого возраста являются $CD45^+CD56^+CD3^-$ НК- и $CD45^+CD56^+CD3^+$ NKT-субпопуляции иммунных клеток, которые обладают умеренным цитотоксическим потенциалом ($IFN-\gamma \uparrow$). В старших возрастных группах происходит вторичное повреждение нейронов и расширение ядра инфаркта вследствие смены доминирующего иммунного звена клеточно-тканевого ответа с преобладанием $CD45^+CD56^-CD3^+$ Т-лимфоцитов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты проведенного исследования позволяют предложить использование разработанной панели мультиплексных иммуногистохимических и молекулярных маркеров для повышения чувствительности и специфичности патологоанатомической диагностики инфаркта головного мозга. Применение данной системы позволяет не только дифференцировать зоны ишемического повреждения и пенумбры, но и оценивать уровень клеточно-тканевой пластичности, активность ангиогенеза, степень нейровоспаления и особенности репаративного ответа в зависимости от возраста пациента. Это существенно расширяет возможности морфологической верификации стадий ишемического процесса и повышает информативность судебно-медицинских и патологоанатомических заключений.

Полученные данные об особенностях возрастной модуляции нейроваскулярных и иммунных механизмов обосновывают необходимость персонализированного подхода к терапии и реабилитации пациентов с ишемическим инсультом. У молодых пациентов целесообразна активация физиологических репаративных программ (PI3K/Akt/mTOR, VEGF-зависимого ангиогенеза), тогда как у пожилых приоритетным является подавление хронического воспаления и коррекция FOXO3A-, NFκB- и TGF-β/SMAD-опосредованных дисрегуляций. Выявленные молекулярные мишени могут быть использованы для разработки таргетных биологических препаратов, направленных на восстановление нейроваскулярной целостности и репаративного потенциала мозга. Представленные подходы имеют потенциал практического применения не только при ишемическом инсульте, но и при других заболеваниях, сопровождающихся нейродегенерацией и нейровоспалением (болезнь Альцгеймера, черепно-мозговая травма, хроническая ишемия мозга).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ГМ – головной мозг

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ИИ – ишемический инсульт

НВЕ – нейроваскулярная единица

ЦНС – центральная нервная система

АКТ – протеинкиназа В (от англ. *protein kinase B*)

Ang – ангиопоэтин (от англ. *angiopoietin*)

AQP4 – аквапорин-4 (от англ. *aquaporin-4*)

CD – кластер дифференцировки (от англ. *cluster of differentiation*)

ЕСМ – внеклеточный матрикс (от англ. *extracellular matrix*)

FOXO3A – фактор транскрипции семейства FOXO, изоформа 3A (от англ. *forkhead box O3A*)

GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок (от англ. *glial fibrillary acidic protein*)

HIF-1 α – фактор, индуцируемый гипоксией 1 α (от англ. *hypoxia-inducible factor 1 alpha*)

IFNG – интерферон гамма (от англ. *interferon gamma*)

IL – интерлейкин (от англ. *interleukin*)

KDR – рецептор VEGF-2 (от англ. *kinase insert domain receptor*)

MMP – матриксная металлопротеиназа (от англ. *matrix metalloproteinase*)

mTOR – мишень рапамицина у млекопитающих (от англ. *mechanistic target of rapamycin*)

NF κ B – ядерный фактор каппа-би (от англ. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

NeuN – нейрональный ядерный белок (от англ. *neuronal nuclei*)

NK – натуральные киллеры (от англ. *natural killers*)

NKT – натуральные киллерные Т-клетки (от англ. *natural killer T-cells*)

NSE – нейронспецифическая енолаза (от англ. *neuron-specific enolase*)

PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа (от англ. *phosphoinositide 3-kinase*)

SMAD – сигнальные молекулы семейства SMAD (от англ. *Sma and Mad-related proteins*)

STAT – сигнальный трансдуктор и активатор транскрипции (от англ. *signal transducer and activator of transcription*)

TGF- β – трансформирующий фактор роста бета (от англ. *transforming growth factor beta*)

TNF- α – фактор некроза опухоли альфа (от англ. *tumor necrosis factor alpha*)

VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста (от англ. *vascular endothelial growth factor*)

WNT – белки семейства Wnt, регулирующие сигнальные пути развития (от англ. *wingless/integrated*)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аван, А. Т. Феномен нейрогенеза и его роль в патологии нервной системы / А. Т. Аван, А. В. Макеева, М. В. Лущик // *European Journal of Natural History*. – 2022. – № 1. – С. 44–48.
2. Ангиогенез: сигнальные пути и их ингибиторы / К. Л. Маркова, О. И. Степанова, П. В. Гребенкина [и др.] // *Медицинская иммунология*. – 2026. – Т. 28. – № 2. – DOI: 10.15789/1563-0625-ASP-3005.
3. Вадюхин, М. А. Влияние VEGF на распределение кровеносных сосудов у пациентов с ишемическим инсультом // Международная научно-практическая конференция «Инновационные технологии в образовательном процессе морфологических дисциплин»: сборник научных статей / Издательство УО «Белорусский государственный медицинский университет»; под общей редакцией проф. Н.А. Трушель. – Минск, БГМУ, 2025. – С. 314-317.
4. Вадюхин, М. А. Возрастные особенности неоангиогенеза в коре головного мозга у пациентов с ишемическим инсультом / М. А. Вадюхин // LXX Международная научно-практическая конференция «Advances in Science and Technology»: сборник статей / «Научно-издательский центр «Актуальность.РФ». – Москва, «Актуальность.РФ», 2025. – С. 28-30.
5. Вадюхин, М. А. Особенности метаболизма нейронов на ранних сроках инфаркта коры головного мозга у пациентов разных возрастных групп / М. А. Вадюхин, Д. В. Болдырев, Г. А. Демяшкин. – Текст: непосредственный // Всероссийская научная конференция «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и при патологии»: сборник научных трудов / Издательство НИИ морфологии человека им. ак. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. ак. Б.В. Петровского»; под общей редакцией чл.-корр. РАН Л.Н. Михалевой. – Москва, Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», 2025. – С. 76-78.

6. Возрастные особенности неангиогенеза в коре головного мозга при ишемическом инсульте / М. А. Вадюхин, В. В. Тарасов, Н. В. Пятигорская [и др.] // Вестник неврологии, психиатрии и нейрохирургии. – 2025. – Т. 18. – № 12. – С. 1400-1414. – DOI: 10.33920/med-01-2511-02.
7. Долгушин, И. И. Роль нейтрофилов в патогенезе ишемического инсульта / И. И. Долгушин, З. З. Зарипова, М. И. Карпова // Бюллетень сибирской медицины. – 2021. – Т. 20. – № 3. – С. 152–160. – DOI: 10.20538/1682-0363-2021-3-152-160.
8. Закономерности постнатального развития нейронов мозга / С. М. Зиматкин, Е. И. Бонь, О. Ф. Карнюшко, А. В. Заерко // Оренбургский медицинский вестник. – 2025. – Т. 13. – № S2(50). – С. 154.
9. Ивкин, А. А. Влияние интерлейкина-6 и гипоксии на экспрессию белков-маркеров повреждения головного мозга в клеточной модели нейроваскулярной единицы / А. А. Ивкин, Е. В. Григорьев, Е. Д. Хилажева // Общая реаниматология. – 2025. – Т. 21. – № 3. – С. 32–40. – DOI: 10.15360/1813-9779-2025-3-2540.
10. Изменение экспрессии VEGFR1 и VEGFR2 и зрелости клеток эндотелия у экспериментальных животных с моделью болезни Альцгеймера / М. В. Кукла, А. С. Аверчук, А. В. Ставровская [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2024. – Т. 23. – № 4. – С. 47–54. – DOI: 10.20538/1682-0363-2024-4-47-54.
11. Изменения в нейрогенной нише гиппокампа крыс при гипоксическом воздействии / Е. Н. Федорова, Д. Н. Воронков, А. В. Егорова [и др.] // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2023. – Т. 59. – № 4. – С. 320–332. – DOI: 10.31857/S0044452923040022.
12. Изменения содержания гипоксией индуцированного фактора 1- в нейронах теменной коры головного мозга крыс со ступенчатой церебральной ишемией / Е. И. Бонь, Н. Е. Максимович, О. А. Карнюшко, С. М. Зиматкин // Новости медико-биологических наук. – 2024. – Т. 24. – № 3. – С. 20–21.

13. Клетки церебрального эндотелия и периваскулярной астроглии в регуляции нейрогенеза / Е. А. Тепляшина, Я. В. Горина, Е. Д. Хилажева [и др.] // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 2022. – Т. 108. – № 5. – С. 530–546. – DOI: 10.31857/S0869813922050119.

14. Клиническая характеристика пациентов с ишемическим инсультом: распределение предрасполагающих факторов в зависимости от возраста / М. А. Вадюхин, А. В. Давыдова, А. А. Журавлева [и др.] // Вестник неврологии, психиатрии и нейрохирургии. – 2025. – Т. 18. – № 10. – С. 1314–1327. – DOI: 10.33920/med-01-2510-09.

15. Кучерова, К. С. Роль матричных металлопротеиназ в патогенетических механизмах ишемического инсульта / К. С. Кучерова, Е. С. Королева, В. М. Алифирова // Российский неврологический журнал. – 2024. – Т. 29. – № 3. – С. 5–15. – DOI: 10.30629/2658-7947-2024-29-3-5-15.

16. Метаболическая пластичность астроцитов / Я. В. Горина, А. Б. Салмина, А. И. Ерофеев [и др.] // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2021. – Т. 57. – № 6. – С. 453–468. – DOI: 10.31857/S0044452921060036.

17. Механизмы церебрального ангиогенеза в норме и при патологии головного мозга / Ю. А. Успенская, А. В. Моргун, Е. Д. Осипова [и др.] // Успехи физиологических наук. – 2021. – Т. 52. – № 2. – С. 39–50. – DOI: 10.31857/S0301179821020090.

18. Министерство здравоохранения РФ : офиц. сайт. Москва. Рубрикатор клинических рекомендаций [Электронный ресурс]. – Клинические рекомендации «Ишемический инсульт и транзиторная ишемическая атака». – Минздрав РФ, 2024. – URL: https://cr.minzdrav.gov.ru/view-cr/814_1 (дата обращения: 24.11.2025).

19. Михалицкая, Е. В. Нейропластичность мозга: мозговой нейротрофический фактор и протеинкиназные сигнальные пути (обзор литературы) / Е. В. Михалицкая, Л. А. Левчук // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. – 2022. – № 3(116). – С. 44–53. – DOI: 10.26617/1810-3111-2022-3(116)-44-53.

20. Молчанова, Е. Е. Иммунологические механизмы в патогенезе ишемического инсульта / Е. Е. Молчанова, Л. К. Решетникова // Амурский медицинский журнал. – 2022. – № 2(33). – С. 17–24. – DOI: 10.22448/23115068_2022_2_17.

21. Мустафин, Р. Н. Постнатальный нейрогенез в головном мозгу человека / Р. Н. Мустафин, Э. К. Хуснутдинова // Морфология. – 2021. – Т. 159. – № 2. – С. 37–46. – DOI: 10.17816/1026-3543-2021-159-2-37-46.

22. Нейрогенез в нейрогенных нишах головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера на досимптоматической стадии развития нейродегенерации / А. С. Аверчук, М. В. Рязанова, Н. А. Розанова [и др.] // Цитология. – 2023. – Т. 65. – № 4. – С. 339–347. – DOI: 10.31857/S004137712304003X.

23. Никитин, Е. С. Разнообразие и функциональные особенности кальций-зависимых калиевых каналов, определяющие их роль в пластичности нейронов головного мозга / Е. С. Никитин, П. М. Балабан // Журнал высшей нервной деятельности им. И. П. Павлова. – 2021. – Т. 71. – № 2. – С. 237–243. – DOI: 10.31857/S0044467721020088.

24. Общие сведения о нейропластичности головного мозга и некоторые механизмы ее регуляции / А. В. Агейкин, В. Л. Мельников, А. Ю. Тычков [и др.] // Психическое здоровье. – 2022. – Т. 17. – № 5. – С. 55–61. – DOI: 10.25557/2074-014X.2022.05.55-61.

25. Особенности экспрессионного профиля клеток в модели нейрогенной ниши гиппокампа *in vitro* при оптогенетической стимуляции / Е. Д. Хилажева, А. В. Моргун, Е. Б. Бойцова [и др.] // Биомедицинская химия. – 2021. – Т. 67. – № 1. – С. 34–41. – DOI: 10.18097/PBMC20216701034.

26. Применение трёхклеточной модели гематоэнцефалического барьера для оценки повреждения клеток нейроваскулярной единицы при болезни Альцгеймера / Н. А. Розанова, А. С. Аверчук, М. Р. Капкаева [и др.] // Бюллетень

экспериментальной биологии и медицины. – 2025. – Т. 180. – № 10. – С. 421–426. – DOI: 10.47056/0365-9615-2025-180-10-421-426.

27. Реутов, В. П. Типовой патологический процесс при глутаматной нейротоксичности: роль активных форм азота и кислорода / В. П. Реутов, Н. В. Пасикова, Е. Г. Сорокина // Биофизика. – 2024. – Т. 69. – № 5. – С. 1044–1077. – DOI: 10.31857/S0006302924050122.

28. Салмина, А. Б. Метаболическая пластичность развивающегося и стареющего головного мозга / А. Б. Салмина // Нейрохимия. – 2023. – Т. 40. – № 3. – С. 197–210. – DOI: 10.31857/S1027813323030159.

29. Сравнительный анализ нейрогенеза и церебрального ангиогенеза в нейрогенной нише гиппокампа у животных с двумя моделями экспериментальной болезни Альцгеймера / А. С. Аверчук, М. В. Кукла, Н. А. Розанова [и др.] // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. – 2025. – Т. 19. – № 2. – С. 41–51. – DOI: 10.17816/ACEN.1227.

30. Узлова, Е. В. Изменения содержания АТФ-синтазы в нейронах мозга при экспериментальной церебральной ишемии / Е. В. Узлова, С. М. Зиматкин, Е. И. Бонь // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2023. – Т. 12. – № 1. – С. 68–76. – DOI: 10.31088/CEM2023.12.1.68-76.

31. Участие VEGF в регуляции неканонического сигнального пути Notch в клетках эндотелия / И. Б. Белоглазова, Е. С. Зубкова, К. В. Дергилев [и др.] // Кардиологический вестник. – 2022. – Т. 17. – № 2. – С. 33–39. – DOI: 10.17116/Cardiobulletin20221702133.

32. Хаспеков, Л. Г. Молекулярные механизмы, опосредующие участие астроцитов в синаптогенезе и пластичности синапсов головного мозга / Л. Г. Хаспеков, Л. Е. Фрумкина // Биохимия. – 2023. – Т. 88. – № 4. – С. 614–628. – DOI: 10.31857/S0320972523040061.

33. Юркевич, М. Ю. Нейротрофический фактор головного мозга (BDNF) и его роль в нейробиологических процессах / М. Ю. Юркевич, Ж. А. Ибрагимова //

Медико-биологические проблемы жизнедеятельности. – 2025. – № 2 (34). – С. 5–13. – DOI: 10.58708/2074-2088.2025-2(34)-5-13.

34. 2024 Heart Disease and Stroke Statistics: A Report of US and Global Data From the American Heart Association / S. S. Martin, A. W. Aday, Z. I. Almarzooq [et al.] // *Circulation*. – 2024. – Vol. 149. – № 8. – P. e347–e913. – DOI: 10.1161/CIR.0000000000001209.

35. A Brief Overview on BDNF-Trk Pathway in the Nervous System: A Potential Biomarker or Possible Target in Treatment of Multiple Sclerosis? / G. Schirò, S. Iacono, P. Ragonese [et al.] // *Front Neurol*. – 2022. – Vol. 13. – P. 917527. – DOI: 10.3389/fneur.2022.917527.

36. Activation of the Wnt/ β -catenin/CYP1B1 pathway alleviates oxidative stress and protects the blood-brain barrier under cerebral ischemia/reperfusion conditions / X. Chen, N. Yao, Y. Mao [et al.] // *Neural Regen Res*. – 2024. – Vol. 19. – № 7. – P. 1541–1547. – DOI: 10.4103/1673-5374.386398.

37. Activation of Wnt/ β -catenin pathway mitigates blood-brain barrier dysfunction in Alzheimer's disease / Q. Wang, X. Huang, Y. Su [et al.] // *Brain*. – 2022. – Vol. 145. – № 12. – P. 4474–4488. – DOI: 10.1093/brain/awac236.

38. Activation of Wnt/Beta-Catenin Signaling Pathway as a Promising Therapeutic Candidate for Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury / Z. Mo, Z. Zeng, Y. Liu [et al.] // *Front Pharmacol*. – 2022. – Vol. 13. – P. 914537. – DOI: 10.3389/fphar.2022.914537.

39. Adult neurogenesis: a real hope or a delusion? / G. Hussain, R. Akram, H. Anwar [et al.] // *Neural Regen Res*. – 2024. – Vol. 19. – № 1. – P. 6–15. – DOI: 10.4103/1673-5374.375317.

40. Age-Dependent Decline in Neuron Growth Potential and Mitochondria Functions in Cortical Neurons / T. C. Sutherland, A. Sefiani, D. Horvat [et al.] // *Cells*. – 2021. – Vol. 10. – № 7. – P. 1625. – DOI: 10.3390/cells10071625.

41. Aging Rewires Neuronal Metabolism, Exacerbating Cell Death After Ischemic Stroke: A Hidden Reason for the Failure of Neuroprotection / M. Vadyukhin,

V. Shchekin, P. Shegai [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2025. – Vol. 27. – № 1. – P. 81. – DOI: 10.3390/ijms27010081.

42. Age-Related Features of Neuroinflammation: Hidden Association of Neuronal Damage with Activation of Natural Killers in Patients with Ischemic Stroke / M. Vadyukhin, T. Demura, E. Kogan [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2025. – Vol. 26. – № 23. – P. 11452. – DOI: 10.3390/ijms262311452.

43. Aksan, B. Beyond vessels: unraveling the impact of VEGFs on neuronal functions and structure / B. Aksan, D. Mauceri // *J Biomed Sci.* – 2025. – Vol. 32. – № 1. – P. 33. – DOI: 10.1186/s12929-025-01128-8.

44. Alkailani, M. I. WNT signaling at the intersection between neurogenesis and brain tumorigenesis / M. I. Alkailani, M. Aittaleb, F. Tissir // *Front Mol Neurosci.* – 2022. – Vol. 15. – P. 1017568. – DOI: 10.3389/fnmol.2022.1017568.

45. Alleviation of Microglia Mediating Hippocampal Neuron Impairments and Depression-Related Behaviors by Urolithin B via the SIRT1-FOXO1 Pathway / C. Liu, D. Zhao, G. Yu [et al.] // *CNS Neurosci Ther.* – 2025. – Vol. 31. – № 4. – P. e70379. – DOI: 10.1111/cns.70379.

46. Antioxidant Intervention to Improve Cognition in the Aging Brain: The Example of Hydroxytyrosol and Resveratrol / S. Terracina, C. Petrella, S. Francati [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2022. – Vol. 23. – № 24. – P. 15674. – DOI: 10.3390/ijms232415674.

47. Asadi, Y. Regulation of mitochondrial function by FOXOs in ischemic stroke and Alzheimer's disease / Y. Asadi, H. Wang // *Organelle.* – 2024. – Vol. 1. – № 1. – P. 2. – DOI: 10.61747/0ifp.202403001.

48. Assessing the Role of Ependymal and Vascular Cells as Sources of Extracellular Cues Regulating the Mouse Ventricular-Subventricular Zone Neurogenic Niche / S. Quaresima, A. Istiaq, H. Jono [et al.] // *Front Cell Dev Biol.* – 2022. – Vol. 10. – P. 845567. – DOI: 10.3389/fcell.2022.845567.

49. Association of phenotypic age and accelerated aging with severity and disability in patients with acute ischemic stroke / Y. Liu, J. Wang, Z. Wei [et al.] // *J Nutr*

Health Aging. – 2024. – Vol. 28. – № 12. – P. 100405. – DOI: 10.1016/j.jnha.2024.100405.

50. Astrocyte in Neurological Disease: Pathogenesis and Therapy / M. Huang, A. Long, L. Hao, Z. Shi, M. Zhang // MedComm. – 2025. – Vol. 6. – № 8. – P. e70299. – DOI: 10.1002/mco2.70299.

51. Astrocyte metabolism and signaling pathways in the CNS / Y. M. Zhang, Y. B. Qi, Y. N. Gao [et al.] // Front Neurosci. – 2023. – Vol. 17. – P. 1217451. – DOI: 10.3389/fnins.2023.1217451.

52. Astrocyte Modulation of Synaptic Plasticity Mediated by Activity-Dependent Sonic Hedgehog Signaling / A. D. Le, M. Fu, A. Carper [et al.] // J Neurosci. – 2025. – Vol. 45. – № 11. – P. e1336242025. – DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1336-24.2025.

53. Astrocytic Glutamatergic Transmission and Its Implications in Neurodegenerative Disorders / S. Satarker, S. L. Bojja, P. C. Gurram [et al.] // Cells. – 2022. – Vol. 11. – № 7. – P. 1139. – DOI: 10.3390/cells11071139.

54. Bartman, S. Mitochondrial Dysfunction: A Key Player in Brain Aging and Diseases / S. Bartman, G. Coppotelli, J. M. Ross // Curr Issues Mol Biol. – 2024. – Vol. 46. – № 3. – P. 1987–2026. – DOI: 10.3390/cimb46030130.

55. Blood-brain barrier repair: potential and challenges of stem cells and exosomes in stroke treatment / X. Fu, J. Li, S. Yang [et al.] // Front Cell Neurosci. – 2025. – Vol. 19. – P. 1536028. – DOI: 10.3389/fncel.2025.1536028.

56. Benarroch, E. What Are the Roles of Pericytes in the Neurovascular Unit and Its Disorders? / E. Benarroch // Neurology. – 2023. – Vol. 100. – № 20. – P. 970–977. – DOI: 10.1212/WNL.0000000000207379.

57. Bin Ibrahim, M. Z. Long-term plasticity in the hippocampus: maintaining within and ‘tagging’ between synapses / M. Z. Bin Ibrahim, A. Benoy, S. Sajikumar // FEBS J. – 2022. – Vol. 289. – № 8. – P. 2176–2201. – DOI: 10.1111/febs.16065.

58. Blood-Brain Barrier (BBB) Dysfunction in CNS Diseases: Paying Attention to Pericytes / T. Yu, Z. Wang, Y. Chen [et al.] // *CNS Neurosci Ther.* – 2025. – Vol. 31. – № 5. – P. e70422. – DOI: 10.1111/cns.70422.

59. Blood-Brain Barrier Dysfunction, Edema Formation and Functional Recovery in Ischemic and Hemorrhagic Stroke: A Retrospective Study / C. A. Müller, J. A. Sembill, B. Kallmünzer [et al.] // *Neurol Int.* – 2025. – Vol. 17. – № 11. – P. 177. – DOI: 10.3390/neurolint17110177.

60. Blood-brain barrier disruption: a pervasive driver and mechanistic link between traumatic brain injury and Alzheimer's disease / B. Sun, L. Li, O. A. Harris, J. Luo // *Transl Neurodegener.* – 2025. – Vol. 14. – № 1. – P. 16. – DOI: 10.1186/s40035-025-00478-5.

61. Brain-derived neurotrophic factor supports pericyte and vascular homeostasis in the aging brain / Q. Luo, W. Quan, Q. Cao [et al.] // *Acta Neuropathol Commun.* – 2025. – Vol. 13. – № 1. – P. 246. – DOI: 10.1186/s40478-025-02181-y.

62. Brain Microvascular Pericytes-More than Bystanders in Breast Cancer Brain Metastasis / D. Ippolitov, L. Arreza, M. N. Munir, S. Hombach-Klonisch // *Cells.* – 2022. – Vol. 11. – № 8. – P. 1263. – DOI: 10.3390/cells11081263.

63. Brain pericyte biology: from physiopathological mechanisms to potential therapeutic applications in ischemic stroke / J. Fu, H. Liang, P. Yuan, Z. Wei, P. Zhong // *Front Cell Neurosci.* – 2023. – Vol. 17. – P. 1267785. – DOI: 10.3389/fncel.2023.1267785.

64. Brain Plasticity and Cell Competition: Immediate Early Genes Are the Focus / P. P. Tregub, Y. K. Komleva, M. V. Kukla [et al.] // *Cells.* – 2025. – Vol. 14. – № 2. – P. 143. – DOI: 10.3390/cells14020143.

65. Bridging Inflammation and Repair: The Promise of MFG-E8 in Ischemic Stroke Therapy / Y. J. Han, H. J. Lee, D. H. Geum [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2025. – Vol. 26. – № 17. – P. 8708. – DOI: 10.3390/ijms26178708.

66. Bridging regional neurovascular unit heterogeneity and cognitive function: a review / A. Tsintzou, R. Poirier, R. Harati [et al.] // *Fluids Barriers CNS*. – 2025. – Vol. 22. – № 1. – P. 85. – DOI: 10.1186/s12987-025-00697-y.
67. Bui, T. A. Neutrophil dynamics and inflammaging in acute ischemic stroke: A transcriptomic review / T. A. Bui, G. C. Jickling, I. R. Winship // *Front Aging Neurosci*. – 2022. – Vol. 14. – P. 1041333. – DOI: 10.3389/fnagi.2022.1041333.
68. Cellular Mechanisms of Damage and Compensation in the Brain in Cerebral Ischemia: Molecular Proteostasis Control Systems as a Target for Therapy / L. I. Bon, S. M. Zimatkin, N. E. Maksimovich, L. I. Vishnevskaya // *Journal of Innovations in Medical Research*. – 2023. – Vol. 2. – № 5. – P. 13–15. – DOI: 10.56397/jimr/2023.05.03.
69. Cerebral Edema in Traumatic Brain Injury / S. Cardona-Collazos, W. D. Gonzalez, P. Pabon-Tsukamoto [et al.] // *Biomedicines*. – 2025. – Vol. 13. – № 7. – P. 1728. – DOI: 10.3390/biomedicines13071728.
70. Cerebral Hypoxia-Induced Molecular Alterations and Their Impact on the Physiology of Neurons and Dendritic Spines: A Comprehensive Review / C. Cui, X. Jiang, Y. Wang [et al.] // *Cell Mol Neurobiol*. – 2024. – Vol. 44. – № 1. – P. 58. – DOI: 10.1007/s10571-024-01491-4.
71. Characterization of the neurogenic niche in the aging dentate gyrus using iterative immunofluorescence imaging / J. D. Cole, J. Sarabia Del Castillo, G. Gut [et al.] // *Elife*. – 2022. – Vol. 11. – P. e68000. – DOI: 10.7554/eLife.68000.
72. Cieri, M. B. Astrocytes, reactive astrogliosis, and glial scar formation in traumatic brain injury / M. B. Cieri, A. J. Ramos // *Neural Regen Res*. – 2025. – Vol. 20. – № 4. – P. 973–989. – DOI: 10.4103/NRR.NRR-D-23-02091.
73. Compromised endothelial Wnt/ β -catenin signaling mediates the blood-brain barrier disruption and leads to neuroinflammation in endotoxemia / X. Huang, P. Wei, C. Fang [et al.] // *J Neuroinflammation*. – 2024. – Vol. 21. – № 1. – P. 265. – DOI: 10.1186/s12974-024-03261-x.

74. Coupland, K. G. Brain fluid physiology in ischaemic stroke; more than just oedema / K. G. Coupland, M. F. Amell, N. J. Spratt // *Fluids Barriers CNS*. – 2025. – Vol. 22. – № 1. – P. 60. – DOI: 10.1186/s12987-025-00671-8.
75. Culig, L. Neurogenesis in aging and age-related neurodegenerative diseases / L. Culig, X. Chu, V. A. Bohr // *Ageing Res Rev*. – 2022. – Vol. 78. – P. 101636. – DOI: 10.1016/j.arr.2022.101636.
76. Current Update on Transcellular Brain Drug Delivery / B. Pawar, N. Vasdev, T. Gupta [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2022. – Vol. 14. – № 12. – P. 2719. – DOI: 10.3390/pharmaceutics14122719.
77. CX3CR1 upregulation modulates microglial activation and preserves synapses in the hippocampus and frontal cortex of middle-aged mice / J. Liu, Z. Sun, X. Liu [et al.] // *Front Aging*. – 2025. – Vol. 6. – P. 1549848. – DOI: 10.3389/fragi.2025.1549848.
78. Czapkowska, J. The Potential Role of Exosomes in Communication Between Astrocytes and Endothelial Cells / J. Czapkowska, A. Głabiński, P. Szpakowski // *Int J Mol Sci*. – 2025. – Vol. 26. – № 10. – P. 4676. – DOI: 10.3390/ijms26104676.
79. Dass, C. R. PEDF and Its Role in Metabolic Disease, Angiogenesis, Cardiovascular Disease, and Diabetes / C. R. Dass // *Biomedicines*. – 2025. – Vol. 13. – № 7. – P. 1780. – DOI: 10.3390/biomedicines13071780.
80. Díaz-Castro, B. Astrocyte Endfeet in Brain Function and Pathology: Open Questions / B. Díaz-Castro, S. Robel, A. Mishra // *Annu Rev Neurosci*. – 2023. – Vol. 46. – P. 101–121. – DOI: 10.1146/annurev-neuro-091922-031205.
81. Differences in Acute Expression of Matrix Metalloproteinases-9, 3, and 2 Related to the Duration of Brain Ischemia and Tissue Plasminogen Activator Treatment in Experimental Stroke / D. Wang, S. Saleem, R. D. Sullivan [et al.] // *Int J Mol Sci*. – 2024. – Vol. 25. – № 17. – P. 9442. – DOI: 10.3390/ijms25179442.
82. Differences in the post-stroke innate immune response between young and old / M. Gallizioli, M. Arbaizar-Rovirosa, D. Brea, A. M. Planas // *Semin Immunopathol*. – 2023. – Vol. 45. – № 3. – P. 367–376. – DOI: 10.1007/s00281-023-00990-8.

83. Diverse NKT cells regulate early inflammation and neurological outcomes after cardiac arrest and resuscitation / T. Tamura, C. Cheng, A. B. Villaseñor-Altamirano [et al.] // *Sci Transl Med.* – 2024. – Vol. 16. – № 776. – P. eadq5796. – DOI: 10.1126/scitranslmed.adq5796.

84. Diversity of Microglia-Derived Molecules with Neurotrophic Properties That Support Neurons in the Central Nervous System and Other Tissues / K. R. Wiens, N. Wasti, O. O. Ulloa, A. Klegeris // *Molecules.* – 2024. – Vol. 29. – № 23. – P. 5525. – DOI: 10.3390/molecules29235525.

85. Downregulation of Notch Signaling-Stimulated Genes in Neurovascular Unit Alterations Induced by Chronic Cerebral Hypoperfusion / D. Ru, Z. Zhang, M. Liu [et al.] // *Immun Inflamm Dis.* – 2024. – Vol. 12. – № 11. – P. e70082. – DOI: 10.1002/iid3.70082.

86. Dual impact of neuroinflammation on cognitive and motor impairments in Alzheimer's disease / S. Fakorede, O. M. Lateef, W. A. Garuba [et al.] // *J Alzheimers Dis Rep.* – 2025. – Vol. 9. – P. 25424823251341870. – DOI: 10.1177/25424823251341870.

87. Duque, A. An assessment of the existence of adult neurogenesis in humans and value of its rodent models for neuropsychiatric diseases / A. Duque, J. I. Arellano, P. Rakic // *Mol Psychiatry.* – 2022. – Vol. 27. – № 1. – P. 377–382. – DOI: 10.1038/s41380-021-01314-8.

88. Dynamics of Endothelial Cell Diversity and Plasticity in Health and Disease / A. Larionov, C. M. Hammer, K. Fiedler, L. Filgueira // *Cells.* – 2024. – Vol. 13. – № 15. – P. 1276. – DOI: 10.3390/cells13151276.

89. Effect of erythropoietin administration on the expression of brain-derived neurotrophic factor, stromal cell-derived factor-1, and neuron-specific enolase in traumatic brain injury: A literature review / M. F. Said, A. A. Islam, N. N. Massi, Prihantono // *Ann Med Surg (Lond).* – 2021. – Vol. 69. – P. 102666. – DOI: 10.1016/j.amsu.2021.102666.

90. Elderly stroke burden: a comprehensive global study over three decades / R. Gou, C. Luo, X. Liang [et al.] // *Front Aging*. – 2025. – Vol. 6. – P. 1489914. – DOI: 10.3389/fragi.2025.1489914.
91. Endothelial β -Catenin Deficiency Causes Blood-Brain Barrier Breakdown via Enhancing the Paracellular and Transcellular Permeability / B. Hussain, C. Fang, X. Huang [et al.] // *Front Mol Neurosci*. – 2022. – Vol. 15. – P. 895429. – DOI: 10.3389/fnmol.2022.895429.
92. Endothelial Cells and the Blood-Brain Barrier: Critical Determinants of Ineffective Reperfusion in Stroke / X. Li, L. Simo, Q. Zhao [et al.] // *Eur J Neurosci*. – 2025. – Vol. 61. – № 3. – P. e16663. – DOI: 10.1111/ejn.16663.
93. Endothelial cells regulate astrocyte to neural progenitor cell trans-differentiation in a mouse model of stroke / W. Li, E. T. Mandeville, V. Durán-Laforet [et al.] // *Nat Commun*. – 2022. – Vol. 13. – № 1. – P. 7812. – DOI: 10.1038/s41467-022-35498-6.
94. Endothelial Dysfunctions in Blood-Brain Barrier Breakdown in Alzheimer's Disease: From Mechanisms to Potential Therapies / Q. Yue, X. Leng, N. Xie [et al.] // *CNS Neurosci Ther*. – 2024. – Vol. 30. – № 11. – P. e70079. – DOI: 10.1111/cns.70079.
95. Endothelial Dysfunction in Neurodegenerative Diseases / Y. C. Fang, Y. C. Hsieh, C. J. Hu, Y. K. Tu // *Int J Mol Sci*. – 2023. – Vol. 24. – № 3. – P. 2909. – DOI: 10.3390/ijms24032909.
96. Energy Metabolism and Brain Aging: Strategies to Delay Neuronal Degeneration / D. Na, Z. Zhang, M. Meng [et al.] // *Cell Mol Neurobiol*. – 2025. – Vol. 45. – № 1. – P. 38. – DOI: 10.1007/s10571-025-01555-z.
97. Epigenetic aging and rejuvenation of the brain: drivers, consequences, and interventions / S. Lee, S. Cho, S. K. Kim, J. H. Yang // *BMB Rep*. – 2026. – Vol. 59. – № 1. – P. 27–39. – DOI: 10.5483/BMBRep.2025-0214.
98. Epigenetic regulation in adult neural stem cells / J. Shi, Z. Wang, Z. Wang [et al.] // *Front Cell Dev Biol*. – 2024. – Vol. 12. – P. 1331074. – DOI: 10.3389/fcell.2024.1331074.

99. ERK1/2 Activity Is Critical for the Outcome of Ischemic Stroke / C. Schanbacher, M. Bieber, Y. Reinders [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2022. – Vol. 23. – № 2. – P. 706. – DOI: 10.3390/ijms23020706.
100. Essential Pieces of the Puzzle: The Roles of VEGF and Dopamine in Aging / M. B. Thompson, S. P. Tirupattur, N. Vishwakarma, L. C. Katwa // *Cells.* – 2025. – Vol. 14. – № 15. – P. 1178. – DOI: 10.3390/cells14151178.
101. Evidence that NF- κ B and MAPK Signaling Promotes NLRP Inflammasome Activation in Neurons Following Ischemic Stroke / D. Y. Fann, Y. A. Lim, Y. L. Cheng [et al.] // *Mol Neurobiol.* – 2018. – Vol. 55. – № 2. – P. 1082–1096. – DOI: 10.1007/s12035-017-0394-9.
102. Examining the Impact of Microglia on Ischemic Stroke With an Emphasis on the Metabolism of Immune Cells / J. Lv, Y. Jiao, X. Zhao [et al.] // *CNS Neurosci Ther.* – 2025. – Vol. 31. – № 2. – P. e70229. – DOI: 10.1111/cns.70229.
103. Excitotoxic Storms of Ischemic Stroke: A Non-neuronal Perspective / X. M. Yang, H. Yu, J. X. Li [et al.] // *Mol Neurobiol.* – 2024. – Vol. 61. – № 11. – P. 9562–9581. – DOI: 10.1007/s12035-024-04184-7.
104. Experience-dependent structural plasticity in the adult brain: How the learning brain grows / S. Schmidt, S. Gull, K. H. Herrmann [et al.] // *Neuroimage.* – 2021. – Vol. 225. – P. 117502. – DOI: 10.1016/j.neuroimage.2020.117502.
105. Experimental Models of Stroke: Seeing the Unseen / H. Yassaad, M. Kahoul, M. M. R. Ali [et al.] // *Nutrition and Stroke.* – Singapore : Springer, 2024. – Nutritional Neurosciences. – DOI: 10.1007/978-981-97-6818-9_3.
106. Exploring the diversity of biological processes regulated by glial cell line-derived neurotrophic factor, a pleiotropic molecule with therapeutic potential / C. Porcari, S. Cattaneo, L. Crippa, M. Simonato, B. Bettegazzi // *Front Physiol.* – 2025. – Vol. 16. – P. 1618330. – DOI: 10.3389/fphys.2025.1618330.
107. Exploring the Intricacies of Neurogenic Niches: Unraveling the Anatomy and Neural Microenvironments / I. Sánchez-Gomar, N. Geribaldi-Doldán, C. Santos-

Rosendo [et al.] // *Biomolecules*. – 2024. – Vol. 14. – № 3. – P. 335. – DOI: 10.3390/biom14030335.

108. Exploring the Role of Neuroplasticity in Development, Aging, and Neurodegeneration / P. Marzola, T. Melzer, E. Pavesi, J. Gil-Mohapel, P. S. Brocardo // *Brain Sci*. – 2023. – Vol. 13. – № 12. – P. 1610. – DOI: 10.3390/brainsci13121610.

109. Exploring the transformative influence of neuroplasticity on stroke rehabilitation: a narrative review of current evidence / N. Aderinto, M. O. AbdulBasit, G. Olatunji, T. Adejumo // *Ann Med Surg (Lond)*. – 2023. – Vol. 85. – № 9. – P. 4425–4432. – DOI: 10.1097/MS9.0000000000001137.

110. Extent and activity of adult hippocampal neurogenesis / R. K. Betters, R. W. Manly, P. M. Huynh, E. Tunc-Ozcan // *Front Neurosci*. – 2025. – Vol. 19. – P. 1709208. – DOI: 10.3389/fnins.2025.1709208.

111. Extracellular Vesicles in the Central Nervous System: A Novel Mechanism of Neuronal Cell Communication / F. M. Filannino, M. A. Panaro, T. Benameur, I. Pizzolorusso, C. Porro // *Int J Mol Sci*. – 2024. – Vol. 25. – № 3. – P. 1629. – DOI: 10.3390/ijms25031629.

112. Factors Determining the Functional Efficiency of Patients After Ischemic Stroke After Neurological Rehabilitation / L. Ścisło, M. Staszkiwicz, E. Walewska [et al.] // *J Multidiscip Healthc*. – 2024. – Vol. 17. – P. 959–969. – DOI: 10.2147/JMDH.S444049.

113. Fang, J. Angiogenesis after ischemic stroke / J. Fang, Z. Wang, C. Y. Miao // *Acta Pharmacol Sin*. – 2023. – Vol. 44. – № 7. – P. 1305–1321. – DOI: 10.1038/s41401-023-01061-2.

114. Feigin, V. L. World Stroke Organization: Global Stroke Fact Sheet 2025 / V. L. Feigin, M. Brainin, B. Norrving // *Int J Stroke*. – 2025. – Vol. 20. – № 2. – P. 132–144. – DOI: 10.1177/17474930241308142.

115. Fibrotic scar formation after cerebral ischemic stroke: Targeting the Sonic hedgehog signaling pathway for scar reduction / J. Wen, H. Tang, M. Tian [et al.] //

Neural Regen Res. – 2026. – Vol. 21. – № 2. – P. 756–768. – DOI: 10.4103/NRR.NRR-D-24-00999.

116. FOXOs and their roles in acute and chronic neurological disorders / Y. Asadi, R. K. Moundounga, A. Chakroborty, A. Pokokiri, H. Wang // *Front Mol Biosci.* – 2025. – Vol. 12. – P. 1538472. – DOI: 10.3389/fmolb.2025.1538472.

117. Frizzled receptors: gatekeepers of Wnt signaling in development and disease / D. Martinez-Marin, G. C. Stroman, C. J. Fulton, K. Pruitt // *Front Cell Dev Biol.* – 2025. – Vol. 13. – P. 1599355. – DOI: 10.3389/fcell.2025.1599355.

118. From Synaptic Plasticity to Neurodegeneration: BDNF as a Transformative Target in Medicine / C. Toader, M. Serban, O. Munteanu [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2025. – Vol. 26. – № 9. – P. 4271. – DOI: 10.3390/ijms26094271.

119. Garcia, A. D. R. New Tricks for an Old (Hedge)Hog: Sonic Hedgehog Regulation of Astrocyte Function / A. D. R. Garcia // *Cells.* – 2021. – Vol. 10. – № 6. – P. 1353. – DOI: 10.3390/cells10061353.

120. Gaspar-Silva, F. Ageing in the brain: mechanisms and rejuvenating strategies / F. Gaspar-Silva, D. Trigo, J. Magalhaes // *Cell Mol Life Sci.* – 2023. – Vol. 80. – № 7. – P. 190. – DOI: 10.1007/s00018-023-04832-6.

121. Gharbi, T. The Function of Astrocyte Mediated Extracellular Vesicles in Central Nervous System Diseases / T. Gharbi, Z. Zhang, G. Y. Yang // *Front Cell Dev Biol.* – 2020. – Vol. 8. – P. 568889. – DOI: 10.3389/fcell.2020.568889.

122. Glial Cells as Emerging Therapeutic Targets in Neurodegenerative Diseases: Mechanistic Insights and Translational Perspectives / T. Vishnumukkala, C. M. N. Che Mohd Nassir, Z. M. Hein [et al.] // *Cells.* – 2025. – Vol. 14. – № 19. – P. 1497. – DOI: 10.3390/cells14191497.

123. Glial Cells in the Early Stages of Neurodegeneration: Pathogenesis and Therapeutic Targets / E. Ahremenko, A. Andreev, D. Apushkin, E. Korkotian // *Int J Mol Sci.* – 2025. – Vol. 26. – № 24. – P. 11995. – DOI: 10.3390/ijms262411995.

124. Global research trends and prospects on immune-related therapy in ischemic stroke: a bibliometric analysis / Q. Wang, L. Yuan, F. Wang, F. Sun // *Front Cell Neurosci.* – 2024. – Vol. 18. – P. 1490607. – DOI: 10.3389/fncel.2024.1490607.
125. Growth Factors and Their Application in the Therapy of Hereditary Neurodegenerative Diseases / S. Issa, H. Fayoud, A. Shaimardanova [et al.] // *Biomedicines.* – 2024. – Vol. 12. – № 8. – P. 1906. – DOI: 10.3390/biomedicines12081906.
126. Guo, S. Microglia Polarization From M1 to M2 in Neurodegenerative Diseases / S. Guo, H. Wang, Y. Yin // *Front Aging Neurosci.* – 2022. – Vol. 14. – P. 815347. – DOI: 10.3389/fnagi.2022.815347.
127. Guo, Y. PI3K/Akt pathway and neuroinflammation in sepsis-associated encephalopathy / Y. Guo, Y. Yu // *Open Med (Wars).* – 2025. – Vol. 20. – № 1. – P. 20251248. – DOI: 10.1515/med-2025-1248.
128. Hagen, H. Interplay of hippocampal long-term potentiation and long-term depression in enabling memory representations / H. Hagen, D. Manahan-Vaughan // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* – 2024. – Vol. 379. – № 1906. – P. 20230229. – DOI: 10.1098/rstb.2023.0229.
129. Haupt, M. The dual role of microglia in ischemic stroke and its modulation via extracellular vesicles and stem cells / M. Haupt, S. T. Gerner, T. R. Doeppner // *Neuroprotection.* – 2024. – Vol. 2. – № 1. – P. 4–15. – DOI: 10.1002/nep3.39.
130. Histological Insights into the Neuroprotective Effects of Antioxidant Peptides and Small Molecules in Cerebral Ischemia / S. Jurja, T. Negreanu-Pirjol, M. C. Mehedinti [et al.] // *Molecules.* – 2025. – Vol. 30. – № 23. – P. 4529. – DOI: 10.3390/molecules30234529.
131. How endothelial cell metabolism shapes blood-brain barrier integrity in neurodegeneration / J. Wang, Y. Chen, S. Chen, Z. Mu, J. Chen // *Front Mol Neurosci.* – 2025. – Vol. 18. – P. 1623321. – DOI: 10.3389/fnmol.2025.1623321.

132. Human adult hippocampal neurogenesis in health and disease / M. C. Alonso-Moreno, M. Gallardo-Caballero, A. V. Prádanos-Senén, M. Llorens-Martín // *Aging Brain*. – 2025. – Vol. 8. – P. 100145. – DOI: 10.1016/j.nbas.2025.100145.
133. Impact and Mechanisms of Action of BDNF on Neurological Disorders, Cancer, and Cardiovascular Diseases / M. Lei, Q. Liu, J. Nie [et al.] // *CNS Neurosci Ther.* – 2024. – Vol. 30. – № 12. – P. e70138. – DOI: 10.1111/cns.70138.
134. Immune-mediated blood-brain barrier disruption after ischemic stroke: mechanisms and therapeutic targets / H. Wang, Z. Yiqiang, J. Cai, J. Guo // *Front Immunol.* – 2025. – Vol. 16. – P. 1716041. – DOI: 10.3389/fimmu.2025.1716041.
135. Immune-Triggered Forms of Plasticity Across Brain Regions / M. Hikosaka, T. Kawano, Y. Wada [et al.] // *Front Cell Neurosci.* – 2022. – Vol. 16. – P. 925493. – DOI: 10.3389/fncel.2022.925493.
136. Immunological dimensions of neuroinflammation and microglial activation: exploring innovative immunomodulatory approaches to mitigate neuroinflammatory progression / L. Fornari Laurindo, J. Aparecido Dias, A. Cressoni Araújo [et al.] // *Front Immunol.* – 2024. – Vol. 14. – P. 1305933. – DOI: 10.3389/fimmu.2023.1305933.
137. Immunoreactivity of Monoaminoxidase Type B, Neun, Neuroglobin, and ATP Synthase in Rat Brain Histaminergic Neurons in the Dynamics of Postnatal Ontogenesis / S. M. Zimatkin, A. Zaerko, E. M. Phedina, L. Yogarathnam // *American Journal of Biomedical Science & Research.* – 2023. – Vol. 20. – № 1. – P. 13–18. – DOI: 10.34297/ajbsr.2023.20.002663.
138. Ion Channel Dysfunction in Astrocytes in Neurodegenerative Diseases / S. Wang, B. Wang, D. Shang [et al.] // *Front Physiol.* – 2022. – Vol. 13. – P. 814285. – DOI: 10.3389/fphys.2022.814285.
139. Irida, K. Neural repair mechanisms after ischemic stroke / K. Irida, T. Shichita // *Inflamm Regen.* – 2025. – Vol. 45. – № 1. – P. 7. – DOI: 10.1186/s41232-025-00372-7.
140. Karpuzoglu, E. Inflammaging: triggers, molecular mechanisms, immunological consequences, sex differences, and cutaneous manifestations / E.

Karpuzoglu, S. D. Holladay, R. M. Gogal Jr. // *Front Immunol.* – 2025. – Vol. 16. – P. 1704203. – DOI: 10.3389/fimmu.2025.1704203.

141. Kim, S. W. Beyond barriers: when neurons act immune and immunity acts neural / S. W. Kim, S. H. Seok // *Signal Transduct Target Ther.* – 2025. – Vol. 10. – № 1. – P. 392. – DOI: 10.1038/s41392-025-02494-3.

142. Kim, Y. Brain energy homeostasis: the evolution of the astrocyte-neuron lactate shuttle hypothesis / Y. Kim, S. E. Dube, C. B. Park // *Korean J Physiol Pharmacol.* – 2025. – Vol. 29. – № 1. – P. 1–8. – DOI: 10.4196/kjpp.24.388.

143. Lampada, A. Notch signaling as a master regulator of adult neurogenesis / A. Lampada, V. Taylor // *Front Neurosci.* – 2023. – Vol. 17. – P. 1179011. – DOI: 10.3389/fnins.2023.1179011.

144. Lee, J. Normal Aging Induces Changes in the Brain and Neurodegeneration Progress: Review of the Structural, Biochemical, Metabolic, Cellular, and Molecular Changes / J. Lee, H. J. Kim // *Front Aging Neurosci.* – 2022. – Vol. 14. – P. 931536. – DOI: 10.3389/fnagi.2022.931536.

145. Levinson, S. Neuroinflammation and acute ischemic stroke: impact on translational research and clinical care / S. Levinson, B. Pulli, J. J. Heit // *Front Surg.* – 2025. – Vol. 12. – P. 1501359. – DOI: 10.3389/fsurg.2025.1501359.

146. Li, C. Mechanistic insights of neuronal death and neuroprotective therapeutic approaches in stroke / C. Li, Y. Luo, S. Li // *Neural Regen Res.* – 2026. – Vol. 21. – № 3. – P. 869–886. – DOI: 10.4103/NRR.NRR-D-24-01324.

147. Lindgren, A. G. Genomics of stroke recovery and outcome / A. G. Lindgren // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2025. – 11 Apr. – DOI: 10.1177/0271678X251332528.

148. Li, Y. Animal models of stroke / Y. Li, J. Zhang // *Animal Model Exp Med.* – 2021. – Vol. 4. – № 3. – P. 204–219. – DOI: 10.1002/ame2.12179.

149. Loss of TGF β -Mediated Repression of Angiopoietin-2 in Pericytes Underlies Germinal Matrix Hemorrhage Pathogenesis / J. M. Dave, R. Chakraborty, A. Agyemang [et al.] // *Stroke.* – 2024. – Vol. 55. – № 9. – P. 2340–2352. – DOI: 10.1161/STROKEAHA.123.045248.

150. Lungu, C. N. Pro-Angiogenic Bioactive Molecules in Vascular Morphogenesis: Integrating Endothelial Cell Dynamics / C. N. Lungu, G. Gurau, M. C. Mehedinti // *Curr Issues Mol Biol.* – 2025. – Vol. 47. – № 10. – P. 851. – DOI: 10.3390/cimb47100851.
151. Luo, Y. The Impact of Microglia on Neurodevelopment and Brain Function in Autism / Y. Luo, Z. Wang // *Biomedicines.* – 2024. – Vol. 12. – № 1. – P. 210. – DOI: 10.3390/biomedicines12010210.
152. M1 Microglia Induced Neuronal Injury on Ischemic Stroke via Mitochondrial Crosstalk between Microglia and Neurons / W. Liu, Z. Qi, W. Li [et al.] // *Oxid Med Cell Longev.* – 2022. – P. 4335272. – DOI: 10.1155/2022/4335272.
153. M2 macrophage-derived exosomes mitigate acute inflammation following ischemic stroke / J. Song, G. Su, W. Chen, X. Xie, Z. Zhang // *Front Neurol.* – 2026. – Vol. 17. – P. 1733679. – DOI: 10.3389/fneur.2026.1733679.
154. Majumder, D. Ischemic Stroke: Pathophysiology and Evolving Treatment Approaches / D. Majumder // *Neurosci Insights.* – 2024. – Vol. 19. – P. 26331055241292600. – DOI: 10.1177/26331055241292600.
155. Malík, M. Nootropics as Cognitive Enhancers: Types, Dosage and Side Effects of Smart Drugs / M. Malík, P. Tlustoš // *Nutrients.* – 2022. – Vol. 14. – № 16. – P. 3367. – DOI: 10.3390/nu14163367.
156. Mallard, C. Immune-Neurovascular Interactions in Experimental Perinatal and Childhood Arterial Ischemic Stroke / C. Mallard, D. M. Ferriero, Z. S. Vexler // *Stroke.* – 2024. – Vol. 55. – № 2. – P. 506–518. – DOI: 10.1161/STROKEAHA.123.043399.
157. Marmolejo-Martínez-Artesero, S. Endogenous Mechanisms of Neuroprotection: To Boost or Not to Boost / S. Marmolejo-Martínez-Artesero, C. Casas, D. Romeo-Guitart // *Cells.* – 2021. – Vol. 10. – № 2. – P. 370. – DOI: 10.3390/cells10020370.

158. Mayer, M. G. Microglia at the blood brain barrier in health and disease / M. G. Mayer, T. Fischer // *Front Cell Neurosci.* – 2024. – Vol. 18. – P. 1360195. – DOI: 10.3389/fncel.2024.1360195.

159. McConnell, H. L. Cells of the Blood-Brain Barrier: An Overview of the Neurovascular Unit in Health and Disease / H. L. McConnell, A. Mishra // *Methods Mol Biol.* – 2022. – Vol. 2492. – P. 3–24. – DOI: 10.1007/978-1-0716-2289-6_1.

160. Mechanisms and Potential Benefits of Neuroprotective Agents in Neurological Health / B. Pekdemir, A. Raposo, A. Saraiva [et al.] // *Nutrients.* – 2024. – Vol. 16. – № 24. – P. 4368. – DOI: 10.3390/nu16244368.

161. Mechanisms of inflammation after ischemic stroke in brain-peripheral crosstalk / L. Xie, M. He, C. Ying, H. Chu // *Front Mol Neurosci.* – 2024. – Vol. 17. – P. 1400808. – DOI: 10.3389/fnmol.2024.1400808.

162. Mekala, A. Interplay Between Vascular Dysfunction and Neurodegenerative Pathology: New Insights into Molecular Mechanisms and Management / A. Mekala, H. Qiu // *Biomolecules.* – 2025. – Vol. 15. – № 5. – P. 712. – DOI: 10.3390/biom15050712.

163. Melatonin Protects Against Ischemic Brain Injury by Modulating PI3K/AKT Signaling Pathway via Suppression of PTEN Activity / Y. Ran, L. Ye, Z. Ding [et al.] // *ASN Neuro.* – 2021. – Vol. 13. – P. 17590914211022888. – DOI: 10.1177/17590914211022888.

164. Meyerink, B. L. Ariadne's Thread in the Developing Cerebral Cortex: Mechanisms Enabling the Guiding Role of the Radial Glia Basal Process during Neuron Migration / B. L. Meyerink, N. K. Tiwari, L. J. Pilaz // *Cells.* – 2020. – Vol. 10. – № 1. – P. 3. – DOI: 10.3390/cells10010003.

165. Microglia-astrocyte crosstalk following ischemic stroke / S. Yang, Y. Chen, J. Tang [et al.] // *Mol Brain.* – 2025. – Vol. 18. – № 1. – P. 75. – DOI: 10.1186/s13041-025-01244-4.

166. Microglia dynamics in aging-related neurobehavioral and neuroinflammatory diseases / N. Javanmehr, K. Saleki, P. Alijanizadeh, N. Rezaei // *J*

Neuroinflammation. – 2022. – Vol. 19. – № 1. – P. 273. – DOI: 10.1186/s12974-022-02637-1.

167. Microglia in Ischemic Stroke: Pathogenesis Insights and Therapeutic Challenges / X. Shui, J. Chen, Z. Fu [et al.] // *J Inflamm Res.* – 2024. – Vol. 17. – P. 3335–3352. – DOI: 10.2147/JIR.S461795.

168. Microglia in neurodegenerative diseases: mechanism and potential therapeutic targets / C. Gao, J. Jiang, Y. Tan, S. Chen // *Signal Transduct Target Ther.* – 2023. – Vol. 8. – № 1. – P. 359. – DOI: 10.1038/s41392-023-01588-0.

169. Microglia-orchestrated neuroinflammation and synaptic remodeling: roles of pro-inflammatory cytokines and receptors in neurodegeneration / G. Yang, X. Xu, W. Gao [et al.] // *Front Cell Neurosci.* – 2025. – Vol. 19. – P. 1700692. – DOI: 10.3389/fncel.2025.1700692.

170. Microglia overexpressing brain-derived neurotrophic factor promote vascular repair and functional recovery in mice after spinal cord injury / F. Zeng, Y. Li, X. Li [et al.] // *Neural Regen Res.* – 2026. – Vol. 21. – № 1. – P. 365–376. – DOI: 10.4103/NRR.NRR-D-24-00381.

171. Minjares, M. Oxidative Stress and MicroRNAs in Endothelial Cells under Metabolic Disorders / M. Minjares, W. Wu, J. M. Wang // *Cells.* – 2023. – Vol. 12. – № 9. – P. 1341. – DOI: 10.3390/cells12091341.

172. Modulation of brain immune microenvironment and cellular dynamics in systemic inflammation / J. Wang, Z. Zhong, H. Luo [et al.] // *Theranostics.* – 2025. – Vol. 15. – № 11. – P. 5153–5171. – DOI: 10.7150/thno.107061.

173. Modulation of the Neurovascular Unit by the Locus Coeruleus-Norepinephrine System: From Physiological Mechanisms to Therapeutic Applications / Z. Pan, Z. Jia, T. Jiang [et al.] // *FASEB J.* – 2025. – Vol. 39. – № 20. – P. e71127. – DOI: 10.1096/fj.202502069R.

174. Molecular and Cellular Foundations of Aging of the Brain: Anti-aging Strategies in Alzheimer's Disease / M. Dzięwa, M. Złotek, M. Herbet, I. Piątkowska-

Chmiel // *Cell Mol Neurobiol.* – 2024. – Vol. 44. – № 1. – P. 80. – DOI: 10.1007/s10571-024-01514-0.

175. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to the pathogenesis of neurodegenerative diseases—an update / W. L. Wu, X. X. Gong, Z. H. Qin, Y. Wang // *Acta Pharmacol Sin.* – 2025. – Vol. 46. – № 12. – P. 3129–3142. – DOI: 10.1038/s41401-025-01576-w.

176. Molecular mediators of angiogenesis and neurogenesis after ischemic stroke / M. R. Paro, A. R. Chakraborty, S. Angelo [et al.] // *Rev Neurosci.* – 2022. – Vol. 34. – № 4. – P. 425–442. – DOI: 10.1515/revneuro-2022-0049.

177. Monocyte-related cytokines/chemokines in cerebral ischemic stroke / M. Bai, R. Sun, B. Cao [et al.] // *CNS Neurosci Ther.* – 2023. – Vol. 29. – № 12. – P. 3693–3712. – DOI: 10.1111/cns.14368.

178. Monsour, M. Neurovascular unit permeability in neuroinflammatory diseases: a common pathologic and therapeutic target? / M. Monsour, C. V. Borlongan // *Neural Regen Res.* – 2023. – Vol. 18. – № 8. – P. 1715–1716. – DOI: 10.4103/1673-5374.363197.

179. mTOR pathway – a potential therapeutic target in stroke / K. Melanis, M. I. Stefanou, K. M. Themistoklis, T. Papasilekas // *Ther Adv Neurol Disord.* – 2023. – Vol. 16. – P. 17562864231187770. – DOI: 10.1177/17562864231187770.

180. Mühleder, S. Endothelial sprouting, proliferation, or senescence: tipping the balance from physiology to pathology / S. Mühleder, M. Fernández-Chacón, I. Garcia-Gonzalez, R. Benedito // *Cell Mol Life Sci.* – 2021. – Vol. 78. – № 4. – P. 1329–1354. – DOI: 10.1007/s00018-020-03664-y.

181. Multimodal insights into adult neurogenesis: An integrative review of multi-omics approaches / J. Li, L. Huang, W. Xiao [et al.] // *Heliyon.* – 2025. – Vol. 11. – № 4. – P. e42668. – DOI: 10.1016/j.heliyon.2025.e42668.

182. Natural killer cells in the central nervous system / Z. Ning, Y. Liu, D. Guo, W. J. Lin, Y. Tang // *Cell Commun Signal.* – 2023. – Vol. 21. – № 1. – P. 341. – DOI: 10.1186/s12964-023-01324-9.

183. Navakkode, S. Neural ageing and synaptic plasticity: prioritizing brain health in healthy longevity / S. Navakkode, B. K. Kennedy // *Front Aging Neurosci.* – 2024. – Vol. 16. – P. 1428244. – DOI: 10.3389/fnagi.2024.1428244.

184. Neural circuit mechanisms underlying aberrantly prolonged functional hyperemia in young Alzheimer's disease mice / T. A. Kim, G. Cruz, M. D. Syty [et al.] // *Mol Psychiatry.* – 2025. – Vol. 30. – № 2. – P. 367–378. – DOI: 10.1038/s41380-024-02680-9.

185. Neural Regulation of Vascular Development: Molecular Mechanisms and Interactions / Y. Zhang, X. Shen, S. Deng [et al.] // *Biomolecules.* – 2024. – Vol. 14. – № 8. – P. 966. – DOI: 10.3390/biom14080966.

186. Neural stem cells fate under neuroinflammatory conditions and oxidative stress response / F. Torrisi, S. Denaro, J. Ragonese [et al.] // *Front Cell Neurosci.* – 2025. – Vol. 19. – P. 1736865. – DOI: 10.3389/fncel.2025.1736865.

187. Neural stem cells in adult neurogenesis and their therapeutic applications in neurodegenerative disorders: a concise review / T. Bayleyegn Derso, B. A. Mengistu, Y. Demessie [et al.] // *Front Mol Med.* – 2025. – Vol. 5. – P. 1569717. – DOI: 10.3389/fmmed.2025.1569717.

188. Neurogenesis After Stroke: A Therapeutic Perspective / A. A. Rahman, N. Amruta, E. Pinteaux, G. J. Bix // *Transl Stroke Res.* – 2021. – Vol. 12. – № 1. – P. 1–14. – DOI: 10.1007/s12975-020-00841-w.

189. Neuroinflammation in Acute Ischemic and Hemorrhagic Stroke / D. L. Alsbrook, M. Di Napoli, K. Bhat [et al.] // *Curr Neurol Neurosci Rep.* – 2023. – Vol. 23. – № 8. – P. 407–431. – DOI: 10.1007/s11910-023-01282-2.

190. Neuroinflammation in neurodegenerative diseases: Focusing on the mediation of T lymphocytes / K. Li, R. Chen, R. Wang [et al.] // *Neural Regen Res.* – 2026. – Vol. 21. – № 5. – P. 1864–1889. – DOI: 10.4103/NRR.NRR-D-24-01539.

191. Neuroinflammation strokes the brain: A double-edged sword in ischemic stroke / G. Lombardozi, V. Castelli, C. Giorgi [et al.] // *Neural Regen Res.* – 2026. – Vol. 21. – № 5. – P. 1715–1722. – DOI: 10.4103/NRR.NRR-D-24-01456.

192. Neuronal Death Mechanisms and Therapeutic Strategy in Ischemic Stroke / R. Mao, N. Zong, Y. Hu [et al.] // *Neurosci Bull.* – 2022. – Vol. 38. – № 10. – P. 1229–1247. – DOI: 10.1007/s12264-022-00859-0.
193. Neuroprotection of IGF-1 in neonatal hypoxic-ischemic brain injury through downregulation of FoXO3a-PUMA pathway / Y. Tang, R. Zhong, J. Liang [et al.] // *Front Cell Neurosci.* – 2025. – Vol. 19. – P. 1685800. – DOI: 10.3389/fncel.2025.1685800.
194. Neurotrophins and neural stem cells in posttraumatic brain injury repair / W. Guo, K. Liu, Y. Wang [et al.] // *Animal Model Exp Med.* – 2024. – Vol. 7. – № 1. – P. 12–23. – DOI: 10.1002/ame2.12363.
195. Neurovascular unit, neuroinflammation and neurodegeneration markers in brain disorders / D. Kempuraj, K. D. Dourvetakis, J. Cohen [et al.] // *Front Cell Neurosci.* – 2024. – Vol. 18. – P. 1491952. – DOI: 10.3389/fncel.2024.1491952.
196. New approaches to recovery after stroke / D. S. Marín-Medina, P. A. Arenas-Vargas, J. C. Arias-Botero [et al.] // *Neurol Sci.* – 2024. – Vol. 45. – № 1. – P. 55–63. – DOI: 10.1007/s10072-023-07012-3.
197. New Drug Targets to Prevent Death Due to Stroke: A Review Based on Results of Protein-Protein Interaction Network, Enrichment, and Annotation Analyses / M. Maes, N. G. Nikiforov, K. Plaimas [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol. 22. – № 22. – P. 12108. – DOI: 10.3390/ijms222212108.
198. New insights into Sirt1: potential therapeutic targets for the treatment of cerebral ischemic stroke / H. Tang, J. Wen, T. Qin [et al.] // *Front Cell Neurosci.* – 2023. – Vol. 17. – P. 1228761. – DOI: 10.3389/fncel.2023.1228761.
199. New perspectives on heterogeneity in astrocyte reactivity in neuroinflammation / D. E. Santos, S. A. Silva Lima, L. S. Moreira [et al.] // *Brain Behav Immun Health.* – 2025. – Vol. 44. – P. 100948. – DOI: 10.1016/j.bbih.2025.100948.
200. NF- κ B in biology and targeted therapy: new insights and translational implications / Q. Guo, Y. Jin, X. Chen [et al.] // *Signal Transduct Target Ther.* – 2024. – Vol. 9. – № 1. – P. 53. – DOI: 10.1038/s41392-024-01757-9.

201. NF- κ B in neurodegenerative diseases: Recent evidence from human genetics / B. Kaltschmidt, L. P. Helweg, J. F. W. Greiner, C. Kaltschmidt // *Front Mol Neurosci.* – 2022. – Vol. 15. – P. 954541. – DOI: 10.3389/fnmol.2022.954541.
202. NF- κ B Pathway and Its Inhibitors: A Promising Frontier in the Management of Alzheimer's Disease / B. S. Sivamaruthi, N. Raghani, M. Chorawala [et al.] // *Biomedicines.* – 2023. – Vol. 11. – № 9. – P. 2587. – DOI: 10.3390/biomedicines11092587.
203. Nguyen, J. N. Bystanders or not? Microglia and lymphocytes in aging and stroke / J. N. Nguyen, A. Chauhan // *Neural Regen Res.* – 2023. – Vol. 18. – № 7. – P. 1397–1403. – DOI: 10.4103/1673-5374.360345.
204. Nguyen, T. Q. T. Targeting immunosenescence and inflammaging: advancing longevity research / T. Q. T. Nguyen, K. A. Cho // *Exp Mol Med.* – 2025. – Vol. 57. – № 9. – P. 1881–1892. – DOI: 10.1038/s12276-025-01527-9.
205. Patabendige, A. The role of the blood-brain barrier during neurological disease and infection / A. Patabendige, D. Janigro // *Biochem Soc Trans.* – 2023. – Vol. 51. – № 2. – P. 613–626. – DOI: 10.1042/BST20220830.
206. Peña, C. J. Epigenetic regulation of brain development, plasticity, and response to early-life stress / C. J. Peña // *Neuropsychopharmacology.* – 2026. – Vol. 51. – № 1. – P. 5–15. – DOI: 10.1038/s41386-025-02179-z.
207. Peng, X. Q. Association Between Transforming Growth Factor- β 1 Polymorphisms and Ischemic Stroke Susceptibility: A Meta-Analysis / X. Q. Peng, F. Cheng, L. Zhou // *Clin Appl Thromb Hemost.* – 2023. – Vol. 29. – P. 10760296231166666. – DOI: 10.1177/10760296231166666.
208. Pharmacological modulation of stem cells signaling pathway for therapeutic applications / S. M. Alnasser, A. S. Alrobian, M. S. Alfayez [et al.] // *Stem Cell Res Ther.* – 2025. – Vol. 16. – № 1. – P. 327. – DOI: 10.1186/s13287-025-04438-8.
209. Phased blood-brain barrier disruption in ischaemic stroke: implications for therapy? / A. Blase, C. G. di Girasole, L. Benjamin, P. Turowski // *Fluids Barriers CNS.* – 2025. – Vol. 22. – № 1. – P. 90. – DOI: 10.1186/s12987-025-00701-5.

210. PI3K/AKT signaling and neuroprotection in ischemic stroke: molecular mechanisms and therapeutic perspectives / T. Liu, X. Li, X. Zhou [et al.] // *Neural Regen Res.* – 2025. – Vol. 20. – № 10. – P. 2758–2775. – DOI: 10.4103/NRR.NRR-D-24-00568.

211. PI3K/AKT signaling pathway: Molecular mechanisms and therapeutic potential in depression / N. Guo, X. Wang, M. Xu [et al.] // *Pharmacol Res.* – 2024. – Vol. 206. – P. 107300. – DOI: 10.1016/j.phrs.2024.107300.

212. PI3K/mTOR Signaling Pathway Dual Inhibition for the Management of Neuroinflammation: Novel Insights from In Vitro Models / A. Ardizzone, S. A. Scuderi, G. Casili [et al.] // *Biomolecules.* – 2025. – Vol. 15. – № 5. – P. 677. – DOI: 10.3390/biom15050677.

213. Positive Controls in Adults and Children Support That Very Few, If Any, New Neurons Are Born in the Adult Human Hippocampus / S. F. Sorrells, M. F. Paredes, Z. Zhang [et al.] // *J Neurosci.* – 2021. – Vol. 41. – № 12. – P. 2554–2565. – DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0676-20.2020.

214. Postnatal Neuronal Nogo-A Knockdown Decreased the Message of Glutamatergic Synaptic Proteins / A. M. Case, J. D. Lautz, S. T. Ton [et al.] // *J Physiol Investig.* – 2024. – Vol. 67. – № 5. – P. 249–257. – DOI: 10.4103/ejpi.EJPI-D-24-00063.

215. Potential crosstalk between sonic hedgehog-WNT signaling and neurovascular molecules: Implications for blood-brain barrier integrity in autism spectrum disorder / E. Gozal, R. Jagadapillai, J. Cai, G. N. Barnes // *J Neurochem.* – 2021. – Vol. 159. – № 1. – P. 15–28. – DOI: 10.1111/jnc.15460.

216. Psychological Stress as a Risk Factor for Accelerated Cellular Aging and Cognitive Decline: The Involvement of Microglia-Neuron Crosstalk / M. Carrier, E. Šimončičová, M. K. St-Pierre [et al.] // *Front Mol Neurosci.* – 2021. – Vol. 14. – P. 749737. – DOI: 10.3389/fnmol.2021.749737.

217. Qin, X. The roles of STAT1, CASP8, and MYD88 in the care of ischemic stroke / X. Qin, S. Li, X. Huang // *Medicine (Baltimore).* – 2025. – Vol. 104. – № 4. – P. e41396. – DOI: 10.1097/MD.00000000000041396.

218. Quercetin improves cerebral ischemia/reperfusion injury by promoting microglia/macrophages M2 polarization via regulating PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway / L. Li, W. Jiang, B. Yu [et al.] // *Biomed Pharmacother.* – 2023. – Vol. 168. – P. 115653. – DOI: 10.1016/j.biopha.2023.115653.

219. Reduction of neuronal activity mediated by blood-vessel regression in the adult brain / X. Gao, X. J. Chen, M. Ye [et al.] // *Nat Commun.* – 2025. – Vol. 16. – № 1. – P. 5840. – DOI: 10.1038/s41467-025-60308-0.

220. Regulated necrosis pathways: a potential target for ischemic stroke / K. Ren, J. Pei, Y. Guo [et al.] // *Burns Trauma.* – 2023. – Vol. 11. – P. tkad016. – DOI: 10.1093/burnst/tkad016.

221. Regulation of Blood-Brain Barrier Transporters by Transforming Growth Factor- β /Activin Receptor-Like Kinase 1 Signaling: Relevance to the Brain Disposition of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors (i.e., Statins) / R. D. Betterton, W. Abdullahi, E. I. Williams [et al.] // *Drug Metab Dispos.* – 2022. – Vol. 50. – № 7. – P. 942–956. – DOI: 10.1124/dmd.121.000781.

222. Relationship Between Amyloid- β Deposition and Blood-Brain Barrier Dysfunction in Alzheimer's Disease / D. Wang, F. Chen, Z. Han [et al.] // *Front Cell Neurosci.* – 2021. – Vol. 15. – P. 695479. – DOI: 10.3389/fncel.2021.695479.

223. Ren, Q. LRP5 and LRP6 in Wnt Signaling: Similarity and Divergence / Q. Ren, J. Chen, Y. Liu // *Front Cell Dev Biol.* – 2021. – Vol. 9. – P. 670960. – DOI: 10.3389/fcell.2021.670960.

224. Repair-associated macrophages increase after early-phase microglia attenuation to promote ischemic stroke recovery / X. Zhang, H. Li, Y. Gu [et al.] // *Nat Commun.* – 2025. – Vol. 16. – № 1. – P. 3089. – DOI: 10.1038/s41467-025-58254-y.

225. Research developments in the neurovascular unit and the blood-brain barrier (Review) / Y. Gong, M. Wu, Y. Huang [et al.] // *Biomed Rep.* – 2025. – Vol. 22. – № 5. – P. 88. – DOI: 10.3892/br.2025.1966.

226. Research progress of neurovascular units involved in ischemic stroke / Y. Yang, H. Tong, Z. F. Ye [et al.] // *Ibrain*. – 2024. – Vol. 11. – № 4. – P. 492–503. – DOI: 10.1002/ibra.12166.

227. Revealing the contribution of astrocytes to glutamatergic neuronal transmission / A. O. Cuellar-Santoyo, V. M. Ruiz-Rodríguez, T. B. Mares-Barbosa [et al.] // *Front Cell Neurosci*. – 2023. – Vol. 16. – P. 1037641. – DOI: 10.3389/fncel.2023.1037641.

228. Roedel, M. Pericytes: The forgotten controllers of a functional blood-brain barrier / M. Roedel, N. Brooks, T. J. Lamb // *PLoS Pathog*. – 2025. – Vol. 21. – № 5. – P. e1013145. – DOI: 10.1371/journal.ppat.1013145.

229. Role of transforming growth factor β in neurovascular unit during cerebral small vessel disease / Y. Li, Y. Cai, K. Xie [et al.] // *Fluids Barriers CNS*. – 2025. – Vol. 22. – № 1. – P. 107. – DOI: 10.1186/s12987-025-00713-1.

230. Role of vascular endothelial growth factor as a critical neurotrophic factor for the survival and physiology of motoneurons / P. M. Calvo, R. G. Hernández, R. R. de la Cruz, A. M. Pastor // *Neural Regen Res*. – 2023. – Vol. 18. – № 8. – P. 1691–1696. – DOI: 10.4103/1673-5374.363194.

231. Santisteban, M. M. The pathobiology of neurovascular aging / M. M. Santisteban, C. Iadecola // *Neuron*. – 2025. – Vol. 113. – № 1. – P. 49–70. – DOI: 10.1016/j.neuron.2024.12.014.

232. Shaping the brain vasculature in development and disease in the single-cell era / T. Wälchli, J. Bisschop, P. Carmeliet [et al.] // *Nat Rev Neurosci*. – 2023. – Vol. 24. – № 5. – P. 271–298. – DOI: 10.1038/s41583-023-00684-y.

233. Shetty, R. M. Advancing the Management of Nontraumatic Brain Injuries with Hypertonic Saline and Mannitol / R. M. Shetty // *Indian J Crit Care Med*. – 2024. – Vol. 28. – № 7. – P. 634–636. – DOI: 10.5005/jp-journals-10071-24756.

234. Shi, P. The Recent Research Progress of NF- κ B Signaling on the Proliferation, Migration, Invasion, Immune Escape and Drug Resistance of Glioblastoma

/ P. Shi, J. Xu, H. Cui // *Int J Mol Sci.* – 2023. – Vol. 24. – № 12. – P. 10337. – DOI: 10.3390/ijms241210337.

235. Signaling Role of Pericytes in Vascular Health and Tissue Homeostasis / A. Fazio, I. Neri, F. D. Koufi [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2024. – Vol. 25. – № 12. – P. 6592. – DOI: 10.3390/ijms25126592.

236. Singh, A. A. Phytochemicals Targeting BDNF Signaling for Treating Neurological Disorders / A. A. Singh, S. Katiyar, M. Song // *Brain Sci.* – 2025. – Vol. 15. – № 3. – P. 252. – DOI: 10.3390/brainsci15030252.

237. Soluble factors influencing the neural stem cell niche in brain physiology, inflammation, and aging / C. M. Willis, A. M. Nicaise, G. Krzak [et al.] // *Exp Neurol.* – 2022. – Vol. 355. – P. 114124. – DOI: 10.1016/j.expneurol.2022.114124.

238. Sommer, C. J. Principles and requirements for stroke recovery science / C. J. Sommer, W. R. Schäbitz // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2021. – Vol. 41. – № 3. – P. 471–485. – DOI: 10.1177/0271678X20970048.

239. Sorrells, S. F. Which neurodevelopmental processes continue in humans after birth? / S. F. Sorrells // *Front Neurosci.* – 2024. – Vol. 18. – P. 1434508. – DOI: 10.3389/fnins.2024.1434508.

240. Soteros, B. M. Complement and microglia dependent synapse elimination in brain development / B. M. Soteros, G. M. Sia // *WIREs Mech Dis.* – 2022. – Vol. 14. – № 3. – P. e1545. – DOI: 10.1002/wsbm.1545.

241. Stackhouse, T. L. Neurovascular Coupling in Development and Disease: Focus on Astrocytes / T. L. Stackhouse, A. Mishra // *Front Cell Dev Biol.* – 2021. – Vol. 9. – P. 702832. – DOI: 10.3389/fcell.2021.702832.

242. Statsenko, Y. Hallmarks of Brain Plasticity / Y. Statsenko, N. V. Kuznetsov, M. Ljubisaljevich // *Biomedicines.* – 2025. – Vol. 13. – № 2. – P. 460. – DOI: 10.3390/biomedicines13020460.

243. Stepien, B. K. From Vessels to Neurons – The Role of Hypoxia Pathway Proteins in Embryonic Neurogenesis / B. K. Stepien, B. Wielockx // *Cells.* – 2024. – Vol. 13. – № 7. – P. 621. – DOI: 10.3390/cells13070621.

244. Tanaka, M. Neurogenesis and Neuroinflammation in Dialogue: Mapping Gaps, Modulating Microglia, Rewiring Aging / M. Tanaka // *Cells*. – 2026. – Vol. 15. – № 1. – P. 78. – DOI: 10.3390/cells15010078.

245. Targeting Neutrophil Extracellular Traps: A New Strategy for the Treatment of Acute Ischemic Stroke Based on Thrombolysis Resistance / G. Huang, H. Wu, B. Lin [et al.] // *Semin Thromb Hemost*. – 2026. – Vol. 52. – № 1. – P. 80–91. – DOI: 10.1055/a-2609-3457.

246. Tataranu, L. G. Neuroplasticity and Nervous System Recovery: Cellular Mechanisms, Therapeutic Advances, and Future Prospects / L. G. Tataranu, R. E. Rizea // *Brain Sci*. – 2025. – Vol. 15. – № 4. – P. 400. – DOI: 10.3390/brainsci15040400.

247. T Cell Response in Ischemic Stroke: From Mechanisms to Translational Insights / D. Zhang, J. Ren, Y. Luo [et al.] // *Front Immunol*. – 2021. – Vol. 12. – P. 707972. – DOI: 10.3389/fimmu.2021.707972.

248. TGF- β and SHH Regulate Pluripotent Stem Cell Differentiation into Brain Microvascular Endothelial Cells in Generating an In Vitro Blood-Brain Barrier Model / N. G. Lee, M. H. Lim, J. Park [et al.] // *Bioengineering (Basel)*. – 2023. – Vol. 10. – № 10. – P. 1132. – DOI: 10.3390/bioengineering10101132.

249. TGF-beta signal transduction: biology, function and therapy for diseases / Y. Tie, F. Tang, D. Peng, Y. Zhang, H. Shi // *Mol Biomed*. – 2022. – Vol. 3. – № 1. – P. 45. – DOI: 10.1186/s43556-022-00109-9.

250. TGF- β Signaling in Microglia: A Key Regulator of Development, Homeostasis and Reactivity / L. Li, B. Sun, O. A. Harris, J. Luo // *Biomedicines*. – 2024. – Vol. 12. – № 11. – P. 2468. – DOI: 10.3390/biomedicines12112468.

251. The age-associated decline in neuroplasticity and its implications for post-stroke recovery in animal models of cerebral ischemia: The therapeutic role of extracellular vesicles / A. Popa-Wagner, D. M. Hermann, T. R. Doeppner [et al.] // *J Cereb Blood Flow Metab*. – 2025. – P. 271678X251365020. – DOI: 10.1177/0271678X251365020.

252. The angiotensin II receptors type 1 and 2 modulate astrocytes and their crosstalk with microglia and neurons in an in vitro model of ischemic stroke / D. N. Olschewski, N. Nazarzadeh, F. Lange [et al.] // *BMC Neurosci.* – 2024. – Vol. 25. – № 1. – P. 29. – DOI: 10.1186/s12868-024-00876-x.

253. The astrocyte-produced growth factor HB-EGF limits autoimmune CNS pathology / M. Linnerbauer, L. Lößlein, O. Vandrey [et al.] // *Nat Immunol.* – 2024. – Vol. 25. – № 3. – P. 432–447. – DOI: 10.1038/s41590-024-01756-6.

254. The Basic Requirement of Tight Junction Proteins in Blood-Brain Barrier Function and Their Role in Pathologies / S. Dithmer, I. E. Blasig, P. A. Fraser [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2024. – Vol. 25. – № 11. – P. 5601. – DOI: 10.3390/ijms25115601.

255. The Biological Changes of Synaptic Plasticity in the Pathological Process of Sepsis-associated Encephalopathy / L. Yang, J. Li, F. Liu [et al.] // *Curr Neuropharmacol.* – 2025. – Vol. 23. – № 4. – P. 359–374. – DOI: 10.2174/1570159X23666241028105746.

256. The Cells of the Vasculature: Advances in the Regulation of Vascular Tone in the Brain and Periphery / L. S. Dunaway, W. A. Mills 3rd, U. B. Eyo, B. E. Isakson // *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* – 2025. – Vol. 136. – № 5. – P. e70023. – DOI: 10.1111/bcpt.70023.

257. The Cross-Talks Among Bone Morphogenetic Protein (BMP) Signaling and Other Prominent Pathways Involved in Neural Differentiation / A. Manzari-Tavakoli, A. Babajani, M. H. Farjoo [et al.] // *Front Mol Neurosci.* – 2022. – Vol. 15. – P. 827275. – DOI: 10.3389/fnmol.2022.827275.

258. The emerging role of lymphocytes in post-stroke inflammation: A treatable target and review of current pharmacological evidence in humans / A. Papageorgiou, D. Chatzistefanidis, M. Nikolakea [et al.] // *Brain Behav Immun Health.* – 2026. – Vol. 52. – P. 101172. – DOI: 10.1016/j.bbih.2026.101172.

259. The evolving roles of Wnt signaling in stem cell proliferation and differentiation, the development of human diseases, and therapeutic opportunities / M. Yu, K. Qin, J. Fan [et al.] // *Genes Dis.* – 2023. – Vol. 11. – № 3. – P. 101026. – DOI: 10.1016/j.gendis.2023.04.042.

260. The Influence of Changes in Microglia Development on the Plasticity of the Developing Visual Cortex Circuit in Juvenile Mice / X. Wang, K. Li, L. Guo [et al.] // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2025. – Vol. 66. – № 4. – P. 45. – DOI: 10.1167/iovs.66.4.45.

261. The interplay of neurovasculature and adult hippocampal neurogenesis / T. A. Kim, L. Chen, S. Ge // *Neurosci Lett.* – 2021. – Vol. 760. – P. 136071. – DOI: 10.1016/j.neulet.2021.136071.

262. The Molecular Basis of Wnt/ β -Catenin Signaling Pathways in Neurodegenerative Diseases / A. A. Anand, M. Khan, M. V, D. Kar // *Int J Cell Biol.* – 2023. – 2023. – P. 9296092. – DOI: 10.1155/2023/9296092.

263. The Potential Role of Hypoxia-Inducible Factor-1 in the Progression and Therapy of Central Nervous System Diseases / H. Chen, D. Ma, F. Yue [et al.] // *Curr Neuropharmacol.* – 2022. – Vol. 20. – № 9. – P. 1651–1666. – DOI: 10.2174/1570159X19666210729123137.

264. The process of angiogenesis in neurodegeneration-pathomechanisms and new therapeutic interventions / P. Kieliszek-Ryba, A. Jakimiuk, J. Kurek [et al.] // *Psychopharmacology (Berl).* – 2026. – Vol. 243. – № 1. – P. 1–18. – DOI: 10.1007/s00213-025-06874-z.

265. The role and therapeutic potential of nuclear factor κ B (NF- κ B) in ischemic stroke / Xu G., Dong F., Su L. [et al.] // *Biomed Pharmacother.* – 2024. – Vol. 171. – P. 116140. – DOI: 10.1016/j.biopha.2024.116140.

266. The role of astrocytes in ischemic stroke - mechanisms, functions and treatment / Y. Wang, D. Wang, D. Li, Y. Ma // *Front Cell Dev Biol.* – 2025. – Vol. 13. – P. 1700564. – DOI: 10.3389/fcell.2025.1700564.

267. The Role of Astrocytes in Poststroke Rehabilitation / Y. Han, L. Huang, J. Wu [et al.] // *Brain Behav.* – 2025. – Vol. 15. – № 6. – P. e70551. – DOI: 10.1002/brb3.70551.

268. The role of endothelial cell-pericyte interactions in vascularization and diseases / G. Li, J. Gao, P. Ding, Y. Gao // *J Adv Res.* – 2025. – Vol. 67. – P. 269–288. – DOI: 10.1016/j.jare.2024.01.016.

269. The role of Foxo3a in neuron-mediated cognitive impairment / Q. Q. Liu, G. H. Wu, X. C. Wang [et al.] // *Front Mol Neurosci.* – 2024. – Vol. 17. – P. 1424561. – DOI: 10.3389/fnmol.2024.1424561.

270. The role of JAK/STAT signaling pathway in cerebral ischemia-reperfusion injury and the therapeutic effect of traditional Chinese medicine: A narrative review / T. Song, Y. Zhang, L. Zhu, Y. Zhang, J. Song // *Medicine (Baltimore).* – 2023. – Vol. 102. – № 46. – P. e35890. – DOI: 10.1097/MD.00000000000035890.

271. The role of MMPs in intracerebral hemorrhage / X. Guan, M. Li, H. Li [et al.] // *Front Cell Dev Biol.* – 2025. – Vol. 13. – P. 1667228. – DOI: 10.3389/fcell.2025.1667228.

272. The role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases: current understanding and future therapeutic targets / A. Adamu, S. Li, F. Gao, G. Xue // *Front Aging Neurosci.* – 2024. – Vol. 16. – P. 1347987. – DOI: 10.3389/fnagi.2024.1347987.

273. The role of neutrophils in tPA thrombolysis after stroke: a malicious troublemaker / Q. Li, J. Ye, Z. Li [et al.] // *Front Immunol.* – 2024. – Vol. 15. – P. 1477669. – DOI: 10.3389/fimmu.2024.1477669.

274. The Role of NF- κ B Triggered Inflammation in Cerebral Ischemia / T. Jover-Mengual, J. Y. Hwang, H. R. Byun [et al.] // *Front Cell Neurosci.* – 2021. – Vol. 15. – P. 633610. – DOI: 10.3389/fncel.2021.633610.

275. The Role of NLRP3 Inflammasome in Cerebrovascular Diseases Pathology and Possible Therapeutic Targets / R. Bai, Y. Lang, J. Shao [et al.] // *ASN Neuro.* – 2021. – Vol. 13. – P. 17590914211018100. – DOI: 10.1177/17590914211018100.

276. The Role of Smad2 in Adult Neuroplasticity as Seen through Hippocampal-Dependent Spatial Learning/Memory and Neurogenesis / S. Gradari, A. Herrera, P. Tezanos [et al.] // *J Neurosci.* – 2021. – Vol. 41. – № 32. – P. 6836–6849. – DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2619-20.2021.

277. The role of SLC transporters for brain health and disease / Y. T. K. Nguyen, H. T. T. Ha, T. H. Nguyen, L. N. Nguyen // *Cell Mol Life Sci.* – 2021. – Vol. 79. – № 1. – P. 20. – DOI: 10.1007/s00018-021-04074-4.

278. The Role of the Wnt Pathway in VEGF/Anti-VEGF-Dependent Control of the Endothelial Cell Barrier / Y. Li, B. Baccouche, O. Olayinka [et al.] // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2021. – Vol. 62. – № 12. – P. 17. – DOI: 10.1167/iovs.62.12.17.

279. Thompson, R. A. Early Brain Development and Public Health / R. A. Thompson // *Dela J Public Health.* – 2024. – Vol. 10. – № 4. – P. 6–11. – DOI: 10.32481/djph.2024.10.03.

280. Thrombospondin-1 in vascular development, vascular function, and vascular disease / B. Liu, H. Yang, Y. S. Song [et al.] // *Semin Cell Dev Biol.* – 2024. – Vol. 155. – Pt B. – P. 32–44. – DOI: 10.1016/j.semcd.2023.07.011.

281. Toledano-Díaz, A. The relationships between neuroglial alterations and neuronal changes in Alzheimer's disease, and the related controversies I: Gliopathogenesis and glioprotection / A. Toledano-Díaz, M. I. Álvarez, A. Toledano // *J Cent Nerv Syst Dis.* – 2022. – Vol. 14. – P. 11795735221128703. – DOI: 10.1177/11795735221128703.

282. Transforming growth factor- β promotes basement membrane fibrosis, alters perivascular cerebrospinal fluid distribution, and worsens neurological recovery in the aged brain after stroke / M. D. Howe, J. W. Furr, Y. Munshi [et al.] // *Geroscience.* – 2019. – Vol. 41. – № 5. – P. 543–559. – DOI: 10.1007/s11357-019-00118-7.

283. Transient neurogenesis in ischemic cortex from Sox2⁺ astrocytes / J. L. Yang, H. Fan, F. F. Fu [et al.] // *Neural Regen Res.* – 2023. – Vol. 18. – № 7. – P. 1521–1526. – DOI: 10.4103/1673-5374.357910.

284. Umbilical mesenchymal stem cells mitigate T-cell compartments shift and Th17/Treg imbalance in acute ischemic stroke via mitochondrial transfer / S. Chen, C. Han, Z. Shi [et al.] // *Stem Cell Res Ther.* – 2025. – Vol. 16. – № 1. – P. 134. – DOI: 10.1186/s13287-025-04224-6.

285. Vaid, S. Progenitor-Based Cell Biological Aspects of Neocortex Development and Evolution / S. Vaid, W. B. Huttner // *Front Cell Dev Biol.* – 2022. – Vol. 10. – P. 892922. – DOI: 10.3389/fcell.2022.892922.

286. Vanacore, G. Age-dependent regenerative mechanisms in the brain / G. Vanacore, J. B. Christensen, N. S. Bayin // *Biochem Soc Trans.* – 2024. – Vol. 52. – № 6. – P. 2243–2252. – DOI: 10.1042/BST20230547.

287. Vascular Endothelial Growth Factor Augments the Tolerance Towards Cerebral Stroke by Enhancing Neurovascular Repair Mechanism / A. Ghori, V. Prinz, M. Nieminen-Kehlä [et al.] // *Transl Stroke Res.* – 2022. – Vol. 13. – № 5. – P. 774–791. – DOI: 10.1007/s12975-022-00991-z.

288. Vascular endothelial growth factor signaling in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic perspectives / C. Lee, M. J. Kim, A. Kumar [et al.] // *Signal Transduct Target Ther.* – 2025. – Vol. 10. – № 1. – P. 170. – DOI: 10.1038/s41392-025-02249-0.

289. Vascular Regulation of Developmental Neurogenesis / J. Vogenstahl, M. Parrilla, A. Acker-Palmer, M. Segarra // *Front Cell Dev Biol.* – 2022. – Vol. 10. – P. 890852. – DOI: 10.3389/fcell.2022.890852.

290. VEGF-E Attenuates Injury After Ischemic Stroke by Promoting Reparative Revascularization / R. Menet, L. Nasrallah, M. Bernard [et al.] // *Eur J Neurosci.* – 2025. – Vol. 61. – № 8. – P. e70114. – DOI: 10.1111/ejn.70114.

291. Wang, X. Endothelial dysfunction: molecular mechanisms and clinical implications / X. Wang, B. He // *MedComm.* – 2024. – Vol. 5. – № 8. – P. e651. – DOI: 10.1002/mco2.651.

292. Wang, Y. Microglia-mediated neuroinflammation and neuroplasticity after stroke / Y. Wang, R. K. Leak, G. Cao // *Front Cell Neurosci.* – 2022. – Vol. 16. – P. 980722. – DOI: 10.3389/fncel.2022.980722.

293. Wang, Y. Unraveling Neurodevelopment: Synergistic Effects of Intrinsic Genetic Programs and Extrinsic Environmental Cues / Y. Wang, S. Zhang, H. Jia, F. Ji,

J. Jiao // *Adv Sci (Weinh)*. – 2025. – Vol. 12. – № 22. – P. e2414890. – DOI: 10.1002/advs.202414890.

294. Weber, R. Z. How neural stem cell therapy promotes brain repair after stroke / R. Z. Weber, R. Rust, C. Tackenberg // *Stem Cell Reports*. – 2025. – Vol. 20. – № 6. – P. 102507. – DOI: 10.1016/j.stemcr.2025.102507.

295. Wevers, N. R. Microfluidic models of the neurovascular unit: a translational view / N. R. Wevers, H. E. De Vries // *Fluids Barriers CNS*. – 2023. – Vol. 20. – № 1. – P. 86. – DOI: 10.1186/s12987-023-00490-9.

296. Wnt signaling pathways in biology and disease: mechanisms and therapeutic advances / C. Xue, Q. Chu, Q. Shi [et al.] // *Signal Transduct Target Ther*. – 2025. – Vol. 10. – № 1. – P. 106. – DOI: 10.1038/s41392-025-02142-w.

297. Wolosowicz, M. Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) as a Therapeutic Target: Insights into Molecular Pathways and Clinical Applications / M. Wolosowicz, S. Prokopiuk, T. W. Kaminski // *Pharmaceutics*. – 2025. – Vol. 17. – № 11. – P. 1425. – DOI: 10.3390/pharmaceutics17111425.

298. Wu, K. Editorial: Crosstalk within neurovascular unit: endothelial implications for the development and function of brain / K. Wu, S. Gong, X. P. Chu // *Front Cell Neurosci*. – 2024. – Vol. 18. – P. 1440772. – DOI: 10.3389/fncel.2024.1440772.

299. Xiao, H. Role of macrophages in neuroimmune regulation / H. Xiao, K. Yang // *Front Immunol*. – 2025. – Vol. 16. – P. 1573174. – DOI: 10.3389/fimmu.2025.1573174.

300. Xu, Z. Uncovering the dual roles of peripheral immune cells and their connections to brain cells in stroke and post-stroke stages through single-cell sequencing / Z. Xu, F. Yang, L. Zheng // *Front Neurosci*. – 2024. – Vol. 18. – P. 1443438. – DOI: 10.3389/fnins.2024.1443438.

301. Yang, C. The Role of Sonic Hedgehog Pathway in the Development of the Central Nervous System and Aging-Related Neurodegenerative Diseases / C. Yang, Y.

Qi, Z. Sun // *Front Mol Biosci.* – 2021. – Vol. 8. – P. 711710. – DOI: 10.3389/fmolb.2021.711710.

302. Yang, S. H. Four Decades of Ischemic Penumbra and Its Implication for Ischemic Stroke / S. H. Yang, R. Liu // *Transl Stroke Res.* – 2021. – Vol. 12. – № 6. – P. 937–945. – DOI: 10.1007/s12975-021-00916-2.

303. Zimatkin, C. M. Structural Organization of the Rat Hippocampal Formation / C. M. Zimatkin, T. V. Klimut, A. V. Zaerko // *Cell and Tissue Biology.* – 2024. – Vol. 18. – № 1. – P. 11–19. – DOI: 10.1134/S1990519X24010115.